

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da  
parboilização do arroz**

**Tatiane Lotufo Leite**

**Pelotas, 2010**

**TATIANE LOTUFO LEITE**

**Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da  
parboilização do arroz.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:  
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L533p

Leite, Tatiane Lotufo

Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz / Tatiane Lotufo Leite. – 73f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2010. – Orientador Fabio Pereira Leivas Leite.

1.Biotecnologia. 2.Biomassa anaerobia. 3.Biocombustível.  
4.UASB. I.Leite, Fabio Pereira Leivas. II.Título.

CDD: 662.8

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Orlando Pereira-Ramirez – UFPel

Prof. Dr. Paulo Roberto Koetz – UPF

Prof. Dr. Maurizio Silveira Quadro – UFPel

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela sua bondade e por ter permitido que este objetivo tenha se realizado. Agradeço a Deus mais ainda pelas pessoas tão importantes que ele colocou no meu caminho durante esta trajetória. Foi uma trajetória as vezes bem complicada, mas sempre abençoada.

Agradeço inicialmente a todos os meus familiares, principalmente ao meu pai, mãe e mano que me deram todo o apoio e carinho que necessitei para concluir este trabalho. Agradeço a minha amigona e segunda mãe, a minha Dinda.

Agradeço ao meu marido, Alexandre, que compartilhou comigo todos os momentos, sendo companheiro e principalmente presente, pois me apoiou e 'aturou' em momentos tão difíceis.

Durante esta jornada tive a oportunidade de fazer grandes amigos, amigos estes a quem devo a execução deste trabalho, que me apoiaram e principalmente me motivaram nos mais difíceis, aos meus grandes professores Orlando Pereira-Ramirez e Maurizio Silveira Quadro, que sou extremamente grata. Eles me motivaram a encontrar uma saída de emergência e a procurar o pessoal de São Paulo, em especial o Professor Marcelo Zaiat.

Nos momentos de aulas contei com uma turma super gente boa, que nas Biologias foram fundamentais como a Gisa e o Régis. Desabafei muitas vezes com o Diego, a Ane e o Fernando, sem falar nas longas conversas com a Alegani.

Não posso esquecer-me do pessoal do Laboratório da Agência da Lagoa Mirim - 'as gurias' - que me auxiliaram nas análises de monitoramento.

Um trabalho envolve muitas pessoas e no meu em especial contei com a ajuda importantíssima do pessoal da USP- São Carlos, da Escola de Engenharia, ao Prof. Marcelo Zaiat, as técnicas Janja e Elô, mas principalmente ao doutorando Guilherme Peixoto que me acompanhou em todos os experimentos e me auxiliou na interpretação dos resultados.

Agradeço a Zizi e ao Mister que me acolheram em Sorocaba e me deram todas as informações, me hospedando nos fins de semana longe de casa!

Não posso esquecer-me de agradecer, em especial, aos meus médicos Dr. Walter e Dra. Cristina que me ajudaram a superar as piores partes e me manter firme embora tivesse vontade de desistir.

Agradeço também a empresa Nelson Wendt que participou continuamente deste trabalho e ao técnico Sandro Neves, que sempre foi atencioso com minhas solicitações.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia, a CAPES e ao professor Odir Dellagostin que me encaminhou ao meu orientador.

Por fim, agradeço a orientação e atenção do Professor Fábio Pereira Leivas Leite.

## RESUMO

LEITE, Tatiane Lotufo. **Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A crescente demanda por energia e a tentativa de substituir a matriz energética baseada nos combustíveis fósseis faz com que existam várias pesquisas na busca de combustíveis alternativos. O gás hidrogênio, que possui potencial energético 2,5 vezes maior que qualquer hidrocarboneto, e que quando queimado libera somente água, sendo sua combustão livre de gases potencializadores do efeito estufa. Vários processos têm sido utilizados para a produção de biohidrogênio. Um desses processos é baseado na degradação anaeróbia de resíduos, principalmente os ricos em carboidratos. A parboilização é um processo hidrotérmico do arroz com casca, que tem por objetivo melhorar a qualidade nutritiva do produto. A parboilização do arroz gera cerca de 4L de efluente por quilo de arroz produzido. Esse efluente apresenta taxas elevadas de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo, apresentando também concentrações consideráveis de carboidratos. O potencial de produção de hidrogênio do efluente da parboilização do arroz foi testado em reatores com lodo anaeróbio de UASB tratado termicamente e com lodo acidogênico produtor de hidrogênio. Também se estudou a necessidade de adição de nutrientes ao efluente de parboilizado para produção de hidrogênio. O pH do experimento foi mantido a 5,5 para evitar o crescimento de arqueas metanogênicas, consumidoras de hidrogênio. A temperatura do reator foi mantida a  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . O experimento foi montado em batelada de 48 horas, utilizando sacarose como substrato controle. O efluente da parboilização do arroz apresenta uma concentração média de DQO bruta de  $4988,6 \text{ mg.L}^{-1}$  e de carboidratos de  $1030,0 \text{ mg L}^{-1}$ . O lodo anaeróbio de UASB tratado termicamente produziu hidrogênio com taxa máxima de  $62,3 \text{ mL.g}^{-1}$  DQO removida, enquanto o lodo acidogênico produziu  $217,5 \text{ mL.g}^{-1}$  DQO removida. O reator acidogênico alimentado com efluente da parboilização apresentou remoção de 32,9% de DQO e de 77,8% de carboidratos. A produção máxima de hidrogênio do efluente foi de 9,61mL. A produção de gás hidrogênio por grama de SSV no reator acidogênico alimentado com sacarose foi superior ao reator alimentado com efluente da parboilização. Os reatores com três diferentes gradientes de adição de nutrientes foram testados, mostrando que a produção de hidrogênio não foi aumentada significativamente com o aumento da concentração da solução de nutrientes, indicando que o efluente da parboilização tem potencial de produção de hidrogênio por processos anaeróbicos, sem a necessidade de adição dos nutrientes testados.

**Palavras-chave:** Biomassa anaeróbia. Biocombustível. UASB.

## ABSTRACT

LEITE, Tatiane Lotufo. **Bio-hydrogen production from the effluent of parboiling rice.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The growing demand for energy and attempt to replace the energy matrix based on fossil fuels causes exist multiple searches in the search for alternative fuels. Hydrogen gas, which has potential energy 2.5 times larger than any hydrocarbon, and when burned releases only water, being their combustion free greenhouse gas potentializing. Several processes have been used for the production of biohydrogen. Of these processes is based on anaerobic degradation of waste, especially rich in carbohydrates. The parboiling is a process hydrothermal treatment of rice in the husk, which aims to improve the nutritional quality of the product. The rice parboiling generates approximately 4 L of effluent per kilogram of rice. This effluent presents a high content of organic substances and nutrients such as nitrogen and phosphorus, showing significant concentrations of carbohydrates also. The potential of hydrogen production from the effluent of parboiling rice was tested on reactors with anaerobic sludge of UASB heat-treated with sludge acidogenic hydrogen producer. Also studied the need for addition of nutrients to effluent parboiled for hydrogen production. The pH of the experiment was kept 5.5 to avoid growth of arquea metanogenic, that consume hydrogen. The temperature of the reactor was maintained at  $20 \pm 5$  °C. The experiment was mounted in batch of 48 hours, using sucrose as substrate control. The effluent from parboiled rice presents an average concentration of COD gross 4988.6 mg L<sup>-1</sup> and carbohydrate 1030.0 mg L<sup>-1</sup>. Of the UASB anaerobic sludge heat-treated produced hydrogen with maximum rate of 62, 3 mL. g<sup>-1</sup> COD removed, while the slime acidogenic produced 217.5 mL g<sup>-1</sup> COD removed. The acidogenic reactor fed with effluent from parboiling presented removing 32.9% COD and 77.8% carbohydrates. Maximum production of hydrogen from the effluent was 9, 61 mL. Hydrogen gas production per gram of SSV in acidogenic reactor fed with sucrose was superior to reactor fed with effluent from parboiling. Reactors with three different gradients of addition of nutrients have been tested, showing that the hydrogen production was not significantly increased with increasing concentration of nutrient solution, indicating that the effluent from parboiling has potential for hydrogen production by anaerobic processes without the need for addition of nutrients tested.

**Keywords:** anaerobic Biomass. Biofuel. UASB.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronologia do combustível utilizado pela humanidade .....	17
Figura 2 – Seqüência de processos da degradação anaeróbia .....	23
Figura 3 – Pontos de produção e consumo de hidrogênio na digestão anaeróbia..	25
Figura 4 – Diferentes rotas a partir da glicose.....	27
Figura 5 – Esquema simplificado para produção de Hidrogênio .....	28
Figura 6 - Reator Acidogênico.....	37
Figura 7 – Lodo acidogênico (a) e material suporte (b).....	37
Figura 8 – Reator para obtenção de hidrogênio.....	39
Figura 9 – Reatores com inóculo acidogênico (a) e inóculo anaeróbio tratado termicamente(b) no tempo zero de experimento.....	42
Figura 10 – Concentração de carboidratos. ....	43
Figura 11 – Concentração de DQO.....	44
Figura 12 – Remoção de DQO.....	44
Figura 13 – Volume de hidrogênio no headspace dos reatores acidogênico e anaeróbio tratado termicamente. ....	46
Figura 14 – Volume de gás carbônico no headspace dos reatores acidogênico e anaeróbio tratado termicamente. ....	47
Figura 15 – Microscopia ótica do reator UASB (a) e coloração de Gram (b). ....	49
Figura 16 – Coloração de Gram do lodo UASB produtor de hidrogênio (a) e do lodo acidogênico (b).....	49
Figura 17 – Concentração de carboidratos nos reatores acidogênicos com substratos sacarose e efluente em concentração $\text{mg.L}^{-1}$ (a) e em % de remoção de Carboidratos (b). ....	54
Figura 18 – Concentração de DQO nos reatores acidogênicos com substratos sacarose e efluente. ....	55
Figura 19 – Remoção de DQO.....	56



Figura 20 – Volume de hidrogênio no headspace dos reatores acidogênico.....	57
Figura 21 – Volume de hidrogênio e de gás carbônico no <i>headspace</i> dos reatores acidogênico.....	58
Figura 22 – Variação na concentração dos principais ácidos envolvidos na formação de hidrogênio para o reator sacarose(a) e as concentrações de ácido acético e butírico (b).....	59
Figura 23 – Variação na concentração dos principais ácidos envolvidos na formação de hidrogênio para o reator efluente(a) e as concentrações de ácido acético e butírico (b).....	60
Figura 24 – Concentração de carboidratos nos reatores acidogênicos com substratos efluente e diferentes adição de nutrientes. ....	63
Figura 25 – Concentração de DQO nos reatores acidogênicos com substratos efluente e diferentes adição de nutrientes.....	64
Figura 26 – Obtenção de hidrogênio dos reatores com diferentes adições de nutrientes. ....	65
Figura 27 – Obtenção de gás carbônico dos reatores com diferentes adições de nutrientes. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os diferentes processos de obtenção de bio-hidrogênio .....	20
Tabela 2 – Influencia da temperatura na produção de hidrogênio .....	29
Tabela 3 – Comparação da influencia do pH na produção de hidrogênio.....	30
Tabela 4 – Caracterização do efluente bruto utilizado no experimento, baseado no monitoramento no período de Jan 2008-Dez 2009. ....	36
Tabela 5 – Composição da solução de nutrientes .....	39
Tabela 6 – Produção específica de hidrogênio e dióxido de carbono .....	48
Tabela 7 – Concentrações de Ácidos Orgânicos Voláteis nos reatores com lodo acidogênico e anaeróbio tratado termicamente. ....	51
Tabela 8 – DQO removida no final das 48 horas em cada reator .....	64
Tabela 9 – Produção específica de hidrogênio dos reatores.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIAP – Associação Brasileira das Indústrias de Arroz Parboilizado  
ATP – Adenosina trifosfato  
AOV- Ácidos Orgânicos Voláteis  
BESA – Ácido-2-bromoetano-sulfônico em sal dissódico  
C/N – Relação Carbono/Nitrogênio  
CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico  
CO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, C<sub>x</sub>H<sub>x</sub> –Óxidos de carbono, enxofre, nitrogênio e hidrocarbonetos  
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
DDGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação  
DQO – Demanda Química de Oxigênio  
DQO:N:P – Relação entre DQO, Nitrogênio e Fósforo  
H<sub>2</sub> – Gás Hidrogênio  
H<sub>2</sub>S – Ácido Sulfídrico  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
LA – Inóculo de Lodo Acidogênico  
LAT – Inóculo de Lodo Anaeróbio tratado termicamente  
LPB-USP – Laboratório de Processos Biológicos da USP  
NADH – Nicotinamida Adenina Difosfato, forma reduzida  
NH<sub>3</sub> – Gás Amônia  
N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - Nitrogênio na forma amoniacal  
NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PIB – Produto Interno Bruto  
PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - íon fosfato  
RAS – Reator Acidogênico com substrato sacarose  
ERA- Reator Acidogênico com substrato efluente  
RN – Reator Acidogênico com substrato efluente e adição de nutriente  
RNA 16S – Porção 16 s do ácido ribonucléico  
RS – Rio Grande do Sul  
RSN – Reator Acidogênico com substrato efluente sem a adição de nutrientes  
R2N – Reator Acidogênico com substrato efluente com o dobro da adição de nutrientes.  
SP – São Paulo  
SST – Sólidos Suspensos Totais  
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis S  
V – Sólidos Voláteis  
TDH – Tempo de Detenção Hidráulico  
UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket – RALF - Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado  
USP – Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	11
SUMÁRIO .....	12
INTRODUÇÃO .....	15
REVISÃO DA LITERATURA .....	17
1 Matriz energética .....	17
2 Conseqüências da queima dos combustíveis fósseis.....	18
3 Uma nova perspectiva: o hidrogênio .....	18
4 Obtenção biológica do gás hidrogênio.....	20
5 Digestão anaeróbia visando obtenção do hidrogênio .....	21
6 Acidogênese .....	24
7 Rotas fermentativas .....	25
8 Fatores que influenciam a produção de hidrogênio .....	28
8.1 Influência da temperatura.....	29
8.2 Influência do pH .....	30

8.3	Influência do inóculo.....	31
8.4	Influência do substrato .....	33
METODOLOGIA GERAL .....		36
1	Substratos .....	36
2	Inóculos .....	37
3	Condições de temperatura e pH .....	38
4	Análises físico-químicas .....	38
5	Montagem dos reatores.....	38
6	Meio nutricional.....	39
1	Capítulo 1 – Avaliação da produção de bio-hidrogênio do inóculo acidogênico e do inóculo anaeróbio tratado termicamente. ....	40
1.1	Introdução .....	40
1.2	Metodologia Específica .....	40
1.2.1	Substrato.....	40
1.2.2	Inóculos.....	40
1.2.3	Condições de temperatura e pH .....	40
1.2.4	Análises físico-químicas e metodologias analíticas .....	41
1.2.5	Análise estatística dos resultados .....	41
1.2.6	Montagem dos reatores .....	42
1.3	Resultados e Discussão .....	42
1.3. 1	Remoção de Carboidratos e da DQO .....	42
1.3. 2	Produção de hidrogênio e de gás carbônico pelo lodo anaeróbio tratado termicamente .....	45
1.3. 3	Microbiologia dos reatores .....	48
1.3. 4	Perfil de ácidos durante a produção de hidrogênio .....	50
2	Capítulo 2 - Avaliação da produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz. ....	52
2.1	Introdução .....	52
2.2	Metodologia Específica .....	52
2.2.1	Substratos.....	52
2.2.2	Inóculo .....	52

2.2.3	Condições de temperatura e pH .....	53
2.2.4	Análises físico- químicas e metodologias analíticas .....	53
2.2.5	Análise estatística dos resultados .....	53
2.2.6	Montagem dos reatores .....	53
2.3	Resultados e Discussão .....	53
2.3.1	Remoção de Carboidratos de DQO .....	53
2.3.2	Produção de hidrogênio pelo efluente da parboilização do arroz.....	56
3	Capítulo 3 – Influência de nutrientes ao substrato da parboilização do arroz na produção de hidrogênio, em reator acidogênico. ....	61
3.1	Introdução .....	61
3.2	Metodologia Específica .....	61
3.2.1	Substrato.....	61
3.2.2	Inóculo .....	62
3.2.3	Condições de temperatura e pH .....	62
3.2.4	Análises físico-químicas e metodologias analíticas .....	62
3.2.5	Análise estatística dos resultados .....	62
3.2.6	Montagem dos reatores .....	62
3.3	Resultados e discussão.....	62
3.3.1	Remoção de Carboidratos e da DQO .....	63
3.3.2	Produção de hidrogênio e de gás carbônico .....	65
	CONCLUSÃO .....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE .....	74

## INTRODUÇÃO

A maior parte da energia gerada é dependente dos combustíveis fósseis, em consequência a poluição gerada pela queima destes combustíveis, com a formação de óxidos de carbono, nitrogênio, enxofre e outros poluentes orgânicos, é uma ameaça ambiental e o acúmulo destes gases na atmosfera, considerado o fator responsável pelas mudanças climáticas (WANG, 2008).

O gás hidrogênio tem sido amplamente reconhecido como a alternativa ideal para substituir os combustíveis fósseis (LIU et al., 2006). Ele é o combustível ideal para o futuro, pois possui benefícios sociais, econômicos e principalmente ambientais em seu favor (KOTAY, 2008).

O processo de obtenção de hidrogênio a partir de microalgas e bactérias é conhecido a cerca de 100 anos, embora os primeiros estudos tenham iniciado por volta de 1920 (HALLENBECK, 2002). A produção do gás hidrogênio pode ocorrer a partir de diferentes processos biológicos, entre eles a fermentação escura, que produz hidrogênio utilizando compostos orgânicos como substrato com utilização de bactérias anaeróbias (HUNG et al., 2008). Segundo Shida (2008) a digestão anaeróbia é uma tecnologia já bastante conhecida para o tratamento de águas residuárias, capaz de gerar fontes de energia alternativas como metano e hidrogênio. A produção biológica do hidrogênio pode ser afetada por diversos fatores, como: inóculo, substrato, pH, carga orgânica e tempo de detenção hidráulica. Esses fatores influem no crescimento microbiológico, nos tipos de micro-organismos e nos processos de fermentação (ZHU et al., 2008).

O processo fermentativo de obtenção de hidrogênio pode ser obtido por diferentes substratos, utilizando-se culturas mistas ou puras, como descrito por Hallembeck (2002). Fernandes et al. (2010) por exemplo, avaliou o potencial de

produção de hidrogênio de resíduos da vinhaça, esgoto sanitário e glicerol. Yang et al.(2006) utilizou o efluente do processamento de queijo, Zhu et al. (2008) utilizou o resíduo de alimentos, lodo primário e biomassa de lodos ativados e Gómez (2009) que utilizou resíduos orgânicos. Esses estudos tinham o objetivo analisar a utilização de resíduos como substrato para produção de hidrogênio.

