

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Lizet Miriam Guevara Roman

**PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DA CASCA DE
ARROZ VIA PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA**

Santa Maria, RS
2021

Lizet Miriam Guevara Roman

**PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ VIA
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestra em Engenharia Ambiental**.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alcaraz-González

Santa Maria, RS
2021

Guevara Roman, Lizet Miriam
Produção de bio-hidrogênio a partir da casca de arroz
via processo de fermentação escura / Lizet Miriam Guevara
Roman.- 2021.
77 p.; 30 cm

Orientador: Victor Alcaraz-González
Coorientador: Andressa De Oliveira Silveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, RS, 2021

1. Biomassa lignocelulósicas 2. Hidrólise ácida 3. Bio
Hidrogênio I. Alcaraz-González, Victor II. De Oliveira
Silveira , Andressa III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

©2021

Todos os direitos autorais reservados a Lizet Miririam Guevara Roman. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Cinco de Março, n. 179, Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105300

Fone (055)51 94988 8010; E-mail: lizetguevarar@gmail.com

Lizet Miriam Guevara Roman

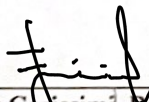
**PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ VIA
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestra em Engenharia Ambiental**.

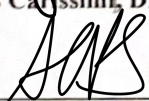
Aprovado em 30 de agosto de 2021:



Victor Alcaraz-González, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)



Ana Lucia Prieto Santa, Dra. (UCHILE)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

A mis padres German Guevara Alarcón y Miriam Roman Cristobal, por el amor y apoyo incondicional en todas mis elecciones. Ustedes son mi principal soporte en mi vida.

A mis hermanos William y Paloma, porque en ellos veo el significado de perseverancia, compromiso e inteligencia.

Ao meu namorado Murillo Figueiredo, e ao nosso cachorrinho “Biscoito”, pelo amor, amizade, companheirismo, e por sempre estarem ao meu lado, me incentivando e apoiando.

Ao meu orientador Víctor Alcaraz, por ter me confiado este projeto de mestrado, pelos ensinamentos, apoio, contribuição para meu crescimento profissional, e pela amizade.

À minha coorientadora Andressa de Oliveira, pela orientação, apoio, contribuição e palavras de incentivo e reconhecimento durante o período do mestrado.

Aos professores Fábio Parreira e Delmira Wolff, pela confiança depositada, espero ter atingido a suas expectativas.

Às minhas famílias do coração em Chapecó, Santa Maria e Santiago. Vocês são meu porto seguro e ficarei sempre grata por ter me recebido com muito amor. Obrigada por me permitir conviver com vocês, conhecer mais sua cultura, tradições, e poder amá-las tanto quanto à minha.

A mis mejores amigos en Perú, Giuliana, Lucía, Luis y Pedro. Sin duda la distancia no fue un obstáculo para seguir con las risas, tristezas y logros.

Aos meus amigos que o Brasil me apresentou, alguns deles de diferentes nacionalidades, mas que a gente se entende né? Fabiele, Kelly, Siara, Sonia, Rolando, Bernardo e Eduardo, obrigada pela paciência, parceria e risadas.

Aos professores, responsáveis e analistas dos laboratórios LEMA, LMI e LEPA, por resolverem minhas dúvidas e apoiarem sempre.

Aos laboratoristas Tanize Bortolotto e Gustavo Ugalde, pelo auxílio na realização das análises cromatográficas. Muito Obrigada pela atenção e disposição.

À Universidade Federal de Santa Maria, juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, pelo suporte oferecido para desenvolvimento deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o período do mestrado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

A felicidade só é verdadeira
quando compartilhada.

(Lord Byron)

RESUMO

PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DA CASCA DE ARROZ VIA PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA

AUTORA: Lizet Miriam Guevara Roman

ORIENTADOR: Víctor Alcaraz-González

No mundo contemporâneo, é perceptível a crescente demanda global por energia, a redução de recursos energéticos não renováveis e a preocupação com a qualidade do meio ambiente. É sabido que a demanda por hidrocarbonetos, que é a fonte de energia mais utilizada hoje, supera as reservas previstas para as próximas décadas. Além disso, o impacto ambiental que sua utilização causou é responsável pelo aquecimento global, destruição da camada de ozônio e desaparecimento dos sistemas ecológicos no que algumas pessoas chamam de sexta extinção em massa. Assim, o Bio-hidrogênio (Bio-H₂) pode facilitar a descarbonização de certas atividades emissoras de carbono, pois produzido via processo de fermentação escura, é considerado mais viável, ecológico e sustentável, uma vez que não necessita de fonte de energia externa e diversos tipos de biomassas lignocelulósicas podem ser utilizadas como fonte de carbono pelos microrganismos produtoras de hidrogênio (H₂). Neste sentido, o objetivo deste trabalho é aproveitar a casca de arroz (CA) e avaliar a produção de Bio-H₂ via processo de fermentação escura sob diferentes tipos de inóculo. A CA foi caracterizada, preparada e submetida ao processo de hidrólise ácida com diferentes concentrações de H₂SO₄ e avaliada a partir do teor de açúcares totais (AT) e concentração dos inibidores. O hidrolisado selecionado foi, então, utilizado como substrato no processo de fermentação escura, empregando-se dois diferentes tipos de lodo, o lodo anaeróbico granulado (LAG) e lodo do tanque séptico (LTS), como inóculo. Os ensaios de fermentação escura foram conduzidos no reator com razão substrato/inóculo de 9 na de temperatura meia de 35,8 °C e do pH inicial neutro (6,5 - 7) e monitorados por um período de 29 ± 1h aproximadamente. A condição experimental que apresentou maior recuperação de açúcares totais foi o pré-tratamento ácido ao 1% v/v H₂SO₄. Nessa condição, a recuperação de AT foi 201 g kg CA⁻¹ e as concentrações dos inibidores foram menores do limite de quantificação de 0,005 g L⁻¹ para o furfural e 0,0005 g L⁻¹ para o 5-HMF. Para a produção e rendimento máximo do Bio-H₂ foi de 5,37 mL g CA⁻¹ e 0,179 mL H₂ h⁻¹ g CA⁻¹, respectivamente. Por fim, conclui-se que o hidrolisado (1% v/v H₂SO₄) como substrato e LAG como inóculo apresentou características apropriadas para produção de Bio-H₂ via processo de fermentação escura, levando a resultados promissores quanto comparados à literatura.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósicas. Hidrólise ácida. Bio-Hidrogênio.

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIO-HYDROGEN FROM RICE HUSK VIA DARK FERMENTATION PROCESS

AUTHOR: Lizet Miriam Guevara Roman

ADVISOR: Víctor Alcaraz-González

In the contemporary world, the growing global demand for energy, the reduction of non-renewable energy resources and the concern with the quality of the environment are noticeable. It is well known that the demand for hydrocarbons, which are the most energy source used today, exceeds the reserves forecast for the next decades. Furthermore, the environmental impact that their utilization has caused is responsible for global warming, destruction of the ozone layer, and disappearance of ecological systems in what some people call the sixth massive extinction. Thus, Bio-hydrogen (Bio-H₂) can facilitate the decarbonization of certain carbon-emitting activities, as it is produced via dark fermentation, which is considered more viable, ecological and sustainable since it does not require an external energy source. Several types of lignocellulosic biomass can be used as a carbon source by microorganisms producing hydrogen (H₂). In this sense, the objective of this work is to use rice husk (RH) and evaluate the production of H₂ via the dark fermentation process under different types of inoculums. RH was characterized, prepared and submitted to the acid hydrolysis process with different concentrations of sulfuric acid and evaluated was performed based on the content of total sugars (TS) and at various concentrations of inhibitors. The selected hydrolyzate was then used as a substrate in the dark fermentation process, using two different types of sludge, anaerobic sludge granulation (ASG) and septic tank sludge (STS). The dark fermentation tests were carried out in a reactor with a substrate/inoculum ratio of 9 in the middle-temperature range of 35.8°C and neutral initial pH (6.5 - 7) and monitored for a period of 29 ± 1h approximately. The experimental condition that showed the highest total sugar recovery was the acid pretreatment to 1% v/v H₂SO₄. The recovery of TS in this condition was 201g kg RH⁻¹, and inhibitor concentrations were less than the limit of quantification of 0.005 g L⁻¹ for Furfural and 0.0005 g L⁻¹ for 5-HMF, and the production and maximum yield of Bio-H₂ were 5.37mL g RH⁻¹ and 0.179 mL H₂ h⁻¹ g RH⁻¹, respectively. Finally, it is concluded that the hydrolysate (1% v/v H₂SO₄) as substrate and ASG as inoculum exhibited adequate properties for the generation of Bio-H₂ via the dark fermentation method, yielding promising results when compared to the literature.

Keywords: Lignocellulosic biomass. Acid hydrolysis. Bio-Hydrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias metabólicas para a conversão do substrato em Bio-H ₂ durante a FE	18
Figura 2 - Progresso da produção cumulativa de H ₂ em diferentes temperaturas	20
Figura 3 - Porcentagem de H ₂ , CO ₂ e CH ₄ no biogás em diferentes TRH.....	22
Figura 4 - Variações das concentrações de carboidratos e produções cumulativas de H ₂	22
Figura 5 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	25
Figura 6 - Principais pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica na produção de Bio-H ₂	27
Figura 7 - Métodos de pré-tratamento para o inóculo	30
Figura 8 - Inibidores da produção de Bio-H ₂	33
Figura 9 - Principais efeitos dos resíduos RFH	34
Figura 10 - Relação entre os produtos da fermentação e a produção de H ₂	36
Figura 11 - Composição AGV nas amostras pós-fermentação escura na CA	40
Figura 12 - Curva de calibração de açúcares totais	42
Figura 13 - Pré-tratamento da casca de arroz	43
Figura 14 - Hidrolisado ácido da casca de arroz	43
Figura 15 - Fluxograma representativo do substrato	45
Figura 16 - Cultivo de Agar sangue.....	46
Figura 17 - Abundância Relativa das amostras de lodo do TS-UFSM, em nível de ordem....	46
Figura 18 - Fluxograma representativo do inóculo	48
Figura 19 - Unidade de produção do Bio-H ₂	49
Figura 20 - Fluxograma do processo de fermentação escura para produção de Bio-H ₂	50
Figura 21 - Concentração de açúcares totais para os pré-tratamentos da CA	52
Figura 22 - Produção acumulativa de Bio-H ₂	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fonte e pré-tratamento do inóculo na produção de Bio-H ₂	31
Quadro 2 - Métodos de pré-tratamento da casca de arroz para produção de Bio-H ₂	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da temperatura na produção de Bio-H ₂	19
Tabela 2 - Efeito do pH na produção de H ₂	21
Tabela 3 - Composição química de biomassas lignocelulósicas para produção de Bio-H ₂	26
Tabela 4 - Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica para produção de Bio-H ₂	28
Tabela 5 - Porcentagem de açúcares em hidrolisados após do pré-tratamento ácido.....	29
Tabela 6 - Concentrações dos inibidores de derivados de furano na produção de H ₂	35
Tabela 7 - Quantidade produzida de arroz com casca no Brasil e no estado do RS.....	37
Tabela 8 - Propriedades da casca de arroz.....	38
Tabela 9 - Ensaios experimentais do pré-tratamento da casca de arroz	42
Tabela 10 - Concentração de açúcares totais e inibidores dos hidrolisados	53
Tabela 11 - Recuperação de AT e concentração dos inibidores Furfural e 5HMF	54
Tabela 12 - Caracterização dos inóculos	54
Tabela 13 - Remoção de MO antes e após de cada ensaio	56
Tabela 14 - Comparação na produção de Bio-H ₂	57
Tabela 15 - Produção de Bio-H ₂ a partir dos açúcares totais	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima
AGV	Ácidos graxos voláteis
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AT	Açúcares totais
ATP	Adenosina trifosfato
Bio-H ₂	Bio-Hidrogênio
CA	Casca de Arroz
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DNS	Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química Oxigênio
ETE	Estação de Tratamentos de Efluentes
FE	Fermentação escura
LAG	Lodo anaeróbio granular
LEMA	Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente
LMI	Laboratório de Materiais Inorgânicos
LTS	Lodo do tanque séptico
MO	Matéria orgânica
N ₂	Nitrogênio gás
NAD ⁺	Íon dinucleotídeo
NADH	Adenina dinocleotídeo
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PFL	Piruvato-formato liase
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidorreductase
ST	Sólidos toais
SV	Sólidos voláteis
Tra1	Pré-Tratamento ácido ao 1% v/v H ₂ SO ₄
Tra2	Pré-Tratamento ácido ao 3% v/v H ₂ SO ₄
Tra3	Pré-Tratamento ácido ao 5% v/v H ₂ SO ₄
TRH	Tempo de retenção hidráulica
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC	Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	FERMENTAÇÃO ESCURA	17
3.2	FATORES QUE INTERFEREM NA FERMENTAÇÃO ESCURA	19
3.2.1	Temperatura	19
3.2.2	pH	20
3.2.3	Tempo de retenção hidráulica	21
3.2.4	Pressão parcial	23
3.2.5	Substrato	25
3.2.5.1	<i>Pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas</i>	26
3.2.6	Inóculo	29
3.2.6.1	<i>Pré-tratamento do inóculo</i>	30
3.2.7	Inibidores da fermentação escura	31
3.3	PRODUÇÃO DE BIO-H ₂ A PARTIR DA CASCA DE ARROZ	37
3.3.1	Substrato: Casca de arroz	37
3.3.2	Cooprodução de bioálcool e ácido graxos voláteis	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	MATÉRIA PRIMA	41
4.1.1	Caracterização da matéria prima	41
4.2	HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ	42
4.3	SUBSTRATO.....	44
4.4	INÓCULO	45
4.4.1	Determinação do teor de umidade e sólidos totais	47
4.4.2	Determinação do teor de sólidos voláteis	47
4.4.3	Determinação do teor de cinzas	48
4.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA	49
4.5.1	Processo da fermentação escura	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ	52
5.2	HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ	52
5.3	PRODUÇÃO DE BIO-H ₂	54
6	CONCLUSÃO	60
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

O mundo está sob grande pressão para administrar os desafios do desenvolvimento sustentável. As pessoas estão usando uma parcela cada vez maior dos recursos da terra e corroendo a capacidade da natureza de restaurar o equilíbrio. As cidades do mundo ocupam apenas 3% da superfície da Terra, mas a crescente população urbana consome mais de 75% da produção global de energia e muitos dos recursos remanescentes da Terra.

Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas apelam à ação de todos os países para promover a prosperidade e proteger o planeta. ODS 11 ‘Cidades e comunidades sustentáveis’ deve ser considerado um objetivo crítico que afetará as realizações de vários outros ODS. Isso envolve pelo menos dois ODS que devem ser considerados no desenvolvimento de projetos de energia e sustentabilidade ambiental: energia acessível e limpa (ODS 7) e ação contra a mudança global do clima (ODS 13). Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias para produzir energia renováveis e limpas enquadradas nos ODS exige atenção especial.

A Revisão Global de Energia 2021 ou *Global Energy Review 2021* avalia a direção que a demanda de energia e as emissões de dióxido de carbono (CO₂) estão tomando no 2021. As emissões de CO₂ caíram mais do que a demanda de energia no 2020 devido à pandemia (COVID-19), diminuindo a demanda por petróleo e carvão, porém aumentando a demanda por energias renováveis (IEA, 2019). Apesar do declínio, as emissões globais de CO₂ se mantiveram elevadas (412,5 partes por milhão) (IEA, 2019). No 2021, as emissões globais de CO₂ relacionadas à energia devem se recuperar e crescer 4,8% conforme a demanda por carvão, petróleo e gás se recupere com a economia (IEA, 2019). Este fator, associado à redução das reservas de fontes fósseis de energia, ao aumento do preço dos hidrocarbonetos e da demanda energética mundial, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, Índia e China, têm incentivado a utilização de fontes renováveis de energia (IEA, 2019).

O Brasil responde bem aos desafios de energia mais urgentes do mundo. O acesso à eletricidade em todo o país é quase universal e as energias renováveis atendem a quase 45% da demanda de energia primária, tornando o setor de energia do Brasil um dos menos intensivos em carbono do mundo (IEA, 2019). Além da diminuição de recursos energéticos não renováveis e a preocupação com a qualidade do meio ambiental tem aumentado o interesse em fontes alternativas de energia (IEA, 2019).

O Hidrogênio (H₂), como transportador de energia neutro em carbono, pode facilitar a descarbonização de certas atividades emissoras de carbono (IEA, 2019). Não só o H₂ tem

rendimento de energia de 122 KJ g^{-1} , que é 2,75 vezes maior do que a energia à base de hidrocarbonetos e produz energia emitindo vapor d'água (STAFFELL *et al.*, 2019). O H_2 também pode ser considerado limpo e sustentável, porém a produção de H_2 com base fóssil está liberando de 70 a 100 milhões de toneladas de CO_2 anualmente na Europa (EU, 2020).

Na atualidade, as principais tecnologias de produção de H_2 são eletrólise, reforma de líquido e reforma de gás natural ou gaseificação (EERE, 2020b). Esta última contribui com 95% da produção industrial de H_2 de hoje usando matérias-primas fósseis (EERE, 2020a). Nesse contexto, o H_2 renovável ou Bio-Hidrogênio (Bio- H_2) pode superar os obstáculos econômicos e tecnológicos. Assim, o critério de sustentabilidade poder ser atendido pela adoção de processos biológicos para sua produção e a substituição de matéria-prima fóssil por recursos renováveis ou resíduos orgânicos.

Os processos mais promissores para a produção de Bio- H_2 envolvem biofotólise direta da água por algas verdes, biofotólise indireta da água por cianobactérias, fotofermentação por bactérias fotossintéticas e fermentação escura por bactérias anaeróbias estritas ou facultativas (BATSTONE *et al.*, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2015; HALLENBECK; GHOSH, 2009; RAJHI *et al.*, 2016; WANG, J.; YIN, 2018). Esta última, ganha interesse generalizado por sua independência da luz, geralmente alta taxa de produção de H_2 , baixo custo na configuração do reator e fácil controle (BATSTONE *et al.*, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2015; HALLENBECK; GHOSH, 2009; RAJHI *et al.*, 2016; WANG, J.; YIN, 2018).

A fermentação escura consiste na conversão de açúcares simples, puros ou naturalmente contidos nos resíduos orgânicos, em hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos a partir de microrganismos na ausência de oxigênio (HALLENBECK; GHOSH, 2009; RAJHI *et al.*, 2016; YIN; WANG, 2016). As bactérias anaeróbias, estritas ou facultativas, utilizadas para produção de H_2 podem ser culturas puras (*Clostridium* e *Enterobacter*) ou mistas (provenientes de lodo anaeróbio, esterco bovino, composto orgânico, resíduos sólidos urbanos ou solo) (GHIMIRE *et al.*, 2015). Além dos benefícios duplos de geração de energia limpa e gerenciamento de resíduos que podem ser alcançados quando resíduos orgânicos tais como as biomassas lignocelulósicas, são usados como substratos (BATSTONE *et al.*, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2015; HALLENBECK; GHOSH, 2009; RAJHI *et al.*, 2016; WANG, J.; YIN, 2018). Uma das principais restrições ao processo de fermentação escura para a produção de H_2 é o baixo rendimento (4mols de H_2 por mol de glicose ou 3,33 mols de H_2 por mol de xilose) em comparação aos processos químicos ou eletroquímicos existentes. Por tanto, a obtenção de rendimentos mais elevados de hidrogênio é principal desafio de investigação dos processos fermentativos (DAS; VEZIROGLU, 2001).

