UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Juliana Ferreira Soares

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Santa Maria, RS
2019

Juliana Ferreira Soares

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Prof. Dr. Flávio Dias Mayer

Santa Maria, RS
2019

Soares, Juliana Ferreira
Produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia de hidrolisados de resíduos agroindustriais / Juliana Ferreira Soares.- 2019.
95 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Flávio Dias Mayer
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2019

1. Resíduos lignocelulósicos 2. Hidrólise ácida 3. Bio hidrogênio I. Mazutti, Marcio Antonio II. Dias Mayer, Flávio 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.

Juliana Ferreira Soares

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Agrícola**.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2019:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Flávio Dias Mayer, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Giovani Leone Zabot, Dr. (UFSM)

Helmut Joél Navarro Díaz, Dr. (UFSM)

Helen Treichel, Dra. (UFFS)

Rodrigo Fernando dos Santos Salazar, Dr. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sempre iluminar meu caminho e colocar pessoas incríveis e essenciais nele, minha eterna gratidão;

À minha família, em especial a minha mãe Vânia, por todo amor, apoio e incentivo, e pela compreensão por muitas vezes não poder estar presente. Minha mãe, meu exemplo de vida, responsável por todas minhas conquistas;

Ao meu namorado Róbson Ilha, pelo amor, amizade, companheirismo, por aquentar as crises de ansiedade, por levar almoços e jantas nos longos dias de experimentos e por sempre estar ao meu lado incentivando e apoiando;

Ao meu orientador Marcio Mazutti, por ter confiado a mim este projeto de doutorado, pelos ensinamentos, apoio, incentivo e por toda contribuição para meu crescimento profissional. Serei eternamente grata por tudo que me proporcionou desde a graduação;

Ao coorientador Flávio Mayer, pela orientação, apoio, incentivo e contribuição durante todo período do doutorado, e, também, pela grande amizade;

Aos meus grandes amigos, em especial as minhas amigas Alana, Juliana e Sabrina, por todo apoio, carinho e compreensão por muitas vezes estar distante.

Ao grupo GBS, por terem me proporcionado momentos incríveis, de muitas aventuras, quando pude abstrair um pouco e renovar as energias para seguir em frente;

As minhas amadas Ivana e Bety, por trabalharem no meu estado físico e mental, pela valiosa amizade, por estarem sempre dispostas a me ouvir e aconselhar. Gratidão!

Aos meus colegas e amigos do coração, Tássia, Izelmar e Luciana, que estiveram comigo desde o início deste projeto e não mediram esforços para me ajudar em tudo que foi possível. Realmente não tenho palavras para agradecer, sem vocês tudo seria mais difícil;

Ao laboratorista Gustavo Ugalde, pela disponibilidade em realizar todas análises cromatográficas, e à laboratorista Mariana Bassaco, pelo essencial auxílio na montagem do sistema de fermentação;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o primeiro ano de doutorado;

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

RESUMO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

AUTORA: Juliana Ferreira Soares
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti
COORIENTADOR: Flávio Dias Mayer

Considerando a crescente demanda global por energia, a redução de recursos energéticos não renováveis e a preocupação com a qualidade do meio ambiente, o hidrogênio (H_2) surge como uma alternativa limpa, renovável e promissora, uma vez que sua combustão resulta apenas em água e energia. Dentre os métodos biológicos de produção de H_2, a fermentação anaeróbia é considerada a tecnologia mais viável, pois não necessita de fonte de energia externa e diversos tipos de biomassa podem ser utilizadas como fonte de carbono pelos microrganismos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar um resíduo agroindustrial e avaliar a produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do seu hidrolisado sob diferentes condições experimentais. As matérias-primas utilizadas foram a casca (CA) e o farelo (FA) de arroz, o bagaço de cevada (BC) e os resíduos da limpeza da soja (RS) e do trigo (RT). Todos os materiais foram caracterizados, preparados e submetidos ao processo de hidrólise ácida para a conversão dos carboidratos em açúcares fermentescíveis em diferentes condições de temperatura (104,4-127,0°C), tempo (20-60 min), concentração de ácido (5-15% H_3PO_4) e umidade (60-90%). A seleção da melhor condição experimental e da matéria-prima a ser utilizada para produção de H_2 foi realizada a partir do teor de açúcares redutores totais (ART) dos hidrolisados obtidos. O hidrolisado selecionado foi, então, utilizado como fonte de substrato no processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2, empregando-se lodo anaeróbio de frigorífico como inóculo. Os ensaios de fermentação foram conduzidos de acordo com o planejamento experimental fatorial, avaliando-se o efeito da temperatura (35-45°C), do pH inicial (5,5-7,5) e da proporção de inóculo (10-30%) na produção e na taxa máxima de produção de H_2. Os experimentos foram monitorados por um período de 20 h. A composição do meio foi analisada antes e após cada ensaio, em termos de açúcares, inibidores e ácido acético. O pH final de cada experimento também foi determinado. A condição experimental de hidrólise ácida que resultou na maior concentração de ART nos hidrolisados da casca e do farelo de arroz foi o ensaio 3 (127°C, 60 min, 15% (m/m) de H_3PO_4 e 60% de umidade). Nessa condição, a concentração de ART foi em média de 118,16 g kg $_{CA}^{-1}$ e de 170,38 g kg $_{FA}^{-1}$. Por outro lado, o ensaio 1 (127°C, 20 min, 5% (m/m) de H_3PO_4 e 90% de umidade) foi o que resultou em maior concentração de ART nos hidrolisados do bagaço de cevada, do resíduo de soja e do resíduo de trigo. A concentração de ART foi em média de 600,97 g kg $_{BC}^{-1}$, 80,37 g kg $_{RS}^{-1}$ e 228,04 g kg $_{RT}^{-1}$. A partir dos resultados da hidrólise, o bagaço de cevada foi a matéria-prima escolhida para o processo de produção de H_2, pois resultou na maior concentração de ART. Além disso, o BC encontra-se disponível em grande quantidade e em qualquer época do ano. A maior produção de H_2 (4160 mL L^{-1}) e a maior taxa máxima de produção de H_2 (760 mL L^{-1} h^{-1}) foram encontradas nos ensaios 7 (35°C, pH 7,5 e 30% de inóculo) e 8 (45°C, pH 7,5 e 30% de inóculo), respectivamente. Em alguns ensaios, o consumo da glicose do hidrolisado do BC chegou a 100%, enquanto que a xilose foi consumida em até 91,56%. A concentração de inibidores (furfural e 5-HMF) antes e após o processo fermentativo não teve alteração significativa, além disso não mostrou interferência negativa na produção de H_2. Por outro lado, a concentração de ácido acético teve um aumento expressivo, de uma faixa de 0,1392-0,3001 g L^{-1} a 1,1490-5,8392 g L^{-1}, o que explica a queda do pH no meio fermentativo ao final dos ensaios. Por fim, conclui-se que o hidrolisado do bagaço de cevada apresentou características apropriadas para produção de H_2 via fermentação anaeróbia, levando a resultados promissores quando comparado à literatura.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósicos. Hidrólise ácida. Bio-hidrogênio.

ABSTRACT

HYDROGEN PRODUCTION FROM ANAEROBIC FERMENTATION OF AGRICULTURAL WASTE HYDROLISATES

AUTHOR: Juliana Ferreira Soares
ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti
CO-ADVISOR: Flávio Dias Mayer

Considering the increasing global demand for energy, the reduction of nonrenewable energy resources and concern for the environmental quality, hydrogen (H_2) emerges as a clean, renewable and promising alternative, since its combustion results only in water and energy. Among the biological methods for H_2 production, anaerobic fermentation is considered the most viable technology, since it does not require an external source of energy and several types of biomass can be used as carbon source by the microorganisms. Therefore, the aim of this work was to select an agroindustrial residue and to evaluate the production of H_2 from anaerobic fermentation of its hydrolysate under different experimental conditions. The raw materials used were rice husk (CA), rice bran (FA), brewers' spent grain (BC), soybean waste (RS) and wheat waste (RT). All materials were characterized, prepared and submitted to the acid hydrolysis process for the carbohydrate's conversion into fermentable sugars under different conditions of temperature (104.4-127.0°C), time (20-60 min), acid concentration (5-15% H_3PO_4), and moisture (60-90%). The best experimental condition and the raw material to be used for H_2 production were selected by total reducing sugars (ART) of obtained hydrolysates. Selected hydrolysate was then used as a source of substrate in the anaerobic fermentation process for H_2 production, using anaerobic sludge as inoculum. Fermentation tests were conducted according to the factorial experimental design, evaluating the effect of temperature (35-45°C), initial pH (5.5-7.5) and inoculum ratio (10-30%) in H_2 production and maximum H_2 production rate. All experiments were monitored for 20 h. The composition of the medium was analyzed before and after each assay in terms of sugars, inhibitors, and acetic acid. The final pH of each experiment was also determined. The experimental condition of acid hydrolysis that resulted in the highest concentration of ART in the hydrolysates of rice husk and rice bran was assay 3 (127°C, 60 min, 15% (w/w) H_3PO_4 and 60% moisture). In this condition, the concentration of ART was 118.16 g kg $_{CA}^{-1}$ and 170.38 g kg $_{FA}^{-1}$. On the other hand, the assay 1 (127°C, 20 min, 5% (w/w) H_3PO_4 and 90% moisture) resulted in higher ART concentration in brewers' spent grain, soybean waste and wheat waste hydrolysates. The concentration of ART was 600.97 g kg $_{BC}^{-1}$, 80.37 g kg $_{RS}^{-1}$ and 228.04 g kg $_{RT}^{-1}$. From the results of hydrolysis, brewers' spent grain was the raw material chosen for the H_2 production process, as it resulted in the highest ART concentration. In addition, the BC will be available in large quantity during all over the year. The highest H_2 yield (4160 mL L^{-1}) and maximum H_2 production rate (760 mL L^{-1} h^{-1}) were found in assays 7 (35°C, pH 7.5 and 30% inoculum) and 8 (45°C, pH 7.5 and 30% inoculum), respectively. In some assays, glucose consumption of the BC hydrolysate reached 100%, while xylose was consumed up to 91.56%. The concentration of inhibitors (furfural and 5-HMF) before and after the fermentation process did not have significant alteration and did not show negative interference in H_2 production. On the other hand, the concentration of acetic acid had an expressive increase from a range of 0.1392-0.3001 g L^{-1} to 1.1490-5.8392 g L^{-1}, which explains the drop in pH in the fermentation medium at the end of the tests. Finally, it was concluded that brewers' spent grain hydrolysate presented appropriate characteristics for H_2 production by anaerobic fermentation, leading to promising results when compared to the literature.

Keywords: Lignocellulosic wastes. Acid hydrolysis. Bio-hydrogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 – Representação esquemática dos procedimentos realizados neste estudo.....34

Figura 3.2 – Matérias-primas utilizadas para produção de hidrogênio 35

Figura 3.3 – Unidade de produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada 48

Figura 4.1 – Matérias-primas após a secagem e moagem 51

Figura 4.2 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida da casca de arroz 56

Figura 4.3 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do farelo de arroz 57

Figura 4.4 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do bagaço de cevada.....59

Figura 4.5 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do resíduo de soja.....61

Figura 4.6 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do resíduo de trigo.....63

Figura 4.7 – Produção acumulada de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h 72

Figura 4.8 – Taxa de produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h 73

Figura 4.9 – Efeito das variáveis temperatura, inóculo e pH inicial, na produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada 74

Figura 4.10 – Efeito das variáveis temperatura, inóculo e pH inicial, na taxa máxima de produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Rendimento de hidrogênio produzido a partir de biomassa lignocelulósica via fermentação anaeróbia 19

Tabela 2.2 – Pré-tratamentos de substratos lignocelulósicos utilizados para produção de H_2 . 28

Tabela 2.3 – Pré-tratamentos aplicados em culturas mistas de inóculo para produção de H_2 .. 31

Tabela 3.1 – Referências das metodologias utilizadas para caracterização da matéria-prima . 36

Tabela 3.2 – Planejamento experimental Plackett-Burman da hidrólise ácida dos resíduos agroindustriais 43

Tabela 3.3 – Quantidade de resíduos agroindustriais produzidos no Rio Grande do Sul (Brasil) 45

Tabela 3.4 – Planejamento experimental fatorial da produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada 49

Tabela 4.1 – Composição química das matérias-primas utilizadas 53

Tabela 4.2 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados da casca de arroz ... 55

Tabela 4.3 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de farelo de arroz .. 56

Tabela 4.4 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de bagaço de cevada 58

Tabela 4.5 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de resíduo de soja . 60

Tabela 4.6 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de resíduo de trigo 62

Tabela 4.7 – Composição química dos hidrolisados da casca (CA) e do farelo de arroz (FA), do bagaço de cevada (BC) e dos resíduos de soja (RS) e trigo (RT) 64

Tabela 4.8 – Potencial de produção de H_2 a partir dos hidrolisados da casca (CA) e do farelo de arroz (FA), do bagaço de cevada (BC) e dos resíduos de soja (RS) e trigo (RT) 66

Tabela 4.9 – Produção (P_{H2}), taxa máxima de produção (T_{H2}) e rendimento (R_{H2}) de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h 68

Tabela 4.10 – Concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose), ácido acético, 5-HMF e furfural antes e após o processo de fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h 77

Tabela 4.11 – pH final do processo de produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	American Public Health Association
ART	Açúcares Redutores Totais
BC	Bagaço de Cevada
CA	Casca de Arroz
CervBrasil	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
D_{ps}	Diâmetro Médio de Sauter
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FA	Farelo de Arroz
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
NREL	National Renewable Energy Laboratory
P_{H2}	Produção de hidrogênio
T_{H2}	Taxa máxima de produção de hidrogênio
RS	Resíduo de Soja
RT	Resíduo de Trigo
ST	Sólidos Totais
TAPPI	Technical Association of the PulP and Paper Industry
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica
UHPLC	Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
1.1 OBJETIVO GERAL 12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS 13
2.1.1 Casca e farelo de arroz 13
2.1.2 Bagaço de cevada 15
2.1.3 Casca de soja 16
2.1.4 Palha de trigo 16
2.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA 17
2.2.1 Substrato 18
2.2.2 Inóculo 21
2.2.3 Subproduto da fermentação anaeróbia 22
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA 23
2.3.1 Temperatura e pH 23
2.3.2 Tempo de retenção hidráulica 25
2.3.3 Pressão parcial de H_2 26
2.3.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica 27
2.3.5 Pré-tratamento do inóculo 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 34
3.1 MATÉRIA-PRIMA 35
3.1.1 Preparo da matéria-prima 36
3.1.2 Caracterização da matéria-prima 36
3.1.2.1 Análise granulométrica 37
3.1.2.2 Determinação do teor de umidade 37
3.1.2.3 Determinação do teor de cinzas 38
3.1.2.4 Determinação de extrativos 38
3.1.2.5 Determinação de carboidratos estruturais, grupos acetila, furfural, hidroximetilfurfural e lignina 39
3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA MATÉRIA-PRIMA 42
3.2.1 Determinação de açúcares redutores totais 43

3.2.2 Caracterização química dos hidrolisados 44
3.2.3 Estimativa de produção de H_2 45
3.3 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA 45
3.3.1 Inóculo 45
3.3.1.1 Determinação do teor de umidade e sólidos totais 46
3.3.1.2 Determinação do teor de sólidos voláteis 46
3.3.1.3 Determinação do teor de cinzas 47
3.3.2 Substrato 47
3.3.3 Procedimento experimental 47
3.3.4 Análise estatística 50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 51
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA 51
4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA MATÉRIA-PRIMA 54
4.2.1 Açúcares redutores totais presentes nos hidrolisados 54
4.2.2 Caracterização química dos hidrolisados 63
4.2.3 Estimativa de produção de H_2 66
4.3 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA 67
5 CONCLUSÕES 79
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 80
REFERÊNCIAS 81

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda global por energia, a diminuição de recursos energéticos não renováveis e a preocupação com a qualidade do meio ambiente tem aumentado o interesse em fontes alternativas de energia. O hidrogênio (H_2) tem sido considerado um combustível limpo, renovável e promissor, visto que sua combustão resulta apenas em água e grandes quantidades de energia (Yamin et al., 2000). Por outro lado, 88% da produção de H_2 tem sido obtida a partir de combustíveis fósseis, o que gera grandes quantidades de gases de efeito estufa. Nesse sentido, surge como alternativa a utilização de processos biológicos, os quais são considerados uma alternativa econômica e ambientalmente limpa (Abdeshahian et al., 2014; Puhulwella et al., 2014), pois requerem menor consumo energético e não emitem gases poluentes.

Os processos biológicos para produção de H_2 são a fermentação anaeróbia, a foto-fermentação, a fotólise direta ou indireta e a fermentação sequencial, onde ocorre a fermentação anaeróbia seguida da foto-fermentação (Arimi et al., 2015). Dentre esses métodos, a fermentação anaeróbia é considerada a tecnologia mais viável para produção de hidrogênio, uma vez que não necessita de fonte de energia externa e diversos tipos de resíduos, subprodutos e efluentes industriais podem ser utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos (Puhulwella et al., 2014). Além disso, altas taxas de produção de H_2 têm sido alcançadas a partir desta técnica (Ghimire et al., 2015b). Uma das principais restrições ao processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2 é o baixo rendimento (máximo de 4 mols 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. Portanto, a obtenção de rendimentos mais elevados de hidrogênio é o principal desafio de investigação dos processos fermentativos (Das e Veziroglu, 2008).

A fermentação anaeróbia consiste na conversão de açúcares simples, puros ou naturalmente contidos na biomassa, em hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos a partir de microrganismos na ausência de oxigênio (Urbaniec; Grabarczyk, 2014). 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., 2015b). As vantagens das culturas mistas em relação as culturas puras são os menores custos operacionais (economia em assepsia), maior simplicidade de operação e controle, e ampla fonte de matéria-prima (Valdez-Vazquez et al., 2005; Li e Fang, 2007).

Diversos subprodutos agroindustriais têm sido estudados como fonte de carboidratos para as bactérias anaeróbias produtoras de hidrogênio. Os subprodutos do processamento da soja, do trigo, do arroz e da indústria cervejeira apresentam-se em elevada disponibilidade e baixo custo no Estado do Rio Grande do Sul, sendo na maioria das vezes subutilizados. Com isso, surge o grande interesse em aproveitar estes resíduos para a produção de H_2 a partir do processo de fermentação anaeróbia. Cabe salientar que poucos estudos têm utilizado casca e farelo de arroz, bagaço de cevada, e resíduos de soja e trigo para a produção de H_2.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia de hidrolisado de resíduo agroindustrial, utilizando lodo anaeróbio de frigorífico como fonte de inóculo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e caracterizar as matérias-primas: casca e farelo de arroz, bagaço de cevada e de resíduos da limpeza da soja e do trigo;
- Realizar ensaios de hidrólise ácida das matérias-primas em diferentes condições operacionais (temperatura, concentração de ácido, umidade e tempo de reação), e selecionar a condição em que os hidrolisados apresentaram maior concentração de açúcares redutores totais;
- Selecionar a matéria-prima que resultou em maior concentração de açúcares redutores totais para ser utilizada como substrato na produção anaeróbia de hidrogênio;
- Avaliar a produção, a taxa máxima de produção e o rendimento de H_2 a partir do processo de fermentação anaeróbia sob diferentes condições de temperatura, pH inicial e proporção de inóculo no meio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos agroindustriais lignocelulósicos são subprodutos abundantes e de baixo valor comercial gerados no processamento industrial de culturas vegetais. Essa biomassa lignocelulósica tem sido considerada uma fonte promissora de energia renovável, uma vez que evita a competição com a produção de alimentos e solos agricultáveis (Lopez-Hidalgo et al., 2017). De acordo com a literatura, os resíduos agroindustriais têm apresentado potencial para a geração de energia a partir de processos termoquímicos (Virmond et al., 2012) e biológicos (Schievano et al., 2009). Além disso, a produção de energia a partir desses resíduos promove, simultaneamente, uma solução para sua destinação final ambientalmente adequada.

A biomassa lignocelulósica é constituída, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas e extrativos (Kapoor et al., 2017). A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É composta por polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos (Saha, 2003). Diferente da hemicelulose, a celulose constitui-se de polímeros homogêneos de glicose, sendo o polissacarídeo mais abundante. Na natureza, as fibras de celulose são incorporadas em uma matriz de outros biopolímeros estruturais, principalmente a hemicelulose e a lignina. A lignina é constituída por três compostos fenólicos principais: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Essa composição varia entre as diferentes plantas, os tecidos vegetais e as camadas da parede celular (Menon e Rao, 2012).

Os resíduos agroindustriais lignocelulósicos têm sido utilizados em diferentes processos biológicos para produção de biocombustíveis, como o hidrogênio, o etanol e o metano. Neste estudo foram utilizados subprodutos do beneficiamento do arroz (casca e farelo), da limpeza da soja (constituído principalmente por casca) e do trigo (constituído principalmente por palha e casca), e o principal resíduo da indústria cervejeira, o bagaço de cevada. A descrição desses resíduos encontra-se nas próximas seções (2.1.1 até 2.1.4).

2.1.1 Casca e farelo de arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o principal alimento de mais da metade da população mundial (Conab, 2015). A produção mundial estimada da cultura é de 759,6 milhões de toneladas,

sendo mais de 12 milhões de toneladas produzidas no Brasil (FAO, 2018). Atualmente, o Rio Grande do Sul é responsável por 70,1% da produção de arroz no Brasil (Conab, 2018). De acordo com os dados disponibilizados pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA, 2018), o estado produziu 8,5 milhões de toneladas na safra 2017/18. O processamento industrial do arroz resulta em grandes quantidades de casca e de farelo como subprodutos de baixo valor comercial. Depois de colhido e seco, o arroz passa pelo processo de descascamento, obtendo-se o arroz integral e a casca. Em seguida, o arroz integral passa pela etapa de polimento, onde é produzido o arroz branco (polido) e gerado o farelo como subproduto (Fujino, 1978).

A casca de arroz corresponde de 20 a 33% da massa de arroz produzido (Lim et al., 2012), constituindo-se de 34,1-40,3% de celulose, 12,0-14,6% de hemicelulose, 15,2-27,0% de lignina e 14,0-20,0% de cinzas (em base seca) (Saha et al., 2005; Singh et al., 2011; Dagnino et al., 2013; Nichols et al., 2014; Cabrera et al., 2014; Gonzales e Kim, 2017). Esse material tem sido utilizado, principalmente, na indústria para a geração de eletricidade (Ferreira-Leitão et al., 2010). No entanto, encontram-se na literatura diferentes processos para a conversão da casca de arroz em energia. Dentre esses processos, destacam-se os termoquímicos, como a combustão direta, a pirólise e a gaseificação, e os biológicos, como a digestão anaeróbia para produção de metano e hidrogênio e a fermentação para produção de etanol (Quispe et al., 2017, Lim et al., 2012).

O farelo de arroz correspondente a 10-12% da massa total do grão *in natura* e tem sido empregado pela indústria brasileira como ingrediente na ração animal, para extração de óleo e como fertilizante orgânico (Kahlon, 2009; Silva et al., 2006). Este subproduto é composto por 8,4-21,1% de lipídeos, 30,8-36,5% de amido, 9,3-15,2% de proteína, 6,5-8,9% de cinzas e 5,6-8,4% de fibras (em base seca) (Jiamyangyuen et al., 2005; Gao et al., 2008; Sereewatthanawut et al., 2008; Wang et al., 2015; Michel Junior et al., 2016). Poucos estudos têm utilizado o farelo de arroz para a produção de energia, uma vez que o foco principal das pesquisas é a extração do óleo contido nesse material. A produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do farelo de arroz desenvolvida por Azman et al. (2016a), Sattar et al. (2016a) e Tandon et al. (2018), e a produção de etanol desenvolvida por Todhanakasem et al. (2015), foram os principais estudos relacionados à produção de biocombustíveis encontrados na literatura.

2.1.2 Bagaço de cevada

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2018), a safra de 2018 alcançou uma produtividade de 385,8 mil toneladas de cevada no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 139,0 mil toneladas. A cevada tem sido utilizada, principalmente, na indústria cervejeira. De acordo com o último boletim da Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil), o Brasil produziu aproximadamente 14 bilhões de litros em 2016. O bagaço de cevada, ou bagaço de malte, é o principal subproduto da produção da cerveja, representando, aproximadamente, 85% do total gerado (Tang et al., 2009). Segundo Cordeiro et al. (2012), são gerados 14 a 20 kg de bagaço de cevada a cada 100 L de cerveja produzida. Esse resíduo é obtido na etapa de separação do mosto no processo de produção da cerveja (Santos et al., 2003), sendo gerado em grandes quantidades tanto em pequenas como em grandes cervejarias (Mussato et al., 2006).