Na metade Sul do Rio Grande do Sul se localizam a maioria das indústrias de beneficiamento de arroz (FARIA, 2006). Esse beneficiamento inclui tanto a produção do arroz branco como a de parboilizado sendo que o consumo de arroz parboilizado tem crescido nos últimos anos atingindo 23% do arroz consumido no Brasil (DORS, 2009).

O efluente da indústria de parboilização do arroz é rico em nutrientes como fósforo e nitrogênio assim como outros substratos utilizados para a obtenção do hidrogênio (FARIA, 2006).

Vários inóculos tem sido testados para a obtenção de bactérias acidogênicas para a produção de hidrogênio. Alguns autores utilizam o lodo de reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) tratado termicamente (aquecimento a 100 °C) para produção de hidrogênio.

Trabalhos como os de Fernandes et al. (2010), Fernandes (2008), Peixoto (2008) utilizam soluções de nutrientes como suplemento aos substratos para aumentar a taxa de produção de hidrogênio, pois a produção de hidrogênio não está ligada somente ao conteúdo de carboidratos de um resíduo, mas também a suas relações de DQO/N/P adequadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio do efluente da parboilização do arroz. Para isto foi estudada a produção de hidrogênio com inóculo acidogênico e inóculo a partir do lodo anaeróbio tratado termicamente. Também foi verificada a produção de hidrogênio relacionada à necessidade da adição de solução de nutrientes ao efluente de parboilização do arroz.



## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 Matriz energética

O homem tem evoluído essa evolução causou uma modificação na fonte de combustíveis utilizada. De acordo com a Figura 1, ao longo dos anos, o homem passou pelo uso da lenha, gordura animal, entre outros, chegando aos dias de hoje, onde a queima destes combustíveis alterou os ecossistemas e o equilíbrio do planeta. Situações como chuvas ácidas, efeito estufa, são consequência de anos de queima de combustíveis fósseis (KOTAY, 2008).



Figura 1 – Cronologia do combustível utilizado pela humanidade  
Fonte: Adaptado de Kotay (2008)

## **2 Conseqüências da queima dos combustíveis fósseis**

O consumo dos combustíveis fósseis sejam eles sólidos, líquidos ou gasosos causam contaminações tanto no solo, na água ou na atmosfera (VALDEZ-VAZQUEZ, 2008).

A oferta atual de energia provém da queima de combustíveis fósseis, tanto petróleo, gás natural e carvão, que resulta na liberação de óxidos de carbono, nitrogênio e enxofre, responsáveis pelo efeito estufa, diminuição da camada de ozônio e chuva ácida (LEITE, 2008). Os processos que vem ocorrendo com relação às mudanças climáticas estão associados à poluição ambiental e a liberação de gases de efeito estufa na atmosfera (FERNANDES, 2008). Esse fato está associado a excessiva queima de combustíveis fósseis e conseqüente emissão de gases que incluem os  $\text{CO}_x$ ,  $\text{SO}_x$ ,  $\text{NO}_x$  e  $\text{C}_x\text{H}_y$  (SREETHAWONG et al., 2010).

Uma alternativa para mudar o cenário de consumo de combustíveis fósseis seria mudar a matriz energética atual para uma matriz baseada na energia nuclear e energias renováveis como hidrelétrica, solar, eólica, geotérmica e bio-energia (FERNANDES, 2008; WANG, 2008). Dentro da bio-energia tem-se o bio-hidrogênio, com potencial energético liberado na queima de 2,75 vezes maior que os combustíveis a base de hidrocarboneto e produto final da combustão, a água (CHEN 2006; SREETHAWONG et al., 2010).

## **3 Uma nova perspectiva: o hidrogênio**

O hidrogênio é um gás de grande importância devido ao seu alto potencial energético ( $122\text{kJ.g}^{-1}$ ) e a produção de água como produto da sua combustão, indicando que o hidrogênio é o combustível ideal para substituir os combustíveis fósseis (PRAKASHAM, 2009; WANG, 2009). A produção energética do hidrogênio quando queimado na presença de oxigênio em automóveis é cerca de 50% mais eficiente que a gasolina (SHIDA, 2008).

Valdez-Vasquez (2008) salienta que dentre as alternativas para diminuição das queimas de combustíveis fósseis o uso do hidrogênio surge como fonte de energia limpa. Seu principal diferencial é que na sua estrutura não possui carbono, nitrogênio ou enxofre, com isso não causa poluição na sua queima.

O hidrogênio pode ser produzido por processos termoquímicos, eletroquímicos ou processos de fermentação microbiana (CHEN, 2006).

A obtenção de hidrogênio por processos biológicos (bio-hidrogênio) é catalisada por micro-organismos em condições determinadas de temperatura e pressão ambiente. O biohidrogênio é considerado a chave para o desenvolvimento sustentável podendo suprir com versatilidade combustíveis no futuro, além disso, ainda pode ser obtido de tecnologias existentes atualmente (KOTAY, 2008).

Uma das vantagens da forma biológica de obtenção do hidrogênio é que ela se baseia numa tecnologia de baixo custo, quando comparada as outras formas de obtenção deste gás, e requer pouca energia na sua produção (FERNANDES, 2008).

Segundo Xin et al.(2010), 88% de todo o hidrogênio comercial é derivado dos combustíveis fósseis (óleos pesados, carvão e gás natural), daí a importância de pesquisas que utilizem matérias primas de fontes renováveis ou reuso de resíduos, objetivando a produção deste gás via fermentativa ou por fotossíntese (PEIXOTO, 2008).

Diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos no intuito de obter o gás hidrogênio biologicamente. Até o ano de 2004, devido à escassez de fontes de energia, a maioria dos trabalhos eram desenvolvidos em países como Coreia, Japão e Taiwan. Os Estados Unidos da América e Europa pouco contribuíam para essa pesquisa. No Brasil, ainda não havia grupos interessados nesse assunto (FERNANDES, 2008).

A obtenção de resultados positivos para a produção biológica de hidrogênio fez com que surgissem outros pesquisadores e sistemas de produção de hidrogênio, que até hoje é pouco pesquisado e acontece ainda em escala piloto (AMORIM, 2009). Esses pesquisadores tem tentado abordar aspectos associados a maiores taxas de produção de hidrogênio, como temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), meio suporte, forma de inoculação, micro-organismos associados, rotas metabólicas, configuração dos reatores (FERNANDES, 2008).

O hidrogênio ainda pode ser utilizado como reagente na produção de compostos de baixo peso molecular e saturados, nos processos de 'cracking' de hidrocarbonetos, para remoção de compostos nitrogenados, sulfurados e traços de

oxigênio, prevenindo oxidação e corrosão e ainda como combustível para foguetes (SHIDA, 2008).

#### 4 Obtenção biológica do gás hidrogênio

Dentre os processos biológicos de produção de hidrogênio podemos destacar a biofotólise direta e indireta, a fotofermentação e a fermentação (VIJAYARAGHAVAN, 2006). Na tabela 1, podemos relacionar as vantagens e desvantagens de tais processos para obtenção de hidrogênio:

Tabela 1 – Comparação entre os diferentes processos de obtenção de bio-hidrogênio

Processo	Tipo de microrganismo	Vantagens	Desvantagens
Biofotólise direta	Algas verdes	Capaz de produzir $H_2$ diretamente da água na presença de luz solar	Requer alta intensidade de luz; $O_2$ pode causar danos ao sistema.
Biofotólise indireta	Cianobactérias	Pode produzir $H_2$ a partir da água, tem capacidade de fixar $N_2$ da atmosfera	Baixa eficiência fotoquímica; $O_2$ tem efeito inibitório sobre a nitrogenase.
Fotofermentação	Bactérias fotossintéticas	Utiliza diferentes substratos	Baixa eficiência de conversão $O_2$ é inibidor da hidrogenase
Fermentação (sem luz)	Bactérias fermentativas	Pode produzir $H_2$ independente da luz; Utiliza diferentes substratos; Produce metabolitos de valor agregado como os ácidos acético, propiônico e butírico	Baixo rendimento Produto misturado com $CO_2$

Fonte: Adaptado de Amorim 2009.

De acordo com Peixoto (2008), a produção de hidrogênio por via biológica pode ocorrer de duas formas: na presença ou ausência de luz.

Os grupos de bactérias fermentativas que são responsáveis pela produção de hidrogênio por via microbiológica são as cianobactérias, decompondo diretamente a água em hidrogênio e oxigênio na presença de energia luminosa ou

fotossíntese e as bactérias heterotróficas, usando substratos orgânicos para produção de hidrogênio, na presença ou ausência de luz, classificado o processo como foto fermentação ou fermentação escura (CHEN, 2006).

Fernandes (2008) e Peixoto (2008) comentam ainda que a fermentação escura é tecnicamente mais simples e apresenta alta velocidade de produção de hidrogênio, a hidrogenase não necessita de ATP e ainda pode-se obter o gás a partir de resíduos orgânicos. Segundo Wang (2009) a principal desvantagem da fotofermentação é a que a sua eficiência está diretamente ligada à presença de luz, dificultando o desenho dos reatores para produção de hidrogênio.

A fermentação escura é feita por bactérias fermentativas, como *Enterobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* (CHEN, 2006). A produção microbiológica com bactérias anaeróbias acidogênicas é a mais atrativa entre os processos de obtenção de hidrogênio (CHU, 2008; WANG et al., 2008 ).

A obtenção de hidrogênio por via biológica a partir de resíduos também pode ocorrer por meio de da utilização de processos combinados, obtendo-se potenciais teóricos em torno de 12mol H<sub>2</sub> para cada mol hexose (WANG et al., 2008).

## **5 Digestão anaeróbia visando obtenção do hidrogênio**

A digestão anaeróbia é uma das alternativas de tratamento biológico de resíduos líquidos mais utilizada no Brasil (CHERNICHARO,1997).

As condições climáticas, os baixos custos de implantação e operação, o baixo consumo de energia e a baixa geração de lodo biológico além da tolerância a altas cargas orgânicas são fatores que confirmam seu uso preferencial, tornando-a bastante conhecida e aplicada (SHIDA, 2008).

A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos produz tipicamente metano, mas na sua fase acidogênica, esta mesma digestão produz o hidrogênio (GAVIRIA, 2007). Segundo Peixoto (2008) a energia contida na ligação molecular do H<sub>2</sub> é maior do que a da maioria dos combustíveis gasosos conhecidos, é livre da emissão de carbono e como último produto da oxidação obtém água.

Os resíduos mais utilizados para produção de hidrogênio são aqueles ricos em carboidratos (resíduos orgânicos que, além de produzir tal gás, produzem

ácidos orgânicos que podem servir de substrato para produção de metano (CHU, 2008).

A etapa fermentativa da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é o processo essencial para a produção do gás hidrogênio, pois nessa etapa os micro-organismos decompõem a matéria orgânica, preferencialmente os carboidratos, em: hidrogênio, gás carbônico e ácidos orgânicos voláteis (AOV) de cadeias curtas (ARGUN et al., 2008).

Existem algumas barreiras à produção de hidrogênio, como por exemplo, os custos com a produção, armazenamento e utilização do gás hidrogênio como fonte de energia, mas de acordo com Kotay (2008), a produção biológica de hidrogênio assume importante papel e alternativa como fonte de energia renovável.

A principal desvantagem do processo fermentativo é um rendimento menor se comparado aos processos fotossintéticos e o hidrogênio obtido se encontrar misturado com o  $\text{CO}_2$ , necessitando de uma separação para sua utilização (PEIXOTO, 2008).

Para Das (2008) o grande objetivo dos estudos de produção de hidrogênio é não só melhorar o rendimento, por exemplo, mas sim avaliar abordagens diferentes, como a aplicação de bioreatores híbridos utilizando fermentação escura e processos fotofermentativos, bem como desenvolvimento de consórcios microbianos, modificações genéticas dos microrganismos, entre outros.

O processo de obtenção de hidrogênio por via fermentativa escura está intimamente ligado ao processo de digestão anaeróbia dos compostos orgânicos mais complexos, passando por aminoácidos, açúcares e ácidos graxos até chegar aos mais simples, que através da metanogênese reagem por metanogênese acetotrófica ou metanogênese hidrogenotrófica e produzem o gás metano numa mistura com gás carbônico (CHERNICHARO, 1997).

Para o mesmo autor, esta sequência de reações conhecida como digestão anaeróbia, nada mais é que um grande processo bioquímico baseado em quatro etapas principais: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese.

Em cada uma destas quatro fases existe um grupo de micro-organismos responsável pela degradação: inicialmente as bactérias acidogênicas, depois as acetogênicas, as arqueas metanogênicas acetoclásticas e por fim as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (SHIDA, 2008).

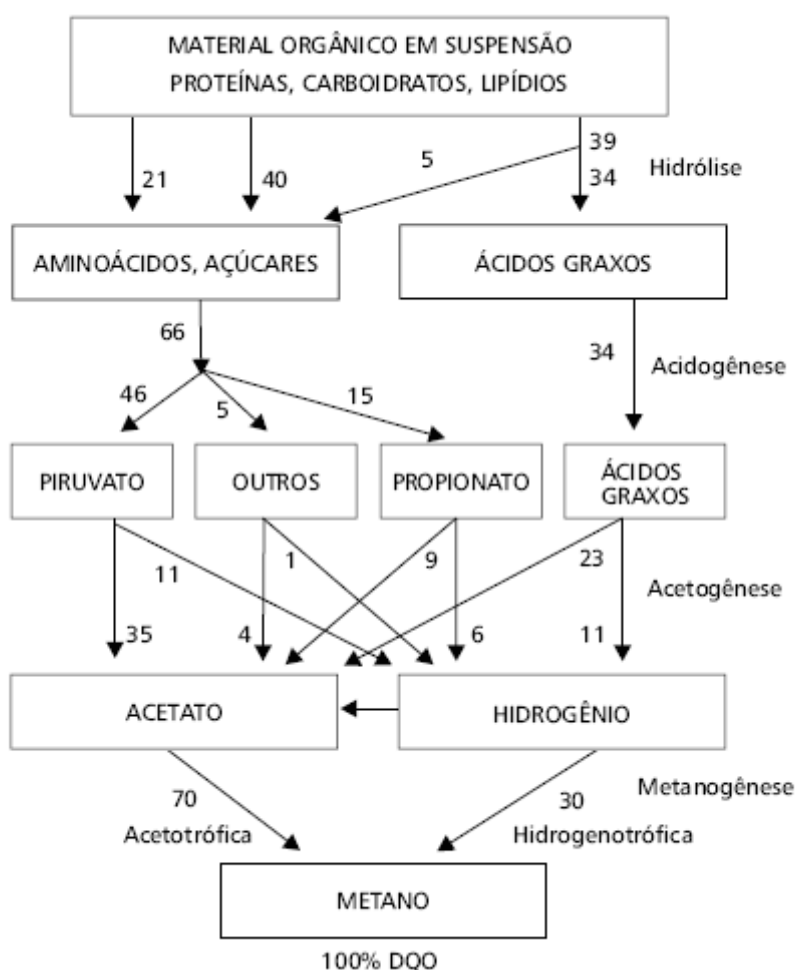


Figura 2 – Seqüência de processos da degradação anaeróbia  
Fonte: CHERNICHARO (1997)

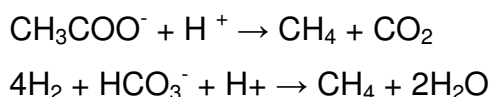
Na etapa inicial ou hidrólise, o material orgânico particulado é convertido em compostos dissolvidos menores pela ação de enzimas (hidrólise ácida) excretadas pelas diferentes bactérias fermentativas (ARGUN et al., 2008).

Na acidogênese, os compostos dissolvidos, são absorvidos pelas células e depois de excretadas como substâncias orgânicas mais simples como ácidos graxos voláteis de cadeia curta, alcoóis, ácido láctico, e compostos minerais como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , entre outros (CHERNICHARO, 1997).

Na acetogênese, os produtos da acidogênese formam os substratos para a produção do metano, na qual cerca de 70% da DQO inicial digerida é convertida em ácido acético. Dependendo do estado de oxidação do material orgânico a ser digerido, a formação de ácido acético é acompanhada pelo surgimento do gás carbônico e hidrogênio (CHERNICHARO, 1997).

Na presença desses dois gases, um terceiro processo ocorre, a homoacetogênese, produzindo dióxido de carbono a partir de ácido acético e hidrogênio.

Por fim a metanogênese, onde a partir da redução do ácido acético pelas bactérias acetotróficas ou pela redução do dióxido de carbono pelas hidrogenotróficas, tem a formação do metano, de acordo com as seguintes equações:



## 6 Acidogênese

Na degradação anaeróbia, a separação do gás hidrogênio é possível se o processo for interrompido ou separado, pois todo o hidrogênio produzido no início (acidogênese) é consumido no final (metanogênese), na metanogênese hidrogenotrófica (PEIXOTO, 2008).

A Figura 3 mostra o processo de digestão anaeróbia com enfoque de produção e consumo de hidrogênio. Os pontos principais de consumo de hidrogênio são a metanogênese e o consumo por bactérias sulfurosas (PEIXOTO, 2008).

Em razão da presença destas bactérias, se utiliza o processo de inibição por aquecimento de lodo, que reduz a população de bactérias sulfato redutoras consumidoras de hidrogênio e com isso, a produção de hidrogênio é favorecida (MAINTINGUER, 2009).

É possível observar que existe uma via de consumo de hidrogênio e gás carbônico para produção de acetato, geralmente favorecido no início das reações onde a concentração de acetato ainda é diminuta (VAZQUEZ-VALDEZ, 2008).