Os subprodutos do processamento do arroz apresentam-se em elevada disponibilidade e baixo custo no Estado do Rio Grande do Sul, sendo na maioria das vezes subutilizados. Diante desse contexto a proposta desta investigação foi aproveitar a casca de arroz gerado no estado de Rio Grande do Sul – Brasil, para a produção de Bio-H₂ a partir do processo de fermentação escura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e o rendimento de Bio-H₂ produzido a partir da casca de arroz via processo de fermentação escura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os parâmetros físico-químicos da casca de arroz;
- Avaliar o pré-tratamento da casca de arroz sob diferentes concentrações de ácido sulfúrico;
- Avaliar a produção de Bio-H₂ a partir do lodo do tanque séptico da ETE da UFSM e lodo anaeróbico da indústria cervejeira.

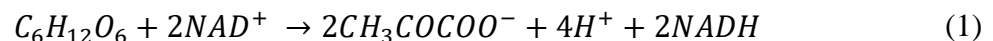
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FERMENTAÇÃO ESCURA

O Bio-H₂ é uma fonte de energia renovável e pode ser produzido usando várias tecnologias (fotólise, reações termoquímicas, fotofermentação e fermentação escura) (DAUPTAIN *et al.*, 2020; EERE, 2020b; ERGAL *et al.*, 2018). A fermentação escura (FE) ganhou atenção significativa devido ao alto rendimento, tempo de reação limitado e capacidade de utilizar uma ampla gama de resíduos de material orgânico como matéria-prima (DAUPTAIN *et al.*, 2020; NTAIKOU; ANTONOPOULOU; LYBERATOS, 2010; YASIN *et al.*, 2013).

Embora o processo de FE usa biomassas lignocelulósicas como matéria-prima (BATSTONE *et al.*, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2015; HALLENBECK; GHOSH, 2009; RAJHI *et al.*, 2016; WANG, J.; YIN, 2018), juntamente com a produção de ácidos graxos voláteis (MARTINEZ- BURGOS *et al.*, 2019; SYDNEY *et al.*, 2020). A geração de Bio-H₂ via processo de FE é obtida principalmente por microrganismos anaeróbicos estritos e facultativos que podem ser usados na forma de culturas puras (por exemplo, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*) e culturas mistas (por exemplo, lodo anaeróbio, esterco bovino, composto orgânico), respectivamente (SAADY, 2013; WONG, Y.-M.; WU; JUAN, 2014).

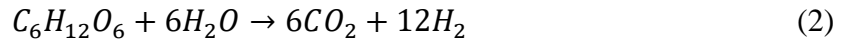
No decorrer do processo de fermentação escura, utilizando como substrato a glicose, esta é degradada pela ação do íon dinucleotídeo (NAD⁺) em piruvato, H⁺ e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) conforme descrito na Equação 1 (equação da glicólise) (DAS; VEZIROGLU, 2001).



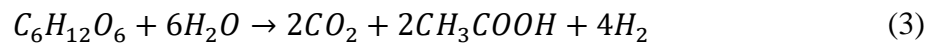
O piruvato é o principal produto intermediário do processo de fermentação escura. Ele é oxidado a Acetilcoenzima A (Acetil-CoA), dióxido de carbono e H₂ através de duas rotas possíveis: piruvato-formato liase (PFL) e a via piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) (Figura1) (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). Os microrganismos facultativos (*Bacillus*, *Enterobacter*) geram hidrogênio usando o sistema de PFL, enquanto as anaeróbicas (*Clostridium*) os obtêm usando o sistema PFOR (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). O Acetil-CoA também pode ser convertido em vários compostos orgânicos sendo produtos de fermentação com valor agregado (etanol, butanol, acetona, ácido butírico ou ácido acético) com

a oxidação simultânea de NADH e/ou formação de Adenosina Trifosfato (Figura 1) (HALLENBECK, 2012; HAWKES, F. *et al.*, 2007).

Teoricamente a quantidade estequiométrica máxima de hidrogênio molecular por mol de glicose é 12 mol, de acordo com a Equação 2 (HALLENBECK, 2012).



No entanto a formação de vários produtos finais, como os ácidos acético, butírico e propiônico, além do metanol, butanol ou acetona, diminui a quantidade de hidrogênio produzido na fermentação (HALLENBECK, 2012). A formação de ácido acético diminui a quantidade de hidrogênio molecular formado de doze moles para quatro moles (Equação 3).



Se o ácido butírico for o produto final, um mol de glicose produz apenas dois moles de hidrogênio (Equação 4) (HALLENBECK, 2012).

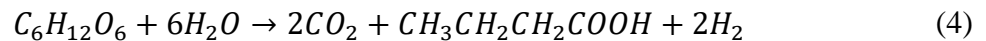
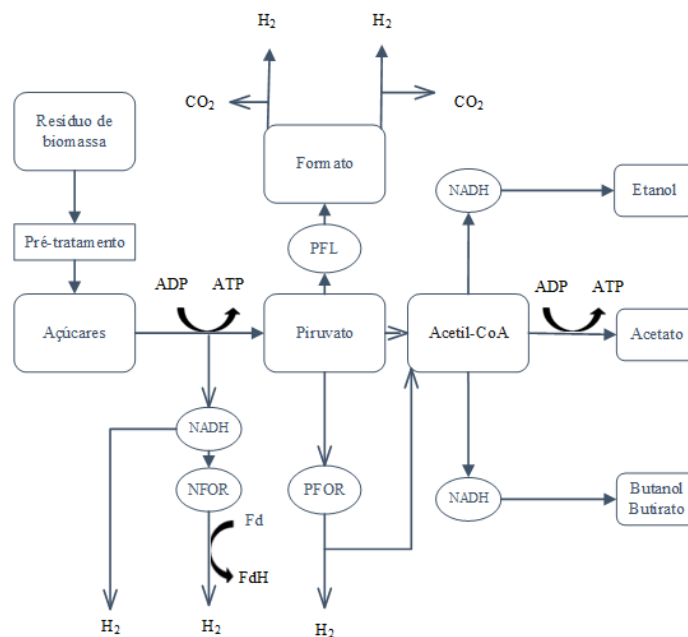


Figura 1 - Vias metabólicas para a conversão do substrato em Bio-H₂ durante a FE



Fonte: Adaptado de Łukajtis et al. (2018).

Enfim, vários fatores podem afetar o rendimento da produção de Bio-H₂ por fermentação escura. Do mesmo modo, numerosos estudos sobre a otimização das condições de fermentação escura foram realizados a fim de obter o rendimento próximo a um máximo teórico (ARGUN *et al.*, 2008; AZBAR *et al.*, 2009a; GÓMEZ *et al.*, 2009; HAWKES, F. *et al.*, 2007; IVANOVA; RÁKHELY; KOVÁCS, 2009; KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012; KARGI; PAMUKOGLU, 2009; LEVIN *et al.*, 2006; MARS *et al.*, 2010; OZTEKIN *et al.*, 2008).

3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA FERMENTAÇÃO ESCURA

3.2.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que influenciam as atividades das bactérias produtoras de H₂. Wang e Wan (2008) demonstraram que numa faixa apropriada, o aumento da temperatura pode aumentar a capacidade das bactérias produtoras de H₂ de produzir Bio-H₂ durante o processo fermentativo, mas a temperatura em níveis muito elevados pode diminuí-la. Conforme mostrado na Tabela 1, a temperatura ótima relatada para a produção de H₂ fermentativo não é sempre a mesma.

Tabela 1 - Efeito da temperatura na produção de Bio-H₂

Inóculo	Substrato	Temperatura		Rendimento máximo de hidrogênio	Referências
		Faixa estudada	Ótimo		
Lodo anaeróbico	Glicose	25 - 55	40	275,1 ml g glicose ⁻¹	Wang e Wan (2008)
Lodo anaeróbico	Glicose	33 - 41	41	1,67 mol mol glicose ⁻¹	Mu et al. (2006)
Lodo de digestor anaeróbico	Pasta de arroz	33 - 55	37	346 mL g carboidrato ⁻¹	Fang et al. (2006)
Lodo de um canal de sedimentação em Pukou.	Casca de arroz	37 - 55	55	30mL VS rem ⁻¹	Sattar et al. (2016)

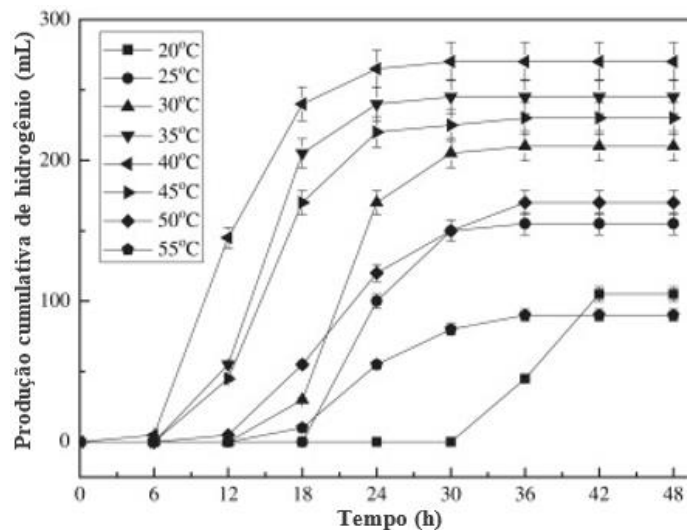
Fonte: Autora.

Wang e Wan (2008) estudaram o efeito de temperatura variando de 20 °C a 55°C na produção de Bio-H₂ por culturas mistas em lote. Os resultados experimentais utilizando glicose como substrato, a eficiência de degradação do substrato e o potencial de produção de H₂

aumentaram com o aumento da temperatura de 20 °C a 40 °C, porém diminuiu com o aumento da temperatura de 40 °C para 55 °C.

Estudos demonstraram que a faixa apropriada, a temperatura pode aumentar a capacidade das culturas mistas de degradar o substrato durante a produção de H₂ fermentativo, o que também foi demonstrado por outros estudos semelhantes (LEE, K. S.; LIN; CHANG, 2006; MU *et al.*, 2006). A Figura 2 apresenta o progresso da produção acumulativa de hidrogênio nos testes de lote em diferentes temperaturas. A partir dele, pode-se verificar que toda a fermentação do hidrogênio cessou em 42 h (WANG, J. L.; WAN, 2008).

Figura 2 - Progresso da produção cumulativa de H₂ em diferentes temperaturas



Fonte : Adaptado de Wang e Wan (2008).

3.2.2 pH

O pH é outro fator importante que influencia as atividades das bactérias produtoras de hidrogênio e a produção fermentativa do Bio-H₂, pois pode afetar tanto a atividade da enzima hidrogenase quanto a via metabólica (WANG, J-L.; WAN, 2009). Wang e Wan (2009) demonstraram que em um faixa apropriada do pH aumenta a capacidade das baterias para produzir Bio-H₂, mas em níveis do pH altos ou baixos pode diminuí-lo. A maioria dos estudos foi conduzida em lote sem controle do pH, apenas o efeito do pH inicial na produção de Bio-H₂ como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito do pH na produção de H₂

Inóculo	Substrato	pH		Rendimento máximo de hidrogênio	Referências
		Faixa estudado	Ótimo		
Compostagem	Sacarosa	4,5 - 6,5	4,5	214mg g COD ⁻¹	Khanal et al. (2004)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sacarosa	5 - 6,5	5,5	2,78 mol mol sacarose ⁻¹	Chen et al. (2005)
Resíduos de lodo ativado	Águas residuais de alimentos	4 - 8	6,0	47,1 mmol g COD ⁻¹	Wu e Lin (2004)
Lodo granular anaeróbico	Glicose	3,88-8,12	7,5	1,46mol mol glicose ⁻¹	Davila-Vazquez et al. (2008)
Composto de esterco de vaca	Resíduos de espiga de milho	4 - 9	7,0	149,69 mL TVS ⁻¹	Zhang et al. (2007)
Lodo de digestor anaeróbico	Sacarosa	3 - 12	9,0	126,9mL g sacarose ⁻¹	Lee et al. (2002)

Fonte: adaptado de Wang e Wan (2009).

Na Tabela 2 existe certa discordância sobre o pH inicial ideal para a produção do Bio-H₂. Por exemplo, o pH inicial ideal para a produção de hidrogênio fermentativo relatado por Khanal et al. (2004) foi de 4,5; enquanto o relatado por Lee (2002) foi de 9,0. A possível razão para essa discordância foi a diferença entre esses estudos quanto ao inóculo, substrato e faixa de pH inicial estudada.

3.2.3 Tempo de retenção hidráulica

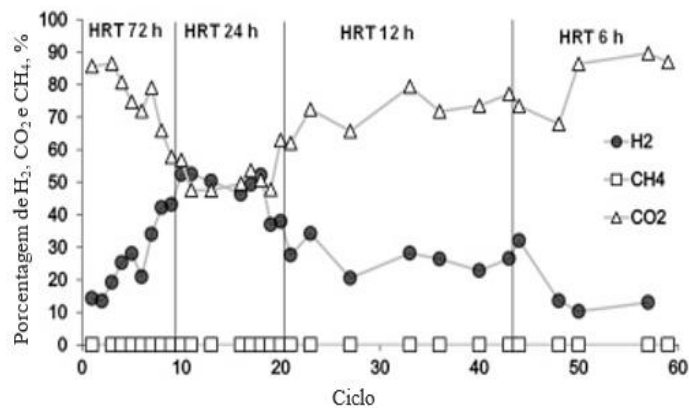
O tempo de retenção hidráulica (TRH) em reatores anaeróbicos operados em batelada pode afetar a hidrólise do substrato e, conseqüentemente, a produção de intermediários e produtos, afetando a produção do Bio-H₂. Além da hidrólise, o TRH também pode ser utilizado como parâmetro de controle da atividade metanogênica (DOS REIS; SILVA, 2011; KIM, J. K. *et al.*, 2006; LIU, D.; ZENG; ANGELIDAKI, 2008; PAKARINEN; KAPARAJU; RINTALA, 2011). As diferentes taxas de crescimento dos produtores e consumidores de H₂ tornam possível usar o tempo de retenção hidráulica como parâmetro de controle para inibir a atividade dos consumidores de H₂ (arqueas metanogênicas) (DOS REIS; SILVA, 2011; KIM, J. K. *et al.*, 2006; LIU, D.; ZENG; ANGELIDAKI, 2008; PAKARINEN; KAPARAJU; RINTALA, 2011).

Na literatura encontram-se estudos que avaliam a influência de diferentes TRH no processo em lote de produção de H₂. Os TRHs analisados variam de 2 a 108 h, sendo que grande

parte dos resultados demonstraram que, quanto maior o TRH, maior é o rendimento de H₂ (KIM, J. K. *et al.*, 2006; LIU, D.; ZENG; ANGELIDAKI, 2008; MORENO-ANDRADE *et al.*, 2015; OH, Y. K. *et al.*, 2004; PAKARINEN; KAPARAJU; RINTALA, 2011).

Moreno-Andrade *et al.* (2015) avaliaram diferentes TRH (6 - 72 h) na produção de H₂ a partir da fermentação anaeróbia de resíduos de alimentos. A porcentagem de H₂ no biogás e os rendimentos de H₂ nos TRH de 6,12,24 e 72 h foram de 24,1, 37,9, 52,6 e 21,6%, e 35,8, 105,3, 103,0 e 40,3 mL H₂ g SV_{removidos}⁻¹, respectivamente (Figura 3). A maior produção de ácido propiônico foi encontrada no ensaio de TRH de 6 h, o que foi relacionado com o decréscimo na produção de H₂. Por outro lado, no ensaio de TRH 24 h apresentou a maior porcentagem de H₂ produzido.

Figura 3 - Porcentagem de H₂, CO₂ e CH₄ no biogás em diferentes TRH

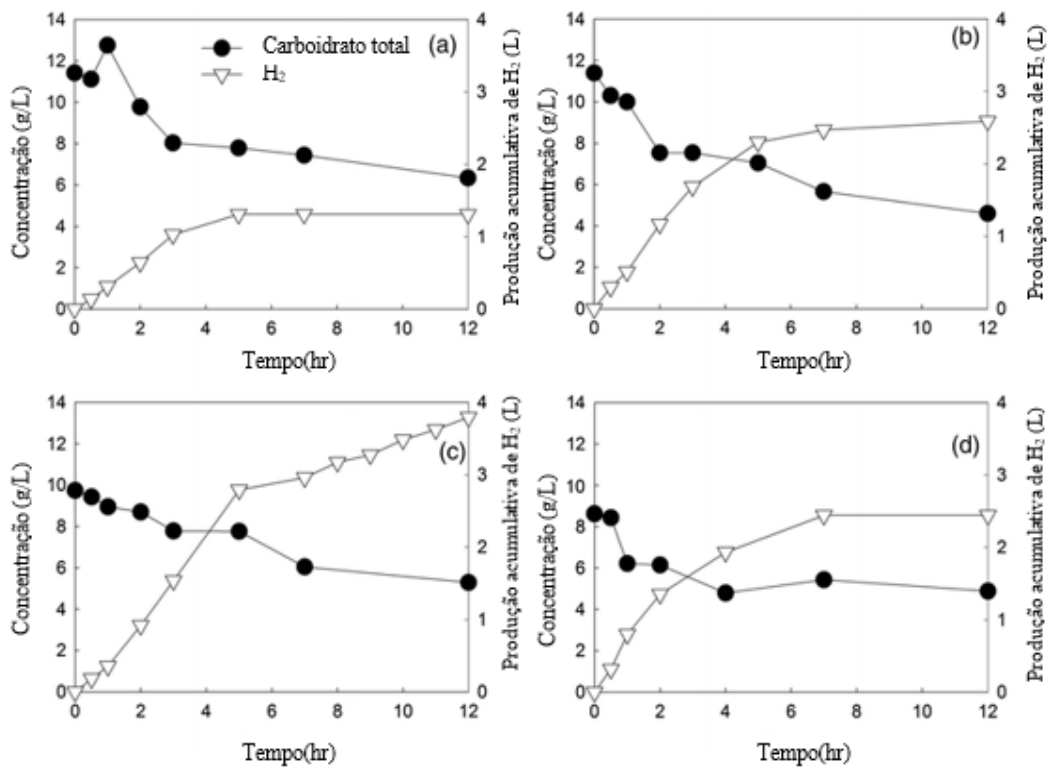


Fonte : Adaptado de Moreno-Andrade *et al.* (2015).

Analogamente Nam *et al.* (2016) relatam a dinâmica da concentração total de carboidratos e produção acumulativa de H₂ em um período de ciclo de sequenciamento de TRH de 36, 48, 72 e 108 h, respectivamente (Figura 4).

A Figura 4.c, o TRH de 72 h em particular, a produção gradual de H₂ foi monitorada até o final da sequência. Ele mostra a correlação clara da operação em lote de sequenciamento e TRH no reator de lote sob 72 h, onde atingiu o objetivo de maximizar a taxa de produção de H₂. O TRH de 72 h claramente levou a um aumento gradual da produção de H₂ durante a sequência de sedimentação, enquanto remove continuamente os carboidratos (NAM *et al.* 2016).

Figura 4 - Variações das concentrações de carboidratos e produções cumulativas de H₂



Nota: (a) TRH 36 h; (b) TRH 48 h; (c) TRH 72 h; (d) TRH 108 h
 Fonte: Adaptado de Nam et al. (2016).

No entanto, o TRH ideal para a produção de Bio-H₂ no processo de fermentação escura depende do tipo de substrato e inóculo usado, pois a taxa de hidrólise, depende da biodegradabilidade dos substratos (GHIMIRE *et al.*, 2015). TRH por si só não é suficiente para suprimir totalmente a atividade metanogênica (LIU et al., 2008).