De acordo com a literatura, o bagaço de cevada, em base seca, é composto por 15,0-25,0% de celulose, 24,8-35,0% de hemicelulose, 7-27,8% de lignina, 3,5-5,5% de cinzas, 2,0-2,6% de amido, 15,3-23,0% de proteínas, 9,0-12,0% de lipídeos e 2,4-3,5% de açúcares solúveis (Beldman et al., 1987; Mussatto e Roberto, 2005; Russ et al., 2005; Gencheva et al., 2012). Essa composição pode mudar com a variedade da cevada, com o tempo de colheita, com as características do lúpulo e de outros produtos adicionados, e com a tecnologia utilizada na cervejaria (Santos et al., 2003). O bagaço apresenta elevado teor de umidade (>70%) e açúcares fermentescíveis, o que o torna facilmente degradável. Desse modo, a secagem desse material torna-se imprescindível tanto para a sua conservação como para a redução do volume e, consequentemente, a diminuição dos custos de transporte e armazenamento (Santos et al., 2003).

O bagaço de cevada está disponível a baixo custo ao longo do ano, e tem como principal destino a ração animal, principalmente de bovinos, devido ao seu alto teor de proteína e fibras. Além disso, o bagaço de cevada tem sido pesquisado para sua utilização na nutrição humana, produção de energia, produção de carvão, como componente de tijolos, na fabricação de papel, como adsorvente de metais e em processos biotecnológicos, onde pode ser empregado como substrato para cultivo de microrganismos, produção de enzimas, produção de bioetanol, como meio suporte em processos fermentativos, como fonte de produtos de valor agregado (glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, etc.), dentre outros (Mussato et al., 2006; Aliyu e Bala, 2011). Para a produção de H_2 foram encontrados poucos trabalhos, como os de Zhang e Zang (2016) e Poladyan et al. (2018).

2.1.3 Casca de soja

A soja é uma cultura de grande importância mundial, visto a ampla aplicabilidade de seus produtos e seu valor econômico no mercado nacional e internacional (Mello Filho et al., 2004). Segundo a Embrapa (2018), o Brasil é o segundo maior produtor de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. De acordo com o Conab (2018), a safra 2017/2018 alcançou uma produção de 119,3 milhões de toneladas. Deste montante, o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 17,2 milhões de toneladas, ou seja, 14,4% da produção nacional (Conab, 2018), sendo o terceiro maior produtor do País.

Após a colheita, a soja é encaminhada à indústria de processamento, onde passa pela pesagem e segue para a etapa de limpeza. Nessa etapa, são geradas grandes quantidades de casca de soja e outras impurezas provenientes da lavoura (Pukasiewicz et al., 2004). A casca é o principal subproduto do processamento da soja, representando cerca de 8% da massa do grão (Gnanasambandam e Proctor, 1999). Este material compõe-se de 35,8-39,7% de celulose, 10,2-25,5% de hemicelulose, 2,8-9,2% de lignina, 0,6-5,8% de cinzas, 10,7-15,4% de proteínas e 4,0% de lipídeos (em base seca) (Schirmer-Michel et al., 2008; Mielenz et al., 2009; Cassales et al., 2011; Rojas et al., 2014). A principal destinação é a alimentação animal, uma vez que constitui-se de, aproximadamente, 86% de carboidratos complexos (Pukasiewicz et al., 2004; Gnanasambandam e Proctor, 1999).

Embora a casca de soja seja um produto usado para a alimentação animal e estritamente aplicado para esse fim, diversos trabalhos têm avaliado o potencial desse resíduo para a produção de etanol, tendo em vista sua elevada concentração de carboidratos (Schirmer-Michel et al., 2008; Mielenz et al., 2009; Al Loman e Ju, 2016). Além disso, a casca de soja apresenta quantidade relativamente pequena de lignina em comparação com outros resíduos agrícolas, o que facilita o processo de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentescíveis (Al Loman e Ju, 2016). Outros estudos também têm utilizado a casca de soja para adsorção de metais (Marshall et al., 1999), produção de nano compostos (Flauzino Neto et al., 2013), produção de butanol (Yu et al. 2015) e produção de ácido polimálico (Cheng et al., 2017).

2.1.4 Palha de trigo

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. No Brasil, o trigo é cultivado durante o inverno nas regiões Sul,

Sudeste e Centro-Oeste. De acordo com a Conab (2018), em 2018 foram produzidos 5,5 milhões de toneladas de trigo, sendo o Rio Grande do Sul o segundo estado de maior produção, alcançando mais de 1,8 milhões de toneladas.

A palha é o principal resíduo da cultura de trigo e um dos mais abundantes da agricultura no mundo, correspondendo a 50% da massa da planta (Saha et al., 2015; Ferreira-Leitão et al., 2010). Estima-se que seja produzido 1,3 kg de palha para cada kg de grãos (Montane et al., 1998). Esse resíduo é gerado na lavoura, durante a colheita, e na chegada ao armazém, onde ocorre o processo de limpeza dos grãos para a remoção da palha excedente e demais impurezas. De acordo com a literatura, a palha de trigo é composta, em base seca, por 34,4-44,5% de celulose, 19,0-33,8% de hemicelulose, 16,9-26,8% de lignina e 1,6-7,4% de cinzas (Ferreira-Leitão et al., 2010; Ruiz et al., 2011; Zhang et al., 2013; Rajan e Carrier, 2014; Saha et al., 2015; Lopez-Hidalgo et al., 2017). No entanto, essa composição depende da variedade da cultura e das condições climáticas e agronômicas (Ruiz et al., 2011; Montane et al., 1998).

Atualmente, a palha de trigo tem sido utilizada na alimentação animal, como cama para o gado, como fertilizante natural para o solo e como biomassa para aproveitamento energético (Guerra-Rodríguez et al., 2012; Ferreira et al., 2014). De acordo com a literatura, diversos estudos têm sido desenvolvidos para a aplicação desse resíduo na produção de bioetanol (Zhu et al., 2006; Zhang et al., 2013; Saha et al., 2015). No entanto, recentemente, alguns trabalhos têm investigado a produção de biometano (Ferreira et al., 2014) e bio-hidrogênio (Chandolias et al., 2016; Lopez-Hidalgo et al., 2017) a partir da palha de trigo.

2.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Nos últimos anos, o hidrogênio (H_2) tem despertado interesse como combustível devido ao seu potencial como energia limpa e renovável. O hidrogênio apresenta densidade energética de 112 kJ/g, ou seja, 2,75 vezes maior do que os hidrocarbonetos, e pode ser facilmente utilizado em células combustíveis para geração de eletricidade (Kapdan e Kargi, 2006). Além disso, a combustão do H_2, mesmo que incompleta, resulta apenas em vapor d'água (Suzuki, 1982). No entanto, a principal fonte de produção de hidrogênio são os combustíveis fósseis. De acordo com Hordeski (2008), a produção de H_2 ocorre a partir do gás natural (48%), do petróleo (30%), do carvão (18%) e da eletrólise da água (4%). Esses processos requerem grande quantidade de energia e nem sempre são favoráveis ao meio ambiente (Das e Veziroglu, 2001).

Para tornar a energia do hidrogênio totalmente sustentável, os combustíveis fósseis precisam ser substituídos por recursos renováveis (Claassen et al., 2010). Nesse sentido, surgem os processos biológicos para produção de H_2 a partir da biomassa, a qual é considerada uma fonte renovável de energia. Os processos biológicos utilizados para produção de hidrogênio são a fermentação anaeróbia, a foto-fermentação, a utilização sequencial destes dois métodos, denominado sistema híbrido, e a biofotólise direta ou indireta. Esses processos operam, principalmente, em temperaturas e pressões ambientais, portanto, com menor gasto energético. Além disso, podem ser utilizados diversos tipos de resíduos como matéria-prima, o que também colabora com a destinação adequada dos mesmos (Das e Veziroglu, 2001).

Dentre os processos biológicos, a fermentação anaeróbia tem se tornado uma opção atraente para a produção de hidrogênio devido à possibilidade de utilizar vários tipos de biomassa, à ampla gama de condições de temperatura de operação, à simplicidade do projeto do reator, à eficiência do processo e às altas taxas de produção de H_2 (Kumar et al., 2015; Ghimire et al., 2015b). Além disso, diversas fontes de culturas puras (*Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*) ou mistas (lodos anaeróbios de tratamento de efluentes) podem ser utilizadas como inóculo no processo fermentativo para produção de H_2.

A fermentação anaeróbia consiste na conversão de açúcares simples ou dissacarídeos, puros ou contidos na biomassa, em biogás e ácidos orgânicos a partir de bactérias na ausência de oxigênio (Urbaniec; Grabarczyk, 2014). O biogás produzido é constituído, principalmente, por H_2 e dióxido de carbono (CO_2), podendo conter também pequenas quantidades de metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) e/ou sulfeto de hidrogênio (H_2S) (Levin et al., 2004). O subproduto da fermentação é constituído, principalmente, pelos ácidos acético, butírico e propiônico (Kapdan e Kargi, 2006), os quais influenciam significativamente na produção de hidrogênio.

2.2.1 Substrato

Diversos tipos de matérias-primas têm sido estudados para a produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia, como resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos de alimentos, resíduos sólidos municipais, efluentes industriais, glicerol, dentre outros (Fernandes et al., 2010; Angeriz-Campoy et al., 2015; Pachapur et al., 2015; Sattar et al., 2016a; Sen at al., 2016; Han et al., 2016; Hay et al., 2016; Ghimire et al, 2016; Cheng et al., 2016; Lopez-Hidalgo et al., 2017; Gonzales e Kim, 2017; Shanmugam et al.; 2018). Açúcares

fermentescíveis puros, como a sacarose, glicose, xilose e lactose, também têm sido utilizados para a produção de H_2, pois são facilmente degradados e resultam em elevados rendimentos (Hussy et al., 2005; Wang e Wan, 2008; Haroun et al., 2016; An et al., 2014; Calli at al., 2008). No entanto, essa fonte de carboidratos apresenta elevado custo para a produção de H_2 (Kapdan e Kargi, 2006).

A escolha do substrato desempenha um papel importante no processo de fermentação anaeróbia, seja em termos de maximização do rendimento de H_2 ou de economia do processo. O potencial de produção de H_2 depende da composição do substrato, principalmente em termos de carboidratos, bem como da sua biodegradabilidade (Ghimire et al., 2015b). Além disso, o custo e a disponibilidade local das matérias-primas são fatores chave para a escolha do melhor material, visto que variam de acordo com a região. Desse modo, a matéria-prima para produção de H_2 pode ser selecionada com base em seu custo-efetividade em um determinado país ou região (Kumar et al., 2015).

A produção de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica tem sido amplamente estudada em escala laboratorial (Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012; Azman et al., 2016a; Sattar et al., 2016a, Lopez-Hidalgo etal., 2017), pois é renovável, sustentável e está disponível em grandes quantidades. A Tabela 2.1 mostra os rendimentos de hidrogênio obtidos a partir da biomassa lignocelulósica via fermentação anaeróbia, bem como o inóculo empregado. Como pode-se observar, diferentes tipos de resíduos lignocelulósicos têm sido utilizados, resultando em elevados rendimentos e produção de H_2, independente do inóculo ser uma cultura mista ou pura. Cabe destacar que, devido a sua estrutura complexa, a utilização direta destas matérias-primas no processo de fermentação anaeróbia não é ideal para a produção de H_2. Para isso, torna-se necessário que a biomassa lignocelulósica seja submetida a algum tipo de pré-tratamento para que as bactérias consigam degradar facilmente os carboidratos presentes.

Tabela 2.1 – Rendimento de hidrogênio produzido a partir de biomassa lignocelulósica via fermentação anaeróbia

(continua)

Substrato	**Inóculo**	**Rendimento de H_2**	**Referência**
Palha de trigo	Cultura mista	318,4 mL $g_{açúcares}^{-1}$	Kongjan et al. (2010)
Palha de milho	*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*	108,5 mmol L^{-1}	Ren et al. (2010)
Espiga de milho	Cultura mista	265 mL $g_{açúcar\ cons.}^{-1}$	Nasr et al. (2014)

Tabela 2.1 – Rendimento de hidrogênio produzido a partir de biomassa lignocelulósica via fermentação anaeróbia

(conclusão)

Substrato	Inóculo	Rendimento de H_2	Referência
Palha de arroz	Cultura mista	14,22 NmL g $_{SV}^{-1}$	Alemahdi et al. (2015)
Folha de cerejeira	Cultura mista	40,09 mL g $_{SV}^{-1}$	Spalková et al. (2016)
Casca de sorgo	*Phanerochaete chrysosporium*	1,05 mol mol $_{ART}^{-1}$	Saratale et al. (2015)
Farelo de milho	Cultura mista	338,91 mL g $_{SV}^{-1}$	Zhang et al. (2015)
Palha de aveia	Cultura mista	2,39 mol mol $_{ART}^{-1}$	Arreola-Vargas et al. (2015)
Farelo de arroz	*Clostridium acetobutylicum*	132,2 mL g $_{açúcar}^{-1}$	Azman et al. (2016a)
Palha de arroz		40,04 mL g SV_{rem}^{-1}	
Farelo de arroz	Cultura mista	38,6 mL g SV_{rem}^{-1}	Sattar et al. (2016a)
Casca de arroz		23,05 mL g SV_{rem}^{-1}	
Resíduos de sorgo	Cultura mista	213,14 mL g $_{açúcar}^{-1}$	Rorke e Kana (2016)
Resíduos de papel	Cultura mista	140 mL g $_{açúcar\ total}^{-1}$	Eker e Sarp et al. (2017)
Palha de arroz	Cultura mista	771 mL L^{-1}	Sen et al. (2016)
Palha de trigo	*Escherichia coli*	140,1 mL g $_{ART}^{-1}$	Lopez-Hidalgo (2017)
Casca de arroz	Cultura mista	473,1 mL g $_{CA}^{-1}$	Gonzales and Kim (2017)
Palha de sorgo	Cultura mista	402,01 mL	Shanmugam et al. (2018)
Resíduo de trigo	Cultura mista	1750 mL L^{-1}	Kirli e Karapinar (2018)
Casca de amendoim	*Clostridium guangxiense* ZGM211^{T}	39,9 mL g $_{substrato}^{-1}$	Qi et al. (2018)

Nota: SV – sólidos voláteis, SV_{rem} – sólidos voláteis removidos, ART – açúcares redutores totais.

2.2.2 Inóculo

Muitas bactérias têm sido utilizadas para a produção de hidrogênio, incluindo anaeróbias estritas (*Clostridium*) (Azman et al., 2016a; Qi et al., 2018), anaeróbias facultativas (*Enterobacter, Escherichia coli, Rhodopseudomonas, Citrobacter*) (Tandon et al., 2018; Poladyan et al., 2018; Asadi e Zilouei, 2017; Satar et al., 2017; Lopez-Hidalgo et al., 2017; Oh et al., 2002; Oh et al., 2003) e aeróbias (*Bacillus*) (Kotay e Das, 2007). Dentre esses microrganismos, as bactérias do gênero *Clostridium* e *Enterobacter* são as mais amplamente estudadas (Li e Fang, 2007).

As bactérias anaeróbias facultativas produzem até 2 mols de H_2 por mol de glicose, enquanto as anaeróbias estritas produzem 4 mols (Das e Veziroglu, 2008). Os microrganismos anaeróbios estritos são extremamente sensíveis ao oxigênio. Uma quantidade muito pequena de oxigênio no meio de fermentação inibe completamente as atividades de produção de H_2. Em contraste, os anaeróbios facultativos consomem o oxigênio rapidamente, recuperando imediatamente a condição anaeróbia no meio. Desse modo, a produção de H_2 por anaeróbias facultativas é considerada melhor do que por anaeróbias estritas (Yokoi et al., 1995).

A fonte de microrganismos anaeróbios, estritos ou facultativos, pode ser culturas puras (*Clostridium*, *Enterobacter*) ou culturas mistas (lodo anaeróbio, esterco bovino, composto orgânico, resíduos sólidos urbanos e solo) (Ghimire et al., 2015b). As culturas mistas têm sido preferidas às culturas puras, pois apresentam baixo custo operacional (economia em assepsia), maior simplicidade de operação e controle e uma ampla fonte de matéria-prima (Valdez-Vazquez et al., 2005; Li e Fang, 2007). No entanto, há a possibilidade de conter espécies que consomem hidrogênio ou espécies que não produzem hidrogênio nas culturas mistas (Tapia-Venegas et al. 2015), o que torna necessário a utilização de um pré-tratamento dessas culturas para desativar os microrganismos consumidores de H_2 e ativar os produtores de H_2.

Na literatura encontram-se trabalhos utilizando lodos de sistemas de tratamento de esgoto municipal (Han et al., 2015; Lopez-Hidalgo et al., 2018), de efluentes de gado leiteiro (Ghimire et al., 2015a; Ghimire et al., 2016), de cervejaria (Gonzales e Kim, 2017), de óleo de palma (Lutpi et al., 2016), de confeitaria (Arreola-Vargas et al., 2015), dentre outros. As diferentes fontes de inóculo resultam em um comportamento diferente na produção de H_2 (Phowan e Danvirutai, 2014; Vera-Toledo et al., 2016; Ghimire et al., 2016). Encontra-se, também, na literatura alguns trabalhos que utilizam lodos aeróbios para produção de H_2 (Ghimire et al., 2016; Yin e Wang, 2015).

2.2.3 Subproduto da fermentação anaeróbia

Na produção de hidrogênio por bactérias fermentativas, os ácidos orgânicos são produzidos como subproduto da fermentação (Yokoi et al., 1995). A composição do subproduto depende das condições do meio de fermentação (Levin et al., 2004), sendo os ácidos acético, butírico e propiônico os principais constituintes (Kapdan e Kargi, 2006). Outros subprodutos da fermentação também são produzidos, mas em proporções reduzidas, como o etanol, o butanol e o ácido lático, os quais contêm hidrogênio que não foi liberado como gás (Levin et al., 2004).

De modo geral, a produção de ácido acético e butírico favorecem a produção de H_2. Quando o ácido acético é o produto final, obtém-se um máximo teórico de 4 mol H_2 mol $_{glicose}^{-1}$ (Equação 1). Já quando o ácido butírico é o produto final, o máximo teórico se reduz para 2 mol H_2 mol $_{glicose}^{-1}$ (Equação 2). Assim, os maiores rendimentos teóricos de H_2 estão associados ao ácido acético como produto final de fermentação. Por outro lado, a produção de ácido propiônico consome o hidrogênio (Equação 3), e o balanço de H_2 nas vias de produção de ácido lático e de etanol é zero. Desse modo, os baixos rendimentos estão associados ao ácido propiônico e aos subprodutos reduzidos (álcoois e ácido lático) (Antonopoulo et al., 2008; Levin et al., 2004; Urbaniec; Grabarczyk, 2014).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (1)$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (2)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \quad (3)$$

Ghimire et al. (2015a) identificaram os ácidos acético, butírico e propiônico como os principais subprodutos para todos os substratos utilizados (resíduo de batata e abóbora, estrume de búfalo, efluente de processamento do azeite de oliva, resíduo de oliveira/bagaço de oliva, resíduo de erva-doce e resíduo de matadouro) na produção de H_2. Antonopoulo et al. (2008) encontraram como principais subprodutos o ácido butírico (5780 mg L^{-1}) e o ácido acético (3480 mg L^{-1}) na produção de H_2 a partir do sorgo sacarino. Os mesmos ácidos também foram identificados por Liu et al. (2014) e Ghimire et al. (2016) como os principais metabólitos da produção de H_2 a partir do hidrolisado da palha de arroz.

Diferente do trabalho citado anteriormente, Han et al. (2015) encontraram como principais subprodutos o etanol (40,9–49,4% do subproduto) e o ácido acético (35,6–42,2%) na fermentação de H_2 a partir do hidrolisado dos resíduos de alimentos. O etanol e o ácido acético foram os produtos predominantes no sistema de produção de H_2 mais eficiente, indicando que o meio de cultura foi favorável para a produção de H_2. Além disso, o ácido propiônico foi detectado em pequenas concentrações (7,3–11,6 mg L^{-1}), o que pode ser benéfico para a taxa de produção de H_2, uma vez que o H_2 pode ser diretamente utilizado na formação do ácido propiônico.

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia é influenciada por diversos fatores, como a temperatura, o pH, o tempo de retenção hidráulica, a pressão parcial do gás e o pré-tratamento do substrato e do inóculo. Os itens a seguir (2.3.1 ao 2.3.5) descrevem todos estes parâmetros.

2.3.1 Temperatura e pH

A temperatura e o pH são os fatores mais importantes no processo fermentativo, pois influenciam as atividades das bactérias produtoras de hidrogênio e a produção de hidrogênio. Em intervalos apropriados, o aumento da temperatura e do pH pode aumentar a capacidade das bactérias produtoras de H_2 em produzir hidrogênio durante a fermentação. No entanto, níveis muito elevados podem diminuir essa capacidade (Wang e Wan, 2009). Diversos trabalhos têm demonstrado a influência da temperatura e do pH na produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia. De acordo com a literatura, a faixa ideal de temperatura e pH na produção de H_2 é de, aproximadamente, 34 a 55°C e de 5,0 a 6,5, respectivamente.

A fermentação anaeróbia pode ser operada em temperaturas mesofílicas (25-40°C), termofílicas (40-65°C), termofílicas extremas (65-80°C) ou hipertermofílicas (>80°C) (Levin et al., 2004). Sattar et al (2016a) quantificaram a produção de H_2 em condições mesofílicas (37°C) e termofílicas (55°C) a partir da palha, da casca, do farelo e do resíduo de arroz. O pH inicial foi fixado em 7,0 nas fermentações com farelo e resíduo de arroz e em 7,5 nas fermentações com palha e casca. Os resultados mostraram que a condição termofílica aumentou o potencial de produção de H_2 quando comparado à condição mesofílica, para todos os substratos utilizados. O rendimento médio de H_2 obtido a partir dos resíduos de arroz foi de

30,36 e 33,16 mL SV_{rem}^{-1} nas condições mesofílicas e termofílicas, respectivamente. Os autores observaram ainda, que a queda do pH no decorrer do processo foi maior nas condições mesofílicas, com exceção dos ensaios com farelo de arroz. O pH final da produção mesofílica de H_2 foi de 5,6, 5,8, 6,1 e 3,8 para a palha, casca, farelo e resíduo de arroz, respectivamente. A faixa ótima de pH para a produção de H_2 a partir da palha, da casca e do farelo de arroz situa-se entre 6 e 7.

O controle do pH do meio pode ser realizado durante todo o processo fermentativo, o que tornaria a operação economicamente inviável devido à grande quantidade de reagentes, ou somente no início do processo fermentativo. Esse controle apenas inicial é o que tem sido adotado na maioria dos trabalhos (Sattar et al., 2016a; Azman et al., 2016a; Wongthanate et al., 2014). Phowan e Danvirutai (2014) avaliaram o efeito do pH inicial (5,0-8,0) na produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado da polpa de mandioca. Os ensaios foram conduzidos em temperatura fixa de 35°C. O pH 5,5 proporcionou maior produção de H_2 (358 mL), enquanto que com pH 8,0 obteve-se a menor produção (125 mL).

Azman et al. (2016a) investigaram as variáveis pH inicial (5,5-6,5) e temperatura (30-38°C) no processo de produção de hidrogênio a partir do farelo de arroz. O maior rendimento (117,24 mL H_2 g $_{\text{açúcar consumido}}^{-1}$) foi alcançado com pH de 5,5 e temperatura de 34°C, enquanto que a maior produção (574,6 mL H_2) foi obtida com pH de 6,5 e temperatura de 34°C. Lopez-Hidalgo et al. (2017) avaliaram a influência do pH (4,8-8,2) e da temperatura (21,9-52,1°C) na produção de H_2 utilizando hidrolisado de palha de trigo como substrato e a *Escherichia coli* como inóculo. A maior produção (509,2 mL) e o maior rendimento (269,2 mL g $_{ART}^{-1}$) de H_2 foi obtido com pH 6,5 e temperatura de 37 °C, enquanto que a maior taxa de produção (25,27 mL^3 L^{-1} h^{-1}) de H_2 foi alcançada com pH 8,2 e temperatura de 37°C.

Wongthanate et al. (2014) avaliaram a influência do pH inicial (4,5-7,0) e da temperatura (35 e 50°C) na produção de H_2 utilizando águas residuais de leite de coco como substrato e lodo anaeróbio como fonte de microrganismos. Os resultados dos ensaios mostraram que o pH inicial de 6,5 em condições mesofílicas de temperatura (35°C) favorecem a produção de H_2. A produção de H_2 foi duas vezes maior em condição mesofílica (35°C; 0,28 L H_2 L^{-1}) quando comparada à termofílica (50°C; 0,16 L H_2 L^{-1}). Segundo os autores, a temperatura pode afetar a atividade das bactérias produtoras de H_2 por influenciar a atividade de algumas enzimas essenciais, como a hidrogenase. Após 7 dias de fermentação, sob condições de temperatura de 35 e 50°C, o pH inicial de fermentação caiu de 6,5 para 4,5.

2.3.2 Tempo de retenção hidráulica

O tempo de retenção hidráulica (TRH) é uma das condições do processo de fermentação anaeróbia que influencia no metabolismo microbiano e, consequentemente, na produção de hidrogênio e nos subprodutos da fermentação (Antonopoulo et al., 2008; Moreno-Andrade et al., 2015). Na literatura encontram-se estudos que avaliam a influência de diferentes tempos de retenção hidráulica no processo de produção de H_2. Os TRHs analisados na literatura variam de 2 a 108 h, sendo que grande parte dos resultados demonstram que, quanto maior o TRH, maior é o rendimento de H_2 (Antonopoulo et al., 2008; Wang et al., 2013; Moreno-Andrade et al., 2015; Nam et al. 2015; Kumar et al., 2016; Satar et al., 2017).