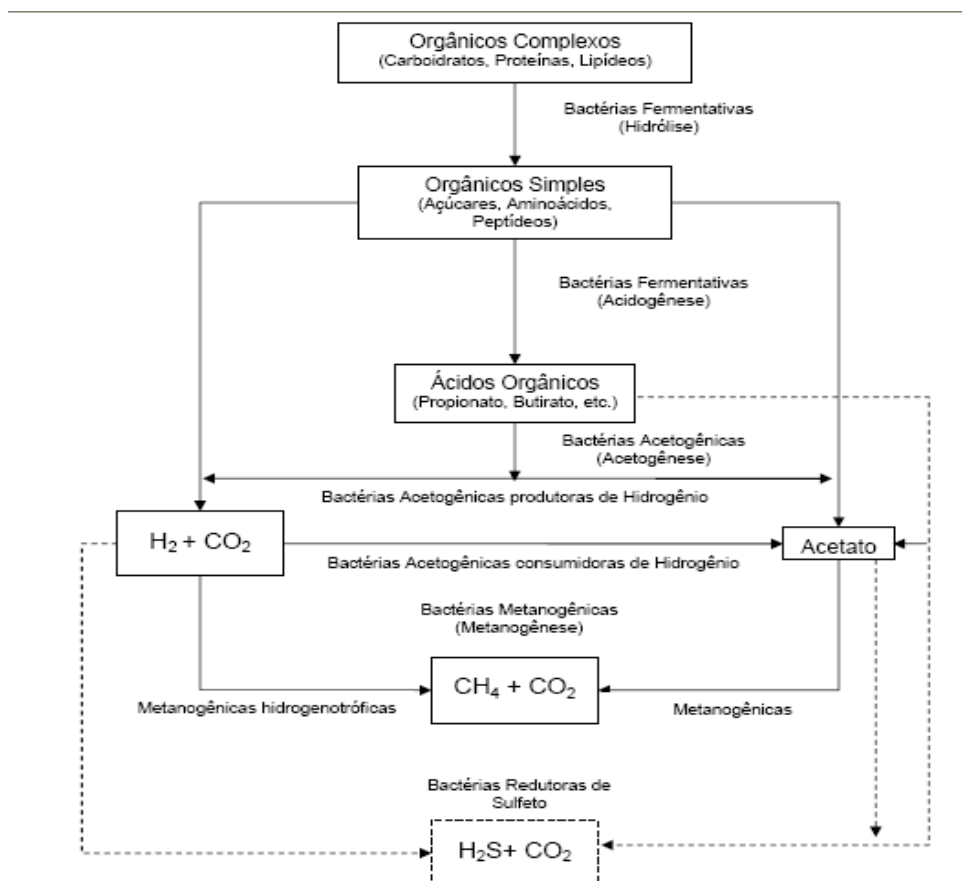


Figura 3 – Pontos de produção e consumo de hidrogênio na digestão anaeróbia

Fonte: PEIXOTO, 2008

Os ácidos produzidos junto com o hidrogênio e os metabolitos solúveis gerados na acidogênese podem ser empregados como substrato para processos de produção de metano (PEIXOTO, 2008).

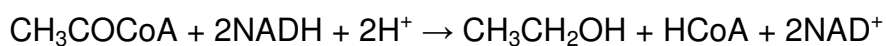
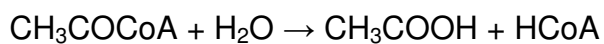
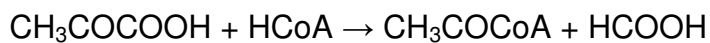
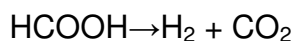
Os ácidos orgânicos obtidos também podem ser utilizados em indústrias farmacêuticas, químicas, plásticas e alimentícias. O ácido butírico, por exemplo, tem aplicação na produção de polímeros de butiril, na indústria de alimentos para realçar sabores como o da manteiga (SHIDA, 2008).

## 7 Rotas fermentativas

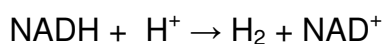
O processo pelo qual se obtém o hidrogênio é baseado na oxidação da matéria orgânica no qual o excesso de elétrons produz o  $H_2$ , catalisado pela hidrogenase (PEIXOTO, 2008).

Fernandes (2008), comenta que uma das formas de produção de hidrogênio é através da decomposição do formiato pela ação da enzima

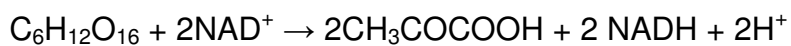
hidrogenase, conhecida como rota do formiato, conforme as reações descritas abaixo:



Outra rota de formação do hidrogênio é denominada rota do NADH (Nicotinamida Adenina Difosfato, forma reduzida). Nessa rota, o hidrogênio é produto da oxidação do NADH, conforme a reação abaixo:



O NADH é formado durante o processo de fermentação, com a conversão da glicose a piruvato, denominada glicólise, de acordo com a reação:



A Figura 4 mostra as reações que podem ocorrer na decomposição da glicose a piruvato, de acordo com Amorim (2009):

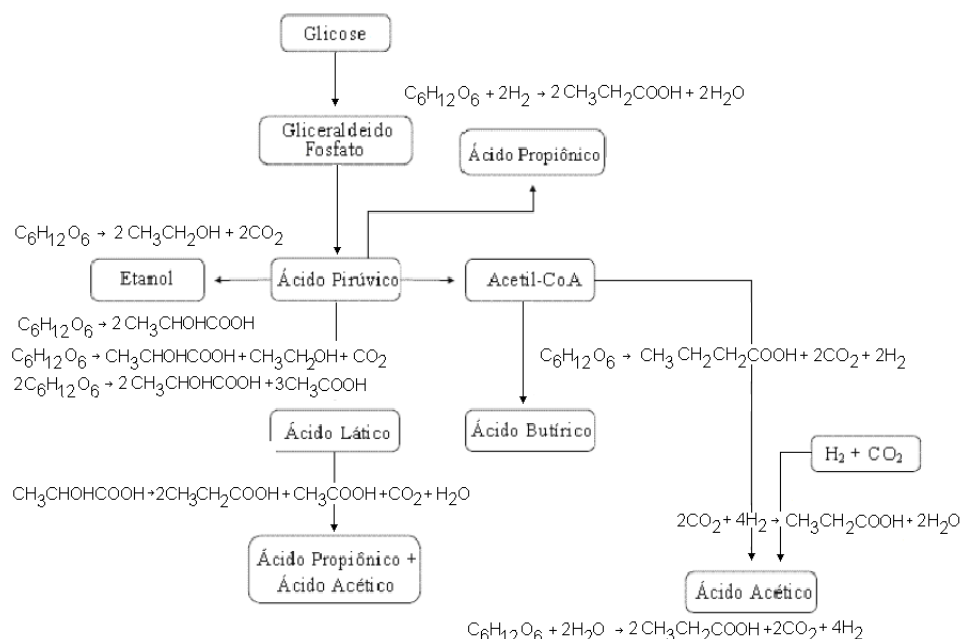


Figura 4 – Diferentes rotas a partir da glicose.  
Fonte: AMORIM 2009

Segundo Leite et al.(2008), a produção fermentativa do hidrogênio ocorre concomitantemente com a produção de ácidos orgânicos como butírico, propiônico e acético.

Diversos ácidos são produzidos juntamente com o gás hidrogênio, mas a produção de ácido acético e butírico é o caminho favorável, pois na produção de ácido propiônico ocorre o consumo de hidrogênio como mostram as equações abaixo (AMORIM, 2009; LEITE et al., 2008):



Das diferentes rotas metabólicas da produção de hidrogênio, 50% da produção teórica deste gás é a partir da rota do formiato, que é uma rota natural independente da formação de outros produtos. Quando escolhida a rota do NADH,

muitas vezes o hidrogênio não é disponibilizado pois ele acaba sendo consumido para produção de ácidos e alcoóis (FERNANDES, 2008)

Resumindo, ocorrem duas vias principais de formação do hidrogênio, a via do formiato e a do NADH, de acordo com a Figura abaixo:

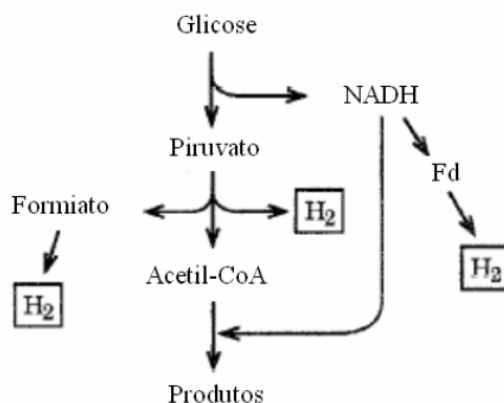


Figura 5 – Esquema simplificado para produção de Hidrogênio  
 Fonte: TANISHO et al., 1998, apud FERNANDES, 2008.

As diferenças fisiológicas entre as bactérias acidogênicas e as áqüreas metanogênicas representam a base fundamental para o desenvolvimento de estratégias para o acúmulo de hidrogênio e ácidos orgânicos (SHIDA, 2008).

Segundo a mesma autora, as bactérias acidogênicas como as espécies *Clostridium* e *Bacillus* podem formar esporos internos de proteção e endósporos, quando são expostas a condições ambientais desfavoráveis tais como alta temperatura, condições de pH fora da neutralidade e dessecação.

Outra característica das bactérias acidogênicas é o fato de crescer numa ampla faixa de pH e tem tempo de geração mais rápido de 2h às 3h.

Essas bactérias diferem-se das áqüreas metanogênicas, pois estas não tem a capacidade de formar endósporos, a maioria resiste a uma faixa limitada de pH (pH entre 7-8) e apresentam tempo de geração de 2 a 3 dias (SHIDA, 2008).

## 8 Fatores que influenciam a produção de hidrogênio

Muitos fatores influenciam a produção de hidrogênio, como pH, temperatura, inóculo, substrato, tempo de detenção hidráulica, meio suporte entre

outros. Experimentos em batelada são influenciados principalmente por temperatura, pH, inóculo e substrato.

### 8.1 Influência da temperatura

A temperatura é considerada o mais importante parâmetro que afeta a produção de hidrogênio, pois altera a atividade produtora de hidrogênio das bactérias e com isso a produção fermentativa do hidrogênio (XIN et al., 2010; WANG et al., 2009).

O gás hidrogênio apresenta baixa solubilidade na fase aquosa sendo que a temperatura influencia sua solubilidade, diminuindo a interação do gás com os micro-organismos presentes no processo. Esse fato traz duas vantagens para a produção de hidrogênio, primeiro como se encontra pouco disponível desfavorece o seu consumo e segundo, facilita a sua remoção (FERNANDES, 2008).

Segundo Wang (2009), o aumento da temperatura aumenta a atividade microbiana, mas somente numa faixa apropriada o aumento de temperatura aumenta a produção de hidrogênio, a temperaturas muito altas esse nível decresce, sendo que na maioria dos casos, a temperatura ideal para produção de hidrogênio é a faixa mesofílica ( em torno de 37 °C) e a termofílica (55 °C).

A tabela abaixo relaciona a temperatura ótima de operação de reatores em batelada produtores de hidrogênio.

Tabela 2 – Influencia da temperatura na produção de hidrogênio

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Temperatura (°C)	
			Testada	Ótima
Lodo anaeróbio	Glicose	Batelada	25-55	40
Lodo anaeróbio	Glicose	Batelada	33-41	41
Lodo anaeróbio	Sacarose	Batelada	25-45	35,1
Lodo anaeróbio	Sacarose	Batelada	25-45	35,5
Lodo anaeróbio digerido	Água de cozimento do arroz	Batelada	37-55	37

Fonte: Wang 2009

Lin et al. (2004), afirmam que embora as bactérias acidogênicas que produzem hidrogênio tenham como faixa de temperatura ótima a mesófila ou termofílica, elas tem uma grande capacidade de adaptação em ambientes com

temperaturas diferentes. Inclusive relata que a produção de hidrogênio a temperatura ambiente (15-34 °C) é possível, produzindo 1,42 mol H<sub>2</sub>. mol<sup>-1</sup> glicose.

Na maioria dos estudos de influencia da temperatura são utilizados reatores em batelada com substratos de sacarose e glicose (AMORIM, 2009)

Em estudo piloto desenvolvido por Wang (2009) foi percebido que o aumento da temperatura de 25 °C para 35 °C aumentou tanto a produção de etanol quanto a de ácido acético, e que de 35 °C para 55 °C essas concentrações diminuíram, sugerindo que em temperaturas superiores, o consórcio de micro-organismos assuma outra rota metabólica para a produção de hidrogênio.

## 8.2 Influencia do pH

O pH é um parâmetro que influencia a atividade das bactérias acidogênicas, pois afeta a ação da enzima hidrogenase, assim como a rota metabólica de degradação da matéria orgânica, influenciando na produção de hidrogênio (AMORIM 2009; FANG e LIU, 2002).

Conforme Valdez-Vazquez (2008), somente com pH próximo a 5,5 tem-se o início da produção de hidrogênio. Para o mesmo autor, a ação da hidrogenase a pH 5,8 é 2,2 vezes maior que a pH 4,5.

Segundo Fernandes (2008) vários trabalhos realizados em reatores em batelada relatam que o pH ideal para a produção de hidrogênio deve ser na faixa de 5 a 6,5, sendo o valor de 5,5 indicado com o pH ideal. Fang e Liu (2002) compararam a produção de hidrogênio a diferentes pH, obtendo os melhores resultados para a produção de hidrogênio a pH 5,5 de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 – Comparação da influencia do pH na produção de hidrogênio

Micro-organismo	pH	Produção de H <sub>2</sub> (mol de H <sub>2</sub> / mol de glicose)
Cultura mista	5,5	2,1
	5,7	1,7
	Não especificado	0,7
<i>E.aerogenes</i>	5,5-6,0	1,0
<i>E. cloacae</i>	5,0-6,0	2,2
<i>C. butyricum</i>	6,7	1,4-2,3

Fonte: Adaptado de FANG e LIU 2002.

O pH abaixo de 6 pode ser utilizado também para inibição da atividade de áruqueas metanogênicas, pois elas têm sensibilidade maior do que as bactérias acidogênicas. Ao passo que ocorre a formação de hidrogênio e ácidos durante a fermentação, ocorre juntamente a redução do pH, que dificulta o crescimento de áruqueas metanogênicas (SHIDA,2008).

Fang e Liu (2002) constataram ainda que um aumento de pH de 4 para 7 resultou na diminuição das concentrações de ácido butírico e aumentou a concentração de ácido acético.

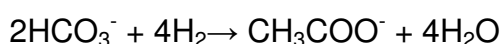
### 8.3 Influência do inóculo

Existe uma grande variedade de micro-organismos capazes de produzir hidrogênio. Espécies como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*, são destacadas na literatura como produtoras de hidrogênio. Entretanto, as espécies mais promissoras para a produção de hidrogênio são as do gênero *Clostridium*, pois tem um rápido metabolismo e altos rendimentos de produção de hidrogênio (Shida 2008; AMORIM, 2009).

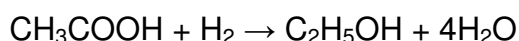
Segundo Wang (2009), essas bactérias acidogênicas, responsáveis pela produção de hidrogênio, podem ser obtidas a partir de fontes naturais como o solo, do sistema de tratamento anaeróbio de efluentes ou até de outros reatores produtores de hidrogênio com culturas já selecionadas (SHIDA, 2008).

O inóculo utilizado para a produção de hidrogênio pode ser tanto de culturas puras quanto de culturas mistas, embora culturas mistas seja o caminho mais viável para produção em grande escala segundo Wang (2009).

O cuidado na escolha do consorcio bacteriano como inóculo é de extrema importância, pois pode ocorrer o consumo do hidrogênio, como por exemplo a via de homoacetogênese, onde a produção de acetato é a partir do consumo de hidrogênio:



Ou a produção de etanol a partir do acetato



Na busca de culturas acidogênicas existem diferentes tratamentos que podem ser aplicados a lodos anaeróbios metanogênicos.

Entre os tratamentos utilizados se destaca o tratamento térmico em que o lodo é submetido a 100°C por 1h, associado a este pode ser utilizado os o pré-tratamentos de ácido fosfórico (pH 3 por 24h), com ácido 2-bromoetano-sulfônico em sal de sódio (BESA; 0,2g.L<sup>-1</sup> por 24h) (FERNANDES, 2008).

Wang (2009), testou estes tratamentos e observou que os lodos tratados produzem quantidades de hidrogênio superiores ao lodo anaeróbio metanogênico original, pois estes pré-tratamentos enriquecem o lodo em bactérias produtoras de hidrogênio, salientando o tratamento a quente que inibe a maioria das bactérias consumidoras de hidrogênio.

Uma fonte de culturas mistas anaeróbias bastante utilizada é o lodo de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes. Quando este lodo é submetido a tratamentos térmicos ocorre o enriquecimento em bactérias acidogênicas que, a determinado pH e temperatura, se tornam inóculos capazes de produzir hidrogênio (SHIDA, 2008).

O lodo acidogênico produtor de hidrogênio também pode ser obtido conforme Leite et al.(2008) que utilizou efluente sintético em reator em escala piloto, recirculando dois litros de efluente por um mês.

Amorim (2009) relata que tratamento térmico de lodo metanogênico a 90 °C por 10 minutos seleciona bactérias acidogênicas confirmadas pelo perfil de DGGE, relacionando as bactérias presentes com *Clostridium* sp.

Os tratamentos térmicos têm a finalidade de favorecer a população de micro-organismos produtores de hidrogênio (PEIXOTO, 2008). Em alguns casos, embora o tratamento térmico seja eficiente para inibição da metanogênese por micro-organismos não esporulados, porem é possível que ocorra a formação de ácido láctico inibindo a produção de hidrogênio (XIN, 2010).

Maintiguer (2009) purificou culturas de bactérias acidogênicas com inóculo anaeróbio proveniente do lodo granular de reator UASB usado no tratamento de dejetos de suinocultura.

Ela realizou um pré-tratamento do inóculo a 90°C por dez minutos, seguidos de purificação com diluições seriais com água residuária sintética acrescida de uréia, sacarose, peptona e solução de vitaminas com relação de



DQO:N:P de 500:5:1, onde as concentrações de sacarose utilizadas foram de 628mg.L<sup>-1</sup> a 4127,0 mg.L<sup>-1</sup>. Com esse tratamento ela verificou que além da produção de hidrogênio, não houve produção de metano.

Argun et al.(2009) comparando *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes*, lodo anaeróbio tratado termicamente e a mistura destas culturas, observou melhores resultados para produção de hidrogênio com o lodo anaeróbio tratado termicamente.

#### 8.4 Influência do substrato

A maioria dos experimentos que avaliam a produção de hidrogênio por via fermentativa utilizam substratos simples como glicose e sacarose como modelo pois substratos complexos não tem se mostrado modelos confiáveis (XIN et al., 2010; WANG, 2009).

Efluentes sintéticos a base de glicose e a sacarose, mesmo apresentando características de alta biodegradabilidade, necessitam de complementação inorgânica, com relações de nitrogênio e fósforo proporcionais (LÁZARO, 2009; PEIXOTO, 2008).

Substratos como a glicose, o amido e a sacarose, têm sido utilizados na produção de biohidrogênio, embora nos últimos anos, tenham surgido alguns estudos que utilizam resíduos orgânicos, principalmente em batelada (WANG,2009).

As principais características de uma água residuária para ser utilizada como substratos para produção de hidrogênio são: disponibilidade, custo, conteúdo de carboidratos e biodegradabilidade (LÁZARO, 2009).