3.2.4 Pressão parcial

A pressão parcial de H₂ é outro fator importante para a produção contínua de Bio-H₂ devido que as rotas metabólicas para a produção são sensíveis às concentrações de H₂. À medida que as concentrações H₂ aumentam, a produção de Bio-H₂ diminui e as vias metabólicas mudam para outros substratos, como etanol, acetona, butanol, lactato ou alanina (KIM, D.-H. *et al.*, 2006; LEE, K. *et al.*, 2012; MIZUNO *et al.*, 2000). A produção de solventes (etanol e butanol) não incentiva o alto rendimento de H₂ pós eles tem efeitos bactericidas (HAWKES, F. R. *et al.*, 2002; KAPDAN; KARGI, 2006; REN, NQ *et al.*, 2007; SEIFERT *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2010; YU; ZHAO; TANG, 2006).

Pressões parciais de H₂ mais altas resultam em maiores rendimentos de NADH que substituem a produção de butirato pela via de produção de ácido propiônico

(SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014). O ácido propiônico consome H_2 durante sua produção, portanto, os produtores de propionato são geralmente considerados concorrentes para a produção de H_2 (CABROL *et al.*, 2017; CASTELLÓ *et al.*, 2020).

Do mesmo modo, a pressão parcial elevada de H_2 é relatada para diminuir a eficiência geral de produção de Bio- H_2 , que pode ser estrategicamente reduzida. Considerando esses efeitos negativos na produção de Bio- H_2 causados pelo aumento da pressão parcial, alguns métodos têm sido estudados para reduzir esse problema. Entre estes, os mais comuns são gás nitrogênio (N_2) e (CO_2) pulverização e vácuo (KIM, D.-H. *et al.*, 2006; LEE, K. *et al.*, 2012; MIZUNO *et al.*, 2000). Embora o uso de um gás espargidor melhore o rendimento de hidrogênio, o produto final é diluído e o custo de sua recuperação pode ser substancial. Portanto, uma melhoria no rendimento do H_2 pode não compensar o custo da recuperação do hidrogênio e o custo de espalhar o reator.

Kim *et al.* (2006) investigaram o efeito da aspersão de gás na produção fermentativa de H_2 utilizando diferentes taxas de vazões ($100-400 \text{ mL min}^{-1}$). Os gases utilizados foram: o próprio biogás produzido (biogás interno), N_2 e CO_2 . A aspersão com gases externos (N_2 e CO_2) mostraram maior rendimento de H_2 quando comparada à aspersão com o biogás interno e com o controle (sem aspersão). Já entre os gases externos, o CO_2 apresentou maior eficiência e maior produção de H_2 quando comparado ao N_2 . Além disso, o CO_2 tem pouco efeito nas bactérias produtoras de H_2 e efeito inibitório nos microrganismos acetogênicos e produtores de ácido lático, os quais são competitivos com os produtores de H_2 . Quanto à vazão de aspersão, a taxa de 300 mL min^{-1} de CO_2 resultou no maior rendimento ($1,68 \text{ mol mol}_{\text{hexose consumida}}^{-1}$) e na maior taxa de produção ($6,86 \text{ L g SV}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de H_2 .

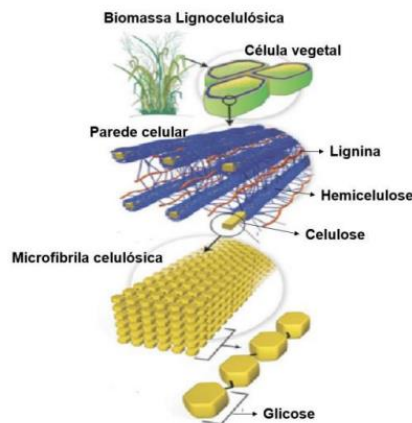
Lee *et al.* (2012) investigaram o efeito das mudanças na pressão do hidrogênio sobre o rendimento e a taxa de produção de hidrogênio, bem como as mudanças na composição dos metabólitos orgânicos líquidos. Uma melhoria significativa na taxa de produção de hidrogênio (de $0,348$ a $0,376 \text{ mol H}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) foi encontrada com a redução da pressão de hidrogênio de 760 para 380 mmHg . A mudança na pressão também afetou as concentrações dos metabólitos formados. A concentração de ácido butírico aumentou 9% com a diminuição simultânea das concentrações de ácidos acético e propiônico em $4,1\%$ e $4,2\%$, respectivamente. Mandal *et al.* (2006) baixou a pressão parcial do hidrogênio sobre o meio de fermentação de 760 mm Hg para 380 mm Hg e observou um aumento no rendimento do hidrogênio de $1,9$ para $3,9 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicose}^{-1}$. A taxa máxima de produção de hidrogênio foi encontrada em uma pressão reduzida e totalizou $0,017 \text{ mmol H}_2 \text{ dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Uma solução alternativa é a remoção do hidrogênio por meio de membranas ativas altamente seletivas ao hidrogênio.

3.2.5 Substrato

O substrato desempenha um papel importante no rendimento de H_2 , na taxa de produção de H_2 e na econômica geral do processo (HAWKES, F. *et al.*, 2007). A produção de Bio- H_2 renovável requer que a matéria-prima (substrato) venha de recursos renováveis (HAWKES, F. *et al.*, 2007; REN, N. *et al.*, 2011). Exemplo deles são os resíduos orgânicos (biomassas lignocelulósicas), que são abundantes e podem suportar o fornecimento de substratos renováveis para o processo de fermentação escura (GUO *et al.*, 2010; KAPDAN; KARGI, 2006; SHOW *et al.*, 2012).

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima mais abundante e possui uma estrutura completa composta principalmente por três polímeros (celulose, hemicelulose e lignina), além de cinzas e extrativos (Figura 5) (BELTRAN *et al.*, 2019; KUMAR, G. *et al.*, 2015; TRAVAINI *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte : Adaptado de Kondo e Polym (1997).

A celulose é o principal componente estrutural da célula vegetal, é um polímero natural de alto peso molecular composto de unidade de glicose, tendo a celobiose como unidade básica de acoplamento (CHEN, H., 2014). A hemicelulose é o segundo polímero, é ramificado de pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácido urônico (4-O-metilglucorônico, D- Glururônico e ácidos D-galactorônico) (BAJPAI, 2016; CHEN, H., 2014). A lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza e contém uma grande estrutura molecular complexa quem contém polímeros aromáticos reticulados de monômeros fenólicos (álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico).

Tabela 3 - Composição química de biomassas lignocelulósicas para produção de Bio-H₂

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Rendimento de H ₂	Referências
Cascas de amendoim	46,1	5,6	27,8	6,4 - 39,9 mL g biomassa ⁻¹	Qi et al. (2018)
Bagaço de caju	20,56	10,17	35,26	0,08 - 1,89 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Silva et al. (2018)
Cacho de frutas de palmeira vazio	38,31	11,22	39,82	1,08 - 1,11 mol H ₂ mol açúcar total ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
Pellets de madeira de pinheiro	39,48	22,1	37,11	0,31 - 1,27 mol H ₂ mol açúcar ⁻¹	Gonzales et al. (2017)
Palhas de arroz	28,2	17,5	14,6	28 mL H ₂ g VS ⁻¹	He et al. (2014)
Casca de arroz	40,26	12,54	25,10	1,81 - 1,96 mol H ₂ mol açúcar total ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
Casca de arroz	29	29	24	5,9 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Tosuner et al. (2018)

Fonte: Adaptado de Soares et al. (2020).

Outros resíduos agroindustriais como fonte de biomassas lignocelulósicas são amplamente utilizados em estudos de produção de Bio-H₂ (FAN *et al.*, 2006a; KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012; LO *et al.*, 2011; NASIRIAN *et al.*, 2011; SCOMA; BERTIN; FAVA, 2013; VIJAYARAGHAVAN, KRISHMAN AHMAD; BIN IBRAHIM, 2006; YASIN *et al.*, 2013; ZHANG, K. *et al.*, 2011). A principal desvantagem associada à biomassa é sua estrutura complexa e a presença de lignina, o que dificulta o acesso da enzima (hidrogenase) a açúcares hidrolisáveis (MILLATI *et al.*, 2020).

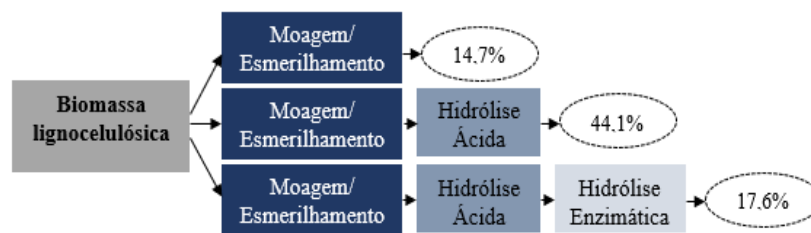
3.2.5.1 Pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas

O objetivo do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é quebrar o selo da lignina, liberar moléculas de celulose na solução, quebrar a estrutura cristalina da celulose e auxiliar na despolimerização para aumentar a hidrólise e a produção de Bio-H₂ (ELBESHBISHY *et al.*, 2011; HSU; LADISCH; TSAO, 1980; MOSIER *et al.*, 2005; SUN, Y.; CHENG, 2002; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009) (Figura 6). Atualmente, os procedimentos de preparação da biomassa lignocelulósica e seu pré-tratamento antes da fermentação são amplamente investigados (AGBOR *et al.*, 2011; AZBAR *et al.*, 2009b; CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, 2000; KARIMI; EMTIAZI; TAHERZADEH, 2006; KOTHARI *et al.*, 2012; KUMAR, P. *et*

al., 2009; LUKAJTIS *et al.*, 2018a, 2018b; LYND; WEIMER; VAN ZYL, 2002; SUN, Y.; CHENG, 2002; WANG, J.; WAN, 2008; ZHU *et al.*, 2009; ZHU; PAN; ZALESNY, 2010).

Soares et al. (2020) apresentam um esquema do principal pré-tratamento de biomassa lignocelulósica usado para a produção de Bio-H₂ fermentativo escuro (Figura 6). Os autores relatam que 44,1% dos trabalhos usaram pré-tratamento físico (moagem, esmerilhamento) seguido de hidrólise ácida, 17,6% usaram pré-tratamento físico seguido de hidrólise ácida e hidrólise enzimática e 14,7% usaram apenas pré-tratamento físico. As eficiências desses pré-tratamentos quanto a produção de H₂ para diversas biomassas lignocelulósicas são apresentados no Tabela 4.

Figura 6 - Principais pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica na produção de Bio-H₂



Fonte: Adaptado Soares et al. (2020).

Outros autores também relatam que os pré-tratamentos com ácido diluído são particularmente mais eficientes para converter a celulose em monômeros de açúcares (glicose) que são convertidos posteriormente por bactérias produtoras de hidrogênio (MONLAU *et al.*, 2013a; PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). Até o momento, o uso de pré-tratamentos com ácido diluído de biomassas lignocelulósicas para a produção de Bio-H₂ foi investigado em palha de arroz (CHANG, A. *et al.*, 2006), talo de milho (PAN, CM *et al.*, 2011), grama (CUI, MJ; SHEN, 2011), folhas de choupo (CUI, M *et al.*, 2010), de cevada (PANAGIOTOPOULOS, I.A. BAKKER *et al.*, 2009), bagaço de Cana-de-açúcar (FANGKUM; REUNGSANG, 2011) e Casca de arroz (GONZALES, R. R.; KIM; KIM, 2019; GONZALES, R. R.; KIM, 2017; GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016; TOSUNER; TAYLAN; OZMIHCI, 2018). Na Tabela 4 mostra os porcentagem de açúcares depois da hidrólise ácida em diferentes concentrações de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Tabela 4 - Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica para produção de Bio-H₂

Biomassa lignocelulósica	Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	Rendimento de H₂	Referências
Cascas de amendoim	Físico: Moagem	6,4-39,9 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Qi et al. (2018)
Bagaço de caju	Físico: Moagem Químico: Peróxido de hidrogênio alcalino; Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 0,6M) Biológico: Hidrólise enzimática (enzima comercial)	0,08 - 1,89mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Silva et al. (2018)
Cacho de frutas vazio de dendezeiro	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 6% v / v) Biológico: hidrólise enzimática (enzima comercial)	169,53 - 286,98mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Gonzales et al. (2019)
Pellets de madeira de pinheiro	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% p/v)	0,31 - 1,27mol H ₂ mol açúcar ⁻¹	Gonzales et al. (2017)
Resíduos de folhas de sorgo	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (HCl, H ₂ SO ₄ e HNO ₃ - 1,0, 3,5 ou 6,0% v/v)	213,14mL H ₂ g açúcar ⁻¹	Rorke e Gueguim Kana (2016)
Palhas de arroz	Físico: Moagem Físico-químico: Hidrotérmico (150 e 210 ° C)	28mL H ₂ g VS ⁻¹	He et al. (2014)
Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% p/v) Biológico: hidrólise enzimática (enzima comercial)	320,6 - 473,1 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Gonzales e Kim (2017)
Casca de arroz	Físico: Moagem	5,9 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Tosuner et al. (2018)

Fonte: Adaptado de Soares et al. (2020).

Tabela 5 - Porcentagem de açúcares em hidrolisados após do pré-tratamento ácido

Pré-tratamento	Substrato	Glu (%)	Xil (%)	Aranb (%)	Celob (%)	Referências
0,5% (L/L) H ₂ SO ₄	Bagaço da cana de açúcar	44,9	46,1	9,1	N.D.	Pattra et al. (2008)
0,9% (kg/kg) H ₂ SO ₄	Palha de arroz	6,1	34,4	13,2	5,5	Chang et al. (2011)
1% (L/L) H ₂ SO ₄	Bagaço da Cana-de-açúcar	16,5	80,5	6,4	N.D.	Fangkum e Reungsang, (2011)
5% (v/v) H ₂ SO ₄	Cacho de frutas de palmeira vazio	45,9	97,5	N.D.	N.D.	Gonzales et al. (2016)
5% (v/v) H ₂ SO ₄	Casca de arroz	46,4	99,0	89,8	N.D.	Gonzales et al. (2016)
5% (v/v) H ₂ SO ₄	Casca de arroz	40,26	12,12	0,42	N.D.	Gonzales et al. (2016)

N.D.: Não detectado

Fonte: Autora.

3.2.6 Inóculo

Uma variedade de microrganismos tem sido usada para a produção de H₂ a partir do processo de fermentação escura, variando de culturas mistas (ALEMAHDI *et al.*, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2016; GONZALES, R. R.; KIM, 2017; HE *et al.*, 2014; RORKE; GUEGUIM KANA, 2016; SATTAR *et al.*, 2016; SEN *et al.*, 2016; WANG, Y. *et al.*, 2010) a culturas puras (*Clostridium Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas*, *Citrobacte* e *Bacillus*) (AZMAN *et al.*, 2016; KOTAY; DAS, 2007; LI, C.; FANG, 2007; LOPEZ-HIDALGO; SÁNCHEZ; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, 2017; MUHARJA *et al.*, 2018; OH, Y. K. *et al.*, 2002, 2003; SATAR *et al.*, 2017; WANG, J-L.; WAN, 2009). Embora rendimentos relativamente altos de H₂ tenham sido obtidos com culturas puras, seu uso não é uma abordagem viável (ANTONOPOULOU *et al.*, 2007; CHEN, W. *et al.*, 2005; OH, Y. K. *et al.*, 2003; REN, N *et al.*, 2008).

Deste modo a produção de hidrogênio por meio de uma cultura mista apresenta várias vantagens em relação à cultura pura: fácil controle, operação simples e utilização de amplas fontes de matéria – prima (LI, C.; FANG, 2007; VALDEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005; WANG, J-L.; WAN, 2008). Ademais que a cultura mista mostrou a capacidade de degradar completamente o furfural e parcialmente o 5-HMF na produção de Bio-H₂ via processo de fermentação escura (MUÑOZ-PÁEZ *et al.*, 2019). Porém o rendimento de Bio-H₂ por bactérias produtoras de hidrogênio em culturas mistas é baixo, pois o hidrogênio é produzido como um

intermediário e pode ser posteriormente convertido em CH₄, acetato ou propionato por bactérias consumidoras de hidrogênio (arqueas metanogênicas) durante o processo de fermentação escura (CAI; LIU; WEI, 2004; OH, S.; GINKEL; LOGAN, 2003).

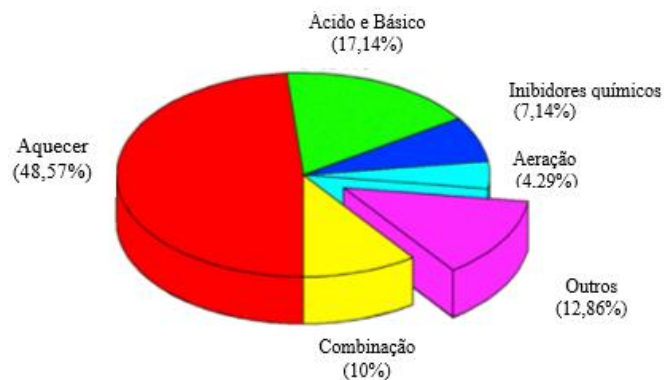
Por conseguinte, para aumentar a taxa de produção de Bio-H₂ é de fundamental importância desenvolver métodos que inibam a atividade de bactérias consumidoras de H₂ e enriqueçam as bactérias produtoras de H₂. Por isso a conveniência de fazer um pré-tratamento eficaz do inóculo (CAI; LIU; WEI, 2004; HU; CHEN, 2007; WANG, J.-L.; WAN, 2008).

3.2.6.1 Pré-tratamento do inóculo

Wang e Yin (2017) relatam os diferentes métodos de pré-tratamento para a produção de Bio-H₂. A Figura 7 mostra-se que o pré-tratamento térmico tem sido o método mais amplamente usado, seguido pelo tratamento com ácido e base, inibidores químicos e aeração. Assim, a alta temperatura geralmente rompe as ligações químicas da parede celular e da membrana, além de solubilizar os componentes da célula e causar a deterioração da proteína microbiana (APPELS *et al.*, 2008).

Wang e Yin (2017) relatam também que a alta resistência ao calor das bactérias produtoras de H₂ (ex. *Clostridium*) é devido à propriedade de formar esporos como uma reação às condições adversas ao contrário das bactérias consumidoras de H₂ (arqueas metanogênicas) que não têm. No entanto, bactérias homoacetogênicas formadoras também de esporos e que são um tipo principal de consumidor de hidrogênio, dificilmente podem ser inibidas por tratamento térmico (OH, S.; GINKEL; LOGAN, 2003). Mesmo assim, a razão para a ampla aplicação do tratamento térmico pode ser também pela sua operação simples e de fácil controle.

Figura 7 - Métodos de pré-tratamento para o inóculo



Fonte: Adaptado de Wang e Yin (2017).

A temperatura é um fator vital que afeta a sobrevivência microbiana (APPELS *et al.*, 2008). Assim como a alta temperatura geralmente rompe as ligações químicas da parede celular e da membrana, também, solubiliza os componentes da célula e causa a deterioração da proteína microbiana (APPELS *et al.*, 2008).

Outros experimentos estudaram a frequência da temperatura e do tempo de aquecimentos para diferentes tipos de inóculos. Eles observaram que a condições mais comumente utilizada foi 100 °C e 60 min (Quadro 2) (DAVILA-VAZQUEZ; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F. DE LEÓN-RODRÍGUEZ; RAZO-FLORES, 2008; DE SÁ *et al.*, 2013; LEE, K.-S. *et al.*, 2008; LEE, K. *et al.*, 2012; LI, Y.-C. *et al.*, 2012; LIN, C.-Y. *et al.*, 2010; LIN, CN; WU; CHANG, 2006; LIN, CY *et al.*, 2011; LIN, P. *et al.*, 2011; O-THONG; PRASERTSAN; BIRKELAND, 2009; ZHANG, Y. F.; LIU; SHEN, 2005).