Moreno-Andrade et al. (2015) avaliaram diferentes TRH (6-72 h) na produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia de resíduos de alimentos. A porcentagem de hidrogênio no biogás e os rendimentos de H_2 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 H_2 g $SV_{removidos}^{-1}$, respectivamente. 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 hidrogênio. Satar et al. (2017) investigaram o efeito de diferentes TRH (8-24 h) no processo fermentativo de produção de H_2 a partir da glicose. Do mesmo modo que o trabalho citado anteriormente, Satar et al. (2017) identificaram que o maior rendimento de H_2 (9,44 mmol H_2 g $_{glicose}^{-1}$) foi obtido em 24 h de TRH.

Antonopoulo et al. (2008) avaliaram diferentes tempos de retenção hidráulica (4, 6, 8, 12 e 24 h) na produção de H_2 a partir da fermentação de açúcares do extrato de sorgo sacarino. A taxa de produção de biogás e de H_2 aumentou quando o TRH diminuiu de 24 a 6 h, no entanto, o maior rendimento de H_2 (0,86 mol H_2 mol $_{glicose}^{-1}$) foi obtido em 12 h. Os principais subprodutos da fermentação foram o ácido butírico e o ácido acético. A concentração de ácido butírico foi maior (5780 mg L^{-1}) para o TRH de 12 h, enquanto que a maior concentração de ácido acético (3480 mg L^{-1}) ocorreu no TRH de 8 h. A concentração de ácido propiônico aumentou e a de ácido lático diminuiu com o aumento do TRH. Já a produção de etanol foi favorecida para os TRH de 6 e 4 h (634 mg L^{-1}).

Tempos de retenção hidráulica mais longos também já foram estudados. Vijayaraghavan et al. (2006), investigaram a influência do TRH de 7 e 12 dias na fermentação anaeróbia da casca de jaca para produção de H_2. Os autores observaram que a produção de biogás foi maior para o TRH de 12 dias (8,3-9,3 L d^{-1}) do que para o de 7 dias (5,5-6,4 L d^{-1}), sendo que para ambos os casos o conteúdo de H_2 no biogás foi de, aproximadamente, 55%. A baixa produção de biogás para o TRH de 7 dias foi atribuída à degradação parcial da matéria

orgânica, o que foi constatado pelo elevado teor de ácidos graxos voláteis quando comparado ao TRH de 12 dias. Além disso, a eficiência da degradação dos sólidos voláteis diminuiu de 50 para 22% quando o TRH passou de 14 para 7 dias.

Kirli e Karapinar (2018) obtiveram resultados contrários aos citados acima. Avaliando o TRH de 2 a 13 h na produção de hidrogênio a partir do hidrolisado de resíduo de trigo, os autores observaram redução no volume e no rendimento de H_2 com o aumento do TRH. A maior taxa volumétrica de produção de H_2 e o maior rendimento, foram de 1,75 L H_2 L^{-1} dia e 1,6 moL H_2 mol ST^{-1}, respectivamente, com um TRH de 2 h. De acordo com os autores, uma das razões para a taxa e o rendimento melhorarem em um curto TRH é que o aumento da velocidade de entrada no reator contribui para uma eficiente recuperação do gás, uma vez que o aumento da vazão de entrada força a saída das bolhas de H_2 que estão na fase líquida e no *head space*.

2.3.3 Pressão parcial de H_2

A pressão parcial de H_2 é um fator muito importante para a produção contínua de H_2. As vias de produção de H_2 são sensíveis às concentrações de H_2. À medida que as concentrações de H_2 aumentam, a produção diminui e as vias metabólicas mudam para a produção de substratos mais reduzidos, como o lactato, etanol, acetona, butanol ou alanina. Por outro lado, à medida que a temperatura do processo aumenta, as condições que favorecem a reação são menos influenciadas pela concentração de H_2 (Levin et al., 2004). Tendo em vista que o aumento da pressão parcial de H_2 tem efeito negativo na produção de hidrogênio, alguns métodos têm sido estudados para a redução dos efeitos negativos causados pelo aumento da pressão parcial. Dentre esses métodos, os mais comuns são a aspersão de gás nitrogênio (N_2) e dióxido de carbono (CO_2) e a redução por vácuo (Mizuno et al., 2000; Kim et al., 2006; Kim et al., 2012; Lee et al., 2012).

Kim et al. (2006) investigaram o efeito da aspersão de gás na produção fermentativa de H_2 utilizando diferentes taxas de vazões (100-400 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 mol mol $_{hexose\ consumida}^{-1}$) e na maior taxa de produção (6,89 L g SV^{-1} d^{-1}) de H_2.

O estudo de Lee et al. (2012) buscou avaliar o efeito da redução da pressão de H_2 por vácuo na produção de hidrogênio. As pressões analisadas foram de 130 a 760 mm Hg em um TRH de 12 h. Os resultados mostraram que o conteúdo de H_2 no biogás produzido sob as diferentes pressões esteve entre 46 e 50%. A taxa de produção de H_2 aumentou ligeiramente (cerca de 8%) de 0,348 mol L^{-1} d^{-1} para 0,376 mol L^{-1} d^{-1} quando a pressão diminuiu de 760 a 380 mm Hg, e manteve-se a mesma quando a pressão foi reduzida de 380 a 130 mmHg. O rendimento e a eficiência de produção apresentaram a mesma tendência do comportamento da taxa de produção de H_2. O maior rendimento e maior eficiência de produção de H_2 foi de 3,57 mol H_2 mol $_{sacarose}^{-1}$ e 45,1%, respectivamente, à pressão de 380 mm Hg.

2.3.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um fator crucial na produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia, pois apresenta uma estrutura complexa de celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento visa aumentar a quantidade de compostos fermentescíveis pelos microrganismos, de modo que se consiga maior produção de H_2. Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados na área de pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica, sendo que os métodos mais utilizados são os físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (Ren et al., 2016). A combinação das técnicas de pré-tratamento, geralmente, é mais eficaz no aumento da digestibilidade da biomassa (Agbor et al., 2011).

A Tabela 2.2 mostra os tipos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica utilizada para produção de H_2 encontrados na literatura. A moagem é a técnica de pré-tratamento física mais utilizada, o que fica evidenciado ao analisar a Tabela 2.2. Na maior parte dos estudos, os resíduos lignocelulósicos são moídos antes de passar por um outro tipo de pré-tratamento, com exceção de materiais que já são extremamente finos, como no caso do pó de trigo e do farelo de arroz utilizados por Gokfiliz e Karapinar (2016) e Sattar et al. (2016a), respectivamente. No processo de moagem, o tamanho da biomassa lignocelulósica é reduzido, aumentando a área superficial acessível à reação (Ren et al., 2016).

Tabela 2.2 – Pré-tratamentos de substratos lignocelulósicos utilizados para produção de H_2 (continua)

Tratamento	Condição	Substrato	Referência
Moagem + Enzimático	2-10 mm 50°C/72 h/celulase e xilanase	Palha de trigo	Ren et al. (2010)
Moagem + Ácido + Enzimático	≈ 2 cm 90°C/2 h/HCl 2% 45°C/10 h/celulase	Palha de aveia	Arreola-Vargas et al. (2015)
Ácido e Enzimático	124°C/1,3 h/HCl 2,7% 45°C/10 h/celulase	Bagaço de *Agave tequilana*	Arreola-Vargas et al. (2016)
Ácido	90°C/15 min/ H_2SO_4 pH 2,0	Pó de trigo	Gokfiliz e Karapinar (2016)
Moagem + Ácido	0,15-0,5 mm 121°C/20 min/ HCl 0,8-1,0M	Palha de arroz	Sen et al. (2016)
Moagem + Ácido	< 200 mesh 121°C/90 min/ H_2SO_4 pH 2,2	Resíduo de papel	Eker e Sarp (2017)
Moagem + Ácido	1-2 mm 100°C/70-240 min/ HCl, H_2SO_4, HNO_3 1-6% de ácido	Resíduo de sorgo	Rorke e Kana (2016)
Moagem + Alcalino	<2 mm 4-8% NaOH/55°C/24 h	Palha de arroz	Ghimire et al. (2016)
Ácido	121°C/1 h/H_2SO_4 1%	Farelo de arroz	Azman et al. (2016a)
Moagem + Explosão a vapor	<2 mm 240°C/4 min	Palha de arroz	Sattar et al. (2016b)
Ácido e Alcalino	H_2SO_4 1,5% HCl 0,25% NaOH 0,1% $Ca(OH)_2$ 0,75%	Farelo de arroz	Khan et al. (2016)

Tabela 2.2 – Pré-tratamentos de substratos lignocelulósicos utilizados para produção de H_2 (conclusão)

Tratamento	Condição	Substrato	Referência
Moagem + Ácido	121°C/1 h/ H_2SO_4 0,75%	Palha de trigo	Lopez-Hidalgo et al. (2017)
Moagem+ Ácido + Enzimático	121°C/1 h/H_2SO_4 5% 50 °C/Celulase	Casca de arroz	Gonzales e Kim (2017)
Moagem + Ácido	90°C/15 min/ H_2SO_4 pH 2,0	Resíduo de trigo	Kirli e Karapinar (2018)
Moagem + Enzimático	Enzima lacase de *T. asperellum*	Palha de sorgo	Shanmugam et al. (2018)
Ácido + Enzimático	121°C/30 min/ H_2SO_4 1% Celulase	Bagaço de cana-de-açúcar	Hu et al. (2018)

Os métodos químicos referem-se ao tratamento da biomassa com reagentes químicos, como ácidos, álcalis, solventes orgânicos, líquidos iônicos, cloretos de metal e plasma. Dentre esses, os pré-tratamentos ácidos e alcalinos são os mais utilizados. Quanto aos pré-tratamentos físico-químicos, a explosão a vapor, água quente e expansão de fibra de amônia são os mais empregados. Ao contrário dos pré-tratamentos físicos, químicos e físico-químicos, o pré-tratamento biológico baseia-se na deslignificação da lignocelulose a partir de microrganismos ou enzimas, sendo a hidrólise enzimática o processo mais viável. Por outro lado, os fungos são os microrganismos mais eficazes para deslignificação devido ao seu sistema ligninolítico exclusivo (Ren et al., 2016).

De acordo com a literatura (Tabela 2.2), os pré-tratamentos ácidos e enzimáticos são os mais empregados para as biomassas lignocelulósicas utilizadas na produção de hidrogênio. Esses métodos são, também, utilizados de modo sequencial, onde o tratamento ácido precede o enzimático. Como exemplo, pode-se citar os estudos realizados por Arreola-Vargas et al. (2015) e Saratale et al. (2015), onde foi utilizada a palha de aveia e a casca de sorgo, respectivamente, para produção de H_2. Embora a hidrólise ácida seguida da hidrólise enzimática promova a hidrólise do material lignocelulósico, o uso de enzimas em escala comercial é o principal fator que contribui para os altos custos de pré-tratamento (Rorke e Kana, 2016).

O pré-tratamento ácido envolve a utilização de ácidos concentrados ou diluídos para romper a estrutura rígida do material lignocelulósico (Brodeur et al., 2011), liberando açúcares, lignina precipitada e compostos inibidores (Lopez-Hidalgo et al., 2017). Nesse processo, a fração de hemicelulose é hidrolisada, enquanto que as frações de celulose e lignina permanecem quase inalteradas (Guerra-Rodríguez et al., 2012). Ainda de acordo com a Tabela 2.2, observa-se que o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) são os mais utilizados, sendo empregados em uma faixa de diluição de 0,75-6% (v/v).

Rorke e Gana (2016) investigaram a recuperação da xilose e da glicose a partir do processo de hidrólise ácida do resíduo de sorgo, bem como a produção de H_2 utilizando o hidrolisado. A hidrólise ácida foi realizada com os ácidos clorídrico, sulfúrico e nítrico, em diferentes condições de concentração (1-6%, v/v), tempo de aquecimento (70-240 min), razão sólido/líquido (30-50%, m/v) e tempo de exposição (0-24 h). Dentre os ácidos estudados, o HCl proporcionou a maior recuperação de xilose (52,02 g L^{-1}) e glicose (18,42 g L^{-1}), na condição de 6% de ácido, 155 min de aquecimento, razão sólido/líquido de 40% e 24 h de exposição ao ácido.

Compostos inibidores, como o furfural, o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e os ácidos acético e fórmico, são produzidos na hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos (Guerra-Rodríguez et al., 2012; Lopez-Hidalgo et al., 2017). De acordo com alguns trabalhos, a concentração de furfural, 5-HMF e ácido acético variam de 0,60-120 mg L^{-1}, 95,8-133,2 mg L^{-1} e 3,6-7,7 g L^{-1}, respectivamente (Arreola-Vargas et al., 2015; Arreola-Vargas et al., 2016; Lopez-Hidalgo et al., 2017). Na etapa de fermentação, a presença destes compostos pode impedir ou dificultar o processo, pois podem afetar o desenvolvimento microbiano de diversas maneiras (Guerra-Rodríguez et al., 2012; Lopez-Hidalgo et al., 2017). No entanto, de acordo com Nasr at al. (2014), a concentração de furfural de 0,21-1,09 g L^{-1} e de 5-HMF abaixo de 0,14 g L^{-1} não causam impacto no rendimento e na taxa de produção de H_2.

2.3.5 Pré-tratamento do inóculo

O pré-tratamento das culturas mistas anaeróbias (inóculo) utilizadas para produção de H_2 é realizado para inibir a atividade das bactérias metanogênicas e ativar os esporos das bactérias produtoras de H_2 durante o processo de fermentação. Na literatura, encontram-se trabalhos empregando, principalmente, os pré-tratamentos térmico, químico, aeração e micro-ondas, em diferentes condições operacionais (Tabela 2.3). A diferença entre as fontes de inóculo, o método de pré-tratamento estudado, as condições específicas de cada método de

pré-tratamento e o tipo de substrato, levam a um desacordo do melhor método de pré-tratamento do inóculo para produção de H_2 (Wang e Wan, 2009).

Embora haja variação no comportamento dos diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo, o tratamento térmico tem sido o mais utilizado, pois é um método fácil e prático para o enriquecimento de microrganismos produtores de hidrogênio nas culturas mistas (Li e Fang, 2007; Wang e Wan, 2008). De acordo os dados da Tabela 2.3, as condições de temperatura e tempo utilizadas nesse processo variam de 70 a 105°C e de 0,5 a 5 h, respectivamente.

Tabela 2.3 – Pré-tratamentos aplicados em culturas mistas de inóculo para produção de H_2

Tratamento	**Descrição**	**Substrato**	**Referência**
Irradiação por micro-ondas	160-800 W/2450 MHz/5 min	Resíduo de *Benincasa hispida*	Singhal e Singh (2014)
Aeração	30 dias	Resíduo de alimentos	Han et al. (2015)
Térmico	100°C/0,5 h	Palha, casca e farelo de arroz	Sattar et al. (2016a)
Térmico e ácido	100°C/1 h/pH 5,9	Pó de trigo	Gokfiliz e Karapinar (2016)
Térmico	95-100°C/1 h	Palha de arroz	Sen et al. (2016)
Térmico	70°C/0,5 h	Glicose e xilose	Haroun et al. (2016)
Térmico e ácido	100°C/2 h/pH 5,9	Resíduo de papel	Eker e Sarp (2017)
Térmico	105°C/4 h	Resíduo de alimentos, palha de arroz e efluente do processamento da oliva	Ghimire et al. (2016)
Térmico	80°C/1 h	Sacarose	Lutpi et al. (2016)
Térmico	90°C/0,5 h	Casca de arroz	Gonzales e Kim (2017)
Térmico	70°C/0,5 h	Bagaço de cana-de-açúcar	Reddy et al. (2017)
Térmico	100°C/5 h	Resíduo de trigo	Kirli e Karapinar (2018)

Ghimire et al. (2015) avaliaram o desempenho dos tratamentos térmico, químico e por aeração do lodo anaeróbio utilizado na produção de H_2 a partir de resíduos de batata e abóbora. O tratamento químico foi o tratamento que resultou em maior quantidade de H_2 acumulada (171,1 mL H_2 g SV^{-1}), maior taxa de produção de H_2 (10,3 mL h^{-1}) e o menor tempo (14,4 h) de germinação dos esporos das bactérias produtoras de H_2 (fase lag). Os autores explicam que as baixas taxas de produção de H_2 obtidas pelos métodos térmico (2,1 mL h^{-1}) e aeração (4,2 mL h^{-1}) podem ser atribuídas ao maior tempo da fase lag (61,1 e 37,4 h) e pela maior atividade das bactérias consumidoras de H_2 (metanogênicas), o que foi comprovado pela presença de 25% de metano no biogás.

Han et al. (2015) avaliaram a produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia de resíduos de alimentos. Nesse trabalho, o inóculo foi pré-tratado pelo método de aeração, durante 30 dias, a fim de inibir a atividade das bactérias metanogênicas. O biogás produzido não apresentou qualquer concentração de metano, o que foi atribuído ao pré-tratamento do lodo anaeróbio. Analisando os trabalhos de Han et al. (2015) e Ghimire et al. (2015), observa-se a disparidade entre os resultados quanto à eficiência do pré-tratamento por aeração do inóculo, enquanto o primeiro apresentou completa eficiência, no segundo foram produzidas quantidades significativas de metano (25% de metano no biogás).

Os tratamentos ácido (pH 3 por 24 h, HCl) e térmico (80°C por 15 min) do inóculo utilizado para a produção de H_2 a partir da glicose foram comparados por Lamaison et al. (2015). Os tratamentos, térmico e ácido, promoveram taxas de produção e de conversão de H_2 de 8,4 e 9,5 mmol L^{-1} d^{-1} e 0,95 e 1,10 mol H_2 mol $_{glicose}^{-1}$, respectivamente. Além disso, os resultados mostraram que o consumo da glicose e a produção de H_2 estabilizou após 7 dias de fermentação com o inóculo submetido ao tratamento térmico e após 12 dias com o inóculo tratado com ácido. O tratamento ácido favoreceu o desenvolvimento de microrganismos da família *Clostridiaceae*. Essas bactérias são capazes de diminuir a concentração de ácido lático, o qual tem sido relatado por inibir a produção de H_2.

Wang e Wan (2008) compararam diferentes tipos de pré-tratamento do lodo anaeróbio na produção de hidrogênio utilizando a glicose como substrato. Os tratamentos estudados foram: ácido (ajuste do pH em 3,0 com 1 mol L^{-1} de HCl e mantido por 24 h), básico (ajuste do pH em 10,0 com 1 mol L^{-1} de NaOH e mantido por 24 h), térmico (100°C por 15 min), aeração (24 h) e com clorofórmio (adição de clorofórmio a 2%, mentido por 24 h). Em todos os ensaios os autores observaram que o tratamento térmico do lodo proporcionou o maior potencial de produção (215,4 mL), maior taxa de produção (120,4 mL h^{-1}) e maior rendimento de hidrogênio (221,5 mL g $_{glicose}^{-1}$), além de maior eficiência na degradação do substrato

(97,2%). Já os ensaios que utilizaram o lodo tratado com clorofórmio apresentaram menor taxa e potencial de produção de H_2 do que todos os demais métodos.

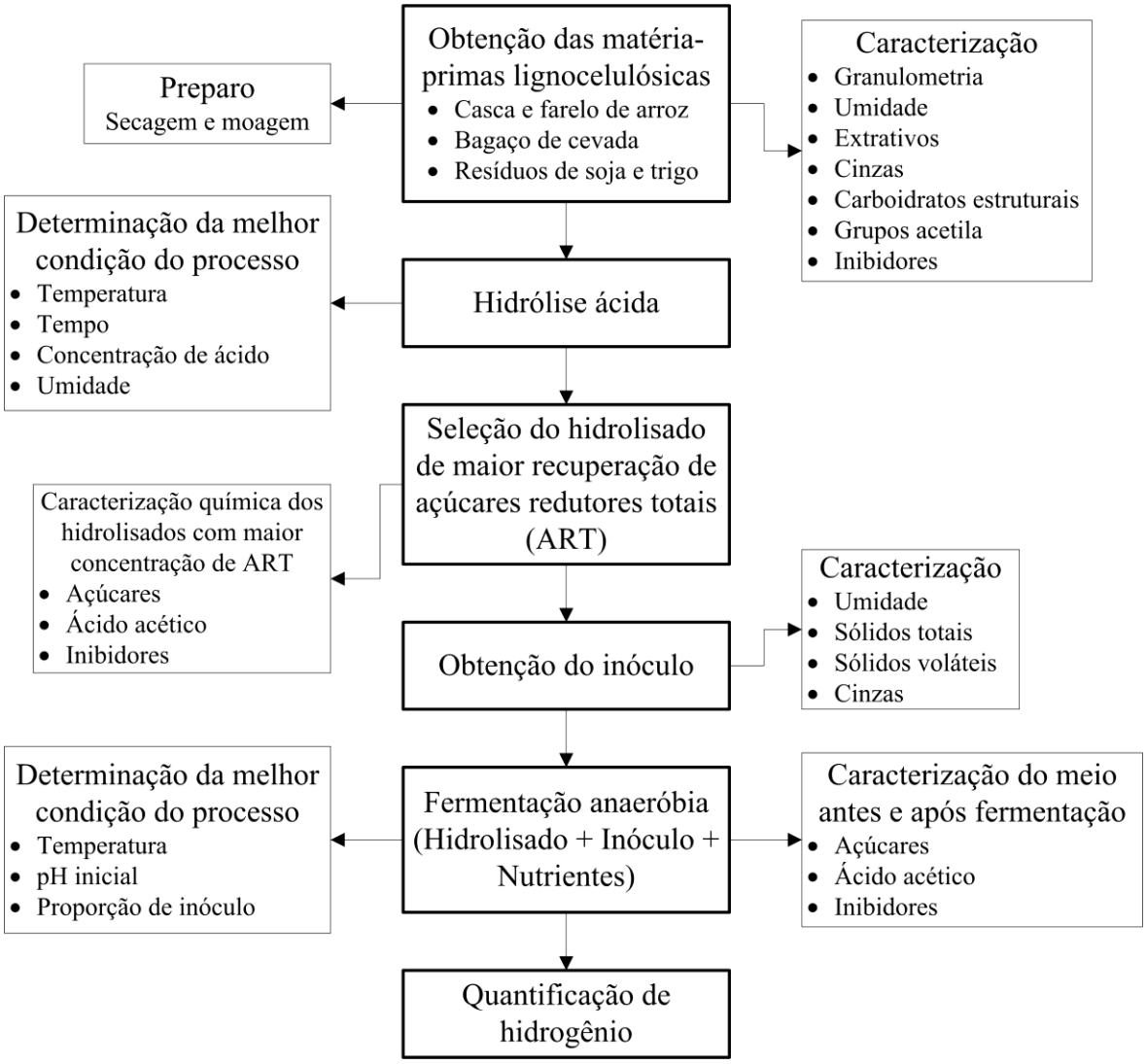
Alemahdi et al. (2015) avaliaram diferentes condições de tempo (30-60 min) e temperatura (80-100°C) no tratamento térmico do inóculo. A palha de arroz foi utilizada como substrato nos ensaios de produção de H_2. Os resultados mostraram que o rendimento de hidrogênio aumentou com o aumento da temperatura e do tempo do tratamento do inóculo, e que o efeito da variação do tempo foi mais significante do que a temperatura. O máximo rendimento de H_2 (14,22 NmL H_2 g SV^{-1}), a máxima concentração de H_2 (70,98%) e a mínima concentração de metano (0,074%) foi alcançada na condição de pré-tratamento do inóculo de 100°C e 60 min.

Considerando os trabalhos aqui citados, a biomassa lignocelulósica tem se mostrado uma fonte promissora para aplicação como substrato na produção de H_2. Deste modo, este trabalho visa contribuir com a pesquisa de biomassas ainda pouco exploradas e disponível em abundância do estado do Rio Grande do Sul. E trazer informações quanto ao comportamento da produção de H_2 sob diferentes condições operacionais, uma vez que tais condições podem variar de acordo com o tipo de biomassa e com a fonte de inóculo utilizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para atender o objetivo geral e os objetivos específicos deste estudo realizou-se uma série de procedimentos sequenciais, como mostra a Figura 3.1. Os principais processos realizados foram a hidrólise ácida das matérias-primas lignocelulósicas e a fermentação anaeróbia do hidrolisado obtido para produção de hidrogênio. Nos ensaios de hidrólise ácida das matérias-primas foram selecionados o hidrolisado e a condição experimental de maior recuperação de açúcares. O hidrolisado selecionado, juntamente com o inóculo e nutrientes, foram, então, submetidos ao processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2, onde avaliaram-se as condições de melhor produção e a taxa máxima de produção.