Existe uma relação de que quanto maior a concentração do substrato maior a capacidade de produção de hidrogênio, embora existam níveis de concentração tão elevados que podem inibir a produção do gás (AMORIM, 2009).

A produção de hidrogênio com bactérias anaeróbias restritas pode alcançar rendimentos de até 4 mol de hidrogênio por mol de glicose, já com bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli*, a produção máxima é de 2 mol H<sub>2</sub> por mol de glicose (AMORIM, 2009).

Chu et al.(2008) operando com reatores em dois estágios, observou que 47,7% da concentração de carboidratos foi removida no estágio de produção de

hidrogênio, enquanto que o estágio posterior com produção de metano, removeu aproximadamente 40% do restante.

#### **8.4.1. Substrato em estudo: o efluente da indústria de parboilização do arroz**

Conforme o IBGE (2009), a cultura do arroz tem uma grande importância para o Estado do Rio Grande do Sul, uma vez que é o estado de maior produção de arroz, contribuindo com cerca de 60%. Estima-se que sua produção, em 2004, respondeu por mais de 40 mil empregos diretos, gerando um valor bruto de produção em torno de 4 bilhões de reais, ou seja, 2,84% do PIB estadual (MIRITIZ, 2007). Segundo Faria (2006), mais de 90% das empresas de beneficiamento de arroz concentra-se na metade sul do Estado. De acordo com Dors (2009), 23% do arroz consumido no Brasil é do cereal que passa por parboilização.

O mesmo autor comenta que o grão inteiro de arroz é constituído por casca, película, germe e endosperma. A casca constitui de 15 a 30% do peso do grão, dependendo da variedade, práticas culturais, localização geográfica, estação do ano e temperatura. Minerais (sílica) e celulose são os maiores componentes da casca, o farelo é composto pelas camadas que envolvem o endosperma amiláceo do grão de arroz, sendo rico em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais, constituindo 5 a 7% do peso do grão. As células do endosperma são uma excelente fonte de carboidratos complexos, representados principalmente pelo amido, que se encontra presente na forma de amilose e amilopectina. O conteúdo de amilose varia de 12 a 35% no arroz, enquanto que variedades cerosas contêm um baixo teor de amilose (DORS, 2009).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Arroz Parboilizado (ABIAP), a parboilização do arroz é um processo onde o arroz com casca é imerso em água potável, a temperatura superior a 58°C, sendo o principal objetivo melhorar a qualidade nutritiva do produto através de três estágios: encharcamento, gelatinização e secagem complementar, onde o amido é aglutinado no interior do grão.

A parboilização do arroz gera efluentes que podem conter alta carga de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo. Segundo Faria (2006) a Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de

Oxigênio Bruta (DQO), destes efluentes são em média de 3.200mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e 4500 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo neste efluente é de 90,0mg.L<sup>-1</sup> e 100,0mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (FARIA, 2006).

## METODOLOGIA GERAL

### 1 Substratos

Os substratos utilizados como fonte para a geração de bio-hidrogênio ( $H_2$ ) foram o efluente bruto da indústria de parboilização do arroz (tab. 4) e a sacarose.

Tabela 4 – Caracterização do efluente bruto utilizado no experimento, baseado no monitoramento no período de Jan 2008-Dez 2009.

Parâmetro	Unidade	Média	Máximo	Mínimo
DBO	mg.L <sup>-1</sup>	1830,0	2692,0	840,0
DQO	mg.L <sup>-1</sup>	4988,6	7540,0	2352,9
P- PO <sub>4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	127,2	153,2	104,8
NTK	mg.L <sup>-1</sup>	109,8	166,5	106,4
N - NH <sub>4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	17,5	33,6	11,2
pH	-	5,1	5,7	4,7
Carboidratos Totais	mg.L <sup>-1</sup>	1030,0	1515,0	472,6

Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), Fósforo Total (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), Nitrogênio Amoniacal (N-NH<sub>4</sub>).

O substrato efluente utilizado nos reatores foi diluído dez vezes em água destilada para obter uma concentração de DQO na faixa de 300-400 mg.L<sup>-1</sup>.

O substrato sacarose foi preparado a partir da sacarose p.a. . Foi preparada uma solução de sacarose na concentração de 350mg.L<sup>-1</sup> baseado nos valores encontrados de DQO no substrato efluente parbolizado.

## 2 Inóculos

Os inóculos utilizados no experimento foram obtidos de dois tipos de reatores para o tratamento de efluentes. O primeiro – Lodo Acidogênico (LA) – (Fig. 6 e 7), oriundo do tratamento de efluente sintético a base de sacarose, obtido do reator anaeróbico de leito fixo (produtor de hidrogênio) e o segundo – ( Lodo Anaeróbico Tratado Termicamente – LAT) obtido do reator UASB( Upflow Anaerobic Sludge Blanket) que opera no tratamento de efluente da parboilização do arroz. O lodo anaeróbico foi coletado, adicionado 200 mL de água destilada para cada 100 mL de lodo, triturado em homogeneizador coloidal e aquecido a 90<sup>0</sup> C por 10min. em banho-maria.



Figura 6 - Reator Acidogênico.

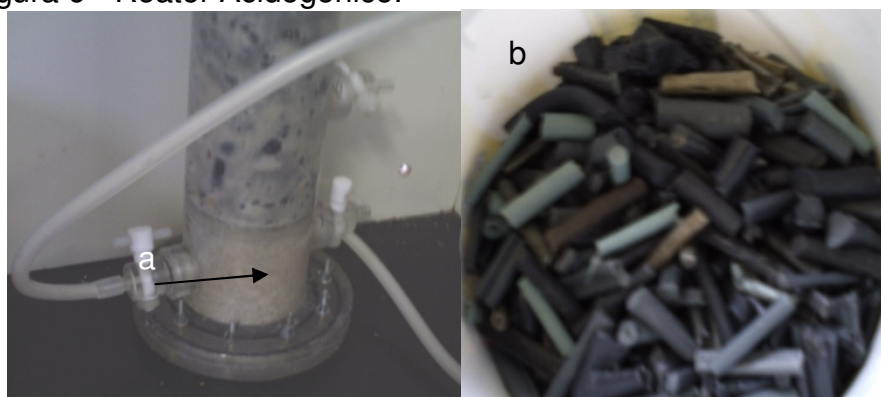


Figura 7 – Lodo acidogênico (a) e material suporte (b).

Os inóculos foram mantidos sob refrigeração (4<sup>0</sup>C) para posterior utilização.

Em todos os reatores foi adicionado o volume de inóculo (LA ou LAT) correspondente a concentração de  $250\text{mg.L}^{-1}$  baseado nas concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV), de acordo com Peixoto (2008).

### **3 Condições de temperatura e pH**

Todos os reatores foram mantidos a temperatura de  $20\pm 5^\circ\text{C}$ , em câmara escura.

O pH inicial dos reatores foi de  $5,5\pm 0,5$  e quando necessário, durante o processo, foi ajustado.

### **4 Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas do efluente foram realizadas no laboratório de Análises de Água da Agência de Desenvolvimento da Bacia da Lagoa Mirim – UFPel. As análises cromatográficas, microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos da USP (LPB - USP) utilizando as metodologias definidas por este laboratório.

Os métodos analíticos para determinação de DBO, DQO, NTK,  $\text{N-NH}_4^+$ , pH,  $\text{PO}_4^{3-}$ , SST e SSV foram de acordo com APHA (2005) e para carboidratos totais foi pelo método adaptado de Dubois (1956). A análise de DQO de acompanhamento dos reatores foi analisada filtrando-se a amostra.

As concentrações e os volumes de hidrogênio e dióxido de carbono, foram analisados por cromatografia gasosa (Shimadzu CG/TCD), os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia gasosa (HP GC 6890/FID), a concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa (Shimadzu GC/FID) com injetor automático (COMBI-PAL, AOC 5000, *headspace mode*) e equipado com coluna HP INNOWAX, de acordo com Peixoto (2008).

### **5 Montagem dos reatores**

Todos os experimentos foram montados em duplicata, em escala de bancada, utilizando reatores (frascos de borosilicato 3.3 – Boeco® e Duran®) com capacidade de 2000mL preenchido com 1000mL de volume de líquido e 1000mL de *headspace* (Fig. 8). Aos reatores foi injetado gás argônio por 20 minutos com a finalidade de remoção de oxigênio dissolvido e gás carbônico. Para o fechamento

foram utilizadas tampas, e rolhas de silicone para evitar vazamentos de gases dos frascos.



Figura 8 – Reator para obtenção de hidrogênio.

## 6 Meio nutricional

Em ambos os reatores foram adicionados o meio nutricional adaptado de Del Nery (1987) para complementar as relações nutricionais.

Tabela 5 – Composição da solução de nutrientes

Composto	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Quantidade adicionada em cada reator
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	6	6 mg
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,15	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75	80μL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,075	
CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,012	
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,618	12μL
SeO <sub>2</sub>	0,0108	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,608	80μL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,39	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,828	

Fonte: Peixoto, 2008

## **1 Capítulo 1 – Avaliação da produção de bio-hidrogênio com inóculo acidogênico e com inóculo anaeróbio tratado termicamente.**

### **1.1 Introdução**

A produção de hidrogênio por via biológica é dependente de vários fatores, como substrato, pH, temperatura, entre outros. Diferentes inóculos também interferem na produção de hidrogênio (SHIDA, 2009). Atualmente tem se observado que as espécies de micro-organismos mais promissoras para a produção de hidrogênio são as do gênero *Clostridium*, pois tem um rápido metabolismo e altos rendimentos de produção de hidrogênio (AMORIM, 2009).

As bactérias utilizadas para a produção de hidrogênio podem ser obtidas por diferentes fontes, como solo, culturas puras ou outros lodos anaeróbios produtores de hidrogênio (WANG, 2009).

Neste experimento se avaliou a produção de hidrogênio de dois inóculos, o inóculo acidogênico e o inóculo anaeróbio tratado termicamente.

### **1.2 Metodologia Específica**

#### **Substrato**

O substrato utilizado foi o efluente da parboilização do arroz diluído 10 vezes.

A caracterização do substrato efluente da parboilização está descrita na metodologia geral.

#### **Inóculos**

Os inóculos utilizado foram o inóculo de lodo acidogênico (LA) proveniente do reator anaeróbio de leito fixo produtor de hidrogênio e o inóculo de lodo anaeróbio tratado termicamente (LAT).

#### **1.2.1 Condições de temperatura e pH**

As condições de temperatura foram de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  e de pH  $5,5 \pm 0,5$ , ajustado quando necessário.



### **1.2.2 Análises físico-químicas e metodologias analíticas**

As análises físico-químicas de DQO filtrada e pH foram de acordo com APHA, 2005. A análise de carboidratos totais foi de conforme método adaptado de Dubois, 1956.

As metodologias para análises cromatográficas do gás hidrogênio, gás carbônico e ácidos orgânicos voláteis foram de acordo com Peixoto, 2008.

A morfologia celular da biomassa proveniente dos reatores foi analisada por microscopia ótica de contraste de fase e por coloração de Gram, com o auxílio de microscópio Olympus modelo BX60, utilizando o software Image Pró-Plus 4.5 e com luz comum e objetiva de imersão (100x), respectivamente.

As amostras de biomassa do lodo anaeróbico de UASB, LAT e de LA foram preparadas em lâminas e fixadas com ágar 2% e analisadas por microscopia ótica sob contraste de fase. Amostras foram analisadas por microscopia ótica de campo claro, coradas por Gram.

O tempo total de experimentação foi de 48h. As concentrações de carboidratos e DQO foram avaliadas nos tempos 0h, 6h, 18h, 24h, 36h e 48h. Os gases hidrogênio e carbônico foram avaliados nos tempos 0h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 36h e 48h.

### **1.2.3 Análise estatística dos resultados**

Os reatores para avaliação dos experimentos foram montados em duplicata, sendo as variáveis DQO e carboidratos avaliadas em triplicata.

As médias de resultados das análises de carboidratos, DQO, hidrogênio e gás carbônico foram tratados com o teste de Tukey, com  $P > 0,005$ .

### 1.2.4 Montagem dos reatores

O potencial de produção de bio-hidrogênio dos dois inóculos foi testada montando-se reatores, em duplicata, com os inóculos obtidos dos lodos LA e LAT (Fig. 9).



Figura 9 – Reatores com inóculo acidogênico (a) e inóculo anaeróbico tratado termicamente(b) no tempo zero de experimento.

## 1.3 Resultados e Discussão

### 1.3. 1 Remoção de Carboidratos e da DQO

A concentração de carboidrato em um determinado resíduo é um fator indicativo da sua potencialidade em produzir hidrogênio por via biológica (FANG, 2006).

A concentração inicial de carboidratos nos reatores foi de  $109,1\text{mg.L}^{-1}$  e as concentrações médias finais foram de  $14,0\text{mg.L}^{-1}$  e  $17,2\text{mg.L}^{-1}$ , para os reatores com inóculo de lodo acidogênico e de lodo anaeróbico tratado termicamente, respectivamente.

Os carboidratos presentes no efluente de arroz parboilizado foram consumidos de forma acelerada nas primeiras 24 horas de incubação, tanto no reator LA como no reator LAT (Fig. 11). Em experimento semelhante, Fernandes et al. (2010), utilizando esgoto sanitário, glicerol, sacarose e vinhaça, observaram que o tempo necessário para estabilização nas concentrações de carboidratos variou entre 10 e 20 horas. Assim como o que aconteceu com Maintinguer (2009) operando reatores alimentados com sacarose em batelada, obtendo redução de 80,4% de sacarose em 28h.

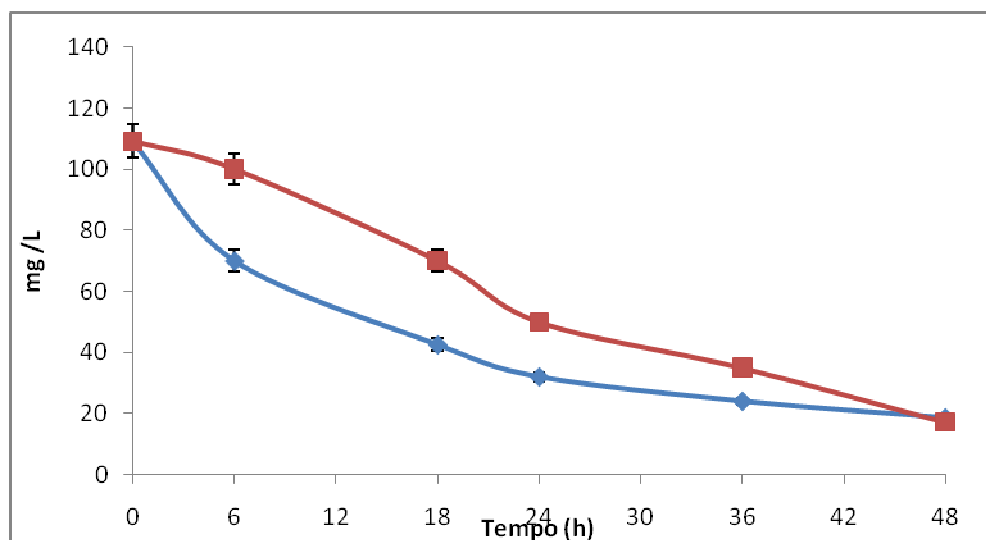


Figura 10 – Concentração de carboidratos. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) das concentrações de carboidratos nos reatores com inóculo acidogênico (◆) e inóculo anaeróbico tratado termicamente (■) com substratos de efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0.5$ ) entre os reatores.

O reator com inóculo de lodo acidogênico e o com inóculo de lodo anaeróbico tratado termicamente apresentaram perfis semelhantes na remoção dos carboidratos. No final do experimento foi observada eficiência de remoção de carboidratos de 87 % para o reator acidogênico e de 84 % para o reator metanogênico, não apresentando diferença significativa entre os inóculos.

A concentração inicial de DQO filtrada nos reatores foi de  $325,4 \pm 2,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  para o reator anaeróbico tratado termicamente e de  $342,6 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  para o reator acidogênico.

Observa-se que a diminuição de DQO ao longo do tempo de experimento (Fig.11) apresentou linearidade em ambos os reatores, sendo que para o reator anaeróbico tratado termicamente obteve uma remoção de DQO maior do que o reator acidogênico.

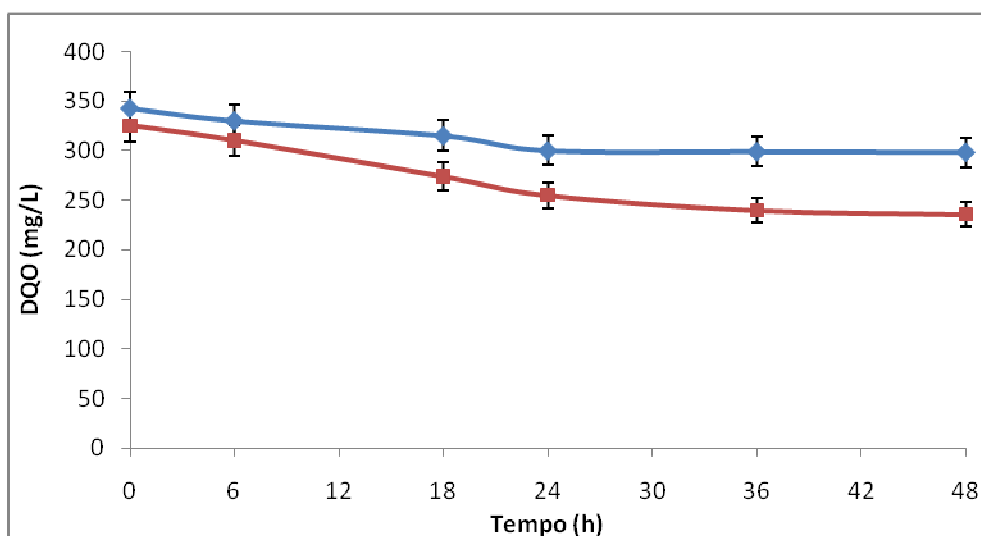


Figura 11 – Concentração de DQO. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) das concentrações de DQO nos reatores com inóculo acidogênico (◆) e inóculo anaeróbio tratado termicamente (■) com substrato de efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0.5$ ) entre os reatores.

A eficiência de remoção de DQO foi avaliada nos dois reatores, sendo que no reator anaeróbio tratado termicamente a remoção chegou a 27 % e no reator acidogênico a remoção foi de 12% (Fig. 12).