Quadro 1 - Fonte e pré-tratamento do inóculo na produção de Bio-H₂

Biomassa Lignocelulósica	Inóculo	Pré-Tratamento	Referência
Palha de arroz	Cultura mista (lodo de um canal de sedimentação)	100 °C 30min	Sattar et al. (2016)
Palha de arroz	Cultura mista (lodo anaeróbico de uma estação de tratamento de esgoto)	Sem tratamento	He et al. (2014)
Palha de arroz	Cultura mista (lodo de esgoto ativado de uma estação de tratamento de águas residuais)	80-100 °C, 30 60min	Alemahdi et al. (2015)
Palha de arroz	Cultura mista (lodo anaeróbico de uma unidade de digestão anaeróbia de uma fazenda de laticínios)	105 °C, 90min	Ghimire et al. (2016)
Casca de Arroz	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator tratando águas residuais de cervejaria)	90 °C, 30min	Gonzales e Kim (2017)
talo de milho	Cultura mista (lodo anaeróbico de um rio natural)	100 °C, 15 min	Wang et al. (2010)
Pelota de madeira de pinheiro	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator UASB na Coreia do Sul)	90 °C, 30min	Gonzales et al. (2017)

Fonte: Autora.

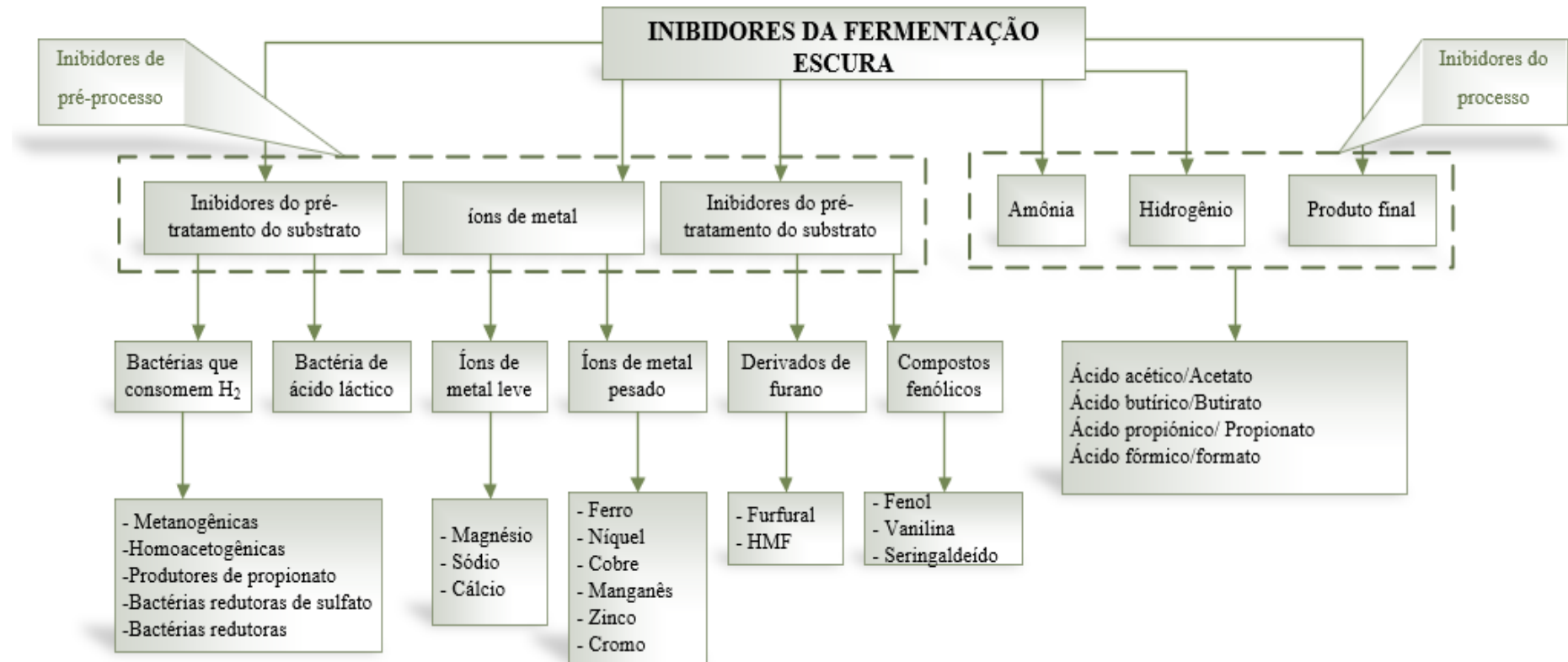
3.2.7 Inibidores da fermentação escura

Os diferentes fatores que podem resultar na inibição da produção de Bio-H₂ podem ser amplamente classificados como inibidores do pré-processo e em processo (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Os inibidores do pré-processo são aqueles supressores que já estão presentes

antes do processo de fermentação, tais como na cultura mítica (inóculo) ou substratos. E por outro lado, os inibidores em processo que são gerados ao longo do processo de fermentação escura (Figura 8) (BUNDHOO; MOHEE, 2016).

O inóculo pode consistir em uma ampla variedade de microrganismos produtores e consumidores de H_2 e outros microrganismos que competem com as bactérias produtoras de H_2 por substratos e estes podem diminuir o rendimento na produção de Bio- H_2 . Esses inibidores incluem arqueas metanogênicas, hidrogenotróficas e homoacetogênicas, bactérias redutoras de sulfato, bactérias redutoras de nitrato, produtoras de propionato, bactérias redutoras de ferro e bactérias de ácido láctico (Figura 8) (ANGENENT *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2010; SAADY, 2013; VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). A principal estratégia para reduzir a inibição das bactérias consumidoras de hidrogênio e é o uso do pré-tratamento térmico do inóculo antes do processo de fermentação (LI, C.; FANG, 2007; SAADY, 2013; VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009; WANG, J. .; YIN, 2017; WONG, Y.-M.; WU; JUAN, 2014; WONG, Y. M. *et al.*, 2014).

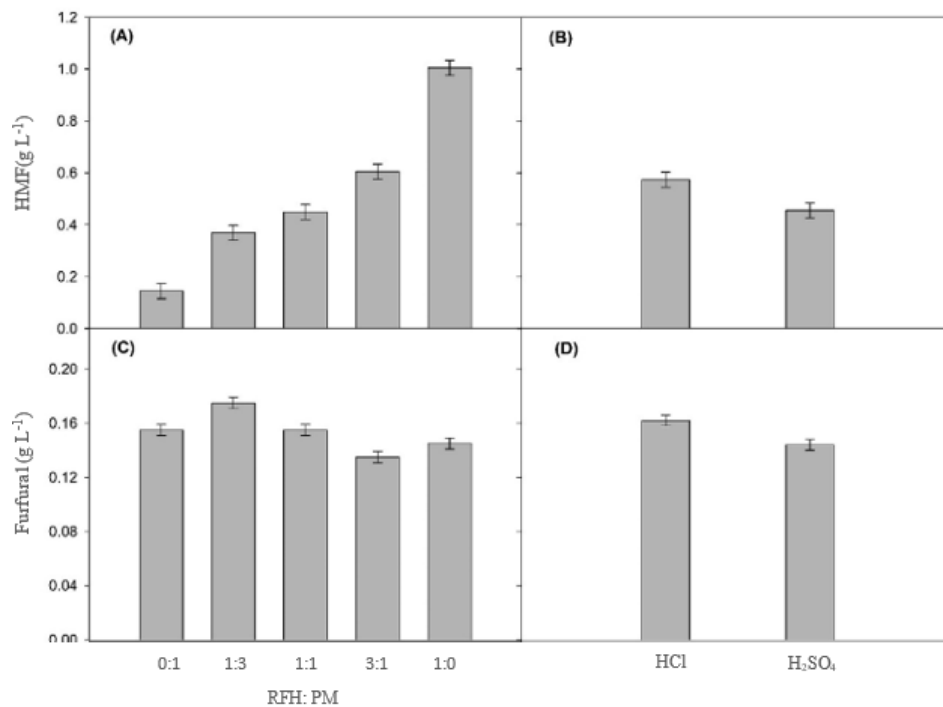
E quanto ao substrato, o pré-tratamento tem como principal objetivo a liberação da celulose em solução e assim aumentar a hidrólise e a produção de Bio- H_2 , como foi mostrado na Figura 6 e Tabela 4 da seção 3.2.5.1 (ELBESHBISHY *et al.*, 2011; HSU; LADISCH; TSAO, 1980; MOSIER *et al.*, 2005; SUN, Y.; CHENG, 2002; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Além desses aspectos positivos, também liberam subprodutos derivados do açúcar que exercem efeitos inibitórios no processo de fermentação do hidrogênio (ALLEN *et al.*, 2010). Os subprodutos obtidos são classificados em três grupos: ácido fraco (ácido acético) da hidrólise dos grupos acetila da hemicelulose; monômeros fenólicos da decomposição da lignina (vanilina, siringaldeído) e derivados do furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural) da desidratação de pentose e hexoses (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009; MONLAU *et al.*, 2014). Os derivados de furano podem impedir as atividades de enzimas envolvidas em reações de fermentação como a glicólise (CHEN, R. *et al.*, 2013; KUMAR, G. *et al.*, 2015; LIN, R. *et al.*, 2015; MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002), suprimir o crescimento celular (BELLIDO *et al.*, 2011; LAI *et al.*, 2014; LIN, R. *et al.*, 2015) e causar danos ao ADN como uma mudança nas vias de fermentação (ALMEIDA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2015; MODIG *et al.*, 2002; SIQUEIRA E REGINATTO, 2015).

Figura 8 - Inibidores da produção de Bio-H₂

Fonte :Adaptado de Bundhoo e Mohee (2016).

Rodríguez-Valderrama et al.(2020) estudaram o coprocessamento de resíduos de frutas e hortaliças (RFH) e palha de milho (PM) para a produção de Bio-H₂. No pré-tratamento do substrato aplicaram ácido diluído em cinco níveis de resíduos RFH: PM (0:1, 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 de biomassa em base seca) e dois tipos de ácidos (HCl e H₂SO₄ a 0,5% em base volumétrica) (Figura 9). Observando-se que no experimento RFH: PM (0:1) respectivamente, suas concentrações do HMF e furfural foram maiores para HCl do que H₂SO₄. Essas observações têm alguma relação que o HCl fornece maior concentração dos inibidores furfural e 5-HMF do que H₂SO₄.

Figura 9 - Principais efeitos dos resíduos RFH



Nota: : PM e catalisadores na produção de HMF (A e B); furfural (C e D)

Fonte: Adaptado Rodríguez-Valderrama et al. (2020).

Kumar et al. (2014) descobriram que mesmo na concentração de 5-HMF de 0,59 g L⁻¹, a produção e o rendimento de H₂ podem ser bastante afetados. Embora o furfural não seja exatamente tóxico, devido ao seu tamanho molecular relativamente maior do que o 5-HMF, tornando mais difícil sua entrada através da célula, ele pode ser ainda mais reduzido a álcool furfurílico em condições anaeróbicas. A Tabela 6 mostra alguns estudos das concentrações de 5-HMF e furfural na produção de hidrogênio.

Tabela 6 - Concentrações dos inibidores de derivados de furano na produção de H₂

Substrato	Inóculo	Faixa estudada (g L ⁻¹)	Rendimento máximo de H ₂	Referências
Furfural				
Hidrolisado ácido de palha de milho	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	0 - 2 (0)	2515 mL L ⁻¹	Cao et al. (2010)
Glicose	Lodo de digestão anaeróbia	0 - 1,4 (0)	247,8 mL g substrato ⁻¹	Lin et al. (2015)
Glicose	Cultura mista de lodo	0 - 2 (0,0)	154,3 mL	Siqueira e Reginatto (2015)
Hidrolisado de casca de arroz com água supercrítica (220°C, 21 min)	N.A.	2,4 ± 0,2	N.A.	Abaide et al. (2019)
Hidrolisado ácido de CA	Lodo de digestor anaeróbico	2,93	3340 mL H ₂ L ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
5-HMF				
Hidrolisado ácido de palha de milho	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	0 - 2 (0)	2515 mL L ⁻¹	Cao et al. (2010)
Glicose	Lodo de digestão anaeróbia	0 - 1,4 (0)	247,8 mL g substrato ⁻¹	Lin et al. (2015)
Hidrolisado de casca de arroz com água supercrítica (220°C, 21 min)	N.A.	0,6 ± 0,1	N.A.	Abaide et al. (2019)
Hidrolisado ácido de CA	Lodo de digestor anaeróbico	2,09	3340 mL H ₂ L ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
Glicose	Lodo de semente	< 0,59	0,46 - 0,14 mol H ₂ mol açúcar ⁻¹	Kumar et al. (2014)

N.A: Não aplicável.

Fonte: Autora.

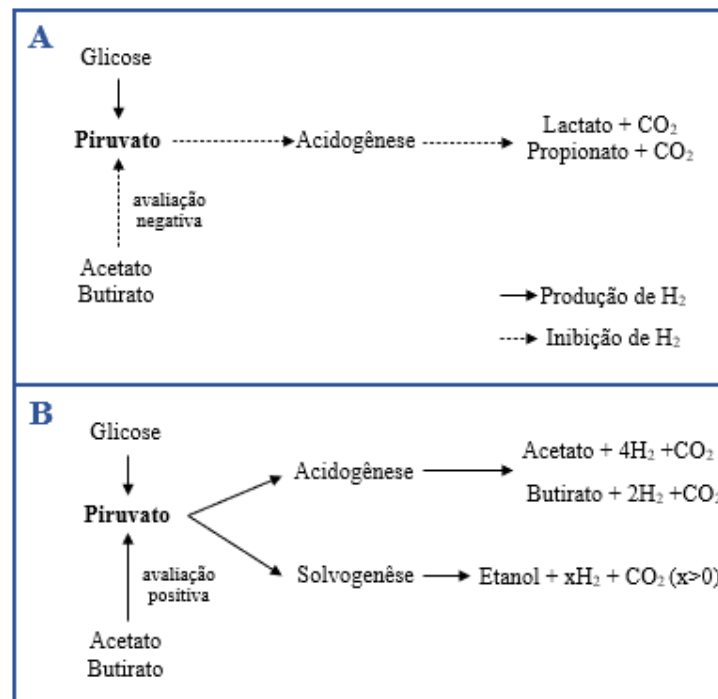
E finalmente no processo de fermentação escura, a produção fermentativa de Bio-H₂ é acompanhada pela formação de ácidos graxos voláteis (AGV), os quais estão conformado pelo acetato, butirato, propionato (LEE, Y.-J.; MIYAHARA; NOIKE, 2002; WONG, Y.-M.; WU; JUAN, 2014). A eficiência da degradação do substrato, maior taxa de produção de hidrogênio

e o rendimento de hidrogênio diminui com o aumento da concentração de AGV (LEE, Y.-J.; MIYAHARA; NOIKE, 2002).

A produção de acetato é normalmente a via preferida na produção de H_2 (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2010; ELBESHBISHY; HAFEZ; NAKHLA, 2010; SHI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010). Pois, o rendimento ideal de H_2 é de 4 mol por mol de hexose pela via do acetato, mas é dividido pela metade pela via do butirato (CHU, Y. *et al.*, 2011; HILIGSMANN *et al.*, 2007; KRAEMER; BAGLEY, 2007; SHI *et al.*, 2010).

Em contraste com a acidogênese, a produção de H_2 pela via da solvogênese é acompanhado pela produção de solventes como etanol e butanol. No entanto, a solvogênese não incentiva o alto rendimento de H_2 , porque solventes como o etanol têm efeitos bactericidas (HAWKES, F. R. *et al.*, 2002; KAPDAN; KARGI, 2006; REN, NQ *et al.*, 2007; SEIFERT *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2010; YU; ZHAO; TANG, 2006). Os AGV podem atuar como um fator suplementar e/ou inibidor da produção de H_2 (SEIFERT *et al.*, 2009; WANG, H. *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010).

Figura 10 - Relação entre os produtos da fermentação e a produção de H_2



Nota: (A) Evento de inibição de H_2 devido ao acúmulo de acetato e/ou butirato; (B) evento de produção de H_2 suplementado por lactato e propionato.

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

3.3 PRODUÇÃO DE BIO-H₂ A PARTIR DA CASCA DE ARROZ

3.3.1 Substrato: Casca de arroz

A Ásia é o maior produtor de arroz no mundo, com cerca de 90,6% da produção (FAO, 2019). O continente americano é o segundo no ranking, sendo responsável por 5% da produção mundial de arroz (37,2 milhões de toneladas aproximadamente).

No caso do Brasil a produção é de 12,2 milhões de toneladas, correspondendo a 11% da produção mundial. Dentre as unidades da federação o Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz em casca (Tabela 7) (CONAB, 2019).

Tabela 7 - Quantidade produzida de arroz com casca no Brasil e no estado do RS

Ano	Quantidade produzida (Toneladas)	
	Brasil	Rio Grande do Sul
2008	12.061.465	7.336.443
2009	12.651.144	7.977.888
2010	11.235.986	6.875.077
2011	13.476.994	8.940.432
2012	11.549.881	7.692.223
2013	11.782.549	8.099.357
2014	12.175.602	8.241.840
2015	12.301.201	8.679.489
2016	10.622.189	7.493.431
2017	12.464.766	8.733.110
2018	11.749.192	8.401.787

Fonte: Adaptada de IBGE/Pesquisa Agrícola Municipal (2019).

Realizando um balanço em 2019, observamos que a produção nacional de arroz foi 10,4 milhões de toneladas, 13,4% menos que a obtida em 2018 (CONAB, 2019). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a estimativa para produção de 2020/21 é de 11,1 milhões de toneladas. Dessa forma, o estado do Rio Grande do Sul, por exemplo, se mantém como maior produtor da cultura no país, participando com 89% do total que será colhido em 2020/21.

A casca de arroz corresponde de 20 a 33% da massa de arroz produzida (SHIUN LIM *et al.*, 2012), constituindo-se de 34,1 - 40,3% de celulose, 12 - 14,6% de hemicelulose, 15,2 - 27% de lignina e 14 - 20% de cinzas (em base seca) (CABRERA *et al.*, 2014; DAGNINO *et*

al., 2013; GONZALES, R. R.; KIM, 2017; NICHOLS *et al.*, 2014; SAHA, BADAL C *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2011).

A Tabela 8 mostra as outras propriedades importantes e características da CA. Assim também, como o maior valor de aquecimento (MVA) da CA que é 15,84 MJ kg⁻¹, que indica o conteúdo de energia de uma determinada biomassa. Sun et al. (2009) relatam que quanto mais o MVA aumenta, o conteúdo de cinzas reduz.

Tabela 8 - Propriedades da casca de arroz

Casca de Arroz	
Maior valor de aquecimento (volume constante)	
MJ kg ⁻¹	15,84
Btu lb ⁻¹	6811
Análise aproximada (% combustível seco)	
Carbono fixo	16,22
Matéria volátil	63,52
Cinza	20,26
Total	100
Análise final (% combustível seco)	
Carbono	38,83
Hidrogênio	4,75
Oxigênio	35,47
Nitrogênio	0,52
Enxofre	0,05
Cloro	0,12
Cinza	20,26
Total	100
Composição elementar de cinzas (%)	
SiO ₂	91,42
Al ₂ O ₃	0,78
TiO ₂	0,02
Fe ₂ O ₃	0,14
CaO	3,21
MgO	<0,01
NaO	0,21
K ₂ O	3,71
SO ₃	0,72
P ₂ O ₅	0,43
CO ₂ /Other	
Total	100,64
Indeterminado	0,64

Fonte: Adaptado de Jenkins et al. (1998).