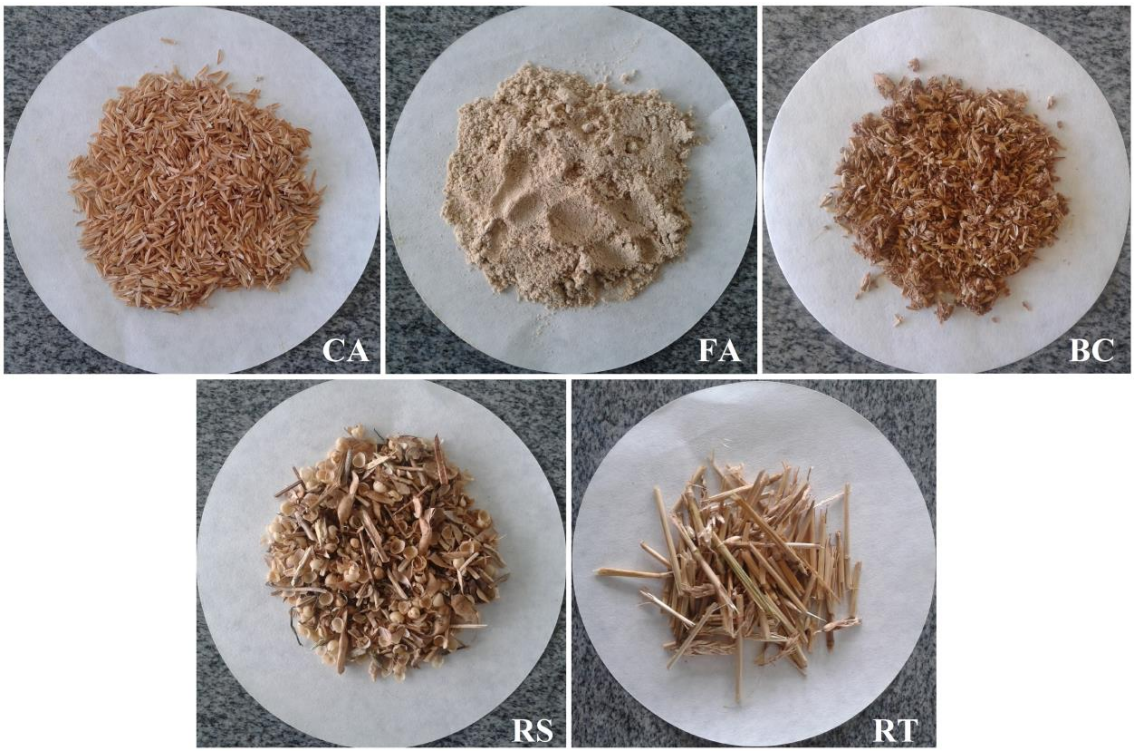
Figura 3.1 – Representação esquemática dos procedimentos realizados neste estudo



3.1 MATÉRIA-PRIMA

Neste trabalho, foram utilizados resíduos agroindustriais como matéria-prima para a produção de hidrogênio – casca (CA) e farelo de arroz (FA), bagaço de cevada (BC) e resíduos de soja (RS) e trigo (RT) – (Figura 3.2). A casca e o farelo de arroz foram obtidos da Empresa Primo Berleze e Cia. Ltda. (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil), a qual realiza o beneficiamento e distribuição do grão. O bagaço de cevada, gerado como principal subproduto da fabricação da cerveja, foi fornecido pela Cervejaria Colônia (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil). Os resíduos de soja e trigo foram fornecidos pela empresa Olfar (Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil), os quais foram provenientes do processo de pré-limpeza dos grãos na entrega do produto ao armazém. O resíduo de soja era composto principalmente pela casca do grão, além da casca da vagem, grãos quebrados, frações de caule e impurezas da colheita. Já o resíduo de trigo era composto principalmente por palha, além da casca do grão, grãos quebrados e demais impurezas da colheita.

Figura 3.2 – Matérias-primas utilizadas para produção de hidrogênio



Fonte: Autora.
Nota: Casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), bagaço de cevada (BC), resíduo de soja (RS) e resíduo de trigo (RT).

3.1.1 Preparo da matéria-prima

Após a coleta, as matérias-primas foram secas em estufa (Brasdonto, modelo 5, Paulínia, SP, Brasil) a 60°C até atingir massa constante. Com exceção do farelo de arroz, as demais matérias-primas foram moídas em um moinho de sapatas (Marconi, modelo MA 880, Piracicaba, SP, Brasil) para a diminuição do tamanho das partículas. Todas as matérias-primas foram armazenadas a temperatura ambiente até o momento de uso.

3.1.2 Caracterização da matéria-prima

As matérias-primas foram caracterizadas quanto à granulometria, teor de umidade, teor de extrativos, teor de cinzas, conteúdo de carboidratos estruturais, conteúdo de grupos acetila e conteúdo de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). As metodologias utilizadas para estas caracterizações foram baseadas nos protocolos padronizados do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL - National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter et al., 2008) e por Gouveia et al. (2009), como mostra a Tabela 3.1. A descrição das metodologias encontra-se nas seções 3.1.2.1 a 3.1.2.6. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 3.1 – Referências das metodologias utilizadas para caracterização da matéria-prima

Protocolo	Referência
Teor de extrativos	NREL
Determinação do teor de cinzas	NREL
Conteúdo de carboidratos estruturais	Sluiter et al. (2008)
Conteúdo de grupos acetila	Gouveia et al. (2009)
Conteúdo de lignina	Sluiter et al. (2008)
Conteúdo de furfural	Gouveia et al. (2009)
Conteúdo de hidroximetilfurfural	Gouveia et al. (2009)

3.1.2.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada utilizando uma série de peneiras Tyler (Bronzinox, São Paulo-SP) acoplada a um agitador eletromagnético de peneiras (Bertel, Caieiras-SP), onde foram submetidos, aproximadamente, 10 g de amostra durante 10 min. As malhas utilizadas foram: 20, 28, 35, 48, 65, 100, 150 e 200 mesh. A massa de material retida em cada peneira foi mensurada a partir de uma balança analítica (Bel Engineering, modelo M214A, Piracicaba-SP). O diâmetro médio de Sauter (D_{ps}) foi determinado conforme a Equação 4, onde x_i é a fração mássica retida e d_i diâmetro médio das partículas retidas em cada peneira.

$$D_{ps} = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{d_i}} \tag{4}$$

3.1.2.2 Determinação do teor de umidade

A determinação da umidade da matéria-prima *in natura* e após a secagem foi realizada a partir de um analisador de umidade por infravermelho (Gehaka, modelo IV 2000, São Paulo-SP). O procedimento constitui-se basicamente em ajustar o analisador a 105°C, aguardar aproximadamente 30 min para a estabilização da temperatura, inserir a amostra em quantidade suficiente para preencher o prato do analisador (em torno de 10 g), e aguardar o resultado (cerca de 5 min) determinado em porcentagem pelo analisador. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Ao contrário das outras matérias-primas, o bagaço de cevada *in natura* foi analisado por gravimetria, pois apresenta elevado teor de umidade. Para esse procedimento, foram colocados 10,00 ± 0,01 g de amostra, em triplicata, na estufa (Sterilifer, SX 1.3 DTME) a 105°C, medindo-se sua massa periodicamente até obter valor constante. O teor de umidade foi calculado conforme a Equação 5, onde m_i é a massa inicial e m_f é a massa final da amostra. A determinação da umidade das matérias-primas é importante para o cálculo das demais caracterizações, uma vez que não foram utilizadas amostras em base seca nos procedimentos. Além disso, não é adequado que o teor de umidade na matéria-prima esteja acima de 10% nos procedimentos de caracterização de carboidratos estruturais e lignina, pois interfere na concentração de ácido (Sluiter et al., 2008).

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

3.1.2.3 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas presente nas matérias-primas foi realizada a partir da calcinação das amostras em forno mufla (Magnus, Belo Horizonte-MG) a 400°C por 1 h e 800°C por 2 h. Para isto, foi colocado 1,00 ± 0,01 g de cada matéria-prima (seca a 60°C) em cadinhos de porcelana. A quantificação da massa de amostra inicial, dos cadinhos e da massa final do cadinho mais as cinzas, foi realizada em uma balança analítica (Bel Engineering, modelo M214A, Piracicaba-SP). O teor de cinzas foi calculado conforme a Equação 6, onde m_1 é a massa do cadinho + cinzas, m_2 a massa do cadinho vazio e m_0 a massa inicial de amostra (1,0 ± 0,01 g) com determinado teor de umidade. O teor de umidade presente nas matérias-primas foi descontado no cálculo. De acordo com Sluiter et al. (2008), o teor de cinzas acima de 10% na biomassa pode interferir nas análises de carboidratos estruturais e lignina, pois as amostras podem conter solo ou outros minerais que interfiram as reações ácidas.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_1(g) - m_2(g)}{m_0(g)} \times 100 \quad (6)$$

3.1.2.4 Determinação de extrativos

Para esta análise, pesaram-se 3,00 ± 0,01 g de matéria-prima (seca a 60°C) em papel filtro qualitativo 80 g (J Prolab, São José dos Pinhais-PR, 12,5 Ø e 14 μm) moldados em forma de cartuchos. Os papéis filtro foram previamente secos e pesados. Os cartuchos preparados com as matérias-primas foram colocados para extração em um extrator Soxhlet (Marconi, Piracicaba-SP). Nesse equipamento, os extrativos foram removidos com 150 mL etanol durante 24 h (8 extrações por hora). Na sequência, realizou-se uma extração com 150 mL de água destilada, também por 24 h (10 extrações por hora), para a lavagem do cartucho. Após as extrações, os cartuchos com as amostras foram lavados com água destilada e secos em uma estufa de secagem (Med Clave, modelo 1) a 105°C até massa constante, determinada em uma balança analítica (Bel Engineering, modelo M214A, Piracicaba-SP). O conteúdo de extrativos presente nas matérias-primas foi quantificado de acordo com a Equação 7, onde m_0

é a massa inicial de matéria-prima (3,00 ± 0,01 g) com determinado teor de umidade, m_1 é a massa dos cartuchos secos, m_2 é a massa do cartucho + amostra secos após a extração. O teor de umidade presente nas matérias-primas foi descontado no cálculo.

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{m_0(g) - (\, m_2(g) - m_1(g))}{m_0(g)} \times 100 \qquad (7)$$

3.1.2.5 Determinação de carboidratos estruturais, grupos acetila, furfural, hidroximetilfurfural e lignina

Determinação de carboidratos estruturais, grupos acetila, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e lignina foi realizada por uma série de procedimentos. Inicialmente, foi realizado um processo de hidrólise ácida concentrada (H_2SO_4) das matérias-primas secas após remoção dos extrativos. Para esse procedimento foi pesado 0,3 ± 0,001 g de cada amostra em tubos de ensaio e adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72%. A reação foi realizada em banho maria (Solab, Piracicaba-SP) a 30°C durante 1 h, agitando-se a amostra com bastão de vidro a cada 10 min. A seguir, iniciou-se o procedimento de hidrólise ácida diluída. Para isso, o material resultante da hidrólise ácida concentrada foi transferido para um frasco de 250 mL, diluído em 89 mL de água destilada e colocado em autoclave (Prismatec, Itu-SP) a 121°C por 1 h. Os frascos foram pesados antes e depois da reação na autoclave para a quantificação de perdas por vaporização. Após a reação de hidrólise ácida diluída, deu-se início ao processo de filtragem. O hidrolisado contido nos frascos foi separado da fração sólida através de papéis filtro qualitativo 80 g (J Prolab, São José dos Pinhais-PR, 12,5 Ø e 14 μm) previamente secos e pesados. O hidrolisado filtrado foi transferido para balões volumétricos para realizar as análises de quantificação de carboidratos, grupos acetila, furfural, 5-HMF e lignina solúvel.

Para a determinação da lignina solúvel, o hidrolisado de cada matéria-prima foi devidamente diluído em água destilada e analisado em um espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, modelo UV 2600, Barueri-SP) a 280 nm. As diluições foram de 1:100 para o resíduo de soja, 1:50 para o farelo de arroz e bagaço de cevada e 1:25 para a casca de arroz e resíduo de trigo. A lignina solúvel foi determinada pelas equações 8 e 9, onde C_{lig} é a concentração de lignina solúvel, em g L^{-1}; A_T é a absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{PD} = c_1\varepsilon_1 + c_2\varepsilon_2$, ou seja, é absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-HMF), cujas concentrações c_1 e c_2

foram determinadas previamente por cromatografia líquida e ε_1 e ε_2 são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g^{-1} cm^{-1}; $V_{filtrado}$ é volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L; FD é o fator de diluição para leitura da absorbância e M é a massa utilizada para caracterização (aproximadamente 0,3 g).

$$C_{lig}(g\ L^{-1}) = 4{,}187 \times 10^{-2}(A_T - A_{PD}) - 3{,}279 \times 10^{-4} \quad (8)$$

$$\text{Lignina solúvel } (\%) = \left(\frac{C_{lig}(g\ L^{-1}) - V_{filtrado}(L) \times FD}{M(g)}\right) \times 100 \quad (9)$$

Os teores de celobiose, glicose, xilose e arabinose presente nos hidrolisados foram quantificados a partir da cromatografia líquida utilizando um Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (UHPLC, Shimadzu, Barueri-SP), do Laboratório Biotec Factory da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os hidrolisados foram filtrados em filtros de seringa nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Aprolab, Santa Maria-RS). Na análise cromatográfica foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) na temperatura de 30°C. A fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, devidamente filtrada e degaseificada. As condições de análise foram: volume injeção de amostra – 15 µL, taxa de fluxo da fase móvel – 0,6 mL min^{-1}, temperatura da coluna – 30°C, temperatura do detector de índice de refração – 30°C e tempo de execução – 30 min. A concentração de cada componente foi obtida pela correlação entre as áreas dos picos dos cromatogramas e as curvas dos padrões, previamente definidas para os padrões de D-celobiose, D-Glicose, D-xilose e D-arabinose.

As concentrações de ácido acético, furfural e 5-HMF, presente nos hidrolisados, também foram quantificadas a partir da cromatografia líquida utilizando UHPLC (Shimadzu, Barueri-SP). Antes das análises cromatográficas, os hidrolisados foram filtrados em filtros de seringa nylon 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Aprolab, Santa Maria-RS). Para quantificação de ácido acético foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm). A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico a 0,01 mol L^{-1}, devidamente filtrada e degaseificada. As condições de análise foram: volume de injeção da amostra de 40 µL, taxa de fluxo da fase móvel de 0,8 mL min^{-1}, temperatura da coluna de 30°C, temperatura do detector IR de 35°C e tempo de execução de 25 min.

Para a quantificação de furfural e 5-HMF, utilizou-se a coluna Nova-Pak C18, Waters, Milford, MA. A fase móvel foi uma solução de acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético), previamente filtrada e degaseificada. As condições de análise foram: volume injeção de 20 µL, taxa de fluxo de 0,8 mL min^{-1}, temperatura da coluna de 30°C, comprimento de onda de 280 nm, temperatura do detector UV-VIS de 30 °C e tempo de execução de 10 min. As áreas dos picos dos cromatogramas, correspondentes ao furfural e ao 5-HMF, foram utilizadas para calcular suas respectivas concentrações, utilizando-se um fator de conversão de 1,37 e 1,3, respectivamente.

A partir dos resultados das quantificações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, furfural, 5-HMF e ácido acético, os teores de celulose, hemicelulose e grupos acetila foram determinados de acordo com as Equações 10, 11 e 12, respectivamente, onde: C_g é a concentração de glicose; C_c é a concentração de celobiose; C_{HMF} é a concentração de 5-hidroximetilfurfural; C_x é a concentração de xilose; C_a é a concentração de arabinose; C_{furf} é a concentração de furfural; C_{aa} é a concentração de ácido acético; FC_g é fator de conversão da glicose (0,90); FC_c é fator de conversão da celobiose (0,95); FC_{HMF} é fator de conversão do 5-hidroximetilfurfural (1,2); FC_x é fator de conversão da xilose (0,88); FC_a é fator de conversão da arabinose (0,88); FC_{furf} é fator de conversão do furfural (1,37); FC_{aa} é fator de conversão do ácido acético (0,72); V_f é volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); FD é o fator de diluição (1); FE é o fator de evaporação durante o procedimento de hidrólise; E é a fração de extrativos, e; M é a massa utilizada para caracterização (aproximadamente 0,3 g).

$$\text{Celulose (\%)} = ((C_g(g\,L^{-1}) \times FC_g + C_c(g\,L^{-1}) \times FC_c + C_{HMF}(g\,L^{-1}) \times FC_{HMF}) \times V_f(L) \times FD \times FE \times (1 - E)) \div M(g) \quad (10)$$

$$\text{Hemicelulose (\%)} = ((C_x(g\,L^{-1}) \times FC_x + C_a(g\,L^{-1}) \times FC_a + C_{furf}(g\,L^{-1}) \times FC_{furf}) \times V_f(L) \times FD \times FE \times (1 - E)) \div M(g) \quad (11)$$

$$\text{Grupos acetila (\%)} = ((C_{aa}(g\,L^{-1}) \times FC_{aa}) \times V_f(L) \times FD \times FE \times (1 - E)) \div M(g) \quad (12)$$

Para a determinação da lignina insolúvel foi utilizado o material retido no papel de filtro após as hidrólises ácidas concentrada e diluída. Os sólidos retidos e o papel filtro foram lavados com água destilada até se obter a neutralidade do filtrado (aprox. 6,0 < pH < 7,0). Os

materiais (sólidos retidos e papel de filtro) passaram por um processo de secagem em estufa (Med Clave, modelo 1) a 105°C durante 48 h. Posteriormente, os materiais foram calcinados em forno mufla (Magnus, Belo Horizonte-MG) a 400°C durante 1 h e a 800°C por mais 2 h. A massa obtida após cada processo foi mensurada a partir de uma balança analítica (Bel Engineering, modelo M214A, Piracicaba-SP). A fração de lignina insolúvel presente nos resíduos foi calculada a partir da Equação 13, onde m_2 é a massa do papel filtro mais a lignina insolúvel após a secagem em estufa, MPFs é a massa do papel filtro seco, m_0 a massa inicial de amostra (0,30 ± 0,001 g) e Cinzas II é o percentual de cinzas obtidas na calcinação dos sólidos retidos + papel filtro.

$$\text{Lignina insolúvel (\%)} = \left(\frac{\mathrm{m_2(g)} - \mathrm{MPFs(g)}}{\mathrm{m_0(g)}} \times 100\right) - \text{Cinzas II (\%)} \qquad (13)$$

3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA MATÉRIA-PRIMA

O tratamento de hidrólise ácida foi aplicado às matérias-primas utilizadas neste trabalho visando à obtenção de açúcares fermentescíveis. O hidrolisado resultante deste processo foi o material utilizado como fonte de carbono para os microrganismos no processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2. Os ensaios de hidrólise ácida foram conduzidos em autoclave utilizando ácido fosfórico P.A. 85% (Synth, Diadema, SP, Brasil). O ácido fosfórico (H_3PO_4) foi escolhido por resultar em hidrolisados com quantidades relativamente pequenas de inibidores e com quantidade adequada de fósforo necessário durante o processo de fermentação (Vasconcelos et al., 2013).

O processo de hidrólise foi avaliado quanto à temperatura (104,4 a 127,0°C), tempo (20 a 60 min), concentração de ácido (5 a 15%, m/m) e umidade (60 a 90%, m/m) conforme o delineamento experimental fracionado Plackett-Burman, (Tabela 3.2). A faixa de temperatura foi escolhida de acordo com o mínimo e máximo possível de ser ajustado na autoclave utilizada, enquanto que as demais foram estabelecidas com base na literatura. A porcentagem de ácido e de umidade adicionados foi calculada com base na quantidade de resíduo utilizado em cada ensaio, o qual foi previamente seco a 60°C. Em todos os experimentos foram utilizados, aproximadamente, 20 g de matéria-prima em base úmida.

No final de cada hidrólise, os sólidos foram separados do hidrolisado por meio de filtração com papel filtro de 14 μm (J Prolab, São José dos Pinhais-PR, 12,5 Ø), e lavados

com 50 mL de água destilada para melhor remoção dos açúcares. A fração sólida retida nos filtros foi devidamente lavada para remoção do ácido residual e descartada. A fração líquida (hidrolisado) foi armazenada sob refrigeração (-4°C) até a quantificação dos açúcares redutores totais (ART). O planejamento experimental Plackett-Burman, aplicado ao processo de hidrólise ácida das diferentes matérias-primas lignocelulósicas, foi analisado a partir do gráfico de Pareto gerado pelo software Statistica 8, com um nível de significância de 10%. Para isto, considerou-se a concentração de ART a variável dependente.

Tabela 3.2 – Planejamento experimental Plackett-Burman da hidrólise ácida dos resíduos agroindustriais

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração do ácido (%, m/m)	Umidade (%)
1[1]	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)
2[1]	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)
3[1]	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)
4[1]	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)
5[1]	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)
6[1]	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)
7[1]	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)
8[1]	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)
9[2]	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)

[1] Duplicata.
[2] Triplicata.

3.2.1 Determinação de açúcares redutores totais

O teor de açúcar redutor total (ART) presente nos hidrolisados foi determinado pelo método DNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico) (Miller, 1959) utilizando espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, modelo UV 2600, Barueri-SP). Para essa análise, os hidrolisados de cada condição foram diluídos em diferentes concentrações, de modo que as leituras no espectrofotômetro permanecessem na faixa confiável de 100 – 1000 mg L^{-1}. O procedimento consistiu em adicionar 1 mL de amostra e 2 mL de solução DNS em tubos de ensaio, agitar, colocar em banho maria à 100°C durante 5 min e resfriar em banho de gelo por 5 min. Na

sequência, foram adicionados 8 mL de tartarato duplo de sódio e potássio e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Ao mesmo tempo foi conduzido o branco, onde substituiu-se a amostra por água destilada. A curva-padrão foi elaborada seguindo o mesmo procedimento, apenas substituindo a amostra pelas diferentes diluições de glicose (0,1 g L^{-1} a 1,0 g L^{-1}). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2 Caracterização química dos hidrolisados

Com base nos resultados do delineamento experimental Plackett-Burman aplicado a cada matéria-prima, escolheu-se a condição em que se obteve maior concentração de ART para a caracterização química do hidrolisado. Nesse sentido, foi investigado o perfil de açúcares produzidos (glicose, xilose, arabinose e celobiose), bem como as concentrações de inibidores (furfural e 5-HMF) e ácido acético. As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se o Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (Shimadzu, Barueri-SP) do Biotec Factory/UFSM. Para a condução das análises cromatográficas, foi filtrada uma fração de, aproximadamente, 1 mL de cada hidrolisado em filtros de seringa nylon 0,45 μm (Aprolab, Santa Maria-RS) para vials de cromatografia.

Para a caracterização dos açúcares e do ácido acético foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm). A fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico 0,01 N, devidamente filtrada e degaseificada. As condições de análise foram: volume injeção de amostra – 15 μL, taxa de fluxo da fase móvel – 0,6 mL min^{-1}, temperatura da coluna – 30°C, temperatura do detector de índice de refração – 30°C e tempo de execução – 30 min. A concentração de cada componente foi obtida pela correlação entre as áreas dos picos dos cromatogramas e as curvas padrões, previamente definidas para os padrões de D-celobiose, D-Glicose, D-xilose e D-arabinose.

Para a quantificação de furfural e 5-HMF, utilizou-se a coluna Nova-Pak C18, Waters, Milford, MA. A fase móvel foi uma solução de acetonitrila/água (1/8 com 1% (v/v) de ácido acético), previamente filtrada e degaseificada. As condições de análise foram: volume injeção de amostra – 20 μL, taxa de fluxo da fase móvel – 0,8 mL min^{-1}, temperatura da coluna – 30°C, comprimento de onda – 280 nm, temperatura do detector UV-VIS – 30°C e tempo de execução – 10 min. A concentração de cada componente foi obtida pela correlação entre as áreas dos picos dos cromatogramas e as curvas padrões.

3.2.3 Estimativa de produção de H_2

O potencial do Rio Grande do Sul (Brasil) para produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia dos hidrolisados das diferentes matérias-primas utilizadas neste trabalho (farelo de arroz, casca de arroz, bagaço de cevada, resíduo de soja e resíduo de trigo), foi estimado de acordo com o máximo teórico estequiométrico que pode ser produzido. Para isto, foram considerados, também, os resultados das análises cromatográficas dos hidrolisados das matérias-primas, em termos de glicose e xilose, e a quantidade de resíduos gerados no Estado, apresentada na Tabela 3.3. Como pode-se observar na referida tabela, a quantidade de bagaço de cevada refere-se à geração no país, uma vez que não foram encontrados dados de produção deste resíduo para o estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 3.3 – Quantidade de resíduos agroindustriais produzidos no Rio Grande do Sul (Brasil)

Matéria-prima	**Quantidade de grão produzido**	**Conteúdo**	**Total de resíduo gerado (ton/ano)**
CA	8.460.200 ton[1]	20-33% da massa do grão[2]	1,69-2,79 milhões
FA	8.460.200 ton[1]	10-12% da massa do grão[3]	0,85-1,02 milhões
BC	~14 bilhões de L de cerveja no Brasil[4]	14-20 kg a cada 100 L de cerveja produzida[5]	~1,96-2,80 milhões [6]
RS	17.150.300 ton[1]	~1%	~0,17 milhões
RT	1.871.900 ton[1]	~1%	~0,02 milhões

[1] Conab (2018)
[2] Lim et al. (2012)
[3] Kahlon (2009)
[4] CervBrasil (2016)
[5] Cordeiro et al. (2012)
[6] Quantidade gerada no Brasil

3.3 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

3.3.1 Inóculo

A fonte de inóculo utilizada para a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia foi o lodo gerado nas lagoas facultativas de tratamento de efluentes do frigorífico Pampeano,

localizado no município de Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brasil). Após a coleta, a amostra foi fracionada em recipientes plásticos, de acordo com a quantidade a ser utilizada em cada ensaio, e armazenada sob refrigeração (-4°C) até o momento de uso. Todos os ensaios foram realizados utilizando o mesmo lote de lodo. O lodo foi caracterizado quanto ao teor de umidade, sólidos totais, sólidos voláteis e cinzas. Os procedimentos adotados estão descritos nas seções a seguir (3.3.1.1 a 3.3.1.3).