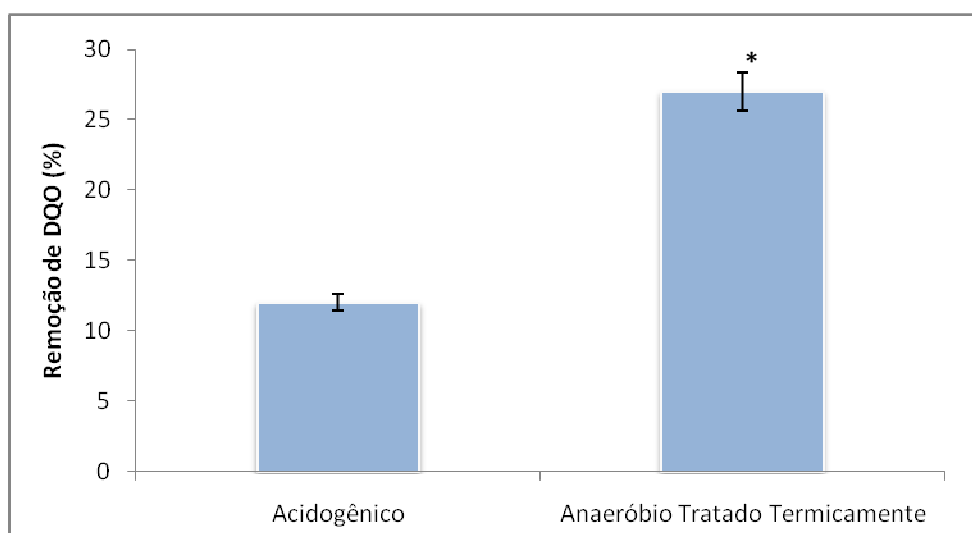


Figura 12 – Remoção de DQO. Os dados representam as médias ( $\pm$ EPM) das remoções de DQO nos reatores com inóculo acidogênico e inóculo anaeróbio tratado termicamente, com substrato de efluente, em cultivos de batelada. Asterisco indica diferença significativa entre os reatores

Fernandes et al.(2010) obtiveram uma remoção de 22% em termos de DQO. Peixoto (2008) operando em reator contínuo observou remoção entre 15,6% e 26,1%, Ren et al.(2006) obteve, em reator contínuo, eficiência de remoção de DQO em torno de 30%.

A eficiência de remoção de DQO do reator com inóculo anaeróbio tratado termicamente e abastecido com substrato de efluente da parboilização do arroz foi semelhante a relatada por outros autores. É relevante o fato de que o inóculo anaeróbio tratado termicamente oriundo do reator UASB e o substrato são provenientes da mesma indústria, além do reator UASB operar com eficiência de remoção de 84,8% de DQO segundo Leite (2008).

Embora as arqueas metanogênicas tenham sido inativadas pelo tratamento térmico, as demais colônias que efetuam a degradação inicial dos compostos de cadeias mais longas permaneceram viáveis. O fato do lodo acidogênico não ter apresentado altas taxas de remoção de DQO provavelmente está relacionado à adaptação do lodo ao tipo de substrato, pois opera em reator tratando sacarose.

Embora tenha sido observada uma diferença significativa na remoção de DQO dos reatores com inóculo LA e LAT; não houve diferença significativa na remoção de carboidratos pelos reatores. Esse fato deve estar relacionado com a composição química do efluente, rico em nitrogênio. Este nitrogênio é responsável por parte da DQO presente no efluente de parboilização do arroz, indicando a presença de outras matérias originárias de DQO, não somente os carboidratos.

### **1.3.2 Produção de hidrogênio e de gás carbônico pelo lodo anaeróbio tratado termicamente**

A evolução da geração de hidrogênio dos reatores com os lodos acidogênico e anaeróbio tratado termicamente se mostrou semelhante no período inicial do experimento (Fig. 13). Foi observada uma pequena geração de  $H_2$  nas primeiras 6 horas de incubação, como aconteceu com Fernandes et al. (2010), correspondente ao período de adaptação da biomassa.

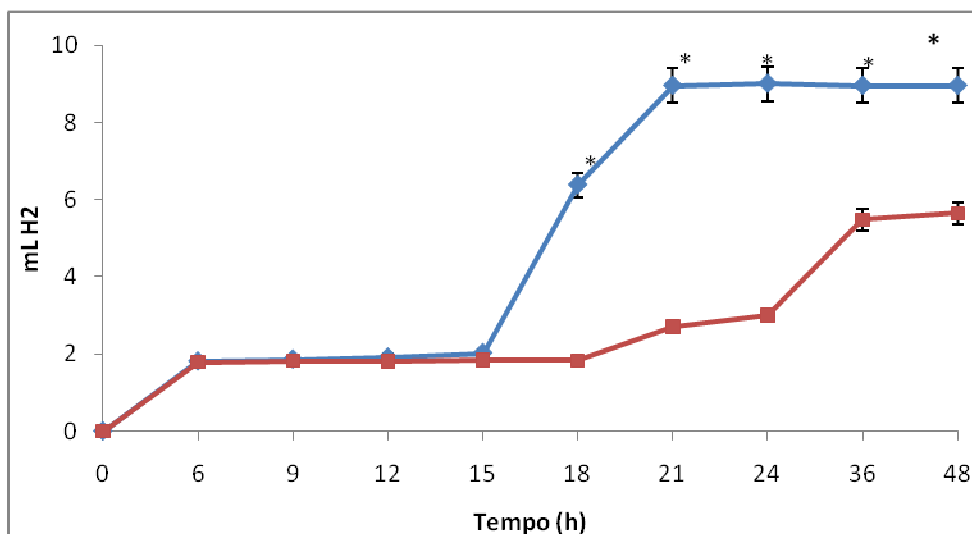


Figura 13 – Volume de hidrogênio no headspace dos reatores acidogênico e anaeróbico tratado termicamente. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) dos volumes de hidrogênio no headspace nos reatores com inóculo acidogênico (♦) e inóculo anaeróbico tratado termicamente (■) com substrato de efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

A partir da sexta hora, houve um leve aumento na produção de hidrogênio tanto no reator LA como no LAT, mantendo-se até o período de 15 horas. A partir das 18 horas, se observou diferença no volume de hidrogênio produzido pelos diferentes inóculos.

O reator acidogênico teve a maior geração de H<sub>2</sub> no *headspace* registrada às 21 horas de incubação, tendo um expressivo crescimento no período de 16 a 21 horas, sendo que após este período foi observada uma estabilização na quantidade de H<sub>2</sub> gerado. No reator com inóculo anaeróbico tratado termicamente foi observado uma produção progressiva de H<sub>2</sub> no período de 16 a 36 horas de incubação, ficando estabilizada até as 48 horas.

A produção de H<sub>2</sub> no final das 48 h foi de 9,61 mL e 5,56 mL nos reatores com lodos acidogênico e anaeróbico tratado termicamente, respectivamente. O reator acidogênico gerou significativamente mais H<sub>2</sub> quando comparado ao reator com lodo anaeróbico tratado termicamente, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

No reator anaeróbico tratado termicamente e no acidogênico houve a produção de CO<sub>2</sub> em pequena quantidade nas primeiras 6 horas de incubação (Fig.14). Para o reator com inóculo anaeróbico tratado termicamente houve um

pequeno aumento na produção de gás carbônico no período de 6 h a 21 h de incubação. No período de 21 h a 36 h foi observado um crescimento progressivo, tendo o pico de produção de CO<sub>2</sub> sendo observado às 36 horas de incubação (Figura 15). Já no acidogênico, embora tenha sofrido um decréscimo de produção de gás por volta das 24 h, ele também apresentou o seu maior pico às 36 horas.

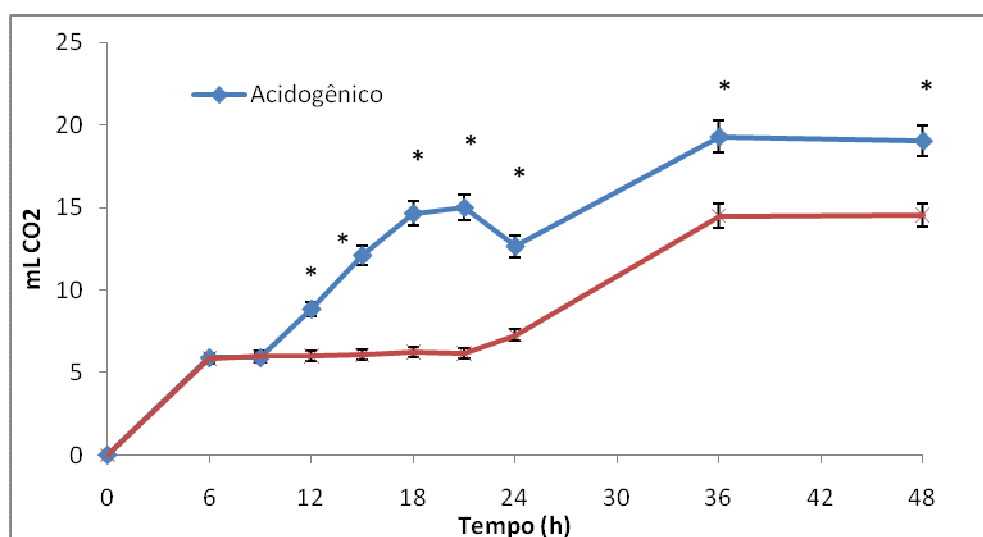


Figura 14 – Volume de gás carbônico no headspace dos reatores acidogênico e anaeróbico tratado termicamente. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) dos volumes de gás carbônico no headspace nos reatores com inóculo acidogênico (◆) e inóculo anaeróbico tratado termicamente (■) com substrato de efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

As quantidade de CO<sub>2</sub> geradas foram de 19,3 mL e 14,6 mL de CO<sub>2</sub> nos reatores acidogênico e anaeróbico tratado termicamente, respectivamente.

Embora o reator anaeróbico tratado termicamente tenha apresentado maior remoção de DQO, não produziu maiores concentrações de CO<sub>2</sub>, confirmando que parte da DQO deste efluente não é originária de carboidratos, mas sim de outros compostos como por exemplo proteínas, lipídeos, fibras e outros compostos oriundos do grão e casca do arroz, de acordo com Dors (2009). Almeida (2004) comenta ainda que quanto menor a relação entre DBO e DQO, maior a concentração de substâncias recalcitrantes, ou seja, substâncias não degradadas biologicamente.

A tabela 6 mostra a produção específica de hidrogênio e gás carbônico dos reatores com lodo acidogênico e com lodo anaeróbico tratado termicamente. Os

valores de hidrogênio foram calculados com base na DQO removida durante as 48h de experimento e na biomassa inicial.

Tabela 6 – Produção específica de hidrogênio e dióxido de carbono

	Reator Acidogênico	Reator Anaeróbio tratado termicamente
mL H <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> DQO	217.5 *	62.3
mL CO <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> DQO	437.30 *	163.57
mL H <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> SV	38.44 *	22.40
mL CO <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> SV	77.3 *	58.4

Asteriscos correspondem a diferença significativa entre os reatores com diferentes inóculos.

Chen (2006) observou produções de hidrogênio de 234 mL/g DQO para sacarose, 119 mL/g DQO para resíduos de leite em pó desnatado e 101 mL/ g DQO para resíduos de alimentos. Xin et al.(2010) relatam que em água de cozimento do arroz tem-se uma produção máxima de hidrogênio de 96 mL.g<sup>-1</sup> SV e para o farelo de arroz uma taxa de 61 mL.g<sup>-1</sup> SV. Taxas de 20-40 mL H<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> SV foram encontradas para o bagaço da cana de açúcar, mistura de excrementos de bovinos e efluentes do manufatura de requeijão segundo o mesmo autor. Fernandes et al. (2010) relacionaram produções específicas de hidrogênio como 200 mL do gás para cada grama de DQO com substratos de glicerol e esgoto doméstico.

Os resultados de produção de hidrogênio menores que os obtidos com a sacarose (substrato puro em carboidrato) podem estar relacionados ao fato de que concentrações elevadas de nitrogênio podem inibir o processo fermentativo de obtenção do hidrogênio, de acordo com Xin et al.(2010) ou ainda, no caso do reator com lodo anaeróbio tratado termicamente, a não purificação do lodo tratado termicamente a partir de sucessivas inoculações em glicose ou xilose até obter um lodo somente acidogênico como descrito por Mairtinguer ( 2009).

### 1.3. 3 Microbiologia dos reatores

A microbiologia dos reatores foi avaliada por microscopia ótica de contraste de fase e por coloração de Gram dos três tipos de amostras: lodo de UASB, lodo de UASB com tratamento térmico e lodo acidogênico, de acordo com a Figura abaixo. O consorcio microbiano utilizado no reator anaeróbio tratado



termicamente(RM-02) foi obtido de reator UASB utilizado para o tratamento de efluentes da indústria de parboilização do arroz como descrito anteriormente.

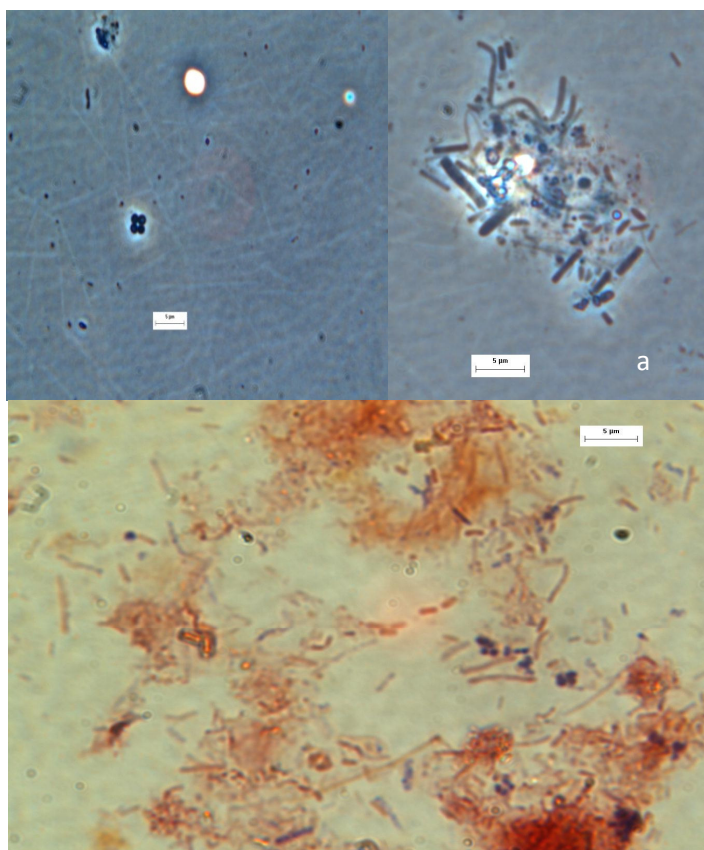


Figura 15 – Microscopia ótica do reator UASB (a) e coloração de Gram (b). A figura representa um campo representativo dos campos analisados.

No reator UASB, foi possível observar bactérias com diferentes morfologias como cocos e alguns bacilos. Já na coloração de Gram se observa uma grande predominância de bactérias com morfologia de bacilo e Gram negativos.

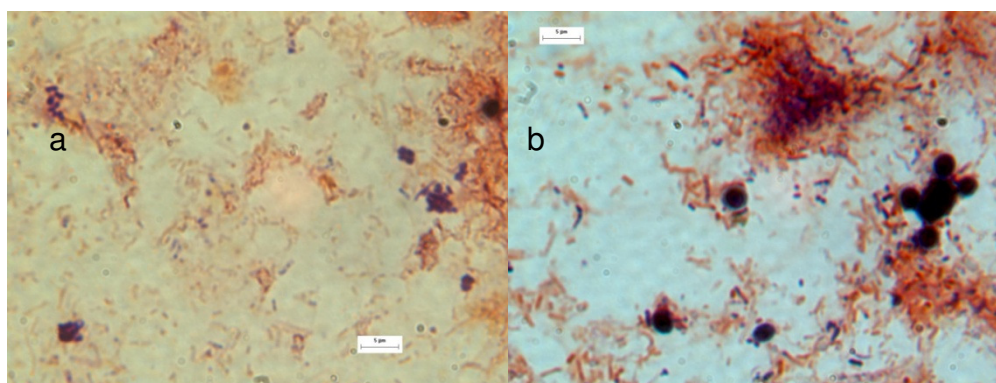


Figura 16 – Coloração de Gram do lodo UASB produtor de hidrogênio (a) e do lodo acidogênico (b). A figura representa um campo representativo dos campos analisados.

No lodo de UASB sem tratamento, assim como o lodo de UASB tratado termicamente (a) apresentou uma grande superioridade em bactérias Gram negativas (Fig. 16). O lodo acidogênico, além de apresentar bactérias Gram negativas e positivas, apresenta algumas leveduras(b), não observadas no lodo UASB.

De acordo com Maintinguer (2009), que utilizou tratamento térmico semelhante, foi possível inibir as bactérias e arqueas consumidoras de hidrogênio, embora no trabalho desenvolvido por tal autor, a maioria das espécies selecionadas foram de Gram positivos formadores de endospóros, característica das espécies produtoras de hidrogênio.

Hawkes et al.(2007) comentou que as espécies de *Clostridiuns* formadoras de endósporos são selecionadas em ambientes por tratamento a quente. Chen et al.(2006) também obteve isolados de *Clostridium* identificadas como *Clostridium butiricum* a partir do tratamento térmico de lodo de UASB. Fang et al., 2006 identificou bacilos como *Clostridium* sp. em reatores anaeróbios de batelada, com inóculo de digestor do beneficiamento do arroz, com pré tratamento a quente do lodo.

A confirmação da espécie dominante produtora de hidrogênio do lodo acidogênico por Fernandes et al.(2010) foi através da identificação por RNA 16S. Eles encontraram as espécies *Klebsiella* sp, bacteróides sp e outras bactérias não cultivadas. A identificação do lodo anaeróbio tratado termicamente produtor de hidrogênio será realizada futuramente, pois não foi o objetivo de tal trabalho.

Embora a maioria dos autores relate que as bactérias Gram positivas são produtoras de hidrogênio, o lodo de UASB tratado termicamente mesmo tendo maioria Gram negativa mostrou potencial em produzir hidrogênio. É possível que com a purificação do lodo de UASB a microbiota Gram positivas se tornem maioria.

#### **1.3. 4 Perfil de ácidos durante a produção de hidrogênio**

Segundo Chernicharo (1997) vários ácidos são produzidos durante a degradação da matéria orgânica. Na obtenção de hidrogênio, na fase de acidogênese Peixoto (2008) comenta que os ácidos que mais se destacam durante este período são o acético, butírico e propiônico, sendo que na produção de ácido acético ocorre a liberação de 4 mol de H<sub>2</sub> e na produção de ácido butírico se

produzem 2 mol; já na produção de ácido propiônico, não ocorre nem consumo nem formação de hidrogênio. De acordo com Peixoto (2008), Fernandes et al.(2010), Maintinguer (2009), os ácidos de maior produção de hidrogênio são o acético e o butírico, assim como o encontrado neste experimento. As concentrações finais de ácido acético e butírico somam cerca de 50% dos ácidos produzidos.