O pré-tratamento contribui com uma grande parte do custo ao longo do processo de conversão da casca de arroz em açúcares fermentáveis (ABAIDE *et al.*, 2019; GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016; MOSIER *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2020; SOAREZ, 2019).

Os componentes da celulose e da hemicelulose da casca de arroz são incorporados à rede de lignina que consiste em camadas de polissacarídeos que evitam a hidrólise enzimática

(Figura 5, seção 3.2.5). Assim, para expor a celulose e a hemicelulose à ação enzimática e, posteriormente, aumentar a eficiência da bio-conversão, a rede de lignina deve ser removida com o pré-tratamento adequado (IIYAMA; LAM; STONE, 1994).

A eficiência do pré-tratamento depende fortemente de suas condições operacionais, incluindo temperatura, tempo de retenção, concentração e relação de sólido/líquido (S/L) (PARK, J.-H. *et al.*, 2011). O pré-tratamento com ácido diluído é um dos mais amplamente realizados para biomassas lignocelulósicas (Figura 6, seção 3.2.5.1) (SOARES *et al.*, 2020). No Quadro 2 mostra-se o rendimento na produção de H₂ com o pré-tratamento ácido da casca de arroz.

Quadro 2 - Métodos de pré-tratamento da casca de arroz para produção de Bio-H₂

Biomassa lignocelulósica	de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	Rendimento de H ₂	Referências
Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% v/v)	1,25 mol H ₂ mol açúcar ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% v/v)	1,96 mol H ₂ mol açúcar total ⁻¹	Gonzales et al. (2016)
Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% v/v) Biológico: hidrólise enzimática (enzima comercial)	320,6 - 473,1 mL H ₂ g biomassa ⁻¹	Gonzales e Kim (2017)

Fonte: Autora.

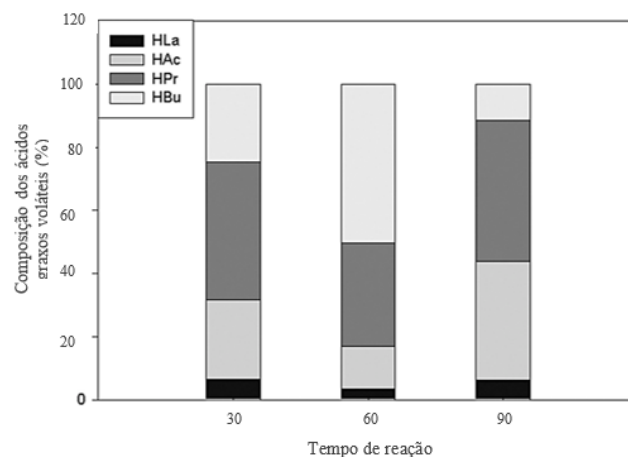
3.3.2 Cooprodução de bioálcool e ácido graxos voláteis

Os rendimentos e as taxas de produção de H₂, aumentam com a elevação das concentrações de hidrolisado até um certo nível, logo os AGV se acumulam inibindo os produtores de H₂ (SAGNAK; KARGI; KAPDAN, 2011) ou diminuindo o pH abaixo da faixa apropriada para as bactérias produtoras de H₂ (FAN *et al.*, 2006b).

As altas concentrações dos hidrolisados podem conter também compostos inibidores ou podem aumentar os tempos de latência para a produção de H₂ (CHU, C. Y. *et al.*, 2011; LI, Y. C. *et al.*, 2011), causar inibição do substrato (PAN, C. *et al.*, 2010) e aumentar a pressão parcial do hidrogênio (FAN *et al.*, 2006a), alterando o metabolismo da produção de ácido para a produção de solventes (etanol e butanol), posto que a solvogenese não incentiva o alto rendimento de H₂ (SHI *et al.*, 2010).

Os ácidos butírico, propiônico e acético são os principais AGV produzidos durante a fermentação. A Figura 11 mostra os ácidos butírico, acético e propiônico foram os principais produtos solúveis da fermentação da CA. A presença desses AGV é tipicamente observada quando glicose e xilose são usadas como a matéria-prima para fermentação de Bio-H₂ em pH 5,5 e temperaturas mesófilas (CHAGANTI *et al.*, 2013).

Figura 11 - Composição AGV nas amostras pós-fermentação escura na CA



Fonte: Adaptado de Gonzales et al. (2016).

O acúmulo de ácidos butírico e acético indica que a produção de H₂ prossegue através das vias de fermentação de butirato e acetato. Por outro lado, a formação do ácido propiônico é indesejável na produção de Bio-H₂, uma vez que este não é apenas um inibidor para as bactérias fermentativas, mas também a produção desse subproduto do mesmo substrato reduz o rendimento do hidrogênio (SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014).

Em concentrações abaixo de 1g L⁻¹ dos AGV, como os ácidos fórmico e propiônico, não são conhecidos por exibir efeitos inibitórios sobre os crescimentos das espécies do *Clostridium*, as principais bactérias produtoras de H₂ (MONLAU *et al.*, 2013b). Observa-se também na Figura 11, a formação do ácido láctico, que é um indicador da presença de acidógenos (não produtores de H₂).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para atender o objetivo geral e os objetivos específicos deste estudo realizou-se uma série de procedimentos sequenciais. Os principais processos realizados foram a hidrólise ácida da CA em diferentes concentrações e o processo de fermentação escura para a produção de Bio-H₂.

Nos ensaios de hidrólise ácida da CA foi selecionado como substrato o hidrolisado que contém a maior recuperação de açúcares totais (AT) e menor concentração de Furfural e 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF). O hidrolisado selecionado (substrato) juntamente com dois tipos de inóculo e micronutrientes (meio mineral), foram, então, submetidos ao processo de fermentação escura para a produção de H₂, onde avaliaram-se o rendimento de Bio-H₂ produzido.

4.1 MATÉRIA PRIMA

A CA foi a matéria-prima escolhida para a produção de Bio-H₂, por resultar uma das biomassas lignocelulósicas mais abundantes no estado de Rio Grande do Sul (RS), Brasil (Tabela 7, seção 3.3.1).

A CA foi fornecida pela empresa de comercialização de arroz localizada da cidade de Águdo no estado federal de RS. Após a coleta da amostra (CA), o material foi transportado e analisado no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizada no município de Santa Maria, RS Brasil.

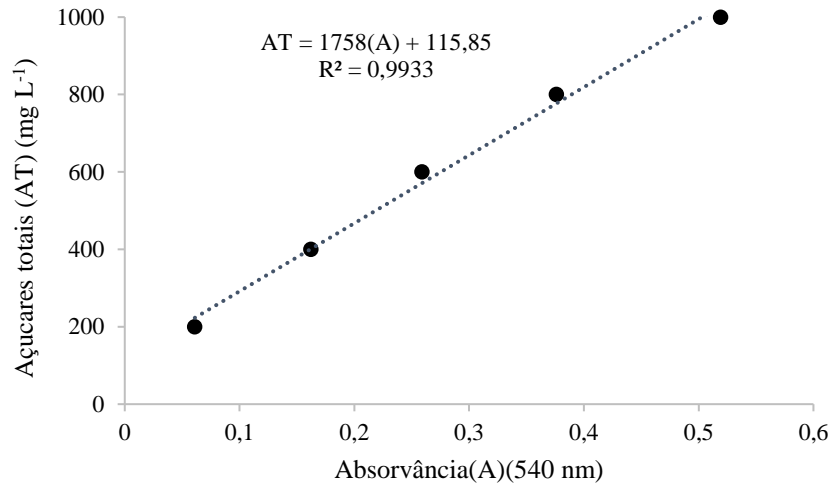
4.1.1 Caracterização da matéria prima

Amostra foi secada na estufa a 60 °C até conseguir uma massa constante (aproximadamente 24h), moída, peneirada (tamanho menor 2mm) e armazenadas a temperatura ambiente até o momento de uso. A CA foi caracterizada quanto à teor de umidade, teor cinzas e AT segundo as metodologias baseadas nos protocolos padronizados do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL- *National Renewable Energy Laboratory*). A curva-padrão para a determinação de AT (Figura 12) foi elaborada seguindo o mesmo procedimento que utilizou Maldone et al. (2013) nas diferentes diluições de glicose (200 a 1000 mg L⁻¹).

Para a análise dos AT da CA, a mostra foi diluída em concentrações de modo que as leituras no espectrofotômetro permanecessem na faixa confiável (Figura 12). As análises foram realizadas em triplicata e as respostas são expressas como média ± desvio padrão. Cabe ressaltar

que não foi possível fazer a análise da composição química da CA (celulose, hemicelulose e lignina) devido à falta do equipamento.

Figura 12 - Curva de calibração de açúcares totais



Fonte: Autora.

4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ

Para o pré-tratamento ácido da CA neste trabalho, foi com o uso do ácido sulfúrico (H₂SO₄ P.A. 98%) visando a maior obtenção de açúcares fermentescíveis e a maior eficiência de recuperação de AT (Tabela 4, seção 3.2.5.1). Para estes ensaios pesaram-se 5,00 ± 0,1 g de CA, Volumes de 1%, 3% e 5% ácido sulfúrico (V_{H₂SO₄}) sendo um volume total de 50mL que corresponde ao tratamento 1 (Trat1), tratamento 2 (Trat2) e tratamento 3 (Trat3) respectivamente (Tabela 9) (Figura 13, a).

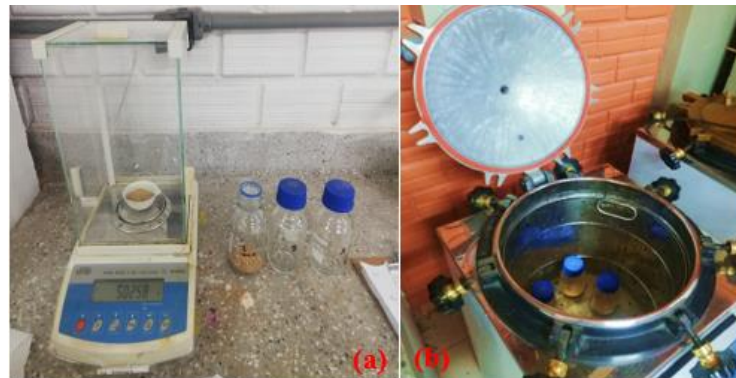
Tabela 9 - Ensaios experimentais do pré-tratamento da casca de arroz

Pré-tratamento	m _{CA} (g)	V _{H₂SO₄} (mL)	V _{total} (mL)
Trat1	5,00 ± 0,1	0,5	50
Trat2	5,00 ± 0,1	1,5	50
Trat3	5,00 ± 0,1	2,5	50

Fonte: Autora.

Todos os ensaios foram conduzidos em autoclave e avaliados à temperatura de 121 °C por um período de 60min (Figura 13, b). As análises foram realizadas dez vezes para os três tratamentos (Trat1, Trat2 e Trat3).

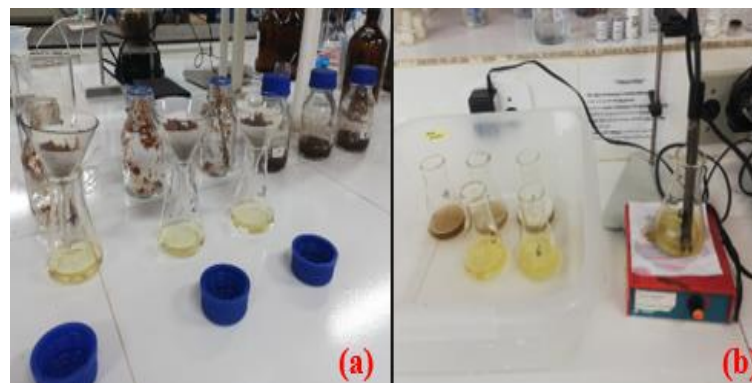
Figura 13 - Pré-tratamento da casca de arroz



Fonte: Autora.

No final de cada tratamento (Trat1, Trat2 e Trat3), a fase líquida foi separada do hidrolisado por meio de filtração (Figura 14, a) e neutralizados em uma faixa de pH de 6 - 7 (Figura 14, b) respectivamente.

Figura 14 - Hidrolisado ácido da casca de arroz



Fonte: Autora.

O teor de açúcares totais presentes na fase líquida (hidrolisado) foi determinado pelo método DNS (ácido 3,5-Dinitrosalocílico) utilizando espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, modelo UV 2006, SP) para avaliar o processo de hidrólise ácida da CA no Trat1, Trat2 e Trat3. Para essa análise, os hidrolisados de cada tratamento foram diluídos em diferentes concentrações de modo que as leituras no espectrofotômetro permanecessem na faixa confiável de 200 - 1000 mg L⁻¹ (Figura 14).

O procedimento consistiu em pipetar 1,0 mL do hidrolisado em um tubo de ensaio e adicionar 1,0 mL do reagente DNS. Agitar e aquecer em banho maria a 100 °C (em ebulição)

por 5 minutos. Resfriar o tubo em banho de gelo por 5 minutos. Adicionar 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir o volume de amostra ou solução de glicose por água destilada (1,0 mL) e realizar o teste de DNS. Para cada tratamento se realizou dez análises de AT.

Por outro lado, a metodologia analítica para a determinação dos inibidores (Furfural e 5HMF) foi baseada em Abaide et al. (2019), com pequenas modificações, cujos procedimentos são descritos resumidamente. As amostras foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Nexera-XR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto por bombas LC-20AXR, amostrador automático SIL-20XR, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A usado para cromatografia. O Software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão) usado para aquisição de dados e análise.

O método foi desenvolvido em uma coluna de fase reversa XBridge™ C18 (3,5 µm 4,6mm d.i. × 50 mm; Waters, Milford, EUA), utilizando-se como fase móvel uma solução de acetonitrila:água (1:8 com 1% (v/v) de ácido acético) filtrada em filtro de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro com porosidade de 0,45 µm (Milipore, EUA) e desgaseificado em banho de ultrassom (USC - 1400, Unique, São Paulo).

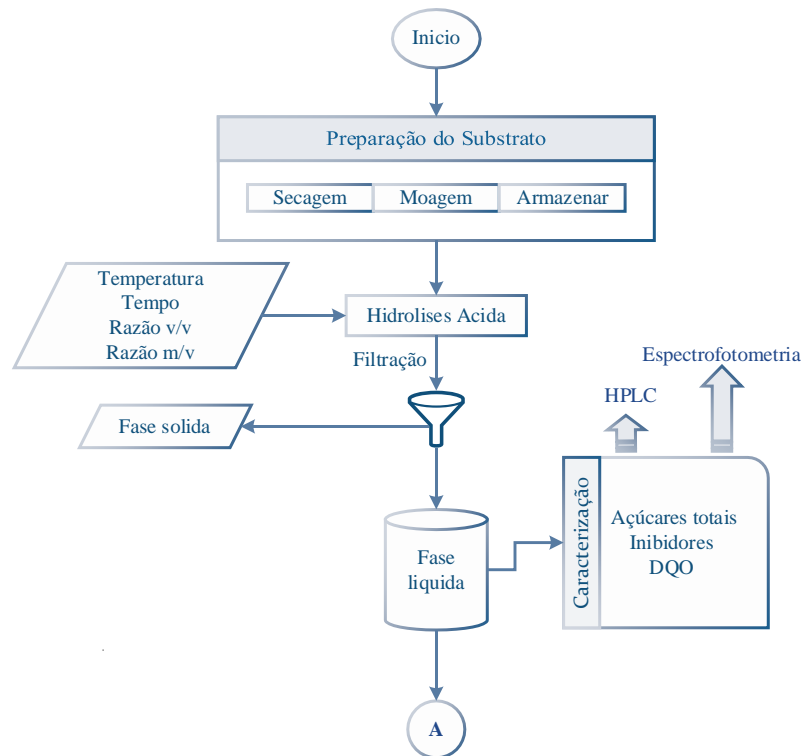
As condições para as análises foram: 10 µL de volume de injeção, taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹ em modo isocrático de eluição, temperatura da coluna de 30 °C, detector monitorando em comprimento de onda de 280 nm, temperatura do detector de 30°C e tempo total de análise de 10 minutos. As concentrações de cada componente foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e curvas padrão previamente determinadas para o furfural e o 5-HMF.

As áreas dos picos correspondentes ao furfural e 5-HMF foram usados para calcular sua concentração nas amostras. Cabe ressaltar que não foi possível a análise da composição química dos hidrolisados (Celobiose, Glicose, Xilose, Arabinose e Ácido acético) por falta de equipamentos.

4.3 SUBSTRATO

De acordo com os resultados obtidos na seção 4.2 o hidrolisado ácido da CA que apresentou maior concentração de açúcares totais e menor concentração dos inibidores furfural e 5-HMF foi escolhido como o substrato para a produção do Bio-H₂ a partir do processo de fermentação escura. Um fluxograma dos principais procedimentos experimentais para o substrato, é apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Fluxograma representativo do substrato



Fonte: Autora.

4.4 INÓCULO

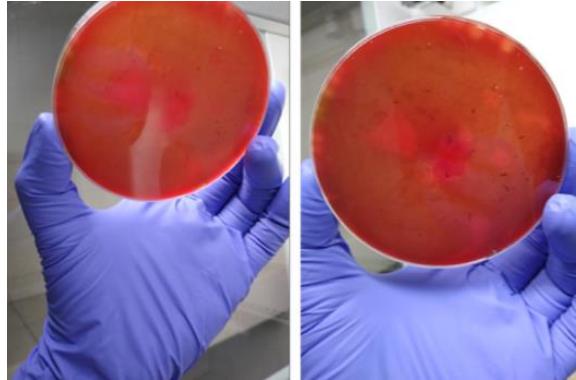
As fontes de cultura mista utilizadas neste trabalho foram o lodo anaeróbio granular (LAG) gerado no reator anaeróbio da indústria cervejeira e o lodo do tanque séptico (LTS) da estação de tratamento de esgoto (ETE), localizada no campus da UFSM, município de Santa Maria, estado de RS.

Martinez (2021) identificou as bactérias do gênero *Clostridium* no LAG pelo método de hemólise em ágar sangue (Figura 16). Os meios de cultura utilizados para o teste foi o meio fluido de tioglicolato que permite o desenvolvimento de bactéria estritamente anaeróbias. Martinez (2021) determinou a presença da espécie *Clostridium perfringens* e *Clostridium tetani*, produtoras de H₂.