3.3.1.1 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 em estufa (Sterilifer, SX 1.3 DTME), medindo-se a massa da amostra, periodicamente, até obter valor constante. O teor de umidade foi calculado conforme a Equação 14, onde m_i é a massa inicial e m_f é a massa final da amostra. A fração sólida resultante do processo de secagem refere-se ao teor de sólidos totais. Deste modo, os sólidos totais foram determinados a partir da Equação 15. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_i(g) - m_f(g)}{m_i(g)} \times 100 \tag{14}$$

$$\text{Sólidos totais (\%)} = 100 - \text{Umidade (\%)} \tag{15}$$

3.3.1.2 Determinação do teor de sólidos voláteis

A análise de sólidos voláteis foi conduzida de acordo com o método padrão (APHA, 1999). Para este procedimento, foram colocados, aproximadamente, 5 g de amostra seca em cadinhos de porcelana e submetidos em forno mufla (Magnus, Belo Horizonte-MG) a 550°C. O material permaneceu na mufla até que a alteração da massa das amostras fosse inferior a 4% ou 50 mg (aproximadamente 1 h). A fração de sólidos voláteis foi calculada a partir da Equação 16, sendo A é a massa da amostra seca + cadinho (mg), B é a massa do cadinho (mg), e C é a massa da amostra + cadinho após a mufla (mg). O ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Sólidos voláteis (\%)} = \frac{(A - C)\ \times 100}{A - B} \tag{16}$$

3.3.1.3 Determinação do teor de cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado a partir da calcinação da amostra em forno mufla (Magnus, Belo Horizonte-MG) a 400°C por 1 h e 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 a 800°C por 2 h. O teor de cinzas do inóculo foi calculado conforme a Equação 17, onde m_1 é a massa de amostra + cadinho após a calcinação, m_2 a massa do cadinho e m_0 a massa inicial de amostra. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_1(g) - m_2(g)}{m_0(g)} \times 100 \tag{17}$$

3.3.2 Substrato

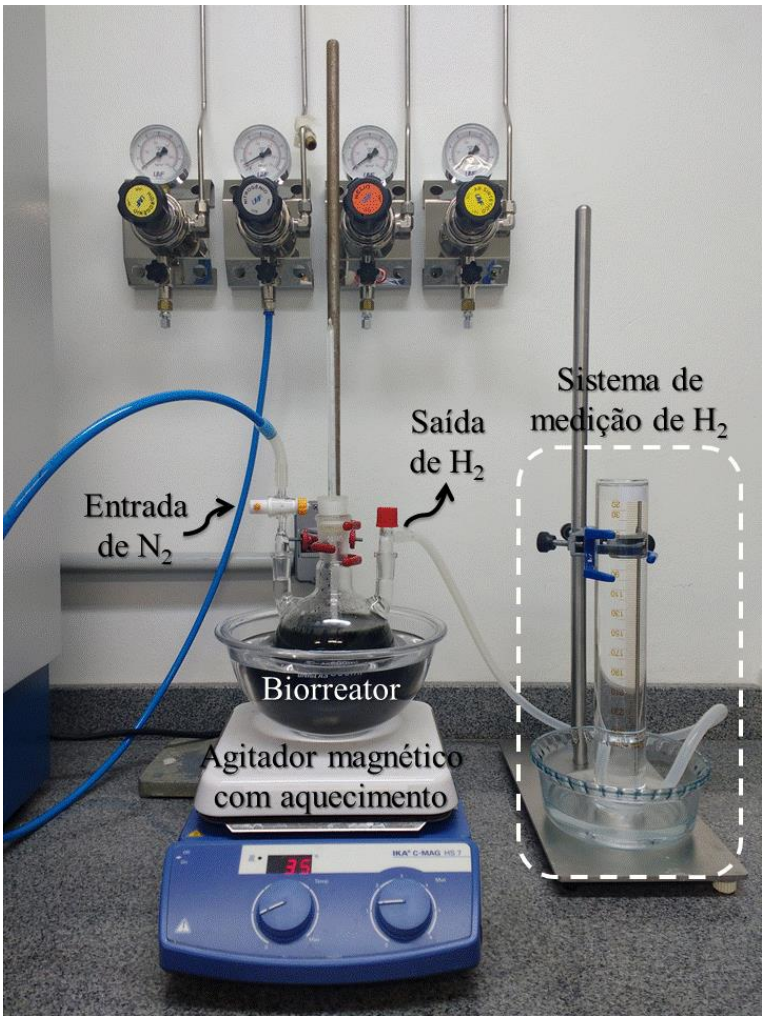
De acordo com os resultados obtidos pelo planejamento experimental da hidrólise ácida das matérias-primas, o hidrolisado do bagaço de cevada foi o substrato escolhido para a produção de hidrogênio a partir do processo de fermentação anaeróbia, pois foi o que resultou em maior concentração de açúcares redutores totais. Os hidrolisados utilizados nas fermentações foram obtidos na condição de hidrólise do ensaio 1, ou seja, com 127°C, 20 min, 5% (m/m) de H_3PO_4 e 90% de umidade. Após este processo, o hidrolisado foi fracionado em recipientes plásticos, de acordo com a quantidade a ser utilizada em cada ensaio, e armazenado sob refrigeração (-4°C) até o momento de uso.

3.3.3 Procedimento experimental

A unidade de produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia foi composta basicamente de um biorreator de 500 mL, um agitador magnético com aquecimento (IKA, modelo C-MAG HS 7, Staufen, Alemanha), um termômetro e um sistema de medição do volume de H_2 produzido (Figura 3.3). A produção de H_2 foi avaliada sob diferentes condições de temperatura (35-45°C), pH inicial (5,5-7,5) e proporção de inóculo no meio (10-30%, v/v), conforme o planejamento experimental fatorial (Tabela 3.4). A temperatura foi controlada

pelo agitador magnético com aquecimento e monitorada por um termômetro, e o pH inicial ajustado com soluções de NaOH 3M ou HCl 3M. O controle do pH e da temperatura na fermentação anaeróbia é um fator crucial para a obtenção de elevadas taxas de conversão de hidrogênio, minimizando a atividade dos organismos consumidores do mesmo (Ghimire et al., 2015b).

Figura 3.3 – Unidade de produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada



Fonte: Autora.

Tabela 3.4 – Planejamento experimental fatorial da produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada

Ensaio	Temperatura (°C)	pH inicial	Inóculo (%, v/v)
1	35 (-1)	5,5 (-1)	10 (-1)
2	45 (1)	5,5 (-1)	10 (-1)
3	35 (-1)	7,5 (1)	10 (-1)
4	45 (1)	7,5 (1)	10 (-1)
5	35 (-1)	5,5 (-1)	30 (1)
6	45 (1)	5,5 (-1)	30 (1)
7	35 (-1)	7,5 (1)	30 (1)
8	45 (1)	7,5 (1)	30 (1)
9[1]	40 (0)	6,5 (0)	20 (0)

[1] Triplicata.

Antes de cada ensaio, o inóculo foi tratado termicamente em estufa (Biopar, Porto Alegre-RS) a 100°C por 1 h (Alemahdi et al., 2015) para inativar as bactérias metanogênicas (consumidoras de H_2) e ativar as acidogênicas (produtoras de H_2). Esse método foi escolhido por apresentar boa eficiência no enriquecimento de bactérias produtoras de H_2 (Giordano et al., 2011), além de ser um método fácil e prático. Os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos foram adicionados ao meio nas seguintes concentrações: 3 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ (Synth, Diadema-SP), 0,5 g L^{-1} K_2HPO_4 (Neon, São Paulo-SP), 0,1 g L^{-1} $CaSO_4$ (Synth, Diadema-SP), 1,0 g L^{-1} $FeSO_4$ $7H_2O$ (Synth, Diadema-SP), 1,0 g L^{-1} $MnSO_4$ H_2O (Synth, Diadema-SP) e 0,5 g L^{-1} $MgSO_4$ $7H_2O$ (Synth, Diadema-SP). Todos os nutrientes foram adicionados na forma sólida no meio de fermentação.

Para iniciar o processo de fermentação, o biorreator era carregado com hidrolisado, inóculo e nutrientes, completando um volume de 500 mL. Na sequência, o pH inicial do meio e a temperatura eram ajustados de acordo com o planejamento experimental fatorial, e então 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 do meio e garantir a condição anaeróbia antes de iniciar o processo fermentativo. De acordo com testes preliminares realizados, todos os ensaios foram conduzidos por um período fixo de 20 h. Além disso, conforme Silva et al. (2018), a produção de H_2 se limita às primeiras

24-48 h. No início e no final de cada ensaio foram coletadas amostras do meio para análise química. Além disso, monitorou-se, também, o pH final de cada experimento.

A produção de H_2 foi medida a partir de um sistema de deslocamento de coluna de NaOH (3%) em uma proveta invertida conectada ao biorreator (Lopez-Hidalgo et al., 2017; Sattar et al., 2016a; Asadi e Zilouei, 2017). O monitoramento foi realizado em intervalos de 30 min após 6 h do início do processo fermentativo. Cabe ressaltar que não foi possível fazer análise cromatográfica do gás devido à falta de alguns instrumentos e padrões de gases. A concentração de açúcares (celobiose, xilose, glicose e arabinose), inibidores (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e ácido acético presentes no meio, antes e após cada ensaio, foi quantificada a partir da cromatografia líquida utilizando Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (UHPLC, Shimadzu, Barueri-SP) do laboratório Biotec Factory/UFSM. A metodologia da análise cromatográfica seguiu o mesmo procedimento descrito na seção 3.2.2.

3.3.4 Análise estatística

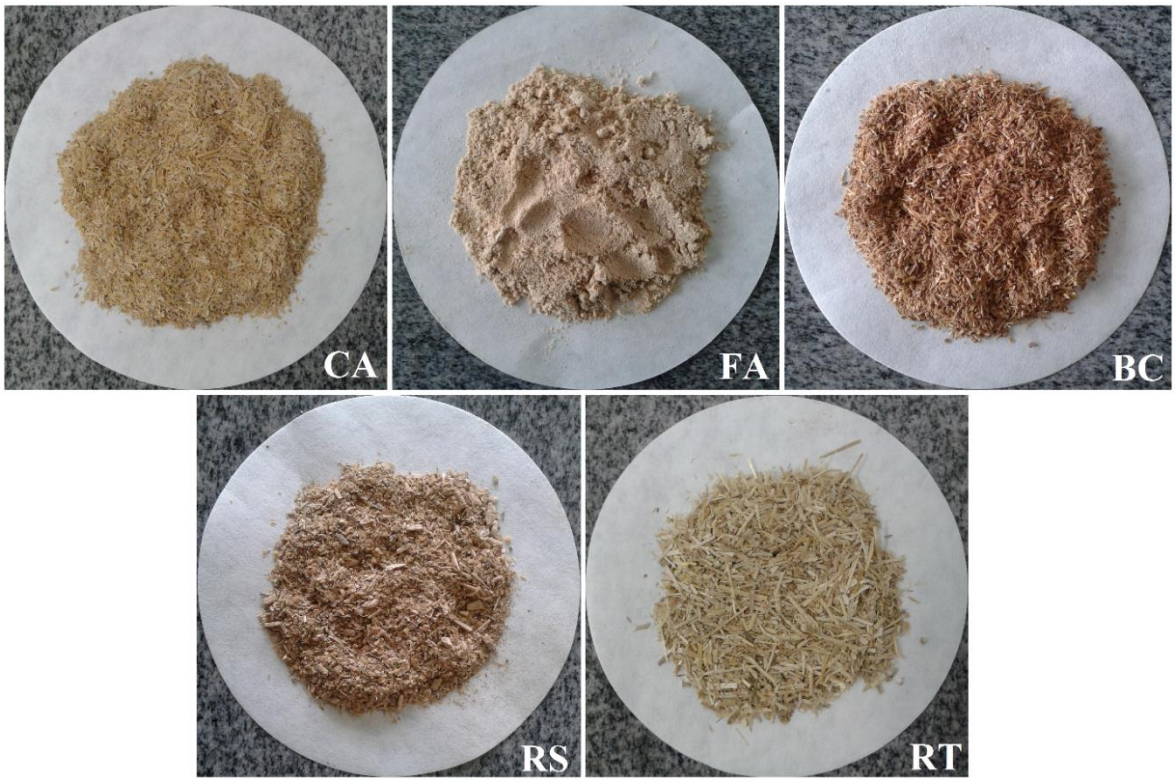
O planejamento experimental fatorial da produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada foi avaliado a partir do gráfico de Pareto, utilizando o software Statistica 8, com um nível de significância de 10%. A produção e a taxa máxima de produção de hidrogênio em 20 h de fermentação foram consideradas as variáveis dependentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram a casca e o farelo de arroz, o bagaço de cevada e os resíduos de soja e trigo. A Figura 4.1 mostra os resíduos secos (a 60°C) e moídos utilizados na etapa de hidrólise ácida. O diâmetro médio de cada material após a moagem foi de 389 µm (±0,003) para a casca de arroz, 310 µm (±0,069) para o farelo de arroz, 500 µm (±0,020) para bagaço de cevada, 533 µm (±0,019) para o resíduo de soja e 530 µm (±0,004) para o resíduo de trigo. As matérias-primas foram caracterizadas quanto ao conteúdo de umidade (*in natura* e após secagem), carboidratos estruturais (glicose, celobiose, xilose e arabinose), lignina, grupos acetila, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), extrativos e cinzas, como descrito a seguir. Os teores de glicose, celobiose e 5-HMF foram convertidos em celulose e os teores de xilose, arabinose e furfural em hemicelulose.

Figura 4.1 – Matérias-primas após a secagem e moagem



Nota: Casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), bagaço de cevada (BC), resíduo de soja (RS) e resíduo de trigo (RT).
Fonte: Autora.

O teor de umidade da casca e do farelo de arroz *in natura* foi de 11,3 ± <0,1% e de 11,3 ± 0,2%, respectivamente, o que está de acordo com os valores encontrados na literatura (4,1-11,8% para a casca e 8,5-13,8% para o farelo) (Saha et al., 2005; Megawati et al., 2011; Yang et al., 2012; Nichols et al., 2014; Cabrera et al., 2014; Jiamyangyuen et al., 2005; Sereewatthanawut et al., 2008; Gao et al., 2008; Wang et al., 2015). Já o conteúdo de umidade do bagaço de cevada *in natura* foi de 72,3 ± 0,1%, estando, também, de acordo com os valores encontrados na literatura (69,5-78,5%) (Beldman et al., 1987; Tang et al., 2009; Gencheva et al., 2012; Li et al., 2012). E o teor de umidade do resíduo de soja e de trigo *in natura* foi de 8,7 ± 0,3% e 11,0 ± 0,3%, respectivamente. Após a secagem, a casca e o farelo de arroz, o bagaço de cevada, e os resíduos de soja e trigo apresentaram 8,9 ± <0,1%, 6,3 ± 0,2%, 5,3 ± 0,2%, 4,6 ± <0,1% e 7,1 ± <0,1% de umidade, respectivamente.

A Tabela 4.1 apresenta a composição química das matérias-primas utilizadas neste trabalho, em termos de celulose, hemicelulose, lignina, grupos acetila, extrativos e cinzas. De acordo com a literatura, a casca de arroz apresenta 34,1-36,0% de celulose, 12,0-14,6% de hemicelulose, 15,4-27,0% de lignina, 1,2% de grupos acetila, 2,0-8,2% de extrativos e 14,0-18,7% de cinzas (Nichols et al., 2014, Cabrera et al., 2014, Dagnino et al., 2013). Desta forma, observa-se que a composição de celulose (23,3%) e hemicelulose (9,5%) da casca de arroz está abaixo dos trabalhos encontrados na literatura, enquanto que os valores de lignina (29,1%) e cinzas (20,0%) está acima. Esta diferença na composição da casca de arroz entre os trabalhos pode ser atribuída a fatores como: localização do plantio, tipo de manejo, ano de colheita, características ambientais, dentre outros.

Poucos são os trabalhos que quantificam o teor de celulose, hemicelulose e lignina no farelo de arroz. Michel Junior et al. (2016) caracterizaram o farelo de arroz em 9,2% de celulose, 22,9% de hemicelulose e 5,4% de lignina. Enquanto Jiamyangyuen et al. (2005) e Gao et al. (2008) identificaram teores de 43,1% e 46,1% de carboidratos no farelo de arroz. Resultados bem distintos do presente estudo. De modo geral, a composição química do farelo de arroz encontrada na literatura corresponde a 8,4-21,1% de lipídeos, 30,8-36,5% de amido, 9,3-15,2% de proteína, 6,5-8,9% de cinzas e 5,6-8,4% de fibras (Jiamyangyuen et al., 2005; Gao et al., 2008; Sereewatthanawut et al., 2008; Wang et al., 2015; Michel Junior et al., 2016).

Conforme os trabalhos de Mussatto e Roberto (2005), Russ et al. (2005) e Beldman et al. (1987), a composição do bagaço de cevada é de 15,1-25,0% de celulose, 24,8-35,0% de hemicelulose, 7,0-27,8% de lignina, 1,4% de grupos acetila, 5,8% de extrativos e 3,5-5,5% de cinzas. Assim, pode-se observar que a composição de carboidratos deste estudo ficou abaixo

do encontrado na literatura, enquanto que o teor de extrativos foi muito superior. A diferença na composição do bagaço de cevada entre os estudos pode ser atribuída à variedade da cevada, ao tempo de colheita, à tecnologia utilizada na indústria e às características do lúpulo e de outros produtos adicionados na produção cervejeira (Santos et al., 2003).

De acordo com a literatura, a casca de soja é composta por 35,8-39,7% de celulose, 10,2-25,5% de hemicelulose, 2,8-9,2% de lignina, 0,6% de grupos acetila, 3,2-5,0% de extrativos e 0,6-5,8% de cinzas (Mielenz et al., 2009, Cassales et al., 2011, Rojas et al., 2014). E a palha de trigo composta por 37,4-41,0% de celulose, 19,0-33,8% de hemicelulose, 16,9-26,8% de lignina, 7,6% de extrativos e 1,6-7,2% de cinzas (Rajan e Carrier, 2014, Ferreira-Leitão et al., 2010, Ruiz et al., 2011). Conforme os resultados da caracterização química do resíduo de soja e do resíduo de trigo, o teor de celulose e hemicelulose estão abaixo dos valores encontrados na literatura, enquanto que o teor de extrativos foi bastante superior. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que neste trabalho foi utilizado o resíduo bruto da limpeza da soja e da limpeza do trigo (contendo cascas dos grãos, grãos quebrados, palha de trigo, caule e cascas da vagem da soja, além de impurezas da colheita). Salienta-se, também, que a composição destes resíduos depende da variedade da cultura e das condições climáticas e agronômicas (Ruiz et al., 2011; Montane et al., 1998).

Tabela 4.1 – Composição química das matérias-primas utilizadas

Composto[1]	**Matéria-prima**				
	Casca de arroz	**Farelo de arroz**	**Bagaço de cevada**	**Resíduo de soja**	**Resíduo de trigo**
Celulose (%)	23,3 ± 0,8	18,1 ± 1,4	11,0 ± 0,2	22,1 ± 3,5	30,1 ± 1,6
Hemicelulose (%)	9,5 ± 0,3	6,0 ± 0,2	13,3 ± 0,2	8,9 ± 1,8	14,0 ± 0,8
Lignina (%)	29,1 ± 1,3	9,6 ± 0,3	11,1 ± 0,6	13,7 ± 1,1	15,9 ± 1,3
Grupos acetila (%)	0,0 ± 0,0	1,7 ± <0,1	3,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,1
Extrativos (%)	5,8 ± 0,7	41,2 ± 0,5	40,0 ± <0,1	34,8 ± 1,2	20,0 ± 0,4
Cinzas (%)	20,0 ± 0,1	10,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	6,2 ± 0,5	5,8 ± 0,2

[1]Base seca.

4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DA MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas utilizadas neste trabalho (casca e farelo de arroz, bagaço de cevada e resíduos de soja e trigo) foram submetidas ao processo de hidrólise ácida para a conversão dos carboidratos (celulose e hemicelulose) em açúcares fermentescíveis. O item 4.2.1 apresenta os resultados da concentração de açúcares redutores totais (ART) dos hidrolisados obtidos nas diferentes condições experimentais de hidrólise ácida. Já o item 4.2.2, mostra a composição química (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-HMF) dos hidrolisados obtidos na melhor condição experimental de hidrólise de cada biomassa.

4.2.1 Açúcares redutores totais presentes nos hidrolisados

O planejamento experimental Plackett-Burmann foi conduzido para identificar a condição de hidrólise de maior recuperação de ART. Além disso, identificou-se, também, a matéria-prima que resultou em um hidrolisado com elevada quantidade de ART, o qual foi posteriormente utilizado como substrato no processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2. As concentrações de ART presente nos hidrolisados resultantes dos ensaios de hidrólise ácida estão apresentadas nas Tabelas 4.2 a 4.6. As variáveis analisadas foram: temperatura (104,4-127,0°C), tempo de reação (20-60 min), concentração de ácido (5-15%, m/m) e umidade (60-90%), sendo os dois últimos em relação à massa de matéria-prima.

Após cada tabela com os resultados do planejamento experimental Plackett-Burmann, encontram-se os respectivos gráficos de Pareto (Figuras 4.2 a 4.6) gerados pelo software Statistica 8, os quais apresentam a significância das variáveis independentes na concentração de ART dos hidrolisados de cada matéria-prima, considerando 90% de confiança. De acordo com os gráficos, a temperatura foi a única variável em comum que influenciou positivamente a produção de ART a partir das diferentes matérias-primas.

Como pode ser observado nas Tabelas 4.2 e 4.3, a condição de maior concentração de ART nos hidrolisados de casca e farelo de arroz foi o ensaio 3 (127°C, 60 min, 15% (m/m) de H_3PO_4 e 60% de umidade), onde a concentração de ácido no meio foi de 5,3% (v/v). Nessa condição, a concentração de ART foi em média de 118,16 g kg $_{CA}^{-1}$ e de 170,38 g kg $_{FA}^{-1}$. De acordo com as Figuras 4.2 e 4.3, a temperatura e o tempo de reação influenciaram positivamente o processo de hidrólise ácida da casca de arroz, enquanto que a umidade influenciou negativamente. Por outro lado, na hidrólise do farelo de arroz apenas as variáveis temperatura e concentração de ácido apresentaram significância, favorecendo o processo.

Saha et al. (2005) avaliaram o pré-tratamento ácido da casca de arroz para a produção de etanol. Foram avaliadas as concentrações de ácido sulfúrico (0,25-1,00%, v/v) e o tempo de pré-tratamento (15-60 min) em temperatura de 121°C. Na melhor condição de pré-tratamento, 1,0% de ácido e 60 min de reação, o hidrolisado resultou em concentração de 189 ± 8 g $_{açúcar}$ kg $_{CA}^{-1}$, o que foi superior ao encontrado no presente estudo. Quanto ao hidrolisado de farelo de arroz, não foram encontrados registros a respeito do teor de ART. Todhanakasem et al. (2012), Todhanakasem et al. (2014), Todhanakasem et al. (2015) quantificaram apenas a concentração de glicose nos hidrolisados de farelo de arroz após tratamento alcalino (KOH) e ácido (H_2SO_4), os quais obtiveram 20, 32,9 e 18 g L^{-1}, respectivamente.