A tabela abaixo relaciona as concentrações dos principais ácidos existentes nos reatores acidogênico e anaeróbio tratado termicamente.

Tabela 7 – Concentrações de Ácidos Orgânicos Voláteis nos reatores com lodo acidogênico e anaeróbio tratado termicamente.

<b>Ácidos (mg.L<sup>-1</sup>) / Tratamento</b>	<b>Tempo</b>	<b>Acético</b>	<b>Lático</b>	<b>Succínico</b>	<b>Propiônico</b>	<b>Butírico</b>
Acidogênico	0h	22.8	27.4	14.2	44.5	11.7
	48h	20.1	20.8	32.2 *	36.8	44.7*
Anaeróbio tratado termicamente	0h	9.4	20.3	25.0	16.2	11.5
	48h	25.7*	16.7	28.6	10.7	35.9*

Os valores representam a média dos resultados. Asteriscos indicam diferença significativa entre o tempo 0h e 48h para o mesmo reator.

No reator acidogênico não houve produção nem consumo de ácido acético. Segundo Chernicharo (1997) e Peixoto (2008), a produção de hidrogênio não está ligada somente a produção deste ácido, mas também a produção de ácido butírico, embora a rota de formação de acetato seja mais produtiva em termos de hidrogênio.

Os principais ácidos produzidos durante a fermentação do efluente da parboilização do arroz foram o ácido acético, butírico e propiônico, relacionados a produção de hidrogênio (Tab. 7). No reator acidogênico, a concentração final de ácido acético foi de 20,1mg.L<sup>-1</sup>, enquanto no reator anaeróbio tratado termicamente foi de 25.7mg.L<sup>-1</sup>.

O ácido propiônico se manteve em quantidades praticamente idênticas no início e final dos experimentos, indicando que a rota de degradação de carboidratos optou pela formação de ácidos butírico e succínico.

O ácido succínico está relacionado com a rota de fermentação alcoólica, pois neste tipo de fermentação ele é o ácido mais abundante, como ocorreu um pequeno aumento na concentração de ácido succínico, existe um indício de que a

rota de fermentação alcoólica não foi a preferencialmente escolhida e sim a rota de formação do ácido butírico, com maior rendimento em produção de hidrogênio do que a alcoólica. De acordo com as análises cromatográficas, não houve formação de álcool em nenhum dos tratamentos descritos.

## **2 Capítulo 2 - Avaliação da produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz.**

### **2.1 Introdução**

A capacidade de um substrato produzir hidrogênio está relacionada com a sua composição em termos de carboidratos e a relação adequada de nutrientes (WANG, 2009).

Alguns resíduos industriais como glicerol (subproduto do biodiesel), efluentes, esgotos domésticos tem sido utilizados como substrato para produção de bio-hidrogênio por reatores com inóculos acidogênicos (PEIXOTO, 2008). O efluente da parboilização do arroz tem concentrações de DQO em torno de 4000mg.L<sup>-1</sup> e concentrações de fósforo e nitrogênio elevadas. É um efluente com disponibilidade, pois é gerado, em média, 4L de efluente por quilo de arroz parboilizado, embora exista uma tendência em reduzir este volume, consumindo menos água, mas gerando efluentes mais concentrados (FARIA, 2006).

### **2.2 Metodologia Específica**

#### **2.2.1 Substratos**

Para avaliação da produção de bio-hidrogênio foram utilizados os substratos, efluente da parboilização do arroz e sacarose. Ambos estão caracterizados na metodologia geral.

#### **2.2.2 Inóculo**

O inóculo utilizado para produção de bio-hidrogênio foi o inóculo de lodo acidogênico obtido dos reatores de leito fixo.

### **2.2.3 Condições de temperatura e pH**

As condições de temperatura e pH estão descritas na metodologia geral.

### **2.2.4 Análises físico-químicas e metodologias analíticas**

As análises físico-químicas e metodologias analíticas estão descritas na metodologia geral.

O tempo total de experimento foi 48h. Os tempos de determinação das concentrações e volumes de DQO filtrada, carboidratos totais, ácidos orgânicos voláteis,  $H_2$  e  $CO_2$  foram 0h, 6h, 12h, 24h, 36h e 48h. A concentração de hidrogênio no *headspace* foi verificada as 0h, 6h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 36h e 48h.

### **2.2.5 Análise estatística dos resultados**

Os reatores para avaliação dos experimentos foram montados em duplicata, sendo as variáveis DQO e carboidratos avaliadas em triplicata.

As médias de resultados das análises de carboidratos, DQO, hidrogênio e gás carbônico foram tratados com o teste de Tukey, com  $P > 0,005$ .

### **2.2.6 Montagem dos reatores**

Foram montados dois tipos de reatores com inoculo acidogênico para a avaliação da produção de bio-hidrogênio, um com substrato sacarose (RAS) e outro com substrato efluente (RAE).

## **2.3 Resultados e Discussão**

### **2.3.1 Remoção de Carboidratos de DQO**

O substrato preferencial para a produção de hidrogênio pelas bactérias acidogênicas são os ricos em carboidratos (PEIXOTO, 2008; FERNANDES et al, 2010). Os carboidratos são compostos energéticos de fácil hidrólise pelas enzimas liberadas pelas bactérias acidogênicas, que fazem com que o rompimento das ligações dos carboidratos forme açúcares, que quando hidrolisados formam ácidos

de orgânicos de cadeias menores, como piruvato e propionato (CHERNICHARO, 1997).

As concentrações iniciais de carboidratos nos reatores com substrato sacarose (RS) e efluente da parboilização (RE) foram de  $347\text{mg.L}^{-1}$  e de  $105,6\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 17).

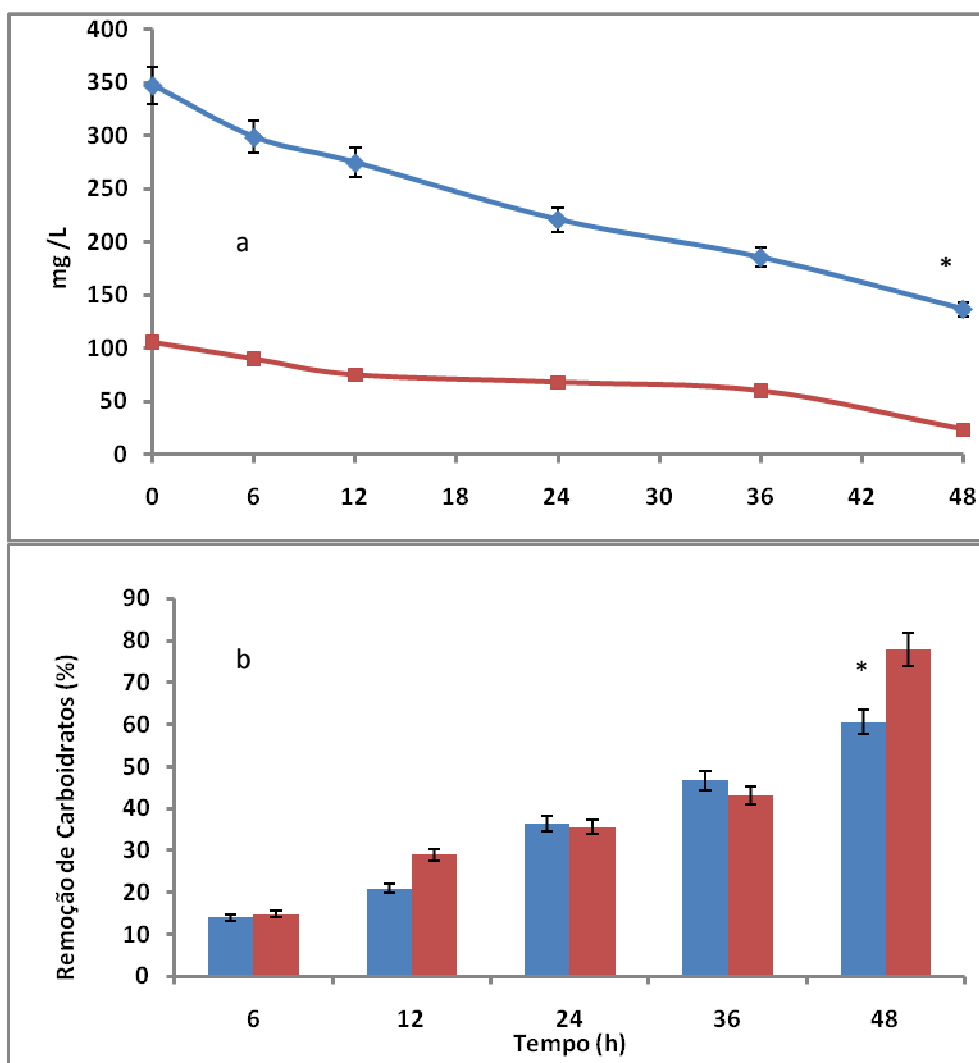


Figura 17 – Concentração de carboidratos nos reatores acidogênicos com substratos sacarose (♦) e efluente(■) em concentração  $\text{mg.L}^{-1}$ (a) e em % de remoção de Carboidratos (b). Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM), em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

A maior remoção de carboidratos no reator a base de efluente pode estar relacionado ao suprimento de nutrientes, pois o efluente da parboilização do arroz apresenta altas concentrações de fósforo e nitrogênio, com relações C/N adequadas, como citado por Argun et al.(2008). As concentrações finais de carboidratos para o reator efluente foi de  $23,4\text{mg.L}^{-1}$  com remoção de 77,8% de carboidratos e de  $136\text{mg.L}^{-1}$  para o sacarose, com remoção de 60,8%.

As concentrações médias iniciais de DQO dos reatores sacarose e efluente foram de  $363,5\text{mg.L}^{-1}$  e de  $336,4\text{mg.L}^{-1}$  respectivamente. Tanto no reator sacarose quanto no efluente houve uma linearidade na remoção de DQO com o passar do tempo (Fig. 18). As concentrações finais de DQO foram de  $296,0\text{mg.L}^{-1}$  e de  $225,7\text{mg.L}^{-1}$  para os reatores sacarose e efluente respectivamente.

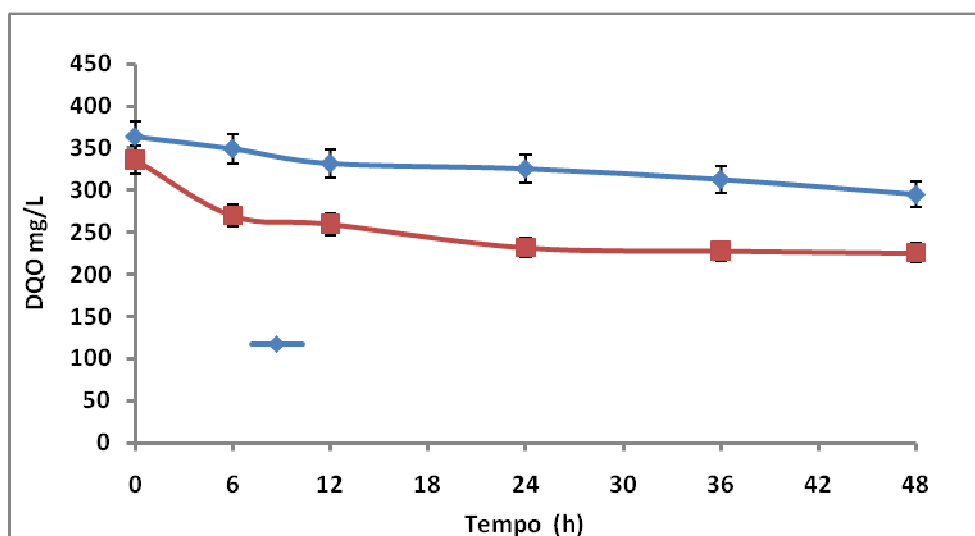


Figura 18 – Concentração de DQO nos reatores acidogênicos com substratos sacarose (◆) e efluente(■). Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM), em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

Os pesquisadores Fernandes (2008), Peixoto (2008), Fernandes et al.(2010) não alcançaram mais de 22% de remoção de DQO tratando diferentes efluentes visando obtenção de hidrogênio.

No reator sacarose foi obtida uma remoção de 18,6% de DQO, concordando com os valores encontrados na literatura. Já para o reator com o substrato a base de efluente da parboilização do arroz, o percentual de remoção de DQO foi superior ao descrito na bibliografia, alcançando um índice de 32,9% (Fig.19).

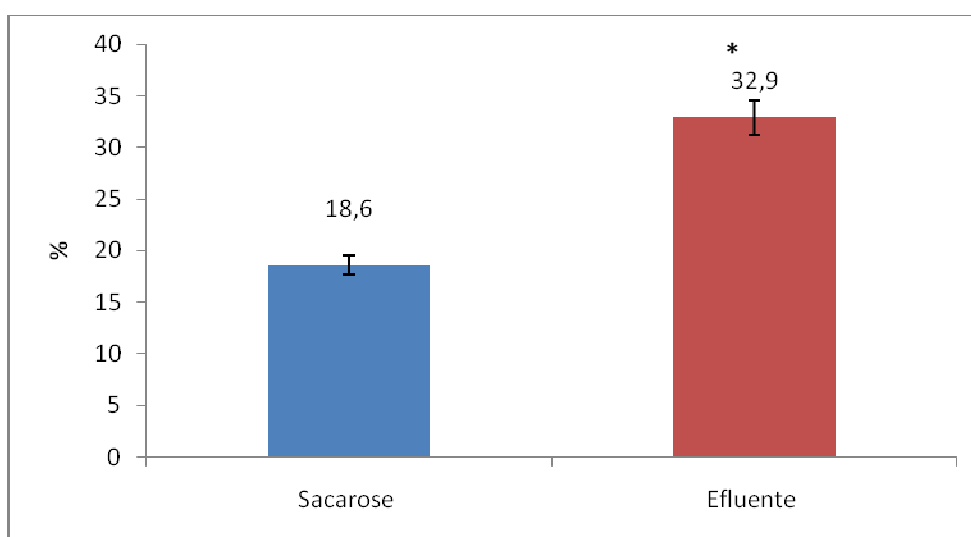


Figura 19 – Remoção de DQO. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) das remoções de DQO nos reatores acidogênicos com substratos sacarose e efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores

O reator sacarose apresentou remoções de carboidratos totais e sacarose inferiores aos valores encontrados para o reator efluente de parboilizado.

### 2.3.2 Produção de hidrogênio pelo efluente da parboilização do arroz

O efluente da parboilização do arroz foi testado como produtor de hidrogênio.

A formação de hidrogênio para o reator sacarose teve um período de aclimação de aproximadamente seis horas, concordando com experimentos em bancada semelhantes desenvolvidos por Fernandes et al.(2010).

De acordo com a Figura 20, o reator efluente sofreu um período de adaptação com produção de hidrogênio mais lenta que a sacarose. Após as seis horas de experimento, o reator efluente de parboilizado sofreu um progressivo aumento até chegar ao ponto de máxima produção, em torno de 20h. Os valores médios de produção de hidrogênio, no final das 48 h foram de 6,3 mL e 8,9 mL para os reatores efluente e sacarose respectivamente.

Das 20 h até as 48 h, os resultados para a produção de hidrogênio de ambos reatores permaneceram constantes. Uma das possíveis causas pela



produção de hidrogênio ser constante após as 20 h é a diminuição da fonte de carboidratos do substrato.

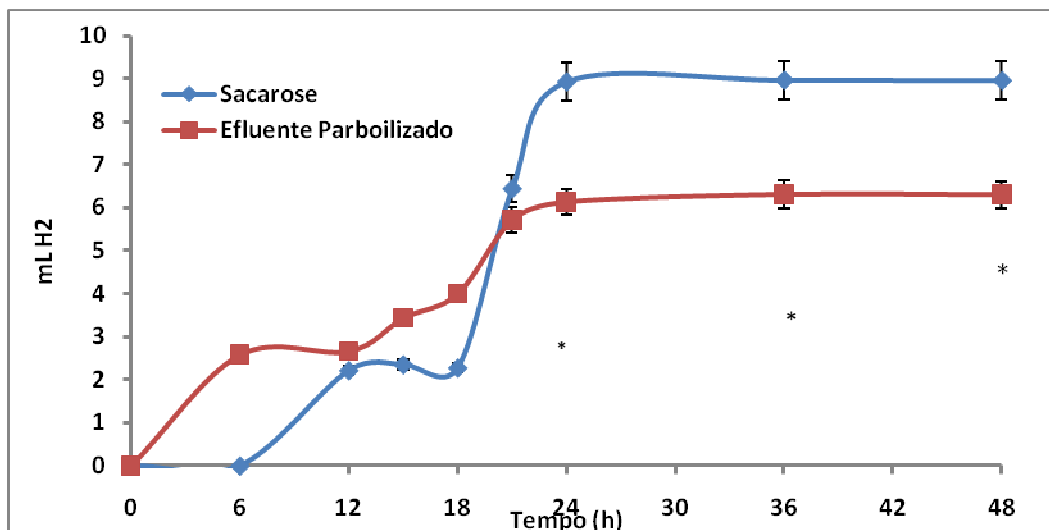


Figura 20 – Volume de hidrogênio no headspace dos reatores acidogênicos. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) dos volumes de hidrogênio no headspace nos reatores com inóculo acidogênico com substratos sacarose (◆) e efluente (■), em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

Embora o reator sacarose tenha apresentado menor remoção de carboidrato, este fato não foi determinante para menor produção de hidrogênio. Carboidratos simples como glicose ou dissacarídeos como a sacarose são de fácil quebra e liberação do gás hidrogênio, diferentemente do que aconteceu com efluentes, esgotos ou outras matérias primas que tem sido testadas como substratos. Segundo Fernandes (2008), os mecanismos para explicar a formação de hidrogênio estão baseados na reação do formiato ou NADH, como descrito na Figura 5 deste trabalho, mas ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas para o real entendimento da produção de hidrogênio, inclusive por vias não produtivas, onde ocorre simultaneamente a produção e consumo deste gás.

Os reatores sacarose e efluente produziram 20,6 mL e 10,3 mL de gás carbônico respectivamente.

Na Figura 21, se observa que no final das 48 horas, o reator que produziu mais hidrogênio também produziu mais gás carbônico.