Por outro lado Ramirez (2019) identificou as diferentes estruturas bacterianas no LTS da ETE da UFSM para as diferentes estações do ano, as quais são apresentadas em unidades taxonômicas operacionais ou Operational Taxonomic Units (OTUs), a bactérias mais abundantes foram representadas pelas ordens *Clostridiales* (35% de Abundância Relativa – AR) e *Lactobacillales* (14% de AR) (Figura 17). A ordem *Clostridiales* compreende bactérias

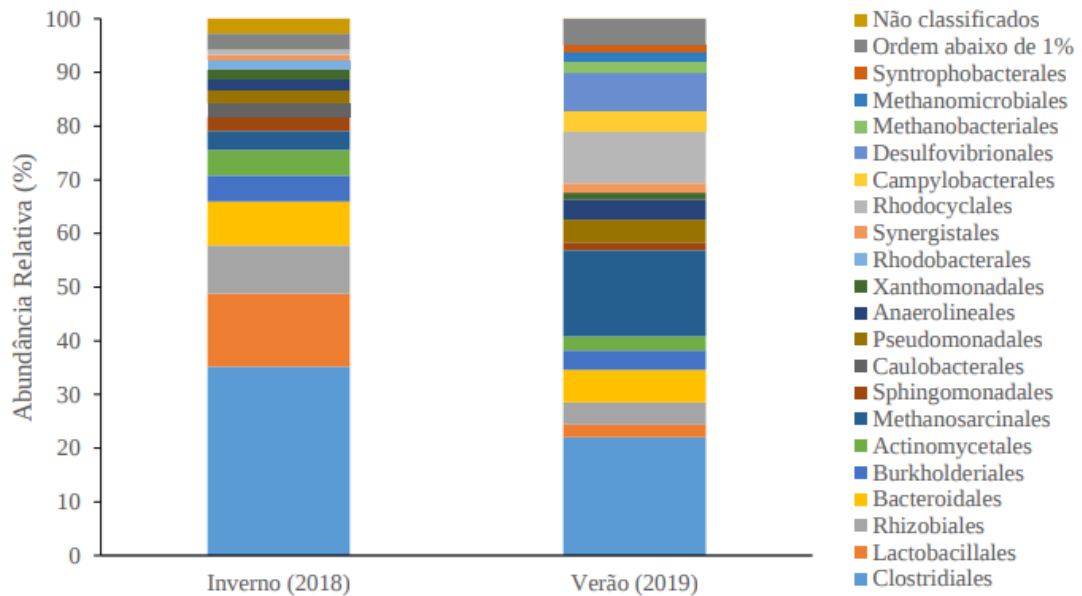
anaeróbias formadoras de esporos, sendo a possível razão da sua predominância sobre as demais ordens (MARA e HORAN, 2003), e sua elevada abundância pode indicar ambientes predominantemente anaeróbios (WANG E YIN, 2017).

Figura 16 - Cultivo de Agar sangue



Fonte: Martinez (2021).

Figura 17 - Abundância Relativa das amostras de lodo do TS-UFSM, em nível de ordem



Fonte: Ramirez (2019).

A coleta para o LTS foi realizada no ponto médio e no fundo do tanque séptico, com auxílio de balde e corda. A amostra foi colocada recipientes de plástico e encaminhadas

imediatamente para o LEMA da UFSM. Seguidamente foi fraccionada e centrifugada (2500 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e a fase sedimentada foi mantida em recipientes de vidro a temperatura de 4 ± 1 °C até o momento do uso para o pré-tratamento.

Todos os ensaios foram realizados utilizando o mesmo lote de lodo. Os inóculos (LAG e LTS) foram caracterizados quanto ao teor de umidade, sólidos totais, sólidos voláteis e cinzas. Os procedimentos adotados estão descritos nas seções 4.4.1. a 4.4.3.

4.4.1 Determinação do teor de umidade e sólidos totais

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico. Esta técnica baseia-se na quantificação da massa de uma amostra antes e depois da secagem em estufa a 105 °C. Para este ensaio, foram colocados, aproximadamente, 10 g de inóculo na estufa, medindo-se a massa da amostra, periodicamente, até obter valor constante.

O teor de umidade foi calculado conforma a Equação 5, onde m_i é a massa inicial e m_f é a massa final da amostra. A fração solida resultante do processo de secagem refere-se ao teor de sólidos totais (ST). Deste modo, os sólidos totais foram determinados a partir da Equação 6. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$Umidade (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

$$ST (\%) = 100 - Umidade (\%) \quad (6)$$

4.4.2 Determinação do teor de sólidos voláteis

A análise de sólidos voláteis (SV) foi conduzida de acordo com o método padrão Método 2540E do APHA (2012) . Para este procedimento, foram colocados, aproximadamente 5 g de amostra seca em cadinhos de porcelana e submetidos na mufla a 550 °C durante 1 h.

A fração de sólidos voláteis foi calculada a partir da Equação 7, sendo que A é a massa da amostra seca + cadinho (g), B é a massa do cadinho (g), e C é a massa da amostra + cadinho após a mufla (g). Os ensaios foram realizados por triplicata.

$$SV(\%) = \frac{(A - C) \times 100}{A - B} \quad (7)$$

4.4.3 Determinação do teor de cinzas

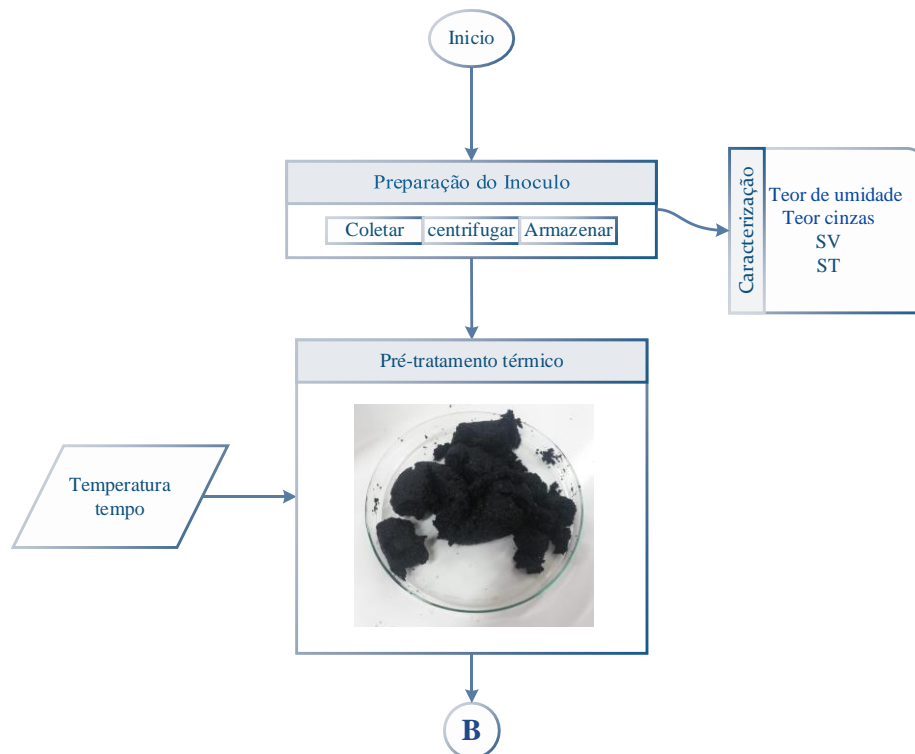
O conteúdo de cinzas foi determinado a partir da calcinação da amostra em forno mufla a 800 °C por 2 h. Para isto, foi colocado aproximadamente, 1 g de amostra (previamente seca a 105 °C) em cadinhos de porcelana em forno mufla.

O teor de cinzas do lodo foi calculado conforme a Equação 8, onde m_1 é a massa da amostra mais cadinho após a calcinação, m_2 a massa do cadinho e m_0 a massa inicial de amostra. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$Cinzas(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \quad (8)$$

Para o pré-tratamento dos lodos, foi escolhido o tratamento térmico por ser o método mais usado para o enriquecimento das bactérias produtoras de hidrogênio em culturas mistas e inativar as bactérias metanogênicas (consumidoras de H₂) (Quadro 1, seção 3.2.6.1). Um fluxograma dos principais procedimentos experimentais dos inóculos, é apresentado na Figura 18.

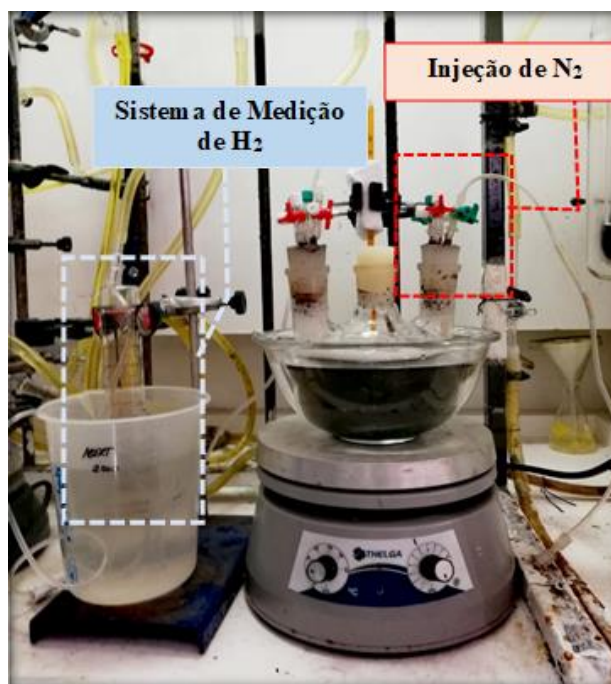
Figura 18 - Fluxograma representativo do inóculo



4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA

A unidade de produção de hidrogênio foi instalada e o Bio-H₂ produzido analisada no laboratório de Materiais Inorgânicos (LMI) na faculdade de Química da UFSM. Está composta basicamente pelo reator com capacidade de 500 mL que foi purgado com N₂ gás para garantir as condições anaeróbicas, um agitador magnético com aquecimento, um termômetro, e um sistema de medição do volume de Bio-H₂ (Figura 19).

Figura 19 - Unidade de produção do Bio-H₂



Fonte: Autora.

A produção do Bio-H₂ manteve-se a temperatura entre 36 e 38 °C, agitação constante e pH inicial no faixa de 6 - 7, que foi ajustado com soluções de NaOH 1N ou HCl 1N. O inóculo foi tratado termicamente na estufa a 100 °C por 60 min para inativar as arqueas metanogênicas (consumidoras de H₂) e ativar as acidogênicas (produtoras de H₂). Esse método foi escolhido por apresentar boa eficiência no enriquecimento de bactérias produtoras de H₂ (Quadro 1, seção 3.2.6.1) além de ser um método fácil e prático.

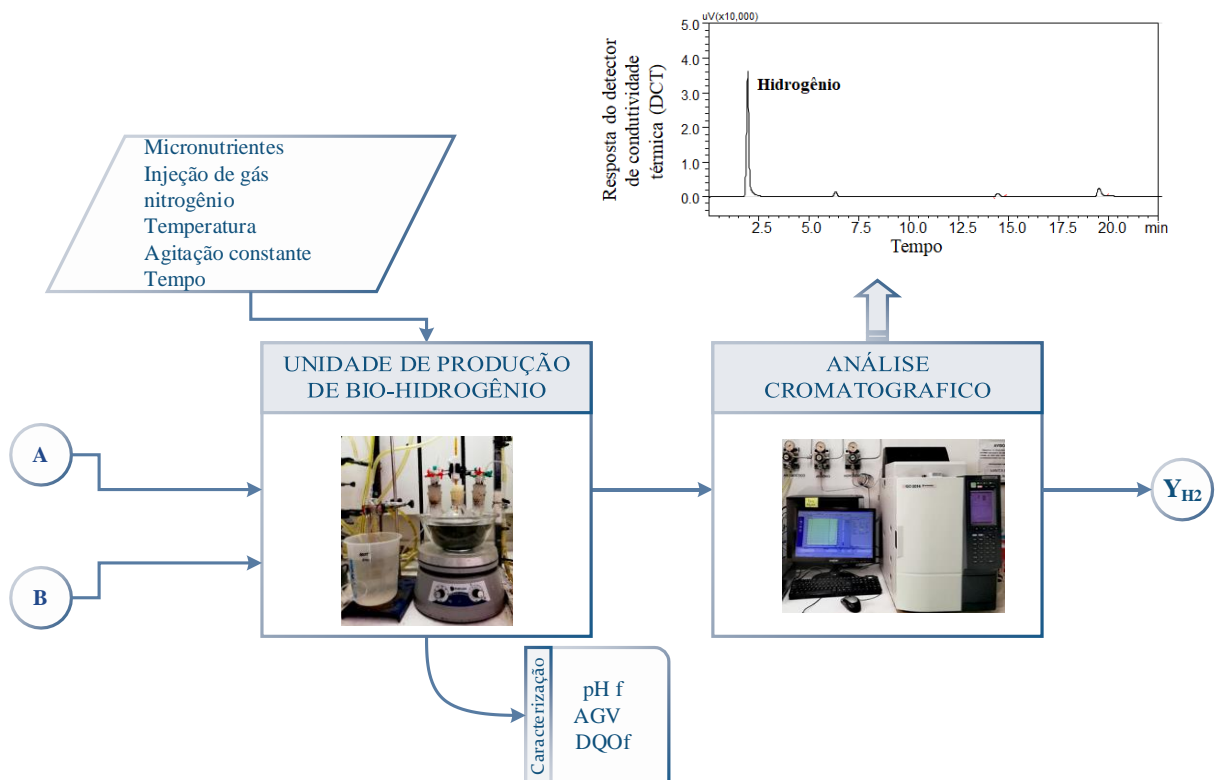
O meio mineral foi preparado pela seguinte forma: 55 g MgCl₂.6H₂O; 0,7902 g ZnCl₂; 7 g FeSO₄(NH₄)₂SO₄.6H₂O; 1,2 g MnCl₂.4H₂O; 0,4 g CuSO₄.7H₂O; 0,01 g H₃BO₃; 1 g Mo₇O₂₄(NH₄).4H₂O; 0,05 g NiCl₂.6H₂O; 0,05 g NaSO₃.5H₂O; 60 g CaCl₂.2H₂O; e 1,174 g CoCl₂.6H₂O em 1 litro de água desionizada.

4.5.1 Processo da fermentação escura

Para iniciar o processo de fermentação escura, a razão de substrato/inóculo foi de 9, adicionado 5ml do meio mineral. Na sequência, o pH inicial do médio e a temperatura eram ajustados segundo a seção 4.5 e o sistema era fechado com uma rolha de silicone, onde estava acoplado o termômetro.

Após o fechamento do sistema, o gás nitrogênio (N_2) era injetado durante 10 min para a remoção do oxigênio no meio e garantir a condição anaeróbia antes de iniciar o processo fermentativo. A concentração de AT e DQO foi medida antes e após cada ensaio. Um fluxograma representativo do processo de fermentação escura para a produção de Bio- H_2 se mostra na Figura 20.

Figura 20 - Fluxograma do processo de fermentação escura para produção de Bio- H_2



A: Fluxograma representativo do substrato (Figura 15).

B: Fluxograma representativo do inóculo (Figura 18).

Fonte: Autora.

A Produção de Bio- H_2 foi medida a partir de um sistema de deslocamento de coluna em uma proveta invertida conectada ao reator (Figura 20) e o monitoramento foi realizado em

intervalos entre 40 - 60 min após do início do processo fermentativo, com exceção do período noturno. Cabe ressaltar que o gás coletado era extraído mediante uma seringa metálica (500 uL), que foi devidamente purgada com gás Árgon. A amostra foi injetada ao Cromatógrafo Shimadzy GC-2014, composto por uma coluna Carboxem 1000, comprimento 4.6 m com diâmetro interno 2,10 mm e detector de condutividade térmica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

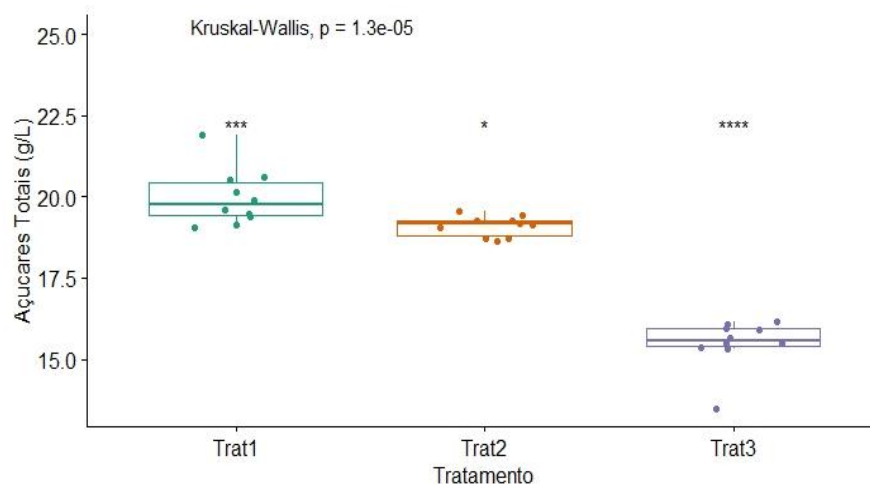
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ

O teor de umidade e teor cinza da CA foi de $9,9 \pm 0,5\%$ e $15,54 \pm 0,2\%$ respectivamente, que está de acordo com os valores na literatura (ABAIDE *et al.*, 2019; CABRERA *et al.*, 2014; NICHOLS *et al.*, 2014; SAHA, B. C. *et al.*, 2005). A concentração de AT para a CA sem pré-tratamento foi seguindo o protocolo para determinação de AT pelo método DNS, foi de $3,19 \text{ g L}^{-1}$ AT.

5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE ARROZ

A CA foi submetida ao processo de hidrólise ácida em três diferentes concentrações de ácido sulfúrico (Trat1, Trat2 e Trat3) para a conversão dos carboidratos (celulose e hemicelulose) em açúcares fermentáveis (Tabela 9, seção 4.2). O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar se alguma das diferenças entre as medianas é estatisticamente significativa. Tendo como variante categórica, a hidrólise ácida da CA (Trat1, Trat2 e Trat3) e a variante dependente continua a concentração de AT. Para verificar se as diferenças são significativas vejamos a Figura 21, observa-se que o valor da significância (p) que no caso é $1,3 \times 10^{-5}$ é bem menor a 0,05, isto quer dizer que existe diferença significativa entre as mediadas dos Trat1, Trat2 e Trat3.

Figura 28 - Concentração de açúcares totais para os pré-tratamentos da CA



*: um dado atípico

***: três dados atípicos

****: quatro dados atípicos

Fonte: Autora.

Conseqüentemente identificou-se quais dos pré-tratamentos da CA resultou no hidrolisado com a maior concentração de açúcares totais. A maior recuperação de AT depois dos pré-tratamentos foi de 201 ± 8 g kg CA⁻¹, 192 ± 3 g kg CA⁻¹ e 156 ± 7 g kg CA⁻¹ para o Trat1, Trat2 e Trat3, respectivamente. Ou seja, o Trat1 apresentou maior concentração de AT e na Figura 21 também apresenta os gráficos Box-plot gerados das análises pelo software R-Studio, os quais apresentam a distribuição dos dados obtidos no Trat1, Trat2 e Trat3.

A Tabela 10 apresenta a média das concentrações de AT presente nos hidrolisados resultantes dos pré-tratamentos. Observa-se que a condição que apresentou maior e menor concentração AT foi o Trat1 e Trat3 com $19,97$ g L⁻¹ e $15,45$ g L⁻¹ respectivamente. A Tabela 10 também mostra as concentrações de 5HMF e Furfural presentes nos hidrolisados após o pré-tratamento ácido da CA, à medida que a concentração do ácido sulfúrico aumentava no pré-tratamento, a concentração do Furfural e 5-HMF também aumentava.

Tabela 10 - Concentração de açúcares totais e inibidores dos hidrolisados

Pré-tratamento ácida da casca de arroz	Concentração de Açúcares totais (g L⁻¹)	Furfural (g L⁻¹)	5-HMF (g L⁻¹)
Trat 1: 1% v/v H ₂ SO ₄	19,97	A.L.	A.L.
Trat 2: 3% v/v H ₂ SO ₄	19,10	0,0091	0,0012
Trat 3: 5% v/v H ₂ SO ₄	15,48	0,0174	0,0009

A.L.: Abaixo do limite de quantificação $0,005$ g L⁻¹ para o Furfural e $0,0005$ g L⁻¹ para o 5-HMF
Fonte: Autora.

Altas concentrações (acima de 1 g L⁻¹) de 5-HMF no citoplasma da célula podem levar ao impedimento do crescimento celular e na maioria das vezes à morte do microrganismo (GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016; PARK, J. *et al.*, 2013). Observe-se que na Tabela 10, nenhum dos pré-tratamentos da casca de arroz superou a concentração de 1 g L⁻¹. Porém o Trat1 tem as menores concentrações do Furfural e 5-HMF.