Tabela 4.2 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados da casca de arroz

Ensaio	**Temperatura (°C)**	**Tempo (min)**	**Concentração de ácido (%, m/m)**	**Umidade (%)**	**Concentração de ART (g kg^{-1})**
1.1	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	47,43 ± 1,91
1.2	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	45,98 ± 2,90
2.1	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	66,66 ± 1,67
2.2	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	66,08 ± 0,66
3.1	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	120,18 ± 1,20
3.2	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	116,14 ± 2,23
4.1	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	13,30 ± 0,83
4.2	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	12,98 ± 0,25
5.1	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	29,15 ± 0,47
5.2	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	33,76 ± 2,90
6.1	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	12,95 ± 0,24
6.2	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	12,93 ± 0,68
7.1	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	5,66 ± 0,10
7.2	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	5,67 ± 0,05
8.1	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	6,84 ± 0,32
8.2	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	6,48 ± 0,28
9.1	116,4 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	14,96 ± 0,18
9.2	116,4 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	17,63 ± 0,28
9.3	116,4 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	18,66 ± 0,31

Figura 4.2 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida da casca de arroz

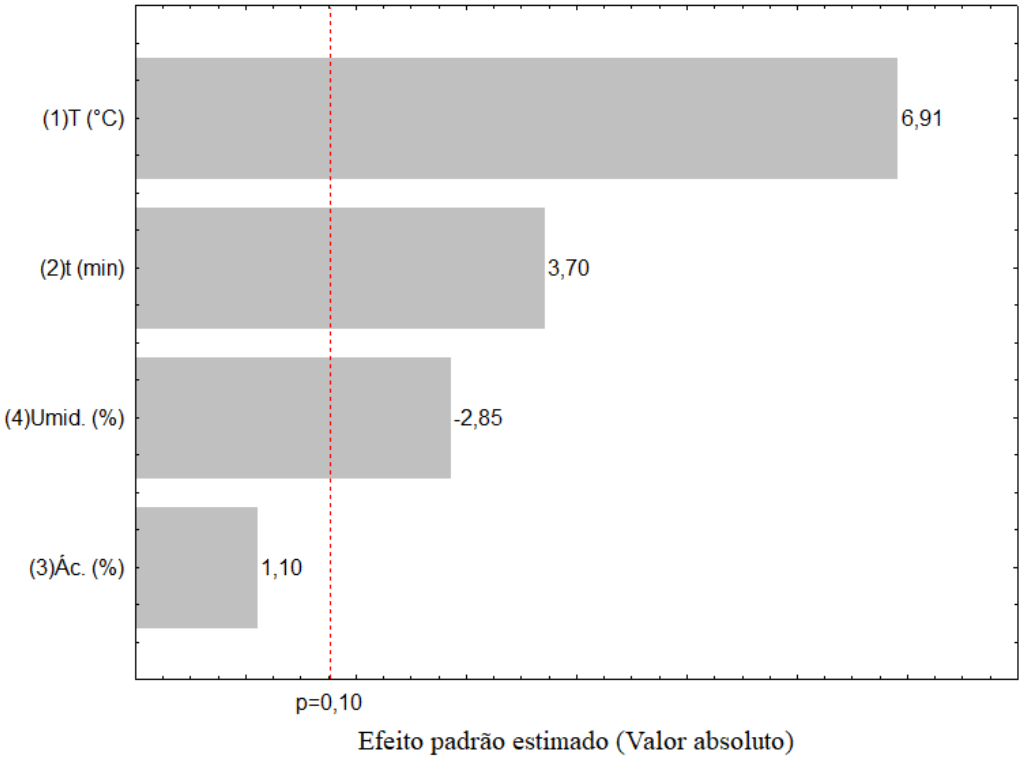


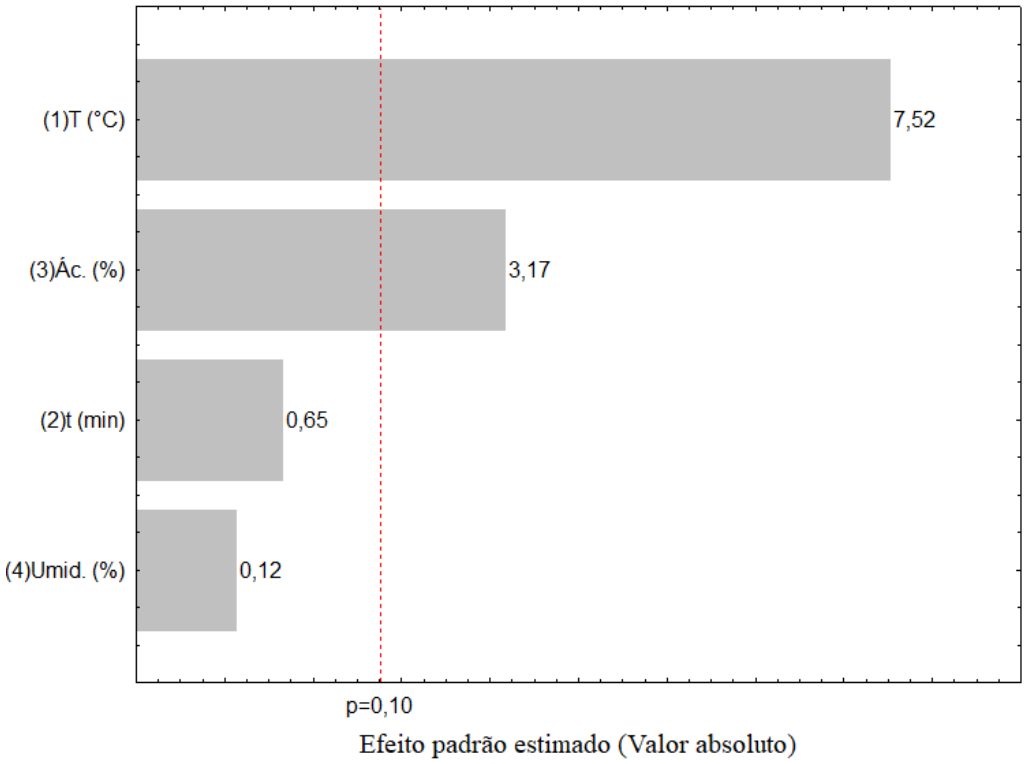
Tabela 4.3 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de farelo de arroz (Continua)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
1.1	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	157,93 ± 4,35
1.2	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	81,28 ± 2,02
2.1	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	93,95 ± 1,31
2.2	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	93,74 ± 1,61
3.1	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	155,91 ± 1,52
3.2	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	184,86 ± 1,61
4.1	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	57,68 ± 0,12
4.2	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	61,80 ± 0,34
5.1	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	107,29 ± 3,23
5.2	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	156,02 ± 1,38
6.1	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	19,58 ± 0,32
6.2	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	27,58 ± 0,36

Tabela 4.3 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de farelo de arroz (Conclusão)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
7.1	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	37,11 ± 0,19
7.2	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	57,70 ± 0,26
8.1	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	15,04 ± 0,10
8.2	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	19,09 ± 0,18
9.1	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	45,19 ± 0,97
9.2	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	79,42 ± 1,84
9.3	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	81,12 ± 1,97

Figura 4.3 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do farelo de arroz



Diferente dos resíduos de arroz, os hidrolisados do bagaço de cevada, do resíduo de soja e do resíduo de trigo, a condição de maior concentração de ART foi o ensaio 1 (127°C, 20 min, 5% (m/m) de ácido fosfórico e 90% de umidade) (Tabelas 4.4 a 4.6). Nessa condição, a concentração de ácido no meio foi de 0,30% (v/v). A concentração de ART foi em média de

600,97 g kg $_{BC}^{-1}$, 80,37 g kg $_{RS}^{-1}$ e 228,04 g kg $_{RT}^{-1}$. Quanto a análise estatística, de acordo com as Figuras 4.4, 4.5 e 4.6, as variáveis temperatura e umidade favoreceram a hidrólise ácida destas 3 matérias-primas. No entanto, o tempo de reação e a concentração de ácido influenciaram negativamente a hidrólise do bagaço de cevada e a hidrólise do resíduo de trigo, respectivamente.

A elevada concentração de ART no hidrolisado do bagaço de cevada pode ser explicada pelo fato desta matéria-prima já apresentar açúcares fermentescíveis em sua composição, uma vez que já passou por processo fermentativo na indústria. Além disso, este processo anterior contribui para o rompimento da estrutura lignocelulósica da cevada, deixando esta matriz mais suscetível ao ataque químico na hidrólise. Gencheva et al. (2012) avaliaram o efeito dos pré-tratamentos ácido, alcalino e com água quente do bagaço de cevada na composição de açúcares redutores para a produção de etanol. Os resultados mostraram que o pré-tratamento ácido (H_2SO_4 0,05M, 115°C por 20 min) levou a uma concentração de açúcares 5 vezes maior quando comparado aos outros dois tratamentos, correspondendo a 9,85% (m/m), ou seja, 98,5 g kg^{-1}. Já para Beldman et al. (1987) a concentração de açúcares solúveis presente nos hidrolisados de bagaço de cevada, após o tratamento ácido (H_2SO_4 2N, 90°C por 4 h), foi de 366 g kg^{-1}.

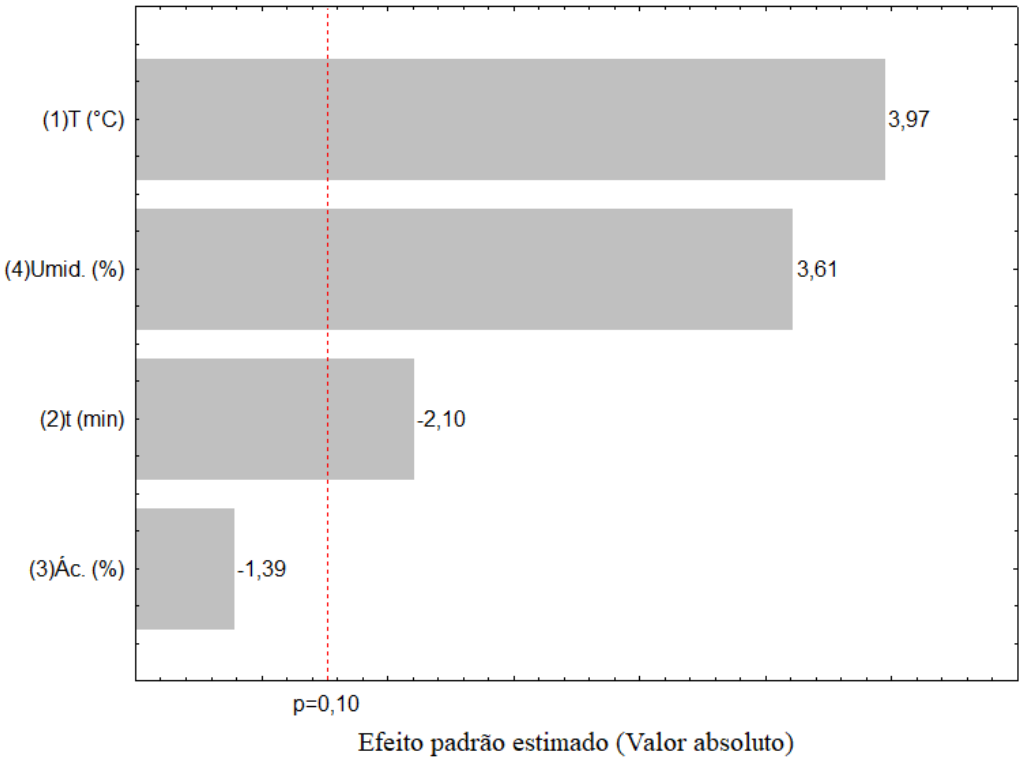
Tabela 4.4 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de bagaço de cevada (Continua)

Ensaio	**Temperatura (°C)**	**Tempo (min)**	**Concentração de ácido (%, m/m)**	**Umidade (%)**	**Concentração de ART (g kg^{-1})**
1.1	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	617,27 ± 10,58
1.2	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	584,68 ± 20,51
2.1	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	138,93 ± 1,81
2.2	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	166,12 ± 1,62
3.1	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	220,34 ± 3,87
3.2	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	235,72 ± 3,09
4.1	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	152,99 ± 1,87
4.2	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	197,21 ± 2,58
5.1	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	282,45 ± 0,12
5.2	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	273,03 ± 15,56
6.1	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	154,24 ± 0,24
6.2	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	192,93 ± 1,29

Tabela 4.4 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de bagaço de cevada (Conclusão)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
7.1	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	101,11 ± 1,89
7.2	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	120,39 ± 3,13
8.1	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	98,89 ± 1,06
8.2	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	114,41 ± 0,26
9.1	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	156,05 ± 2,30
9.2	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	167,81 ± 6,91
9.3	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	209,53 ± 2,59

Figura 4.4 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do bagaço de cevada



Como já mencionado, não foram encontrados relatos na literatura quanto aos resíduos de soja e trigo utilizados nesse trabalho. Os estudos relacionados utilizam especificamente a casca de soja ou a palha de trigo. Neste trabalho a casca e a palha estão misturados com outras partes da planta e impurezas da colheita. Desse modo, citam-se os estudos de Schirmer-

Michel et al. (2008), Guerra-Rodríguez et al. (2012) e Lopez-Hidalgo et al. (2017). Schirmer-Michel et al. (2008) estudaram a utilização do hidrolisado da casca de soja como substrato para produção de etanol. O hidrolisado foi obtido em diferentes condições de temperatura (100, 120 e 125°C) e concentração de H_2SO_4 (0,2, 0,8, e 1,4% v/v) durante 1 h de reação. A condição de 125°C e 1,4% foi a que resultou em uma maior concentração de açúcares (14,91 g L^{-1}).

Guerra-Rodríguez et al. (2012) estudaram o efeito das condições de hidrólise ácida da palha de trigo na composição de açúcares. A concentração de H_2SO_4 foi avaliada de 1 a 5% a 130°C durante um intervalo de 0-180 min. A maior concentração de açúcares foi de 25,5 g L^{-1}, obtida com 2% de ácido e 29,3 min de reação. Lopez-Hidalgo et al. (2017) utilizaram o hidrolisado da palha de trigo para produção de hidrogênio e etanol a partir da fermentação anaeróbia. A hidrólise ácida da palha de trigo foi conduzida utilizando H_2SO_4 (0,75% (v/v)), sob temperatura de 121°C por 1 h. Utilizando o método DNS os autores obtiveram um hidrolisado com 21 g L^{-1} de ART, o que se aproxima dos resultados encontrados por Guerra-Rodríguez et al. (2012).

Tabela 4.5 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de resíduo de soja (Continua)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
1.1	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	82,06 ± 3,25
1.2	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	78,69 ± 2,83
2.1	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	23,64 ± 0,33
2.2	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	33,85 ± 0,78
3.1	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	44,50 ± 0,29
3.2	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	48,77 ± 0,92
4.1	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	65,93 ± 0,01
4.2	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	67,49 ± 0,27
5.1	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	56,81 ± 0,80
5.2	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	57,57 ± 1,17
6.1	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	19,59 ± 0,23
6.2	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	18,47 ± 0,28
7.1	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	11,69 ± 0,10
7.2	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	15,07 ± 0,18

Tabela 4.5 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de resíduo de soja

(Conclusão)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
8.1	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	7,30 ± 0,05
8.2	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	11,24 ± 0,14
9.1	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	16,70 ± 0,22
9.2	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	20,01 ± 0,15
9.3	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	19,61 ± 0,27

Figura 4.5 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do resíduo de soja

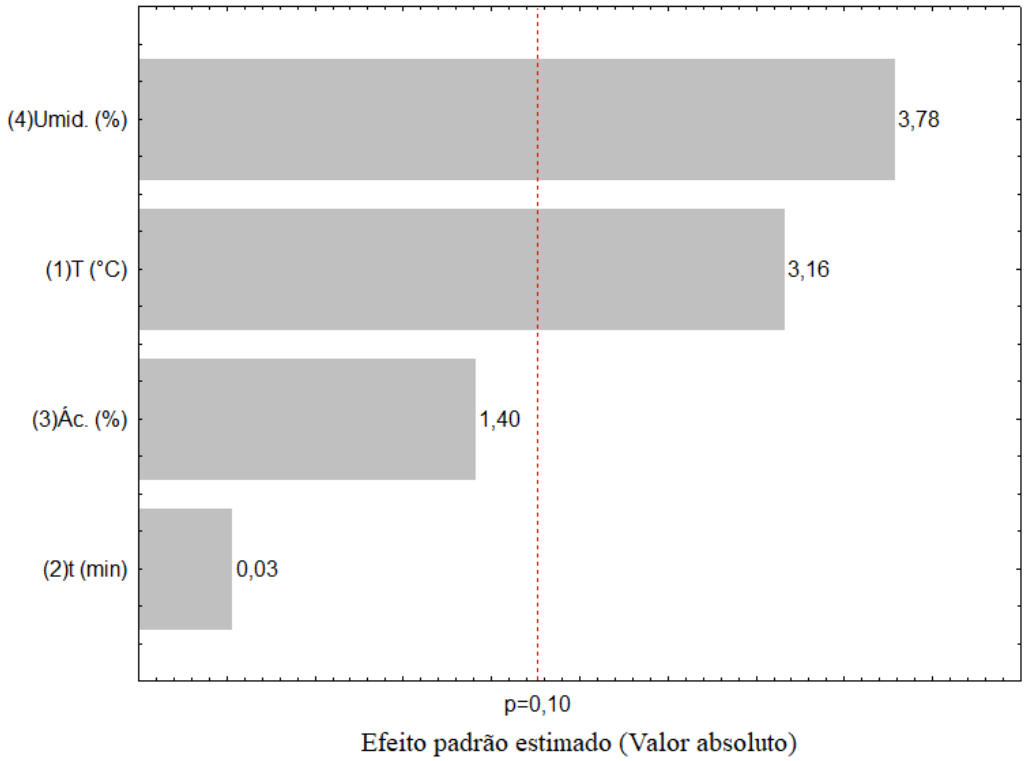
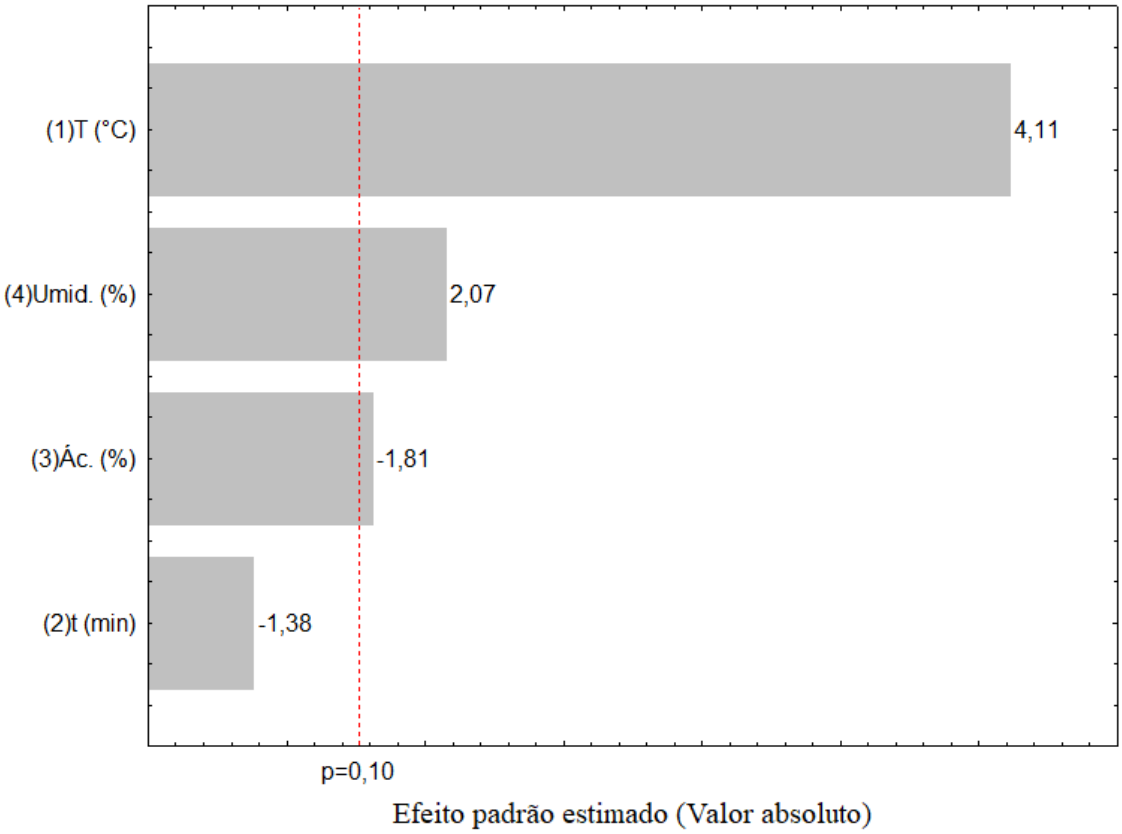


Tabela 4.6 – Concentração de açúcares redutores totais dos hidrolisados de resíduo de trigo

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido (%, m/m)	Umidade (%)	Concentração de ART (g kg^{-1})
1.1	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	225,24 ± 10,08
1.2	127,0 (1)	20 (-1)	5 (-1)	90 (1)	230,85 ± 8,42
2.1	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	69,84 ± 0,93
2.2	127,0 (1)	60 (1)	5 (-1)	60 (-1)	85,45 ± 1,21
3.1	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	116,95 ± 2,00
3.2	127,0 (1)	60 (1)	15 (1)	60 (-1)	88,54 ± 1,91
4.1	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	33,75 ± 0,47
4.2	104,4 (-1)	60 (1)	15 (1)	90 (1)	22,30 ± 0,30
5.1	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	72,12 ± 6,30
5.2	127,0 (1)	20 (-1)	15 (1)	90 (1)	107,80 ± 1,32
6.1	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	88,44 ± 1,19
6.2	104,4 (-1)	60 (1)	5 (-1)	90 (1)	53,86 ± 1,52
7.1	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	41,21 ± 0,15
7.2	104,4 (-1)	20 (-1)	15 (1)	60 (-1)	42,21 ± 0,23
8.1	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	13,66 ± 0,39
8.2	104,4 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	60 (-1)	46,05 ± 1,24
9.1	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	45,94 ± 0,83
9.2	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	45,41 ± 0,87
9.3	115,7 (0)	40 (0)	10 (0)	75 (0)	50,34 ± 1,52

Figura 4.6 – Efeito das variáveis temperatura (T), concentração de ácido (Ác.), umidade (Umid.) e tempo de reação (t), na produção de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do resíduo de trigo



4.2.2 Caracterização química dos hidrolisados

A caracterização química dos hidrolisados foi realizada a partir da cromatografia líquida de ultra performance, em termos de concentração de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácido acético e inibidores (furfural e 5-HMF). Esta análise foi aplicada aos hidrolisados da casca e do farelo de arroz do ensaio 3 (127°C; 60 min;15% (m/m) de H_3PO_4; 60% de umidade) do delineamento experimental Plackett-Burman e aos hidrolisados do bagaço de cevada, do resíduo de soja e do resíduo de trigo do ensaio 1 (127°C; 20 min; 5% (m/m) de H_3PO_4; 90% de umidade), os quais apresentaram maior concentração de ART pelo método DNS. A Tabela 4.7 apresenta os resultados da caracterização dos hidrolisados da casca e do farelo de arroz, do bagaço de cevada e dos resíduos de soja e trigo, os quais apresentaram teores de açúcares de 37,69, 28,66, 8,02, 4,72 e 8,67 g L^{-1}, o que corresponde a 56,54, 42,99, 72,18, 42,48 e 78,03 g kg^{-1}, respectivamente. Cabe salientar que o volume de hidrolisado obtido da casca e do farelo de arroz era de 30 mL e do bagaço de cevada e dos resíduos de soja e trigo de 180 mL, considerando as condições experimentais. Desta forma, os

valores das concentrações apresentadas na Tabela 4.7 expressos em g L^{-1} não são proporcionais aos valores expressos em g kg^{-1}.

Tabela 4.7 – Composição química dos hidrolisados da casca (CA) e do farelo de arroz (FA), do bagaço de cevada (BC) e dos resíduos de soja (RS) e trigo (RT)

Composto	Unidade	CA	FA	BC	RS	RT
Celobiose	g L^{-1}	1,86 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	g kg^{-1}	2,79 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Glicose	g L^{-1}	2,37 ± 0,56	13,78 ± 0,08	2,37 ± 0,09	2,01 ± 0,06	2,32 ± 0,06
	g kg^{-1}	3,56 ± 0,84	20,67 ± 0,12	21,33 ± 0,81	18,09 ± 0,54	20,88 ± 0,54
Xilose	g L^{-1}	30,10 ± 1,66	9,26 ± 0,26	1,26 ± 0,02	1,99 ± 0,03	4,52 ± 0,06
	g kg^{-1}	45,15 ± 2,49	13,89 ± 0,39	11,34 ± 0,18	17,91 ± 0,27	40,68 ± 0,54
Arabinose	g L^{-1}	3,36 ± 0,13	5,62 ± 0,22	4,39 ± 0,15	0,72 ± 0,02	1,83 ± 0,22
	g kg^{-1}	5,04 ± 0,20	8,43 ± 0,33	39,51 ± 1,35	6,48 ± 0,18	16,47 ± 1,98
Ácido acético	g L^{-1}	3,48 ± 0,11	0,82 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,18 ± <0,01
	g kg^{-1}	5,22 ± 0,17	1,23 ± 0,05	1,71 ± 0,18	3,06 ± 0,09	1,62 ± <0,01
Furfural	g L^{-1}	0,51 ± 0,01	0,69 ± <0,01	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± <0,01
	g kg^{-1}	0,77 ± 0,02	1,04 ± <0,01	0,18 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,09 ± <0,01
5-HMF	g L^{-1}	0,13 ± 0,01	0,89 ± <0,01	0,11 ± <0,01	0,02 ± <0,01	0,16 ± <0,01
	g kg^{-1}	0,20 ± 0,02	1,34 ± <0,01	0,99 ± <0,01	0,18 ± <0,01	1,44 ± <0,01

A xilose foi o principal produto da hidrólise ácida da casca de arroz e do resíduo de trigo, a glicose foi o principal produto da hidrólise do farelo de arroz e do resíduo de soja e a arabinose da hidrólise do bagaço de cevada. A xilose e a arabinose resultam da degradação da fração hemicelulósica, enquanto que a glicose e a celobiose precedem da fração celulósica. Devido às altas temperaturas e às condições ácidas do pré-tratamento, os açúcares produzidos são degradados em compostos inibidores, como o furfural (degradação de pentoses) e o 5-HMF (degradação de hexoses) (Dagnino et al., 2013). Conforme a Tabela 4.7, a concentração de furfural e 5-HFM nos hidrolisados foi pequena, variando de 0,00-0,69 g L^{-1} (0,00-1,04 g kg^{-1}) e de 0,02-0,89 g L^{-1} (0,18-1,44 g kg^{-1}), respectivamente. De acordo com Cassales et al. (2011), 0,6 g L^{-1} de furfural ainda está abaixo dos níveis de toxicidade aos microrganismos.