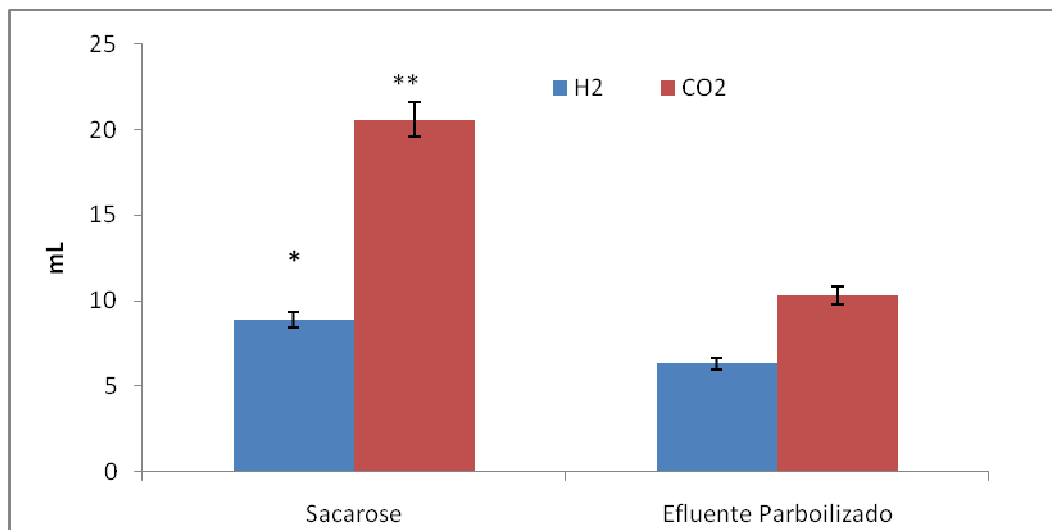


Figura 21 – Volume de hidrogênio e de gás carbônico no *headspace* dos reatores acidogênico. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM) dos volumes de hidrogênio e de gás carbônico no *headspace* nos reatores com inóculo acidogênico e com substratos sacarose e efluente, em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

O lodo acidogênico para os reatores sacarose e efluente de parboilizado foi obtido dos reatores experimentais da Escola de Engenharia Ambiental da Universidade de São Paulo (USP). Estes reatores operam em sistema piloto contínuo, alimentado com substrato sacarose e solução Del Nery de nutrientes, produzindo hidrogênio.

O fato do inóculo obtido dos reatores com lodo acidogênico operar a base de substrato sacarose foi um fator que influenciou na maior taxa de produção de gás hidrogênio neste reator, pois, mesmo obtendo remoções de carboidratos totais e DQO tenha inferiores, o volume de gás hidrogênio produzido no final das 48 horas de experimento foi maior.

A concentração de ácido láctico durante as 48 h de experimento se manteve praticamente constante (Fig.22). A produção deste ácido tem saldo zero de hidrogênio.

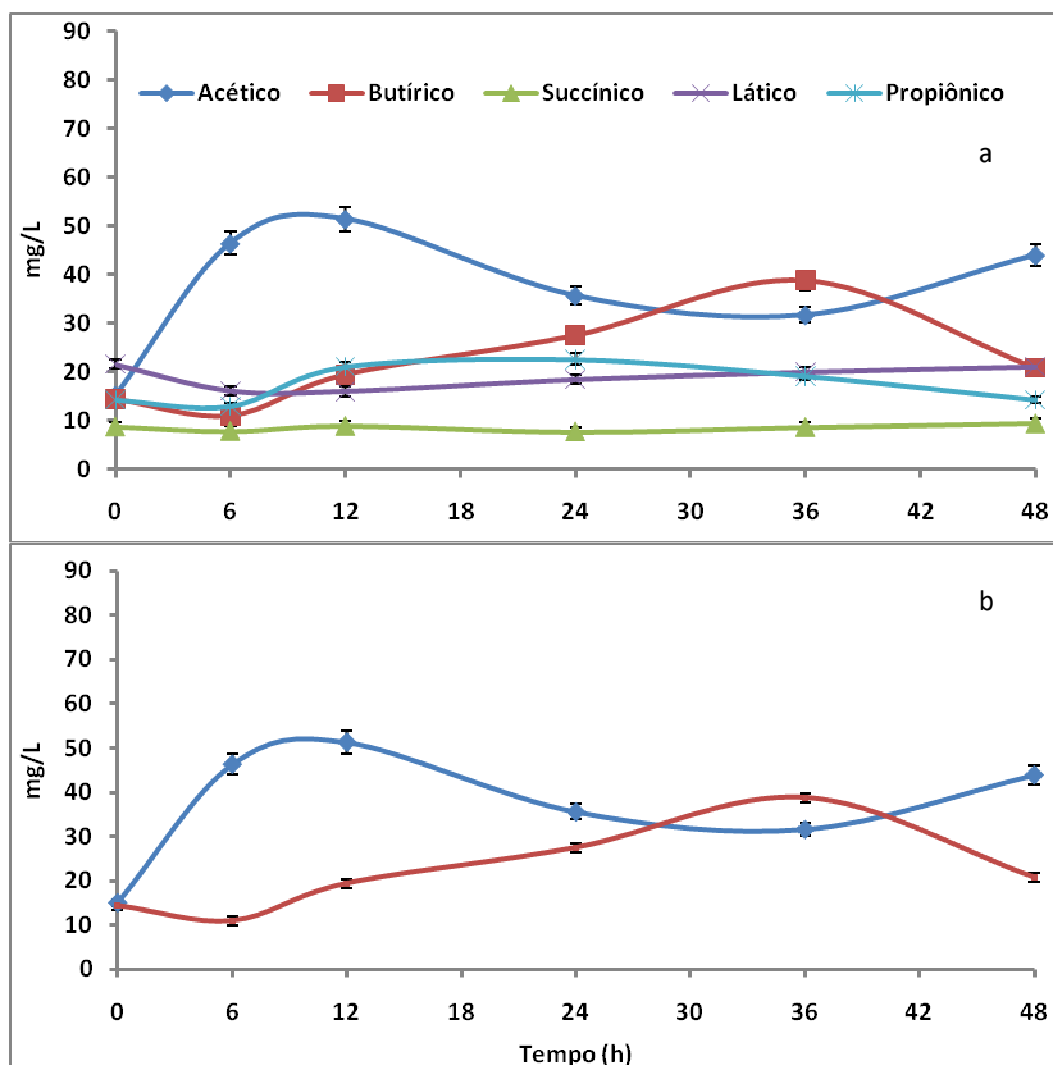


Figura 22 – Variação na concentração dos principais ácidos envolvidos na formação de hidrogênio para o reator sacarose(a) e as concentrações de ácido acético e butírico (b). Os pontos correspondem ao valor médio, na duplicata de reatores, e o erro médio da média.

O ácido butírico, com o passar do tempo de experimento teve sua concentração aumentada, chegando a um máximo na 36h.

O ácido acético foi o ácido de maior concentração até as 24 h de experimento. Este ácido apresentou um aumento da sua concentração após as 6 horas. O aumento na concentração de ácido acético coincide com o aumento na produção de hidrogênio.

Após as 24 horas de experimento, as taxas dos ácidos acético/butírico tenderam a se compensar, pois segundo Sagnak (2010), relações entre ácido acético e butírico elevadas estão relacionadas a produções maiores de gás hidrogênio.

O perfil de ácidos formados no reator efluente pode ser observado na Figura 24. O reator efluente apresentou uma concentração inicial elevada de ácido succínico, o que não foi observado no reator sacarose. O ácido succínico foi consumido ao longo do período de experimento, com concentrações finais semelhantes para ambos os reatores. O ácido láctico, inicialmente teve uma concentração pequena, mas que com o passar do tempo obteve um grande aumento, chegando a concentrações em torno de  $70 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir das 18 horas o ácido láctico foi o de maior concentração no reator efluente, embora se sabe que a formação de ácido láctico tem saldo nulo para produção de hidrogênio.

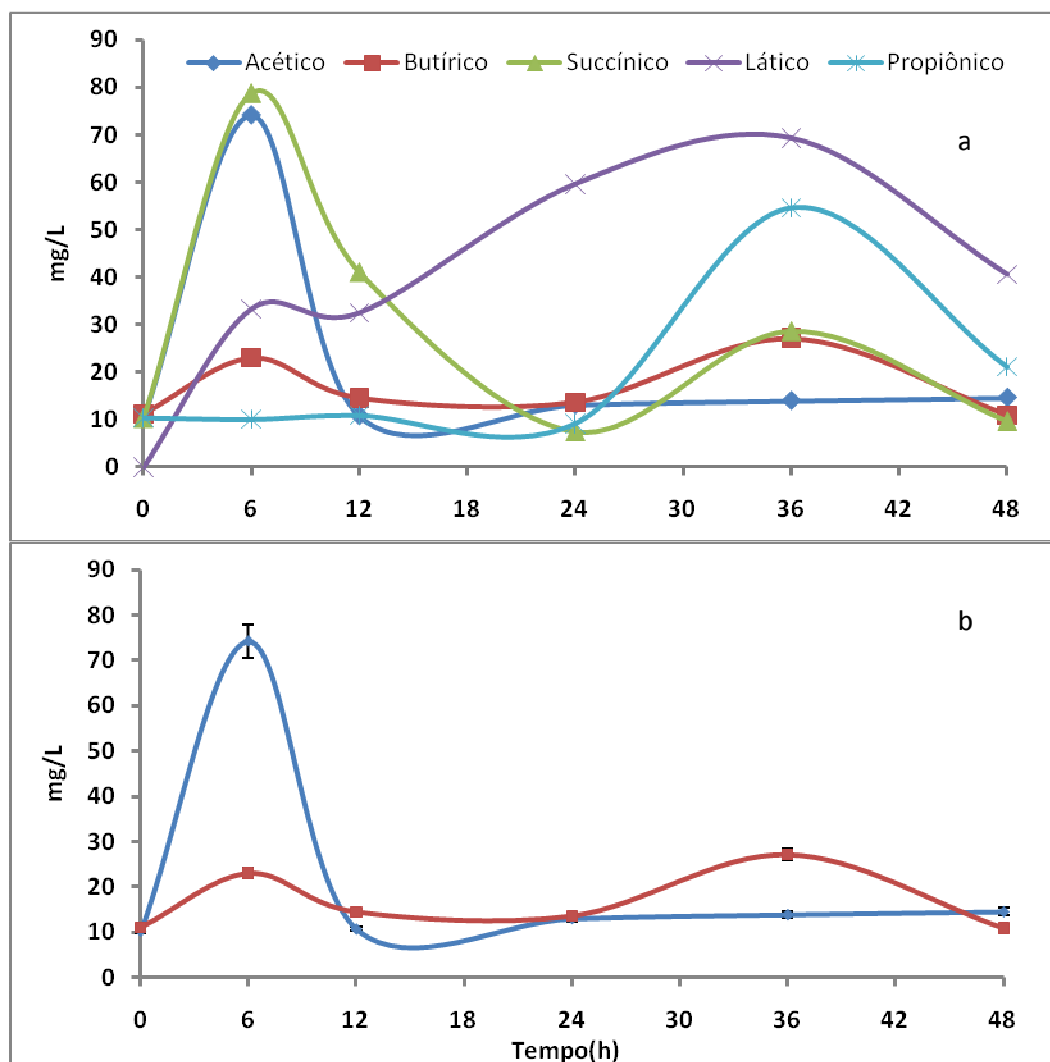


Figura 23 – Variação na concentração dos principais ácidos envolvidos na formação de hidrogênio para o reator efluente(a) e as concentrações de ácido acético e butírico (b). Os pontos correspondem ao valor médio, na duplicata de reatores, e o erro médio da média.

O ácido acético apresentou uma concentração inicial bastante ascendente. O pico da produção de ácido acético foi por volta das 6 horas de experimento, concordando com o início da produção de hidrogênio do reator. A concentração de ácido acético após as seis horas começou a decrescer, se comparando as concentrações de ácido butírico.

Baixas taxas de ácido acético e butírico após as 20 h de experimento podem estar relacionadas as baixas produções de hidrogênio no reator efluente em relação ao sacarose.

### **3 Capítulo 3 – Influência de nutrientes ao substrato da parboilização do arroz na produção de hidrogênio, em reator acidogênico.**

#### **3.1 Introdução**

Os diferentes substratos testados para a produção de hidrogênio por via fermentativa, segundo Hallenbeck (2009) é estudado baseado no conteúdo de carboidratos de tal material. Para o mesmo autor, as proteínas são hidrolisadas a amino ácidos, onde um amino ácido serve de receptor de elétron para outro, não gerando desta forma o hidrogênio.

#### **3.2 Metodologia Específica**

##### **3.2.1 Substrato**

Para a realização deste experimento foram montados três tipos de substratos:

Substrato sem a adição de nutrientes - Efluente da parboilização do arroz, diluído 10 vezes, sem a adição da solução de nutrientes (RSN).

Substrato com a adição de nutrientes – Efluente da parboilização do arroz, diluído 10 vezes, com adição da solução de nutrientes (RN).

Substrato com o dobro de nutrientes – Efluente da parboilização do arroz, diluído 10 vezes, com a adição do dobro de volume da solução de nutrientes (R2N).

### **3.2.2 Inóculo**

O inóculo utilizado foi o inóculo obtido do lodo acidogênico.

### **3.2.3 Condições de temperatura e pH**

As condições de temperatura e de pH foram conforme descrito na metodologia geral.

### **3.2.4 Análises físico-químicas e metodologias analíticas**

As análises físico-químicas foram conforme o descrito na metodologia geral.

O experimento teve batelada de 48h. Os tempos de coleta para avaliação do perfil de carboidratos totais e DQO foram 0h, 18h, 24h e 48h. Para análise da concentração de  $H_2$  no *headspace* os tempos de coleta foram: 0h, 14h, 16h, 18h, 24h e 48h.

### **3.2.5 Análise estatística dos resultados**

Os reatores para avaliação dos experimentos foram montados em duplicata, sendo as variáveis DQO e carboidratos avaliadas em triplicata.

As médias de resultados das análises de carboidratos, DQO, hidrogênio e gás carbônico foram tratados com o teste de Tukey, com  $P > 0,005$ .

### **3.2.6 Montagem dos reatores**

Para avaliar a influencia da adição de nutrientes ao efluente da parboilização na produção de hidrogênio foram montados três reatores: reator sem a adição de nutrientes (RSN), reator com a adição de nutrientes (RN) e reator com o dobro da adição de nutrientes (R2N). Em todos os reatores foram adicionados como inóculo o LA.

## **3.3 Resultados e discussão**

Foi montado um grupo de reatores na qual se avaliou a produção de hidrogênio com três diferentes gradientes de nutrientes (meio nutricional – página 38). Foram montados os reatores sem a adição de solução Del Nery, reator com

adição de solução Del Nery e um terceiro reator com adição do dobro de volume de solução nutriente descrita na metodologia geral.

### 3.3.1 Remoção de Carboidratos e da DQO

Foi monitorada a variação na concentração de carboidratos dos reatores sem adição de nutrientes, com adição normal e com adição do dobro de nutrientes.

Os perfis de consumo de carboidratos podem ser observados no gráfico abaixo:

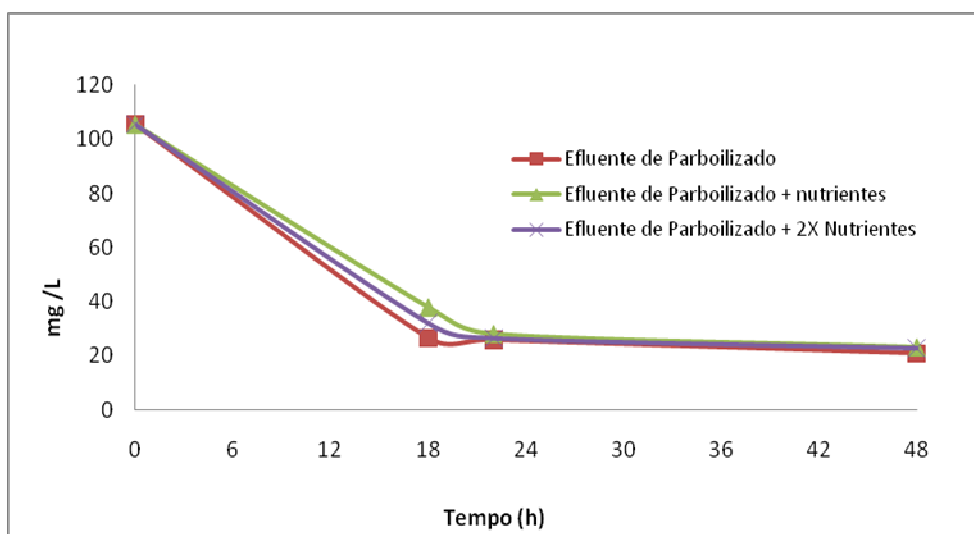


Figura 24 – Concentração de carboidratos nos reatores acidogênicos com substratos efluente e diferentes adição de nutrientes. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM), em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

A concentração inicial de carboidratos para os reatores foi de  $105,6 \text{ mg.L}^{-1}$ . Do ponto inicial até as 18 h foi observado um consumo quase total de carboidratos presentes, mantendo-se praticamente estável das 18 h às 48 h de experimento. As concentrações finais de carboidratos nos reatores foram de  $20,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $23,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $22,8 \text{ mg.L}^{-1}$  para os reatores sem nutrientes, nutrientes e dobro de nutrientes respectivamente. Esses valores correspondem a eficiências de remoção de carboidratos de 80,3%, 78,2%, 78,5%, não apresentando diferença significativa entre os resultados. As 18 h de experimento os três reatores já tinham removido mais de 64%, assim como o que relatou Fernandes et al.(2010), que obteve estabilização da remoção de carboidratos abaixo de 20 horas.

A remoção de DQO foi avaliada nos três reatores, que tiveram a concentração de  $440 \text{ mg.L}^{-1}$  como DQO inicial. O reator sem adição de nutrientes apresentou remoção de 6,8% de DQO nas 18 primeiras horas, com eficiência total de 12,2% de remoção. O reator com nutrientes apresentou remoção de 9,2% nas 18h e total de 20,7%. O reator com o dobro de nutrientes apresentou eficiência de remoção nas primeiras 18h de 13,9% e eficiência nas 48h de 17,6%.