A Tabela 11 mostra outros estudos do pré-tratamento da CA, a recuperação de AT e concentração dos principais inibidores. Mostra-se também que no presente estudo, o pré-tratamento de CA com concentração de ácido de 1% (v/v H₂SO₄) deu bons rendimento na recuperação de AT sem formar produtos de degradação de açúcar (inibidores) significativos. Embora o método não gerasse concentrações de inibidores significativos, precisa-se realizar a análise da composição química do hidrolisado.

Tabela 11 - Recuperação de AT e concentração dos inibidores Furfural e 5HMF

Referência	Pré-tratamento	Condições	Recuperação AT (g kg CA ⁻¹)	Inibidores	
				Furfural (g L ⁻¹)	5-HMF (g L ⁻¹)
Abaide,2019	Físico	Água supercrítica a 120 °C e 25MPa	183 ± 2,3	2,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1
Soarez,2019	Físico - Químico	Ácido fosfórico (15% m/m), 127 °C, 60min e 60% de umidade	118,16	0.51 ± 0,01	0.13 ± 0,01
Saha et al.,2005	Físico - Químico	Ácido Sulfúrico (1% v/v), 121 °C e 60min	189 ± 8	A. L.	A. L.
Roman,2021	Físico - Químico	Ácido Sulfúrico (1% v/v), 121 °C e 60min	201 ± 8	A. L.	A. L.

A.L.: Abaixo do limite de quantificação 0,005g L⁻¹ para o Furfural e 0,0005 g L⁻¹ para o 5-HMF
 Fonte: Autora.

5.3 PRODUÇÃO DE BIO-H₂

A produção de Bio-H₂ via processo de fermentação escura, teve como substrato o hidrolisado avaliado do pré-tratamento ácido que apresentou maior recuperação de AT da casca de arroz (Trat1) e para o inóculo se trabalhou sob dois tipos diferentes de culturas mistas apresentado na seção 4.4. O LAG e LTS foram aquecidos a 100 °C durante 60 min antes do seu uso e quanto à caracterização destes foram segundo os procedimentos descritos nas seções 4.4.1. a 4.4.3, mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização dos inóculos

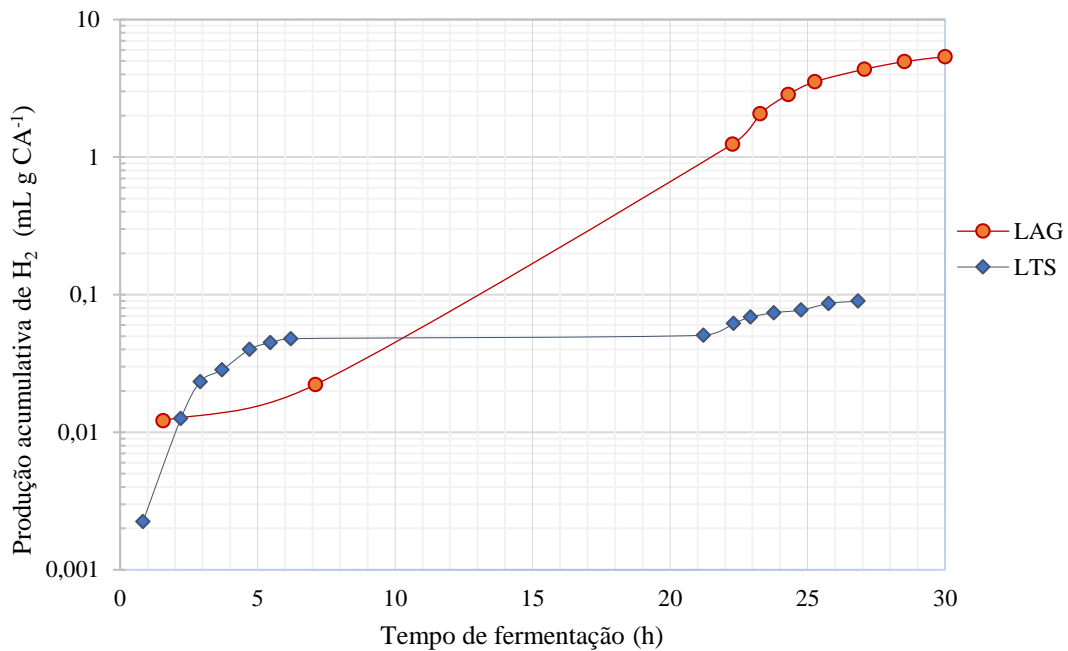
Inóculo	Umidade (%)	Sólidos Totais (%)	Sólidos Voláteis (%)	Cinzas (%)
LAG	54,67 ± 1,36	45,33 ± 1,36	44,69 ± 1,27	26,53 ± 1,54
LTS	76,62 ± 1,55	23,38 ± 1,55	65,15 ± 1,88	33,17 ± 1,74

Fonte: Autora.

Neste trabalho, a relação de substrato/inóculo foi de 9, tempo de fermentação no escuro foi menor de 30 h aproximadamente (Figura 22), a temperatura manteve-se na faixa de 35-37 °C com um valor médio de 35,8 °C, pH inicial na faixa 6,5 – 7, e agitação constante durante o

processo de fermentação escura na unidade de produção do Bio-H₂. De acordo com a literatura são condições ideais para uma produção máxima de Bio-H₂.

Figura 36 - Produção acumulativa de Bio-H₂



Nota: Eixo de “Produção acumulativa de H₂” em escala logarítmica.
Fonte: Autora.

Na Figura 22 observa-se o aumento crescente na produção de Bio-H₂ para ambos inóculos (LAG e LTS), porém o rendimento na produção de Bio-H₂ para o LTS é bem baixo comparado com do LAG. A produção acumulativa de Bio-H₂ com os diferentes inóculos (LAG e LTS) note-se também que não foi possível terminar o processo de fermentação escura pela disponibilidade do cromatógrafo.

A produção de Bio-H₂ com o LAG e LTS foi de 5,37 mL H₂ g CA⁻¹ e 0,09 mL H₂ g CA⁻¹ respectivamente. Sendo que para o ensaio com LAG, o rendimento de Bio-H₂ foi de 0,173 mL h⁻¹ g CA⁻¹ tendo como concentração inicial de AT de 18,7 g L⁻¹ durante um período de 30 h e para o ensaio com LTS o rendimento de Bio-H₂ foi de 3,3x10⁻³ mL h⁻¹ g CA⁻¹ tendo como concentração inicial de AT de 18,4 g L⁻¹ durante um período aproximado de 27 h. No entanto, o potencial de produção de hidrogênio usando como inóculo LAG é muito maior (quase 60 vezes) do que produzida pelo LTS.

A remoção da matéria orgânica (MO) foi avaliada em relação ao parâmetro de DQO antes e após de cada ensaio. A Tabela 13 mostra as eficiências de remoção de MO expressada na forma de DQO_i e DOQ_f ao longo do tempo de fermentação. Sendo que a maior porcentagem de remoção de MO para ensaio com o uso do LAG foi quase três vezes mais que com o uso do LTS.

Tabela 13 - Remoção de MO antes e após de cada ensaio

Inóculo	DQO_i (g L ⁻¹)	DOQ_f (g L ⁻¹)	Remoção de MO (%)
LAG	17,2	14,3	16,8
LTS	16,9	15,8	5,9

Fonte: Autora.

O presente estudo apresentou a maior produção de Bio-H₂ (0,173 mL H₂ h⁻¹ g CA⁻¹) do que estudos tais como: Tosuner et al. (2018), Sen et al. (2016), Silva et al. (2018) e Zhang et al. (2020) (Tabela 14). Porém em estudos mostrados também na Tabela 14, a adição de enzimas no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica ou o uso de inóculos puros tem sido maior produção de Bio-H₂.

Por outro lado, a Tabela 14 apresenta a produção de Bio-H₂ a partir da concentração de AT, ou seja, a partir da recuperação de açúcares totais fermentáveis. A produção de Bio-H₂ com o LAG e LTS foi de 28,57 mL H₂ g AT⁻¹ e 0,49 mL H₂ g AT⁻¹, respectivamente. Assim como produção de Bio-H₂ a partir da casca de arroz e com o uso do LAG apresentou maior rendimento de H₂ do estudado pelos pesquisadores Moodley e Gueguim Kana (2018) (Tabela 14). Porém outros estudos também mostrados na Tabela 14 apresentam maior produção de Bio-H₂ com diferentes tipos de biomassas lignocelulosicas e culturas mistas. Cabe ressaltar que o processo de fermentação escura não foi concluída e que é possível atingir um maior rendimento.

De acordo com a literatura, diferentes resultados de produção, taxa e rendimento de Bio-H₂ tem sido obtido, dependendo, principalmente, da fonte de matéria prima, da fonte de inóculo e das condições operacionais. Poucos trabalhos que utilizam casca de arroz como substrato foram encontrados.

Tabela 14 - Comparação na produção de Bio-H₂

(Continua)

Referência	Biomassa lignocelulósica	Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	Inóculo	TRH (h)	Rendimento de H ₂ (mL H ₂ g biomassa ⁻¹)	Produção H ₂ (mL h ⁻¹ g biomassa ⁻¹)
Sen et al. (2016)	Palha de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (HCl 1 – 3 M) Biológico: hidrólise enzimática (celulase 1% v/v de <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921)	Cultura mista (lodo de um parque de bambu). Pré-tratamento: 95–100 °C por 60min.	240 - 336	1,89 – 4,39	0,0078 - 0,013
Gonzales e Kim (2017)	Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 5% p/v) Biológico: Hidrólise enzimática (enzima comercial)	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator de tratamento de águas residuais de cervejaria) Pré-tratamento: 90 °C por 30 min.	77	320,6 – 473,1	4,15 - 6,14
Tosuner et al.(2018)	Casca de arroz	Físico: Moagem	<i>Clostridium termitidis</i> ATCC-21846 e <i>Clostridium intestinale</i> ATCC-BAA 1027	324	5.9	0,018
Tandon et al. (2018)	Farelo de arroz	-	<i>Enterobacter ludwigii</i> YM1	144	266,4	1,89
Zhang et al. (2020)	Palha de milho	Físico: Moagem Biológico: hidrólise enzimática (celulase comercial)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	72	36,08	0,50
Wang et al.(2010)	Talo de milho	Físico: Moagem Químico: ácido (HCl 0,2 - 1,2% em peso) Biológico: hidrólise enzimática (<i>Trichoderma viride</i>)	Cultura mista (lodo anaeróbico de um rio natural) Pré-tratamento: 100 °C por 15min	-	126,22	9,58

							(Conclusão)
Gonzales et al. (2019)	Cacho de frutas vazio de dendê	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 6% v/v) Biológico: hidrólise enzimática (enzima comercial)	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator UASB) Pré-tratamento: 90 °C por 30 min	77	169,53–286,98	2,2 - 3,72	
Silva et al. (2018)	Bagaço de caju	Físico: Moagem Químico: Peróxido de hidrogênio alcalino; Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 0,6M) Biológico: hidrólise enzimática (enzima comercial)	<i>Clostridium roseum</i> ATCC 17,797	50	0,08–1,89	0,002 - 0,038	
Roman, (2021)	Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 1% v/v)	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator de tratamento de águas residuais de cervejaria) Pré-tratamento: 100 °C por 30 min	30	5,37	0,179	
	Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 1% v/v)	Lodo do tanque séptico da Estação tratamento de esgoto da UFMS Pré-tratamento: 90 °C por 60 min	27	0,09	0,003	

Fonte: Autora.

Tabela 15 - Produção de Bio-H₂ a partir dos açúcares totais

Referência	Biomassa lignocelulósica	Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	Inóculo	Rendimento de H ₂ (mL H ₂ g AT ⁻¹)
Azman et al.(2016)	Farelo de arroz	Químico: Hidrólise ácida (18M H ₂ SO ₄ 1% v/v)	<i>Clostridium acetobutylicum</i> YM1	38,52 - 117,24
Kongjan et al.(2010)	Palha de trigo	Físico-químico: Hidrotérmico	Cultura mista (cultura hidrogenogênica enriquecida de um CSTR em escala de laboratório alimentado com xilose)	147,7 – 317,6
Rorke e Gueguim Kana (2016)	Resíduos de folhas de sorgo	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (HCl, H ₂ SO ₄ e HNO ₃ - 1,0; 3,5 ou 6,0% v/v)	Cultura mista (lodo anaeróbico de uma estação de tratamento de águas residuais) 121 °C for 10 min	213,14
Moodley e Gueguim Kana (2018)	Resíduos de folhas de cana-de-açúcar	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (HCl, H ₂ SO ₄ e HNO ₃ - 0,5; 2,75; 5,0% (v/v)	Cultura mista (lodo anaeróbico de uma estação de tratamento de águas residuais) 121 °C for 10 min	18,6
Roman (2021)	Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 1% v/v)	Cultura mista (lodo anaeróbico de um reator de tratamento de águas residuais de cervejaria) Pré-tratamento: 100 °C por 30 min	28,57
	Casca de arroz	Físico: Moagem Químico: Hidrólise ácida (H ₂ SO ₄ 1% v/v)	Lodo do tanque séptico da Estação tratamento de esgoto da UFMS Pré-tratamento: 90 °C por 60 min	0,49

Fonte: Autora.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo investigar a eficiência do pré-tratamento com ácido diluído e o desempenho na produção de hidrogênio via processo de fermentação escura para o reaproveitamento de biomassas lignocelulósicas abundante no estado do Rio Grande do Sul, e foi concluído que:

- de acordo com os ensaios de hidrólise ácida, a maior concentração de açúcares totais da casca de arroz foi $201 \pm 8 \text{ g kg CA}^{-1}$ obtida na temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de reação de 60 min, concentração de ácido H_2SO_4 de 1% (v/v) (Trat1). Também, a menor concentração de dos inibidores Furfural e 5HMF foram menores que $0,005 \text{ g L}^{-1}$ e $0,0005 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente no Trat1. Portanto o pré-tratamento ácido ao 1% v/v H_2SO_4 foi a melhor condição para casca de arroz, não só apenas pela maior recuperação de açúcares totais, mas também pela menor concentração na formação de subprodutos inibitórios;

- o lodo anaeróbico granulado apresentou maior eficiência que o lodo do tanque séptico enquanto à produção do Bio- H_2 via fermentação escura a partir casca de arroz no RS Brasil;

- a partir dos ensaios de fermentação escura identificou-se que a maior produção de Bio- H_2 foi de $5,37 \text{ mL H}_2 \text{ g CA}^{-1}$ obtida em condições de tempo de fermentação de 30 h, temperatura média de $35,7$; pH inicial média de $6,4$ e o lodo anaeróbico granulado como inóculo. Sendo esta mesma, a taxa máxima de produção de H_2 de $0,173 \text{ mL h}^{-1} \text{ g CA}^{-1}$;

- o rendimento na produção de Bio- H_2 a partir da recuperação de açúcares totais para o LAG e LTS foi de $28,57 \text{ ml H}_2 \text{ g AT}^{-1}$ e $0,49 \text{ ml H}_2 \text{ g AT}^{-1}$, respectivamente.

O desenvolvimento desta dissertação contribui com o avanço do conhecimento por trazer informações sobre processo de hidrólise ácida da casca de arroz produzidas no estado federal de RS, para obtenção integrada de açúcares fermentescíveis, bioprodutos e coprodutos sólidos além de identificar culturas mistas produtoras de Bio- H_2 .

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e conclusões deste trabalho, recomenda-se para futuros trabalhos:

- Avaliar o pré-tratamento ácido da casca de arroz com adição de enzimas;
- Realizar análise cromatografia dos açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose) no hidrolisado da casca de arroz;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do lodo gerado na ETE da UFSM, segundo a Resolução CONAMA 375/06;
- Avaliar o pré-tratamento do lodo do tanque séptico sob diferentes condições.
- Estudar o desempenho de outras fontes de inóculo no processo de fermentação escura, como, por exemplo, o lodo gerado na cervejeira Santa Maria;
- Aproveitamento da fase sólida depôs do pré-tratamento ácido da casca de arroz, como, por exemplo, utilizado como matéria prima para obtenção de Biochar;
- Avaliar o processo de fermentação escura em contínuo e possível modelagem.

REFERÊNCIAS

- ABAIDE, E. R. **Hidrólise subcrítica de palha e cascas de arroz para obtenção íntegra de açúcares fermentescíveis e material adsorvente**. 2019. 209 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) — Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.
- ABAIDE, E. *et al.* Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 272, p. 510–520, 2019.
- AGBOR, V. B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnol**, [s. l.], v. 29, p. 675–685, 2011.
- ALEMAHDI, N. *et al.* Enhanced mesophilic bio-hydrogen production of raw rice straw and activated sewage sludge by co-digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 40, n. 46, p. 16033–16044, 2015.
- ALLEN, S. A. *et al.* Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2010.
- ALMEIDA, J. R. *et al.* Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 625, 2009.
- ANGENENT, L. *et al.* Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 22, p. 477–485, 2004.
- ANTONOPOULOU, G. *et al.* Biohydrogen production from sweet sorghum biomass using mixed acidogenic cultures and pure cultures of *Ruminococcus albus*. **Global Nest Journal**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 144–151, 2007.
- APHA. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (SMEWW) 22st Edition**. [S. l.: s. n.], 2012.
- APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008.
- ARGUN, H. *et al.* Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: effects of the initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, n. 21, p. 6109–6115, 2008.
- AZBAR, N. *et al.* Comparative Evaluation of Bio-Hydrogen Production from Cheese Whey Wastewater Under Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Conditions. **International Journal of Green Energy**, [s. l.], v. 6, p. 192–200, 2009a.
- AZBAR, N. *et al.* Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 34, p. 7441–7447, 2009b.
- AZMAN, N. F. *et al.* Biohydrogen production from de-oiled rice bran as sustainable feedstock in fermentative process. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, p. 145–156, 2016.

BAGHCHEHSARAEI, B. *et al.* Fermentative hydrogen production by diverse microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, p. 5021–5027, 2010.

BAJPAI, P. Structure of lignocellulosic biomass. *In*: PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FOR BIOFUEL PRODUCTION. [S. l.: s. n.], 2016. p. 7–12.

BATSTONE, D. J. *et al.* Platforms for energy and nutrient recovery from domestic wastewater: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 140, p. 2–11, 2015.

BELLIDO, C. *et al.* Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, p. 10868–10874, 2011.

BELTRAN, J. . *et al.* Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 18, p. 3721, 2019.

BUNDHOO, Z. M. A.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, n. 16, p. 6713–6733, 2016.

CABRERA, E. *et al.* Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2014.

CABROL, L. *et al.* Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 158–181, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

CAI, M.; LIU, J.; WEI, Y. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 3195–3202, 2004.

CAO, G.-L. *et al.* Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, n. 24, p. 13475–13480, 2010.

CASTELLÓ, E. *et al.* Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 119, n. May, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>

CHAGANTI, S. R. *et al.* Influence of linoleic acid, pH and HRT on anaerobic microbial populations and metabolic shifts in ASBRs during dark hydrogen fermentation of lignocellulosic sugars. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 2212–2220, 2013.

CHANG, A. *et al.* Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, p. 14280–14288, 2006.

CHANG, A. C. C. *et al.* Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolysed rice straw hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36,

n. 21, p. 14280–14288, 2011.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. No Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 84, p. 5–37, 2000.

CHEN, H. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer, 2014. 511 p.

CHEN, R. *et al.* Hydrolysates of lignocellulosic materials for biohydrogen production. **BMB Rep**, [s. l.], v. 46, p. 244–251, 2013.

CHEN, W. *et al.* Fermentative hydrogen production with CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 30, p. 1063–1073, 2005.