Como pode ser visto na Tabela 4.7, o hidrolisado da casca de arroz apresentou a maior concentração de xilose (30,10 ± 1,66 g L^{-1} ou 45,15 ± 2,49 g kg^{-1}) e a maior concentração de

ácido acético (3,48 ± 0,11 g L^{-1} ou 5,22 ± 0,17 g kg^{-1}). De acordo com Felipe et al. (1995), o teor de ácido acético acima de 3 g L^{-1} pode inibir a atividade do microrganismo *Candida guilliermondii*, o qual tem sido utilizado para a produção de xilitol e etanol, por exemplo. Dagnino et al. (2013) caracterizaram o hidrolisado da casca de arroz para produção de etanol em diferentes condições de pré-tratamento ácido (0,3-2,4% de ácido sulfúrico e 10-50 min de reação), os quais apresentaram composição de 10,3-22,4% de glicose, 7,33-15,6% de xilose, 1,35-1,94% de arabinose, 0,04-0,36% de 5-HMF e 0,11-2,47% de furfural.

A maior concentração dos inibidores furfural (0,69 g L^{-1} ou 1,04 g kg^{-1}) e 5-HMF (0,89 g L^{-1} ou 1,34 g kg^{-1}) foi encontrada no hidrolisado do farelo de arroz. Durante esta pesquisa, não foram encontrados relatos na literatura quanto à composição de celobiose, arabinose e xilose no hidrolisado do farelo de arroz obtido por tratamento ácido. Todhanakasem et al. (2014) e Todhanakasem et al. (2015) utilizaram hidrolisado de farelo de arroz para a produção de etanol. No entanto, caracterizaram apenas quanto ao teor de glicose (18,0-32,9 g L^{-1}), furfural (198,68 mg L^{-1}), 5-HMF (0,095 mg L^{-1}) e ácido acético (0,168%).

Conforme os resultados da Tabela 4.7, o hidrolisado do resíduo de soja foi o que apresentou menor concentração de açúcares. Além disto, os resultados destoaram dos dados da literatura para hidrolisado de casca de soja, o que se deve à composição heterogênea do resíduo utilizado. Schirmer-Michel et al. (2008), por exemplo, caracterizaram o hidrolisado da casca de soja obtido em diferentes condições de temperatura (100-125°C) e concentração de ácido (0,2-1,4% v/v). A composição dos hidrolisados variou de 0,0-7,78 g L^{-1} de xilose, 0,0-6,64 g L^{-1} de arabinose, 0,0-3,88 g L^{-1} de manose, 0,0-0,38 g L^{-1} de glicose, 0,02-0,28 g L^{-1} de furfural e 0,29-1,10 g L^{-1} de ácido acético.

O hidrolisado do resíduo de trigo utilizado neste trabalho apresentou concentração de ART abaixo dos hidrolisados da palha de trigo caracterizados por Canilha et al. (2004) e Guerra-Rodríguez et al. (2012), o que pode ser atribuído à composição do resíduo utilizado. Nos trabalhos de Canilha et al. (2004) e Guerra-Rodríguez et al. (2012) os hidrolisados da palha de trigo, obtido após hidrólise ácida (H_2SO_4), apresentaram a seguinte composição: 3,5-7,26 g L^{-1} de glicose, 18,11-18,9 g L^{-1} de xilose, 2,23-3,1 g L^{-1} de arabinose, 1,95-2,3 g L^{-1} de ácido acético, 0,26-0,6 g L^{-1} de furfural e 0,18-0,3 g L^{-1} de 5-HMF. Por outro lado, Lopez-Hidalgo et al. (2017) obtiveram concentrações menores de açúcares no hidrolisado da palha de trigo, chegando a 1,54 g L^{-1} de glicose, 13,96 g L^{-1} de xilose e 1,93 g L^{-1} de arabinose. Neste mesmo material foram identificados 3,59 g L^{-1} de ácido acético e 0,12 g L^{-1} de furfural.

Embora a caracterização dos hidrolisados da casca e do farelo de arroz, do bagaço de cevada e dos resíduos de soja e trigo obtidos neste trabalho tenham apresentado, em alguns

casos, concentrações inferiores aos trabalhos da literatura, os mesmos apresentaram concentrações consideravelmente menores de ácido acético, furfural e 5-HMF. A baixa concentração identificada destes inibidores pode ser considerada um benefício para a utilização deste material como fonte de substrato em processos biológicos subsequentes, como é o caso da próxima etapa deste trabalho, onde o hidrolisado do bagaço de cevada foi utilizado para produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia.

4.2.3 Estimativa de produção de H_2

O potencial do Rio Grande do Sul para produção de H_2 a partir das diferentes matérias-primas utilizadas neste trabalho foi calculado a partir do máximo teórico estequiométrico, como mostra a Tabela 4.8. De acordo com Chen et al. (2013), o máximo teórico que pode ser produzido é de 4 mol H_2 mol $_{glicose}^{-1}$ e de 3,33 mol H_2 mol $_{xilose}^{-1}$, se o subproduto da fermentação for o ácido acético. Deste modo, aproximadamente, $24{,}20 \times 10^8$, $7{,}21 \times 10^8$, $1{,}36 \times 10^8$ e $0{,}27 \times 10^8$ mols de H_2 podem ser produzidos por ano no Rio Grande do Sul a partir da casca de arroz, do farelo de arroz, do resíduo de soja e do resíduo de trigo, respectivamente, enquanto que $17{,}26 \times 10^8$ mols de H_2 por ano podem ser produzidos no Brasil a partir do bagaço de cevada. Considerando esses resultados, nota-se que a casca de arroz tem o melhor potencial para a produção de H_2 no Rio Grande do Sul. O bagaço de cevada também apresentou bom resultado, embora se refira à matéria-prima produzida no Brasil e não no Estado. No entanto, cabe salientar que os dados de produção de cerveja referem-se às empresas associadas a CervBrasil (96% do mercado), não incluindo todas as cervejarias do país.

Tabela 4.8 – Potencial de produção de H_2 a partir dos hidrolisados da casca (CA) e farelo de arroz (FA), do bagaço de cevada (BC) e dos resíduos de soja (RS) e trigo (RT) (continua)

Matéria-prima	**Produção de açúcares**	**Rendimento teórico (mol H_2 kg $_{MP}$)**	**Matéria-prima disponível (ton ano^{-1})**	**Potencial de H_2 (mol)**
CA	3,56 g $_{glicose}$ kg^{-1} 45,15 g $_{xilose}$ kg^{-1}	0,08 (da glicose) 1,00 (da xilose)	~2,24 milhões	~$24{,}20 \times 10^8$
FA	20,67 g $_{glicose}$ kg^{-1} 13,89 g $_{xilose}$ kg^{-1}	0,46 (da glicose) 0,31 (da xilose)	~0,94 milhões	~$7{,}21 \times 10^8$

Tabela 4.8 – Potencial de produção de H_2 a partir dos hidrolisados da casca (CA) e farelo de arroz (FA), do bagaço de cevada (BC) e dos resíduos de soja (RS) e trigo (RT)

(conclusão)

Matéria-prima	**Produção de açúcares**	**Rendimento teórico (mol H_2 kg $_{MP}$)**	**Matéria-prima disponível (ton ano^{-1})**	**Potencial de H_2 (mol)**
BC	21,33 g $_{glicose}$ kg^{-1} 11,34 g $_{xilose}$ kg^{-1}	0,47 (da glicose) 0,25 (da xilose)	~2,38 milhões	~17,26 × 10^8
RS	18,09 g $_{glicose}$ kg^{-1} 17,91 g $_{xilose}$ kg^{-1}	0,40 (da glicose) 0,40 (da xilose)	~0,17 milhões	~1,36 × 10^8
RT	20,88 g $_{glicose}$ kg^{-1} 40,68 g $_{xilose}$ kg^{-1}	0,46 (da glicose) 0,90 (da xilose)	~0,02 milhões	~0,27 × 10^8

4.3 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

O processo de fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio foi conduzido em um biorreator de 500 mL por um período de 20 h, utilizando hidrolisado do bagaço de cevada como substrato e lodo de frigorífico como inóculo. O bagaço de cevada foi a matéria-prima escolhida para o processo de produção de H_2 por resultar na maior concentração de ART (600,97 g $_{ART}$ kg $_{BC}^{-1}$). Além disso, o BC encontra-se disponível em grande quantidade e em qualquer época do ano. Quanto à caracterização do lodo empregado como inóculo, o mesmo apresentou 79,62% (± 1,65) de umidade e 20,38% (± 1,65) de sólidos totais. Da fração sólida, 68,15% (± 1,98) corresponderam ao teor de sólidos voláteis e 30,17% (± 1,84) de cinzas.

A produção (P_{H2}) e a taxa máxima de produção (T_{H2}) de H_2 via fermentação anaeróbia foram analisadas a partir do planejamento experimental fatorial em diferentes condições de temperatura (35-45°C), pH inicial (5,5-7,5) e proporção de inóculo no meio (10-30%, v/v), como mostra a Tabela 4.9. A produção de H_2 variou de 379 a 2080 mL (ou 760 a 4160 mL L^{-1}) e a taxa máxima de produção de H_2 de 260 a 760 mL L^{-1} h^{-1}. Como pode-se observar na Tabela 4.9, o ensaio 7 resultou na maior P_{H2} (2080 mL ou 4160 mL L^{-1}). Neste ensaio, a temperatura foi a mais baixa (35°C) e o pH inicial (7,5) e a proporção de inóculo (30%) foram os mais elevados do planejamento. De acordo com a literatura, microrganismos do gênero *Clostridium* e *Escherichia coli* têm mostrado bom desempenho na produção de H_2 em temperaturas próximas a 35°C. Por outro lado, os menores valores de temperatura (35°C), pH inicial (5,5) e proporção de inóculo (10%) levaram a menor P_{H2} (379 mL ou 760 mL L^{-1}) no ensaio 1.

Em termos de taxa máxima de produção de H_2, o ensaio 8 apresentou melhor resultado (760 mL L^{-1} h^{-1}), onde a temperatura, o pH inicial e a proporção de inóculo eram de 45°C, 7,5 e 30%, respectivamente. Desta forma, pode-se verificar que os valores máximos analisados do planejamento para as três variáveis favoreceram a taxa de produção de H_2, enquanto que os menores valores adotados para pH inicial (5,5) e inóculo (10%) levaram a menor T_{H2} (260 mL L^{-1} h^{-1}) no ensaio 2. De acordo com estes resultados, nota-se que o valor do pH inicial mais elevado (7,5) favoreceu tanto a P_{H2} quanto a T_{H2}. Além de beneficiar o processo fermentativo, o pH levemente alcalino também contribui para a precipitação dos inibidores furfural e 5-HMF (Gonzales et al., 2017).

A Tabela 4.9 também apresenta os resultados do rendimento de H_2 de alguns ensaios. Devido à falta de alguns dados referente à cromatografia da caracterização do meio de fermentação não foi possível determinar o rendimento de todos os ensaios. De acordo com os resultados prévios, o rendimento variou de 544,07 a 2333,77 mL H_2 g $_{glicose\ cons.}^{-1}$. Azman et al. (2016a), Azman et al. (2016b) e Rorke e Kana (2016) obtiveram máximo de 138,07 mL H_2 g $_{glicose\ cons.}^{-1}$, 264,94 mL H_2 g $_{glicose\ cons.}^{-1}$ e 213,14 mL H_2 g $_{açúcar}^{-1}$, a partir do hidrolisado de farelo de arroz, do hidrolisado de bagaço de semente de palma e de folha de sorgo pré-tratada, respectivamente, o que mostra o bom desempenho do processo desenvolvido no presente estudo.

Tabela 4.9 – Produção (P_{H2}), taxa máxima de produção (T_{H2}) e rendimento (R_{H2}) de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h

Ensaio	**Condições do ensaio**			**Resultados**			
	Temp. (°C)	**pH inicial**	**Inóculo (%)**	**P_{H2} (mL)**	**P_{H2} (mL L^{-1})**	**T_{H2} (mL L^{-1} h^{-1})**	**R_{H2} (mL g $_{glicose\ cons.}^{-1}$)**
1	35	5,5	10	379	760	356	544,07
2	45	5,5	10	474	948	260	552,25
3	35	7,5	10	2070	4140	640	*
4	45	7,5	10	1415	2830	680	1648,61
5	35	5,5	30	1535	3070	360	2333,77
6	45	5,5	30	745	1490	690	1189,50
7	35	7,5	30	2080	4160	480	*
8	45	7,5	30	1765	3530	760	*
9	40	6,5	20	1645 ± 79	3290 ± 157	567 ± 42	*

*Resultado ainda não obtido.

De acordo com a literatura, diferentes resultados de produção, taxa e rendimento de H_2 têm sido obtidos, dependendo, principalmente, da fonte de matéria-prima, da fonte de inóculo e das condições operacionais. Poucos trabalhos que utilizam bagaço de cevada como substrato foram encontrados. Mais precisamente, foram encontrados os trabalhos de Poladyan et al. (2018) e de Zhang e Zang (2016). Poladyan et al. (2018) estudaram a produção de H_2 a partir do hidrolisado do bagaço de cevada utilizando *E. coli* BW25113, sob condições de temperatura de 37°C e pH 7,5. Utilizando este microrganismo, os autores obtiveram 100 ± 3 mL H_2 g $_{\text{cultura bacteriana}}^{-1}$ em um meio de 500 mL. Em termos de produção, os autores chegaram a 26 ± 3 mL e 46 ± 2 mL a partir da estirpe parental do tipo selvagem da *E. coli* e da estirpe duplo mutante DhyaB DhybC, respectivamente, após 11 h de fermentação. Possivelmente, a fonte de inóculo, diferente da utilizada neste trabalho, interferiu na baixa produção de H_2 encontrada pelos referidos autores.

Diferente de Poladyan et al. (2018), Zhang e Zang (2016) investigaram a utilização de lama vermelha calcinada no pré-tratamento do bagaço de cevada para aumentar a produção de H_2. Após o tratamento, o bagaço foi utilizado como substrato na fermentação anaeróbia. O processo foi conduzido em um biorreator com volume de trabalho de 800 mL, por 100 h, sob temperatura de 55°C, pH inicial de 6,8-8,5 e proporção de inóculo de 20%. Foi empregada uma cultura mista como fonte de inóculo. A máxima produção e o máximo rendimento obtido pelos autores foi de 936 mL e 198,62 mL g $_{SV}^{-1}$, respectivamente, o que foi 67,74% maior do que a amostra controle, ou seja, sem pré-tratamento. Considerando estes resultados, pode-se perceber o bom desempenho do processo desenvolvido no presente estudo, onde obteve-se uma produção máxima de 4160 mL H_2 L^{-1}, enquanto que Poladyan et al. (2018) e Zhang e Zang (2016), obtiveram 92 mL H_2 L^{-1} e 1170 mL H_2 L^{-1}, respectivamente. Esta diferença entre os três trabalhos pode ser atribuída às diferentes fontes de inóculo utilizadas e as condições operacionais. Além disso, enquanto este trabalho e o de Poladyan et al. (2018) utilizaram o hidrolisado do bagaço de cevada (via hidrólise ácida), Zhang e Zang (2016) utilizaram a própria biomassa pré-tratada no processo fermentativo.

Embora poucos trabalhos tenham utilizado o bagaço de cevada para a produção de H_2, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando outras fontes de matéria-prima lignocelulósica, como os resíduos do processamento do arroz, a palha de trigo, o bagaço de cana, entre outros. Neste contexto, observa-se que os resultados obtidos foram promissores quando comparado a outros trabalhos encontrados na literatura. Tandon et al. (2018), Silva et al. (2018) e Moodley e Kana (2018), por exemplo, obtiveram produção de 545 mL H_2 L^{-1} utilizando farelo de arroz (37°C e pH inicial 6,0), 302,4 mL H_2 L^{-1} utilizando hidrolisado de

bagaço de caju (38°C e pH inicial 5,5) e 127,69 mL H_2 L^{-1} utilizando hidrolisado de folha de cana (37°C e pH inicial 6,5), respectivamente, o que foi mais baixo do que a menor produção encontrada neste trabalho (760 mL H_2 L^{-1}). Por outro lado, Shanmugam et al. (2018) obtiveram produção de 4020,1 mL H_2 L^{-1} a partir da palha de sorgo sacarino, com pH inicial 7,0 e temperatura de 37°C, resultado semelhante ao encontrado na melhor condição experimental deste trabalho (4160 mL H_2 L^{-1}).

Lopez-Hidalgo et al. (2017) utilizaram hidrolisado da palha de trigo para a produção de H_2 em um meio de 110 mL monitorado por 650 h. A *E. coli* WDHL foi utilizada como fonte de inóculo. Os autores avaliaram a temperatura (21,9-52,1°C), o pH (4,8-8,2) e a concentração de hidrolisado (6,6-23,4 g $_{ART}$ L^{-1}) na produção, taxa de produção e rendimento de H_2. A maior produção de H_2 (509,2 mL ou 4629,1 mL L^{-1}) foi com 37°C, pH 6,5 e 23,4 g $_{ART}$ L^{-1}, a maior taxa de produção (25,27 mL L^{-1} h^{-1}) com 37°C, pH 8,2 e 15 g $_{ART}$ L^{-1}, e o maior rendimento (269,2 mL g $_{ART}^{-1}$) com 37°C, pH 6,5 e 15 g $_{ART}$ L^{-1}. As três variáveis dependentes mostraram melhores resultados em temperatura semelhante a encontrada neste trabalho (35°C). Saratele et al. (2018) avaliaram o efeito do pH inicial (5,5-7,5), da temperatura (28-40°C) e da concentração do hidrolisado (10 g $_{ART}$ L^{-1}) na produção, na taxa de produção e no rendimento de H_2 a partir do hidrolisado de bagaço de cana utilizando *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. Os melhores resultados (1485 mL L^{-1}, 61,87 mL L^{-1} h^{-1} e 1,24 mmol H_2 mol $_{ART}^{-1}$) foram obtidos com pH inicial 7,0, temperatura de 35°C e concentração do hidrolisado de 10 g $_{ART}$ L^{-1}.

Tien et al. (2016) estudaram o efeito da temperatura (34-45°C), do pH inicial (6-8) e da proporção de inóculo (5-10%) na produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do amido de mandioca, utilizando cultura mista. O melhor resultado foi obtido com 40°C, pH 6,5 e 10% de inóculo, chegando a 76,22 mL H_2 (1385,82 mL H_2 L^{-1}). Nesta pesquisa, observou-se um aumento gradual na produção de H_2 com o aumento da quantidade de inóculo no meio. De acordo com os autores, se a quantidade de inóculo for muito pequena, a grande quantidade de substrato pode inibir a atividade microbiana. Por outro lado, se a proporção de inóculo for muito elevada a quantidade de substrato se torna insuficiente para os microrganismos, reduzindo a eficiência do processo fermentativo.

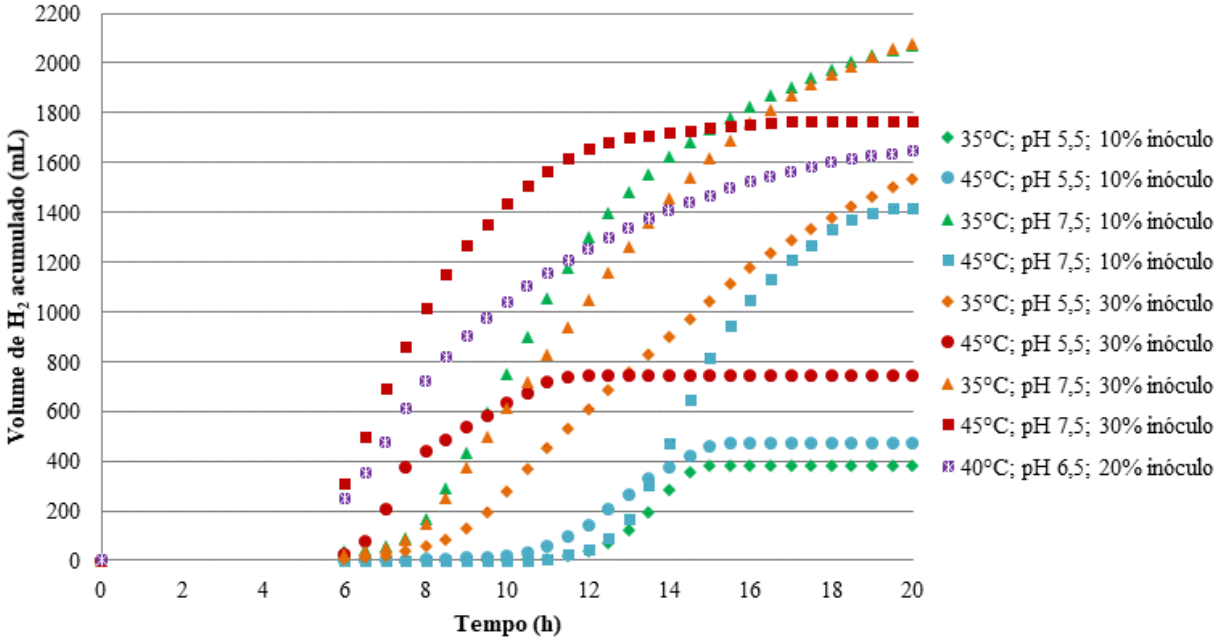
Qi et al. (2018) avaliaram o efeito do pH inicial (5,5-8,0) e da proporção de inóculo (2-10%) na produção de H_2 a partir da casca de amendoim misturada com glicose, utilizando *Clostridium guangxiense* ZGM211^T. O aumento do pH inicial de 5,5 a 6,5 aumentou a produção de H_2, no entanto, a partir do pH 6,5 ao 8,0 foi observado um decréscimo significativo. Quanto à proporção de inóculo, diferente de Tien et al. (2016), Qi et al. (2018)

verificaram um decréscimo (6,5%) da produção de H_2 com o aumento desta proporção. Tanto no trabalho de Tien et al. (2016) como no de Qi et al. (2018) os melhores resultados foram obtidos com pH inicial mais baixo do que o encontrado no presente estudo. Além disso, Qi et al. (2018) observaram um efeito negativo da quantidade de inóculo no meio. Estas diferenças devem-se, principalmente, a diferente fonte de inóculo utilizada.

Semelhante ao presente trabalho, Azman et al. (2016a) estudaram o efeito da temperatura (30-38°C), do pH inicial (5,5-6,5) e da proporção de inóculo (5-20%) na produção e no rendimento de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do farelo de arroz utilizando *Clostridium acetobutylicum* YM1. A maior produção (2873 mL H_2 L^{-1} ou 574,6 mL H_2) foi obtida com temperatura de 34°C, pH inicial 6,5 e 12,5% de inóculo, enquanto que o maior rendimento (117,24 mL H_2 g $_{\text{açúcar cons.}}^{-1}$) foi alcançado com temperatura de 34°C, pH inicial 5,5 e 12,5% de inóculo. Desta forma, os autores observaram que a combinação dos parâmetros estudados apresentou efeito diferente no consumo de açúcares e na produção de H_2 pelo microrganismo do gênero *Clostridium*. Estes efeitos variados dos parâmetros operacionais nos ensaios de produção de H_2 também foram identificados no trabalho já citado de Lopez-Hidalgo et al. (2017) e no presente estudo, onde os melhores resultados de produção e taxa máxima de produção foram alcançados em condições experimentais diferentes.

A Figura 4.7 apresenta as curvas cinéticas dos ensaios da produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada. A partir da figura, pode-se identificar que os ensaios 3 (35°C, pH 7,5, inóculo 10%) e 7 (35°C, pH 7,5, inóculo 30%) resultaram nas maiores produções acumuladas de H_2, não tendo cessado nas 20 h. Por outro lado, os ensaios 1 (35°C, pH 5,5, inóculo 10%) e 2 (45°C, pH 5,5, inóculo 10%) apresentaram produção mais baixa se comparado aos demais, cessando em 15 e 15,5 h de fermentação, respectivamente. Com isto, pode-se dizer que o baixo pH inicial não favoreceu a produção de H_2. Pode-se verificar, também, que o início da produção de H_2 foi mais acelerado no ensaio 8 (45°C, pH 7,5, inóculo 30%) e mais lento nos ensaios 1 (35°C, pH 5,5, inóculo 10%), 4 (45°C, pH 7,5, inóculo 10%) e 2 (45°C, pH 5,5, inóculo 10%), onde o percentual de inóculo era menor. Nestes quatro ensaios a produção cessou antes das 20 h.