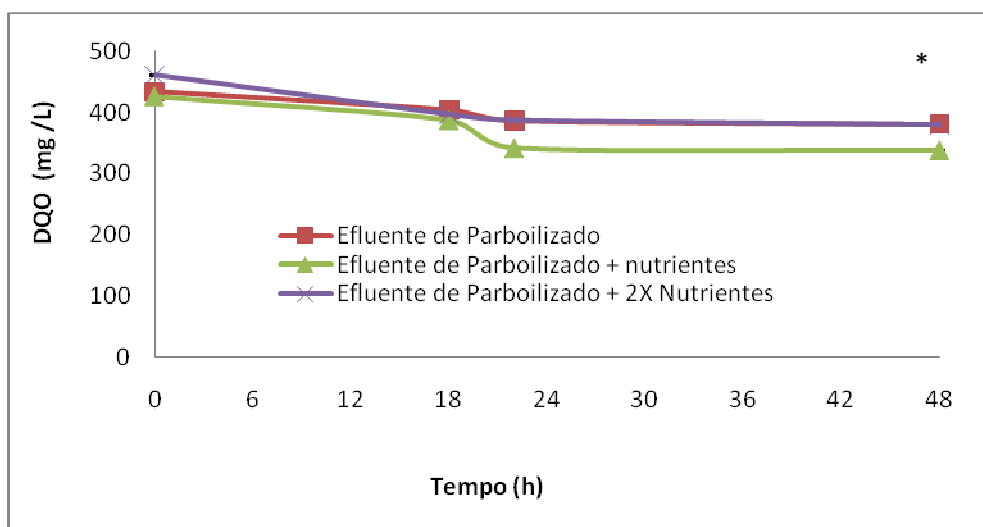


Figura 25 – Concentração de DQO nos reatores acidogênicos com substratos efluente e diferentes adição de nutrientes. Os dados representam as médias ( $\pm$  EPM), em cultivos de batelada. Asteriscos indicam diferença significativa entre os reatores.

Todos os reatores tiveram o mesmo inóculo. Nos três reatores foi adicionada a mesma concentração de substrato, alternando a concentração de nutrientes adicionada em cada um deles.

A Tabela 8 mostra os valores de DQO removida (DQO rem) durante as 48h de operação dos reatores:

Tabela 8 – DQO removida no final das 48 horas em cada reator

	RSN	RN	R2N
DQO removida (mg/L)	52,8	88,4	81,0

A diferença nas remoções de DQO provavelmente esteja associada às diferentes proporções de nutrientes em cada reator. O reator que utilizou substrato sem adição de nutrientes teve uma remoção de DQO menor que o que o reator com adição de nutrientes. O reator que teve adição do dobro de nutrientes não



apresentou remoção de DQO superior ao que teve adição de nutrientes conforme o citado por Peixoto (2008), mas apresentou maior remoção do que o que não teve adição de nutrientes.

### 3.3.2 Produção de hidrogênio e de gás carbônico

Foi avaliada a capacidade de produção de hidrogênio dos três reatores. Segundo Peixoto (2008), a produção de hidrogênio está ligada a disponibilidade também de nutrientes como nitrogênio e fósforo. Lin e Chang (2004) relataram que a taxa C/N é uma variável importante para os processos biológicos de produção de hidrogênio. Os mesmos autores descrevem que o aumento nas taxas de C/N de 40 para 130 que resultou num aumento na DQO de  $6,1 \text{ g.L}^{-1}$  para  $26,5 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente, aumentaram as concentrações de SSV de  $2,3 \text{ g.L}^{-1}$  para  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , indicando que um aumento na relação C/N ocasiona uma modificação na bioatividade da biomassa, expresso pelo aumento da mesma.

Esses autores ainda relacionaram que no aumento da relação C/N de 40 para 130 houve um aumento na produção de hidrogênio de 40 mL para 166 mL, justificando que a produção de hidrogênio esta relacionada com a relação C/N do substrato.

O gráfico abaixo (Figura 26) mostra a produção de hidrogênio obtida pelos reatores:

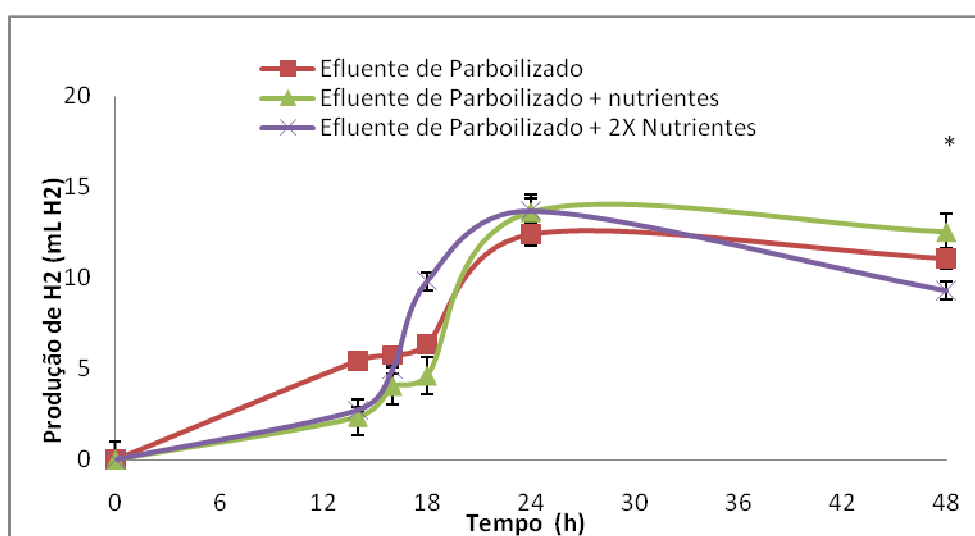


Figura 26 – Obtenção de hidrogênio dos reatores com diferentes adições de nutrientes. Os pontos correspondem ao valor médio, na duplicata de reatores, e o erro médio da média. Asteriscos indicam diferença significativa.

Os três tratamentos apresentaram perfis semelhantes de produção de hidrogênio, tendo um período inicial de aclimação e depois um pico de produção por volta das 20 h e estabilização no decorrer das 24 h posteriores.

O volume de hidrogênio nas 48 horas foram de 12,4 mL, 13,6 mL e 13,7 mL para os reatores sem adição de nutrientes, nutrientes e dobro de nutrientes respectivamente. Não houve diferença significativa entre a produção de hidrogênio dos três tratamentos. A relação de remoção de carboidratos e de produção de hidrogênio pode ser observada neste trabalho, pois para remoções de carboidratos sem diferença significativa houve produção de hidrogênio também sem diferença para os tratamentos.

A produção de gás carbônico nos reatores foi quantificada e esteve diretamente relacionada à remoção de carboidratos e de DQO.

Segundo Chu et al.(2008), a degradação da glicose pode produzir dois ácidos preferenciais: acético e butírico, ambos com a produção de hidrogênio e gás carbônico. É observado que, pela rota de degradação com formação de ácido acético, ocorre a produção de 2 mol de gás carbônico para 4 de hidrogênio e na rota do ácido butírico, a produção de 2 mol de gás carbônico para 2 mol de hidrogênio.

Entre as 12 primeiras horas houve um aumento crescente na produção de gás carbônico para os três reatores, de acordo com a Figura 27.

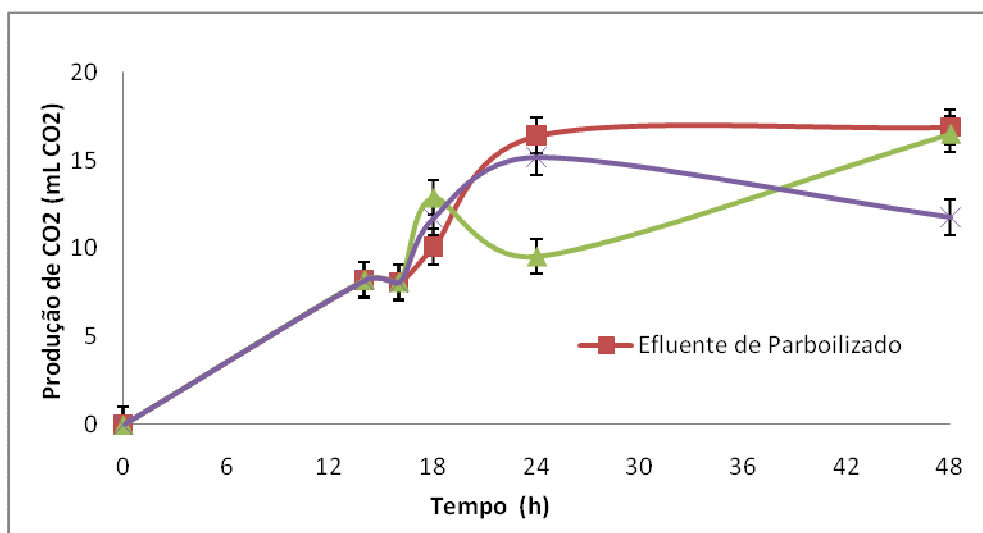


Figura 27 – Obtenção de gás carbônico dos reatores com diferentes adições de nutrientes. Os pontos correspondem ao valor médio, na duplicata de reatores, e o erro médio da média. Asteriscos indicam diferença significativa.

A partir das 18 h o reator sem adição de nutrientes apresentou um acréscimo elevado de produção de hidrogênio até as 24 h, onde se estabilizou até as 48 h, obtendo uma produção máxima de gás carbônico de 16,4 mL. O reator nutriente apresentou uma produção ascendente linear inicialmente, com pico por volta das 18 h de 12,9 mL, um pequeno decréscimo e após as 24 h um aumento até obter o máximo de produção as 48 h de experimento com volume de 15,5 mL.

Comparando-se a produção específica de hidrogênio dos três reatores observa-se que, de acordo com a tabela 9, o reator que produziu mais hidrogênio em relação a DQO removida foi o reator sem a adição de nutrientes.

Tabela 9 – Produção específica de hidrogênio dos reatores

Produção específica mL H <sub>2</sub> / g DQO removida	Sem adição de nutrientes	Nutrientes	Dobro de nutrientes
	235,1	153,9	169,1

Os reatores que sofreram adição de nutrientes demonstraram produções específicas semelhantes entre si. A produção específica de hidrogênio do reator sem a adição de nutrientes foi superior aos valores encontrados por Fernandes et al. (2010) em experimento semelhante, que obteve produção específica de hidrogênio de 200 mL para o substrato sacarose.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados nos permite concluir que o inóculo obtido a partir do lodo anaeróbio de reator UASB tratado termicamente produz hidrogênio com substrato de efluente da parboilização do arroz. Também concluímos que o efluente da parboilização do arroz apresenta potencial para a ser utilizado como substrato para produção de hidrogênio com inóculo acidogênico.

O efluente da parboilização do arroz, quando adicionado meio nutricional, produz hidrogênio, embora que com a adição de nutrientes ao efluente não se observou aumento na produção de hidrogênio. Com isso, o efluente da parboilização do arroz não necessita da adição dos nutrientes testados para a produção de hidrogênio.

## REFERÊNCIAS

- ABIAP. Dados Estatísticos no Brasil. **Dados Estatísticos**. Porto Alegre: 2001. Disponível em: <http://www.abiap.com.br/DadosBrasil.php>. Acesso em: 15 ago. 2010.
- ALMEIDA, Edna, ASSALIN, Márcia Regina, ROSA, Maria Aparecida, DURÁN, Nelson, Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, p. 818-824. 2004.
- AMORIM, Eduardo Lucena Cavalcante, **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidificado**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 192p, 2009.
- APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 st. ed., New York, Washington: APHA (American Public Health Association); 2005.
- ARGUN, Hidayet, KARGI, Fikret, KAPDAN, Ilgi. Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 2195- 2200, 2009.
- ARGUN, Hidayet, KARGI, Fikret, KAPDAN, Ilgi., OZTEKIN, Rukiye, 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**, 33, p. 1813-1819, 2008.
- CHEN, Wen-Hsing; CHEN, Shen-Yi; KHANAL, Samir K.; SUNG, Shihwu, Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2170-2178, 2006.
- CHERNICHARO, C. A. **Reatores Anaeróbios – Princípio do Tratamento Biológico de águas residuárias**, vol. 5, 2ª ed., Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 1997.

CHOU, Chia-Hung; WANG, Cheng-Wei; HUANG, Chieh-Chen; LAY, Jiunn-Jyi, Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1550-1558, 2008.

CHU, Chun Feng; LI, Yu-You; XU, Kai-Qin; EBIE, Yoshitaka; INAMORI, Yuhei, KONG, Hai-Nan, A pH and temperature phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p.4739-4746, 2008.

DAS, Debalrata, VEZIROGLU, Nejat, Advantages in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p.6046-6057, 2008.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbico imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1987.

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

FANG, Herbert H. P., LIU Hong, Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, **Bioresource Tecnology**, v. 82, p. 87-92, 2002.

FANG, Herbert H. P.; LI Chenlin; ZHANG Tong, Ácidophilic biohydrogen production from rice slurry; **International Journal of Hydrogen Energy** ,v. 31, p. 683-692, 2006.

FARIA, Osvaldo Luis Vieira; KOETZ, Paulo Roberto; SANTOS, Magda Santos; NUNES, Wolney Aliodes, Remoção de fósforo de efluente da parboilização do arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada seqüencial (RBS), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 309-317, 2006.

FERNANDES, Bruna; **Produção de Hidrogênio em reator Anaeróbico de leito fixo**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 115 p, 2008.

FERNANDES, Bruna Soares, PEIXOTO, Guilherme; ALBRECHT, Fernanda Rui; DEL AGUILA, Nora Katia Saavedra, ZAIAT, Marcelo, Potential to produce biohydrogen from various wastewaters, **Energy for Sustainable Desenvolpment**, 2010. *In press*

GAVIRIA, Alzate L.M., SEBASTIAN, P.J., PÉREZ, Hernandez, EAPEN, A.D., Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 32, p. 3141-3146. 2007.

GOMEZ X., CUETOS M.J., PRIETO J.I., MORAN, A., Bio-hydrogen production from waste fermentation: mixing and static conditions, **Renewable Energy**, v. 34, p. 970-975, 2009.

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

HALLENBECK, Patrick C., BENEMANN John R., Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1185-1193, 2002.

HAWKES, F., FORSEY H., PREMIER G., DINSDALE R., HAWKES D., GUWY A., MADDY J., CHERRYMAN S., SHINJI, AUTY D., Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 110-119, 2007.

HUNG, C.H.; CHENG, C.H.; CHENG, L.H.; CIANG, C.M.; LIN, C.Y.; application of Clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p.1586-1592, 2008.

IBGE, Participação dos principais Estados produtores de Arroz, **Levantamento sistemático da produção Agrícola**, 2009, Disponível em [http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/produtores\\_arroz.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/produtores_arroz.htm) Acesso em: 11 out. 2010.

KOTAY, Shireen Meher; DAS, Debabrata; Biohydrogen as a renewable energy resource – Prospects and potentials, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 258-263, 2008.

LÁZARO, Carolina Zampol, **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 127 p, 2009.

LEITE, José A.C., FERNANDES, Bruna, POZZI, Eloisa, BARBOSA, Marlei, ZAIAT, Marcelo, Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 33, p. 579-586, 2008.

LEITE, Tatiane Lotufo, ROLL, Adriane Letnin, PEREIRA-RAMIREZ, Orlando, Eficiência da Remoção de DQO e carga orgânica aplicada a reator UASB com pós tratamento de lodo ativado – um estudo de caso. In: 1ª Mostra de Trabalhos de Tecnologia Ambiental, 2008.

LIN, Chiu-Yue, CHANG, Rong-Chong, Fermentative hydrogen production at ambient temperature, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p.715-120, 2004.

LIU, Dawey; LIU, Dapeng; ZENG, Raymond J.; ANGELIDAKI, Irini; Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process, **Water Research**, v. 40, p. 2230-2236, 2006.

MAINTINGUER, Sandra Imaculada; **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado a produção de hidrogênio**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 167 p, 2009.

MIRITIZ, Luciane Dittgen; **Diferenciação e diversificação na agroindústria arrozeira do Rio Grande do Sul**. – Programa de Pós Graduação em Agronegócio,UFRGS, 2007.

PEIXOTO, Guilherme; **Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado e fluxo ascendente a partir de água residuária da indústria de refrigerantes**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 123 p, 2008.

PRAKASHAM, R.S, BRAHMAIAH, P., SATHISH T.,SAMBASIVA RAO K.R.S.,Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: impact of glucose to xilose ratio, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 34, p. 9354-9361, 2009.

REN, Nanqi; LI, Jianzheng; LI, Baikun, Wang, Yong, LIU, Shirui. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 31, p. 2147-2157, 2006.

SAGNAK, Rana, KAPDAN, Ilgik, KARGI, Fekret, Dark fermentation of acid hydrolysed grownd wheat starch for bio-hydrogen production by periodic feeding and effluent removal, **International Journal of Hydrogen Energy** , p. 1-7, 2010.

SHIDA, Gessia M.; **Produção de Hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado**, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 121 p, 2008.

SREETHAWONG, Thammanoon, CHATSIRIWATANA, Suchawadee, RANGSUNVIGIT, Pramoch, CHAVADEJ, Sumaeth, Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor:Effects of operational parameters COD:N ratio and organic composition, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 35, p. 4092-4102, 2010.

VALDEZ-VAZQUEZ, I, POGGI-VARALDO, H.M., Hydrogen production by fermentative consortia, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 2008.

VIJAYARAGHAVAN, Krishnan, AHMAD, Desa, SONING Christianto. Bio-hydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32 , p.4754-4760, 2006.

WANG, Mei-Yun; TSAI, Yu-Li; OLSON, Betty H.; CHANG, Jo-Shu; Monitoring dark fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR; **International Journal of Hydrogen Energy** , p. 1-9, 2008.



WANG, Jianlong, WAN, Wei, Factors influencing fermentative hydrogen production: a review, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799-811, 2009.

YANG, Mu, ZHEN, Mian-Jun, YU Han-Qing, ZHU, Ren-Fa, Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures, **International Journal of Hydrogen Energy** , v. 31, p. 780-785, 2006.

XIN Mei Guo, et al., Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review, **International Journal of Hydrogen Energy** , p. 1-14. 2010. *In press*

ZHU, Heguang, PARKER Wayner, BASNAR Robert, PRORACKI Alexander, FALLETTA Pat, BÉLAND, Michel, SETO, Peter, Biohydrogen production by anaerobic co-digestion of municipal food waste and sewage sludges, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 3651-3659, 2008.

## **APÊNDICE**

Apêndice 1 - Método adaptado de Dubois para determinação de Carboidratos.

### **CARBOIDRATOS**

#### Reagentes

Solução de fenol (5%) – Dissolver 2,5g de fenol em um béquer e transferir para um balão de 50mL;

Ácido sulfúrico concentrado.

#### Procedimento

Em um tubo de ensaio, colocar 1,0 mL da amostra filtrada em membrana de 0,45 µm;

Adicionar 1 mL da solução de fenol (5%);

Agitar;

Adicionar rapidamente contra a superfície das amostras 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado para obter uma boa mistura;

Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente;

Agitar;

Deixar em repouso em banho de água a temperatura entre 25 e 30°C por 15 minutos;

Ler absorbância a 490nm.