CHEN, W. M. *et al.* Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 30, p. 1063–1070, 2005.

CHU, C. Y. *et al.* Kinetics of cotton cellulose hydrolysis using concentrated acid and fermentative hydrogen production from hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 14, p. 8743–8750, 2011.

CHU, Y. *et al.* Bioconversion of wheat stalk to hydrogen by dark fermentation: effect of different mixed microflora on hydrogen yield and cellulose solubilisation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, p. 3805–3809, 2011.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. [S. l.], 2019.

CUI, M *et al.* Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, p. 4041–4047, 2010.

CUI, MJ; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 37, p. 1120–1124, 2011.

DAGNINO, E. P. *et al.* Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 42, p. 363–368, 2013.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 26, p. 13–28, 2001.

DAUPTAIN, K. *et al.* Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 313, p. 123665, 2020.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F. DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, n. 19, p. 4989–4997, 2008.

- DE SÁ, L. *et al.* Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.
- DOS REIS, C. .; SILVA, E. L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 172, p. 28–36, 2011.
- EERE - Robert Rapier. **Life cycle emissions of hydrogen**. The Fourth Generation, 2020. Acesso em 05 abr. 2021. Disponível em:<<https://4thgeneration.energy/life-cycles-emissions-of-hydrogen/>>.
- EERE - Energy Efficiency and Renewable Energy. **Hydrogen Production Processes: Hydrogen and fuel cell technologies office**. Energy Efficiency and Renewable Energy. Acessado em 05 abr. 2021. Disponível em:<<https://www.energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production-processes>>.
- ELBESHISHY, E. *et al.* Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. **International Journal of Green Energy**, [s. l.], v. 36, p. 11379–11387, 2011.
- ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. Enhancement of biohydrogen producing using ultrasonication. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 6184–6193, 2010.
- ERGAL, Í. *et al.* The physiology and biotechnology of dark fermentative biohydrogen production. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 36, p. 2165–2186, 2018.
- EU. A hydrogen strategy for a climate-neutral Europe. **Communication From The Commission To The European Parliament, The Council, The European Economic And Social Committee And The Committee Of The Regions**, [s. l.], 2020.
- FAN, Y. T. *et al.* Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 493–496, 2006a.
- FAN, Y. T. *et al.* Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 500–505, 2006b.
- FANG, H. H. P.; LI, C. L.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, p. 683–692, 2006.
- FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, p. 8687–8696, 2011.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019. Acesso em 13 out. 2020. Disponível em:<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.
- GHIMIRE, A. *et al.* A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, [s. l.], v. 144, p. 73–95, 2015.

GHIMIRE, A. *et al.* Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. **Waste Management**, [s. l.], v. 50, p. 55–64, 2016.

GÓMEZ, X. *et al.* Bio-hydrogen production from waste fermentation: mixing and static conditions. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 970–975, 2009.

GONZALES, R. R.; KIM, J. S.; KIM, S. H. Optimization of dilute acid and enzymatic hydrolysis for dark fermentative hydrogen production from the empty fruit bunch of oil palm. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], p. 2191–2202, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.022>

GONZALES, R. *et al.* Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 113, p. 22–27, 2016.

GONZALES, R. R. *et al.* Enhancement of hydrogen production by optimization of pH adjustment and separation conditions following dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 42, p. 27502–27511, 2017.

GONZALES, R. R.; KIM, S. . Dark fermentative hydrogen production following the sequential dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of rice husk. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 42, n. 45, p. 27577–27583, 2017.

GONZALES, R. R.; KIM, J. S.; KIM, S. H. Optimization of dilute acid and enzymatic hydrolysis for dark fermentative hydrogen production from the empty fruit bunch of oil palm. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 44, p. 2191–2202, 2019.

GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN, P.; KIM, S. Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, p. 21678–21684, 2016.

GUO, X. M. *et al.* Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, p. 10660–10673, 2010.

HALLENBECK, P. C. Microbial technologies in advanced biofuels production. *In*: SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC, NEW YORK. [S. l.: s. n.], 2012.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 27, p. 1185–1193, 2002.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009.

HAWKES, F. *et al.* Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 32, p. 172–184, 2007.

HAWKES, F. R. *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 27, p. 1339–1347, 2002.

- HE, L. *et al.* Enhanced hydrogen production from anaerobic fermentation of rice straw pretreated by hydrothermal technology. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 171, p. 145–151, 2014.
- HILIGSMANN, S. *et al.* Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 29, p. 685–695, 2007.
- HSU, T.; LADISCH, M.; TSAO, G. Alcohol from cellulose. **Chemistry and Technology**, [s. l.], p. 315–319, 1980.
- HU, B.; CHEN, S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 32, n. 15, p. 3266–3273, 2007.
- IBGE/PESQUISA AGRÍCOLA MUNICIPAL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. [S. l.], 2019.
- IEA - International Energy Agency. **Global Energy and CO2 Status Report 2019: Report extract:emissions**. International Energy Agency, 2019. Acessado em 05 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/global-energy-co2-status-report-2019/emissions>>.
- IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 104, p. 315, 1994.
- IVANOVA, G.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 3659–3670, 2009.
- JENKINS, B. M.; BAXTER, L. L.; MILES, T. R. Combustion properties of biomass. **Fuel Processing Technology**, [s. l.], v. 54, p. 17–46, 1998.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 16, 2013.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 38, p. 569–582, 2006.
- KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. **Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations**. [S. l.: s. n.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.162>
- KARGI, F.; PAMUKOGLU, M. Y. Dark fermentation of ground wheat starch for bio-hydrogen production by fed-batch operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 64, p. 2940–2946, 2009.
- KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, p. 138–144, 2006.

- KHANAL, S. K. *et al.* Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 29, p. 1123–1131, 2004.
- KIM, D.-H. *et al.* Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, p. 2158–2169, 2006.
- KIM, J. K. *et al.* Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 102, p. 328–332, 2006.
- KONDO, T.; POLYM, J. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science**, [s. l.], v. 35, p. 717, 1997.
- KONGJAN, P. *et al.* Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 899–908, 2010.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 98, p. 1183–1190, 2007.
- KOTHARI, R. *et al.* Fermentative hydrogen production—An alternative clean energy source. **Renewable. Sustainable. Energy Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2337, p. 2346, 2012.
- KRAEMER, J.; BAGLEY, D. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 29, p. 685–695, 2007.
- KUMAR, G. *et al.* Lignocellulose biohydrogen: practical challenges and recent progress. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 44, p. 728–737, 2015.
- KUMAR, G.; CHEON, H.-C.; KIM, S.-H. Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H₂ production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 39, n. 30, p. 16885–16890, 2014.
- KUMAR, P. *et al.* Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 48, p. 3713–3729, 2009.
- LAI, Z. *et al.* Optimization of key factors affecting hydrogen production from sugarcane bagasse by a thermophilic anaerobic pure culture. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, p. 1–11, 2014.
- LEE, K.-S. *et al.* Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1565–1572, 2008.
- LEE, K. *et al.* Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 37, n. 20, p. 15556–15562, 2012.
- LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a

granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 465–472, 2006.

LEE, Y.-J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 694–698, 2002.

LEVIN, D. B. *et al.* Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 31, p. 1496–1503, 2006.

LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 37, p. 1–39, 2007.

LI, Y.-C. *et al.* Feasible pretreatment of textile wastewater for dark fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 37, n. 20, p. 15511–15517, 2012.

LI, Y. C. *et al.* Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step acid hydrolysis process. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 21, p. 14245–14251, 2011.

LIN, C.-Y. *et al.* Pilot-scale hydrogen fermentation system start-up performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, n. 24, p. 13452–13457, 2010.

LIN, CN; WU, S.; CHANG, J. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, n. 15, p. 2200–2210, 2006.

LIN, CY *et al.* A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 14, p. 8758–8764, 2011.

LIN, P. *et al.* Enhancing the performance of pilot-scale fermentative hydrogen production by proper combinations of HRT and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 21, p. 14289–14294, 2011.

LIN, R. *et al.* Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 196, p. 250–255, 2015.

LIU, D.; ZENG, R. J.; ANGELIDAKI, I. Effects of pH and hydraulic retention time on hydrogen production versus methanogenesis during anaerobic fermentation of organic household solid waste under extreme-thermophilic temperature (70 degrees C). **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 100, p. 1108–1114, 2008.

LIU, Z. *et al.* Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 175, p. 152–159, 2015.

LO, Y. C. *et al.* **Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis.** [S. l.: s. n.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.100>

LOPEZ-HIDALGO, A. M.; SÁNCHEZ, A.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A. Simultaneous

production of bioethanol and biohydrogen by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate. **Fuel**, [s. l.], v. 188, p. 19–27, 2017.

LUKAJTIS, R. *et al.* Comparison and Optimization of Saccharification Conditions of Alkaline Pre-Treated Triticale Straw for Acid and Enzymatic Hydrolysis Followed by Ethanol Fermentation. **Energies**, [s. l.], v. 11–639, 2018a.

LUKAJTIS, R. *et al.* Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. **Energies**, [s. l.], v. 11, p. 886, 2018b.

LUKAJTIS, R. *et al.* Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 91, p. 665–694, 2018.

LYND, L. R.; WEIMER, P. .; VAN ZYL, W. . Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 66, p. 506–577, 2002.

MALDONE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. COMUNICADO TÉCNICO. *In:* , 2013. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. [S. l.: s. n.], 2013. p. 1–4.

MANDAL, B.; NATH, K.; DAS, D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 831–835, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9008-8>

MARS, A. E. *et al.* Biohydrogen production from untreated and hydrolyzed potato steam peels by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, n. 15, p. 7730–7737, 2010.

MARTINEZ- BURGOS, W. *et al.* The effect of hydrolysis and sterilization in biohydrogen production from cassava processing wastewater medium using anaerobic bacterial consortia. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 4, p. 25551–25564, 2019.

MARTINEZ, L. N. **Fermentación oscura em operación continua e implementación de un algoritmo de control adaptativo para la producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras**. 120 f. 2021. [s. l.], 2021.

MILLATI, R. *et al.* Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 304, p. 122998, 2020.

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolyzate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 26, 2009.

MIZUNO, O. *et al.* Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 73, p. 59–65, 2000.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 363, p. 769–776, 2002.

MONLAU, F. *et al.* Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass

hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.

MONLAU, F. *et al.* Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 260–322, 2013a.

MONLAU, F. *et al.* Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 38, n. 28, p. 12273–12282, 2013b.

MOODLEY, P.; GUEGUIM KANA, E. B. Comparative study of three optimized acid-based pretreatments for sugar recovery from sugarcane leaf waste: A sustainable feedstock for biohydrogen production. **Engineering Science and Technology, an International Journal**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 107–116, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2017.11.010>

MORENO-ANDRADE, I. *et al.* Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 40, n. 48, p. 17246–17252, 2015.

MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 96, p. 673–686, 2005.

MU, Y. *et al.* Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, p. 780–785, 2006.

MUHARJA, M. *et al.* An integrated green process: subcritical water, enzymatic hydrolysis, and fermentation, for biohydrogen production from coconut husk. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 249, p. 268–275, 2018.

MUÑOZ-PÁEZ, K. M. *et al.* Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 4, p. 2289–2297, 2019.

NAM, J.-Y. *et al.* Harnessing dark fermentative hydrogen from pretreated mixture of food waste and sewage sludge under sequencing batch mode. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, p. 7155–7161, 2016.

NASIRIAN, N. *et al.* Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 411–420, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.073>

NICHOLS, N. N. *et al.* ScienceDirect Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 7, p. 1–10, 2014.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 1, p. 21–39, 2010.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELAND, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and

microbial community analysis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 909–918, 2009.

OH, S.; GINKEL, S.; LOGAN, B. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 37, n. 22, p. 186–190, 2003.

OH, Y. K. *et al.* Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 28, p. 1353–1359, 2003.

OH, Y. K. *et al.* Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 27, p. 1373–1379, 2002.

OH, Y. K. *et al.* Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 88, n. 690–698, 2004.

OZTEKIN, R. *et al.* Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, n. 15, p. 4083–4090, 2008.

PAKARINEN, O.; KAPARAJU, P.; RINTALA, J. The effect of organic loading rate and retention time on hydrogen production from a methanogenic CSTR. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, p. 8952–8957, 2011.

PAN, C. *et al.* Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 2663–2669, 2010.

PAN, CM *et al.* Bioaugmented cellulosic hydrogen production from cornstalk by integrating dilute acid-enzyme hydrolysis and dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, p. 4852–4862, 2011.

PANAGIOTOPOULOS, I.A. BAKKER, R. R. *et al.* Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, p. 6331–6338, 2009.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. *et al.* Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compound. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 24, p. 11204–11211, 2011.

PARK, J.-H. *et al.* Feasibility of biohydrogen production from *Gelidium amansii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, p. 13997–14003, 2011.

PARK, J. *et al.* Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. **HYDROGEN ENERGY**, [s. l.], v. 38, n. 14, p. 6130–6136, 2013.

PATTRA, S. *et al.* Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, p. 5256–5265, 2008.

QI, N. *et al.* Fermentative hydrogen production with peanut shell as supplementary substrate:

effects of initial substrate, pH and inoculation proportion. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 127, p. 559–564, 2018.

RAJHI, H. *et al.* Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 513–521, 2016.

RAMÍREZ, R. J. M. G. **Remoção de matéria orgânica e nutrientes em sistema de tanque séptico seguido de wetland construído de fluxo vertical com recirculação**. 2019. 207 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) — Universidade Federal do Santa Maria, Santa Maria, 2019.

REN, N. *et al.* Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 22, p. 365–370, 2011.

REN, N *et al.* Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium ihermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, p. 6124–6132, 2008.

REN, NQ *et al.* Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 98, p. 1774–1780, 2007.

RODRÍGUEZ-VALDERRAMA, S. *et al.* Batch biohydrogen production from dilute acid hydrolyzates of fruits-and-vegetables wastes and corn stover as co-substrates. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 140, p. 105666, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105666>

RORKE, D.; GUEGUIM KANA, E. B. Biohydrogen process development on waste sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves: optimization of saccharification, hydrogen production and preliminary scale up. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, n. 30, p. 12941–12952, 2016.

SAADY, N. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 38, p. 13172–13191, 2013.

SAGNAK, R.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K. Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed waste ground wheat by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 36, n. 20, p. 12803–12809, 2011.

SAHA, B. C. *et al.* Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 40, p. 3693–3700, 2005.

SAHA, BADAL C *et al.* Dilute Acid Pretreatment , Enzymatic Saccharification , and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **BIOTECHNOLOGY PROGRESS**, [s. l.], p. 816–822, 2005.

SATAR, I. *et al.* Production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* in an immobilized cell reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 42, p. 9024–9030, 2017.

- SATTAR, A. *et al.* Quantification of temperature effect on batch production of bio-hydrogen from rice crop wastes in an anaerobic bio reactor. **international Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, p. 11050–11061, 2016.
- SCOMA, A.; BERTIN, L.; FAVA, F. **Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters**. [S. l.: s. n.], 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.028>
- SEIFERT, K. *et al.* Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 34, p. 3671–3678, 2009.
- SEN, B. *et al.* Pretreatment conditions of rice straw for simultaneous hydrogen and ethanol fermentation by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 4421–4428, 2016.
- SHI, X. *et al.* Enhanced bio-hydrogen production from sweet sorghum stalk with alkalization pretreatment by mixed anaerobic cultures. **International Journal of Energy Research**, [s. l.], v. 34, p. 662–672, 2010.
- SHIUN LIM, J. *et al.* A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 3084, p. 3094, 2012.
- SHOW, K. Y. *et al.* Biohydrogen production: current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 37, p. 15616–15631, 2012.
- SILVA, J. S. *et al.* Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 286, p. 71–78, 2018.
- SINGH, A. *et al.* Bioresource Technology Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave – alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, p. 1773–1782, 2011.
- SIQUEIRA, M.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 80, p. 109–116, 2015.
- SIVAGURUNATHAN, P.; SEN, B.; LIN, C.-Y. Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 39, n. 33, p. 19232–19241, 2014.
- SOARES, J. F. **Produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia de hidrolisados de resíduos agroindustriais**. 2019. 95 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) — Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.
- SOARES, J. *et al.* Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 117, p. 109484, 2020.
- SOAREZ, J. **Produção de hidrogênio a partir de fermentação anaeróbia de hidrolisados de resíduos agroindustriais**. 1–96 f. 2019. - Universidade Federal de Santa Maria, [s. l.], 2019.

STAFFELL, I. *et al.* The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. **Energy and Environmental Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 463–491, 2019.

SUN, S. *et al.* Experimental research on air staged cyclone gasification of rice husk. **Fuel Processing Technology**, [s. l.], v. 90, p. 465–471, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 83, p. 1–11, 2002.

SYDNEY, E. *et al.* Development of short chain fatty acid-based artificial neuron network tools applied to biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 5, p. 5175–5181, 2020.

TANDON, M. *et al.* Enterobacter ludwigii strain IF2SW-B4 isolated for bio-hydrogen production from rice bran and de-oiled rice bran. **Environmental Technology and Innovation**, [s. l.], v. 10, p. 345–354, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.03.008>

TOSUNER, Z. V.; TAYLAN, G. G.; OZMIHCI, S. Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 44, n. 34, p. 18785–18791, 2018.

TRAVAINI, R. *et al.* Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 2–12, 2016.

VALDEZ-VAZQUEZ, I. *et al.* Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 30, p. 1383–1391, 2005.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 13, p. 1000–1013, 2009.

VIJAYARAGHAVAN, KRISHMAN AHMAD, D.; BIN IBRAHIM, M. K. Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 569–579, 2006.

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

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

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

WANG, J. .; YIN, Y. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 4804–4823, 2017.

WANG, J. L.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 33, p. 5392–5397,

2008.

WANG, J.; WAN, W. Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, p. 8864–8868, 2008.

WANG, J.; YIN, Y. N. Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, p. 22, 2018.

WANG, Y. *et al.* Biohydrogen production from cornstalk wastes by anaerobic fermentation with activated sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 35, p. 3092–3099, 2010.

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

WONG, Y. M. *et al.* High efficiency biohydrogen production from glucose revealed in an inoculum of heat-pretreated landfill leachate sludge. **Energy**, [s. l.], v. 72, p. 628–635, 2014.

WU, J. H.; LIN, C. Y. Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 49, p. 223–228, 2004.

YASIN, N. H. M. *et al.* **Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review**. [S. l.: s. n.], 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.009>

YIN, Y. N.; WANG, J. Changes in microbial community during biohydrogen production using gamma irradiated sludge as inoculum. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 200, p. 217–222, 2016.

YU, H.-Q.; ZHAO, Q.-B.; TANG, Y. Anaerobic treatment of winery wastewater using laboratory-scale multi- and single-fed filters at ambient temperatures. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, p. 2477–2481, 2006.

ZHANG, T. *et al.* Comparative study on bio-hydrogen production from corn stover: Photo-fermentation, dark-fermentation and dark-photo co-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 3807–3814, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.170>

ZHANG, K. *et al.* Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1929–1936, 2011. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60679-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60679-1)

ZHANG, M. L. *et al.* Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 31, p. 250–254, 2007.

ZHANG, Y. F.; LIU, G. Z.; SHEN, J. Q. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 855–860, 2005.

ZHAO, M. *et al.* Effects of butyric acid stress on anaerobic sludge for hydrogen production from kitchen wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 85, p. 866–871, 2010.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, [*s. l.*], v. 2, p. 51–68, 2009.

ZHU, J. Y. *et al.* Swine manure fermentation for hydrogen production. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 100, p. 5472–5477, 2009.

ZHU, J. Y.; PAN, X.; ZALESNY, R. . Pretreatment of woody biomass for biofuel production: Energy efficiency, technologies, and recalcitrance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 87, p. 847–857, 2010.