Figura 4.7 – Produção acumulada de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h

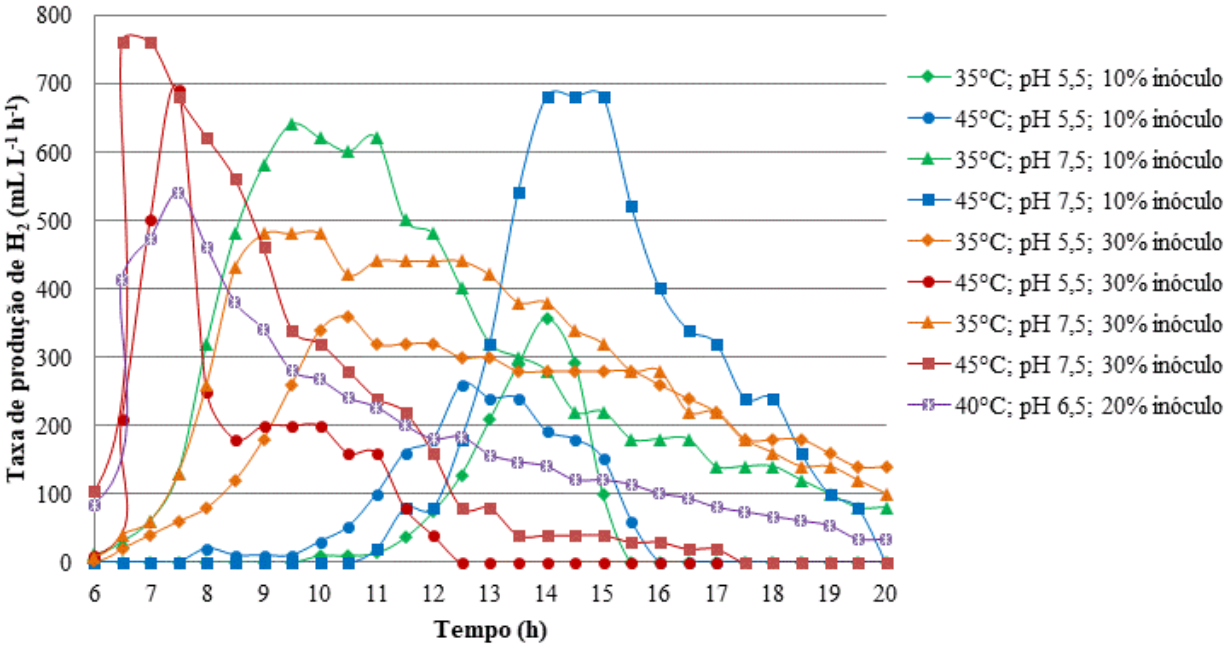


A Figura 4.8 mostra as curvas da taxa de produção de H_2 nas diferentes condições experimentais de fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada. De acordo com a figura, pode-se observar que as taxas máximas de produção de H_2 ocorreram dentro das 20 h de monitoramento do processo fermentativo, entre 6,5 e 14,5 h. Este baixo tempo de obtenção do H_2 é um fator promissor, principalmente quando comparado a outros processos de produção de biogás (Silva et al., 2018). Além disso, a taxa máxima de produção de H_2 encontrada nos ensaios (260-760 mL L^{-1} h^{-1}) foi superior ao encontrado em outros trabalhos, como os de Phowan e Danvirutai (2014) (140,88 mL L^{-1} h^{-1}), Gonzales et al. (2016) (139,17 mL L^{-1} h^{-1}), Lopez-Hidalgo et al. (2017) (25,27 mL L^{-1} h^{-1}), Gonzales et al. (2017) (76 mL L^{-1} h^{-1}) e Saratele et al. (2018) (61,87 mL L^{-1} h^{-1}).

De acordo com a Figura 4.8, a maior taxa de produção de H_2 (760 mL L^{-1} h^{-1}) foi alcançada no ensaio 8, seguido pelos ensaios 6 (690 mL L^{-1} h^{-1}) e 4 (680 mL L^{-1} h^{-1}). Nos ensaios 6, 8 e 9, a taxa máxima de produção de H_2 foi obtida no início do processo fermentativo, entre 6,5 e 7,5 h, enquanto que nos ensaios 3, 5 e 7 a taxa máxima foi observada em um período intermediário, entre 9,5 e 10,5 h. Já nos ensaios 1, 2 e 4 o aumento da taxa foi mais tardio, entre 12,5 e 15 h). Embora a produção de H_2 nos ensaios 3 e 7 tenha sido relativamente igual, verifica-se que o ensaio 3 apresentou uma taxa máxima de produção mais elevada, indicando que o aumento da proporção de inóculo no meio não favoreceu o processo.

Observa-se, também, que além de resultar na segunda menor produção de H_2, o ensaio 2 (45°C, pH 5,5, inóculo 10%) apresentou a menor taxa de produção de H_2 (260 mL L^{-1} h^{-1}), demonstrando que estas condições não beneficiam o processo.

Figura 4.8 – Taxa de produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h



As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam, respectivamente, os gráficos de Pareto referentes a análise do efeito das variáveis temperatura, pH inicial e proporção de inóculo, e suas interações, sob a produção e a taxa máxima de produção de H_2. Considerando 90% de confiança, observa-se que a produção de H_2 foi influenciada estatisticamente apenas pelo pH inicial, evidenciando o efeito negativo do baixo pH no processo de fermentação. Por outro lado, todas as variáveis estudadas favoreceram estatisticamente a taxa máxima de produção de H_2, ou seja, quanto maior o pH inicial, a temperatura e a proporção de inóculo, dentro da faixa analisada, maior é a taxa. Deste modo, observa-se que a variável que teve maior influência estatística, tanto na produção quanto na taxa, foi o pH inicial do meio de fermentação.

Figura 4.9 – Efeito das variáveis temperatura, inóculo e pH inicial, na produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada

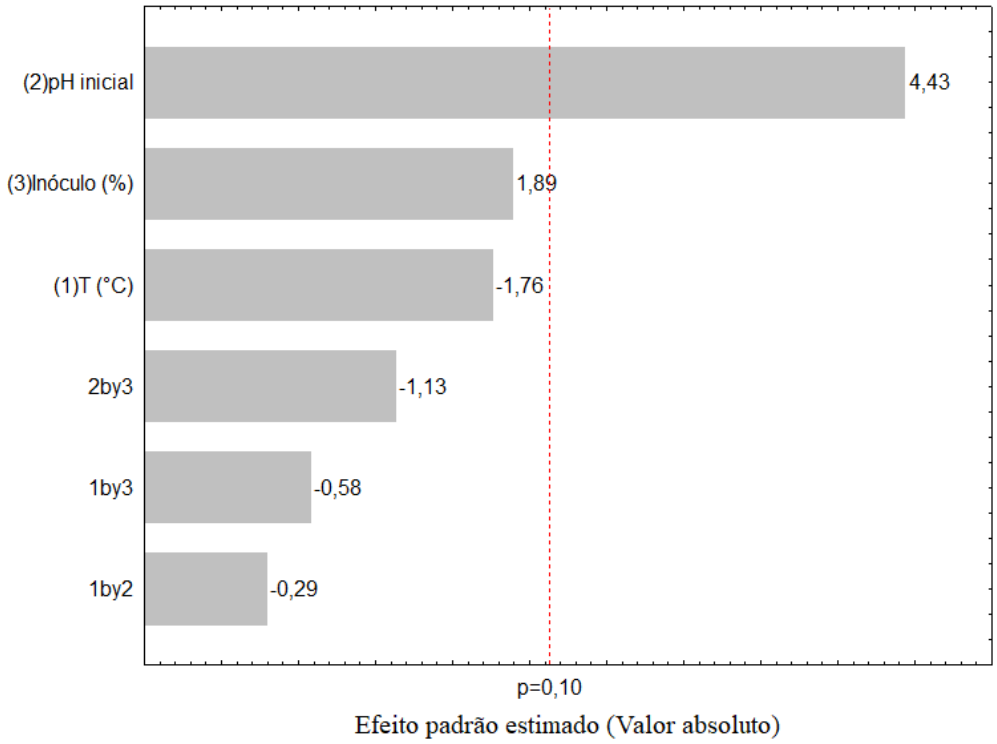
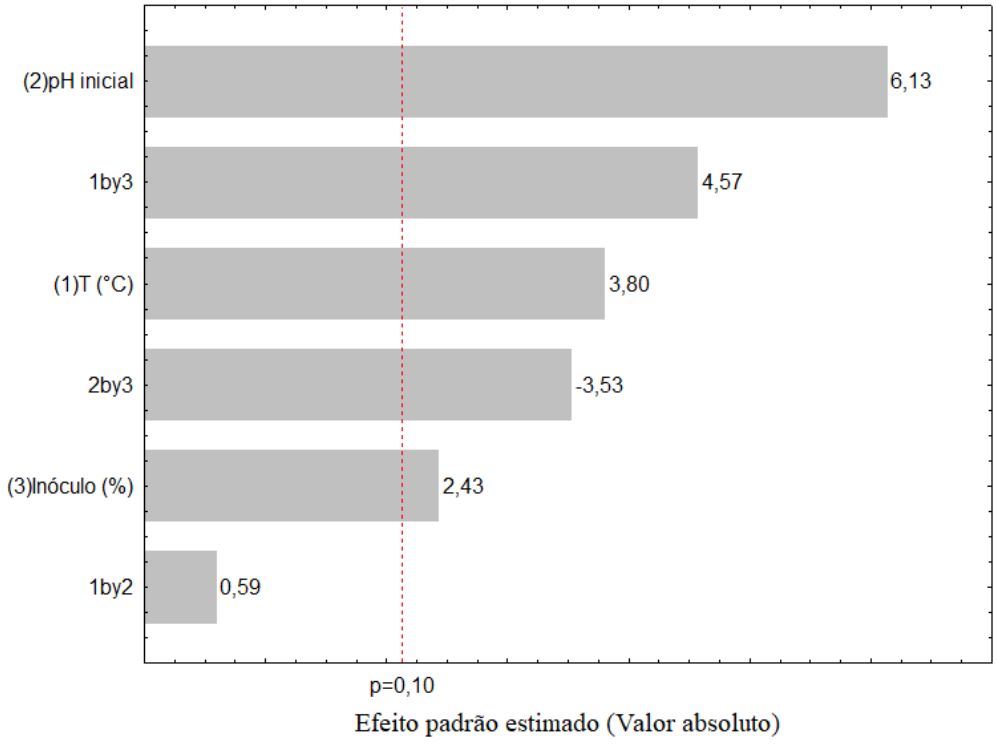


Figura 4.10 – Efeito das variáveis temperatura, inóculo e pH inicial, na taxa máxima de produção de H_2 a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada



As concentrações de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose), ácido acético, furfural e 5-HMF antes e após cada ensaio de fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada estão apresentadas na Tabela 4.10. Devido a alguns problemas laboratoriais, não foi possível concluir a análise cromatográfica de todos os ensaios. Cabe salientar, também, que foi necessário mais de um processo de hidrólise ácida do bagaço de cevada para a obtenção do hidrolisado utilizado nas fermentações. Portanto as concentrações iniciais do meio não são iguais em todos ensaios.

A concentração inicial de glicose e xilose no meio variou de 1,3155-1,7656 e 0,4123-0,9930 g L^{-1}, respectivamente, decaindo para 0-0,3687 g $_{glicose}$ L^{-1} e 0,0348-0,1105 g $_{xilose}$ L^{-1}. No processo de fermentação anaeróbia para produção de H_2, a glicose é mais facilmente consumida pelos microrganismos do que a xilose, a qual só começa a ser metabolizada quando a concentração de glicose se aproxima de 0% (Muñoz-Páez et al. 2018; Moodley e Kana, 2018). Este fato pode ser evidenciado na Tabela 4.10, onde pode-se observar que em muitos ensaios a concentração final de glicose chegou a 0 g L^{-1}, e em nenhum a xilose foi totalmente consumida. O consumo da glicose chegou até 100% nos ensaios 2, 4 e 5, enquanto que o consumo máximo da xilose foi de 91,56% no ensaio 6.

De acordo com a Tabela 4.10 as concentrações iniciais do 5-HMF, do furfural e do ácido acético variaram de 0,0002-0,0220, 0,0000-0,0041 e 0,1392-0,3001 g L^{-1}, respectivamente. A presença de 5-HMF deve-se à degradação da glicose durante o processo de hidrólise ácida da biomassa, enquanto que o furfural deriva da degradação da xilose e o ácido acético da hemicelulose. O ácido acético também é um subproduto do metabolismo microbiano no processo de fermentação anaeróbia. De acordo com a Tabela 4.10, as concentrações finais de ácido acético foram de 1,1490 a 5,8392 g L^{-1}, observando-se um aumento significativo quando comparado com as concentrações iniciais, o que está de acordo com a literatura. Conforme os trabalhos de Kumar et al. (2017), Silva et al. (2018), Rabelo et al. (2018) e Tosuner et al. (2018), a concentração de ácido acético ao final do processo de produção de H_2 variou de 0,220 a 3,243 g L^{-1}. A presença deste composto acidifica o meio, reduzindo o crescimento e a atividade microbiana e, consequentemente, a eficiência do processo de fermentação.

Muñoz-Páez et al. (2018) avaliaram a influência do furfural (0,10, 0,50, e 1,00 g L^{-1}), do 5-HMF (0,02, 0,09, 0,19 g L^{-1}) e de uma mistura dos dois inibidores na produção de H_2 utilizando cultura mista como inóculo e xilose (10 g L^{-1}) como substrato. Os referidos autores observaram que o furfural não inibiu a produção de H_2, o mesmo foi totalmente consumido pelo inóculo. Para baixas e médias concentrações de 5-HMF também não foi observado

influência negativa na produção de H_2, sendo o inibidor parcialmente removido pelo inóculo. No entanto, altas concentrações de 5-HMF mostraram forte inibição da produção de H_2. Neste caso o inóculo foi incapaz de removê-lo. Quanto as misturas de furfural e 5-HMF, todas as proporções apresentaram efeito inibitório.

De acordo com o estudo de Muñoz-Páez et al. (2018), o ensaio controle, ou seja, sem inibidores, resultou em uma produção de 2295 mL H_2 L^{-1}, enquanto que nos ensaios com a presença de furfural, de 5-HMF e com uma mistura dos dois variou de 2158-2379 mL H_2 L^{-1}, 1145-2735 mL H_2 L^{-1} e 1582-2059 mL H_2 L^{-1}, respectivamente. Dessa forma, observa-se que, mesmo com a presença de inibidores, alguns ensaios mostraram um aumento da produção de H_2 quando comparado ao controle. O mesmo foi verificado no trabalho de Akobi et al. (2017), onde foi observado um aumento de 48% na produção de H_2 com o aumento da concentração de furfural de 0 para 1 g L^{-1}. Nasr et al. (2014), também não identificaram efeito negativo do furfural, em concentrações de 0,21-1,09 g L^{-1}, e do 5-HMF, em concentrações de 0,05-0,14 g L^{-1}, na produção e na taxa de produção de H_2. Os três trabalhos citados realizaram o processo de fermentação anaeróbia em temperatura mesofílica (37°C) e utilizaram cultura mista como fonte de inóculo, semelhante ao presente estudo.

Conforme os resultados obtidos por Nasr et al. (2014), Akobi et al. (2017) e Muñoz-Páez et al. (2018), pode-se dizer que as concentrações de furfural e 5-HMF presentes no hidrolisado do bagaço de cevada utilizado no presente estudo não são capazes de inibir a produção de H_2, uma vez que foram detectados em concentrações mais baixas que as estudadas pelos referidos autores. Isto evidencia-se ao comparar os ensaios 5 e 6, onde as concentrações de 5-HMF e furfural foram semelhantes nos dois ensaios, mas a produção de H_2 no ensaio 5 foi, aproximadamente, duas vezes maior que o ensaio 6. Além disso, de acordo com a Tabela 4.10, o ensaio 2, por exemplo, mostrou uma redução da concentração de furfural e 5-HMF no final da fermentação. Segundo Muñoz-Páez et al. (2018), alguns microrganismos, como *Lactobacillus* e espécies de *Clostridium*, podem atuar na desintoxicação do meio de fermentação, consumindo os inibidores (furfural e 5-HMF) e resultando em produtos metabólitos, que são, então, convertidos em H_2.

Tabela 4.10 – Concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose), ácido acético, 5-HMF e furfural antes e após o processo de fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h

Ensaio			Glicose ($g\ L^{-1}$)	Xilose ($g\ L^{-1}$)	Arabinose ($g\ L^{-1}$)	Celobiose ($g\ L^{-1}$)	Ácido acético ($g\ L^{-1}$)	5-HMF ($g\ L^{-1}$)	Furfural ($g\ L^{-1}$)
1	35°C/pH 5,5/10% inóculo	Antes	1,7656	0,9930	3,7233	13,3343	0,1392	0,0220	0,0000
		Após	0,3687	0,1105	3,6957	13,0244	1,1490	0,0455	0,0074
2	45°C/pH 5,5/10% inóculo	Antes	1,7166	0,5527	2,7842	8,1563	0,3001	0,0029	0,0035
		Após	0,0000	0,0902	2,7240	7,7904	1,6961	0,0024	0,0022
3	35°C/pH 7,5/10% inóculo	Antes	*	*	*	*	*	*	*
		Após	*	*	*	*	*	*	*
4	45°C/pH 7,5/10% inóculo	Antes	1,7166	0,5527	2,7842	8,1563	0,3001	0,0029	0,0035
		Após	0,0000	0,0686	2,0578	2,8642	5,8392	0,0051	0,0065
5	35°C/pH 5,5/30% inóculo	Antes	1,3155	0,4123	2,1214	6,2661	0,1485	0,0002	0,0041
		Após	0,0000	0,0511	2,1833	2,3320	5,0249	0,0057	0,0107
6	45°C/pH 5,5/30% inóculo	Antes	1,3155	0,4123	2,1214	6,2661	0,1485	0,0002	0,0041
		Após	0,0628	0,0348	1,3458	4,8023	2,6000	0,0057	0,0093
7	35°C/pH 7,5/30% inóculo	Antes	*	*	*	*	*	*	*
		Após	*	*	*	*	*	*	*
8	45°C/pH 7,5/30% inóculo	Antes	*	*	*	*	*	*	*
		Após	*	*	*	*	*	*	*
9	40°C/pH 6,5/20% inóculo	Antes	*	*	*	*	*	*	*
		Após	*	*	*	*	*	*	*

*Resultado ainda não obtido.

A Tabela 4.11 apresenta a alteração do pH inicial ao final de cada ensaio de fermentação, ou seja, após 20 h. Como pode-se observar, o pH teve uma redução considerável, ficando entre 4,5 e 5,2 no final dos ensaios. Esta acidificação do meio deve-se a presença de ácidos orgânicos gerados como subprodutos dos microrganismos durante a produção de H_2, o que foi evidenciado pelo expressivo aumento da concentração de ácido acético no final dos ensaios. Tal efeito também é identificado nos demais estudos de produção de H_2 a partir do processo de fermentação anaeróbia. Poladyan et al. (2018), por exemplo, identificaram uma diminuição do pH de 7,5 para 5,5 depois de 6 h do crescimento microbiano utilizando hidrolisado do bagaço de cevada para produção de H_2. Enquanto Lopez-Hidalgo et al. (2017) observaram redução ainda maior no pH, de 8,2 para 4,3 no final da fermentação do hidrolisado de palha de trigo.

No estudo de Qi et al. (2018), foi observada uma relação positiva entre o pH inicial (5,5-8,0) e o pH final (3,9-6,7) do processo de fermentação para produção de H_2, ou seja, quanto maior era o pH inicial maior era o pH final. Da mesma forma, observa-se pela Tabela 4.11 que o pH final mais baixo (4,5) foi obtido para o pH inicial mais baixo (5,5) e o pH final mais alto (5,2) para o pH inicial também mais alto (7,5).

Tabela 4.11 – pH final do processo de produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia do hidrolisado do bagaço de cevada em 20 h

Ensaio	**pH inicial**	**pH final**
1	5,5	5,0
2	5,5	4,9
3	7,5	5,2
4	7,5	4,9
5	5,5	4,5
6	5,5	4,9
7	7,5	5,0
8	7,5	5,0
9.1	6,5	4,7
9.2	6,5	5,1
9.3	6,5	5,1

5 CONCLUSÕES

- As matérias-primas utilizadas nesse trabalho (casca de arroz, farelo de arroz, bagaço de cevada e de resíduos da limpeza da soja e do trigo), apresentam-se em elevada abundância e com baixo custo no estado do Rio Grande do Sul. De acordo com a caracterização química, essas matérias-primas apresentam uma composição significativa de carboidratos (24,1-44,1%), o que os torna fonte atrativa para a produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia.
- De acordo com os ensaios de hidrólise ácida, a maior concentração de ART nos hidrolisados da casca (118,16 g kg^{-1}) e do farelo de arroz (170,38 g kg^{-1}) foram obtidas na condição de maior temperatura (127°C), maior tempo de reação (60 min), maior concentração de ácido (15%, m/m) e menor concentração de umidade (60%). Por outro lado, a maior concentração de ART nos hidrolisados do bagaço de cevada (600,97 g kg^{-1}), do resíduo de soja (80,37 g kg^{-1}) e do resíduo de trigo (228,04 g kg^{-1}) foram obtidas na condição de maior temperatura (127°C), menor tempo de reação (20 min), menor concentração de ácido (5%, m/m) e maior concentração de umidade (90%).
- A análise cromatográfica mostrou que a composição de açúcares (arabinose, glicose, xilose e celobiose) dos hidrolisados da casca de arroz, do farelo de arroz, do bagaço de cevada, do resíduo de soja e do resíduo de trigo, resultaram em um total de 56,54, 44,22, 72,18, 42,48 e 78,03 g kg^{-1}, respectivamente. Além disso, a concentração de inibidores (furfural e 5-HMF) nos hidrolisadas foi consideravelmente baixa.
- Tendo em vista os resultados obtidos na hidrólise ácida das matérias-primas, optou-se por utilizar o hidrolisado do bagaço de cevada para os ensaios de produção de H_2 via fermentação anaeróbia, uma vez que apresentou elevada concentração de ART. Além disso, o bagaço de cevada está disponível durante todo ano e em grande quantidade.
- A partir dos ensaios de fermentação identificou-se que a maior produção de H_2 (4160 mL L^{-1}) foi obtida em condições de temperatura mais baixa (35°C) e pH inicial e proporção de inóculo mais elevadas (7,5 e 30%, respectivamente). Por outro lado, a taxa máxima de produção de H_2 apresentou melhor resultado (760 mL L^{-1} h^{-1}) na condição de maior temperatura (45°C), pH inicial (7,5) e proporção de inóculo (30%). De acordo com a análise estatística, o pH inicial foi o parâmetro que mais influenciou a produção de H_2, apresentando efeito positivo no processo fermentativo.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a produção de H_2 a partir dos hidrolisados não estudados, ou seja, dos hidrolisados da casca e do farelo de arroz e dos resíduos da soja e do trigo.
- Realizar análise cromatográfica do gás gerado na fermentação, identificando o percentual de cada gás produzido, principalmente do H_2 e CO_2.
- Caracterizar o subproduto da fermentação também quanto ao teor de ácido butírico, ácido propiônico e etanol.
- Estudar o desempenho de outras fontes de inóculo no processo de fermentação dos hidrolisados, como, por exemplo, o lodo gerado na Estação de Tratamento de Efluentes do município.
- Avaliar o tratamento dos inóculos sob diferentes condições de temperatura e tempo.

REFERÊNCIAS

Abdeshahian, P., Al-Shorgani, N. K. N., Salih, N. K. M., Shukor, H., Kadier, A., Hamid, A. A., Kalil, M. S. The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, p. 12524-12531, 2014.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

Al Loman, A., Ju, L-K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1046-1057, 2016.

Alemahdi, N., Man, H. C., Rahman, N. A., Nasirian, N., Yang, Y. Enhanced mesophilic bio-hydrogen production of raw rice straw and activated sewage sludge by co-digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 16033-16044, 2015.

Aliyu, S., Bala, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 324-331, 2011.

American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 ed. Washington, 1999.

An, D., Li, Q., Wang, X., Yang, H., Guo, L. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, p. 19928-19936, 2014.

Angeriz-Campoy, R., Álvarez-Gallego, C. J., Romero-García, L. I. Thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with food waste (FW): Enhancement of bio-hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 291-296, 2015.

Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K., Lyberatos, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 110-119, 2008.

Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., Geißen, S-U. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. **Biomass and bioenergy**, v. 75, p. 101-118, 2015.

Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., Méndez-Acosta, H. O. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 897-904, 2016.

Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L. B., Alatriste-Mondragón, F. Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 10756-10765, 2015.

Asadi, N., Zilouei, H. Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. **Bioresource Technology**, v. 227, p., 335-344, 2017.

Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - CervBrasil. Anuário 2016. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2019.

Azman, N. F., Abdeshahian, P., Kadier, A., Al-Shorgani, N. K. N., Salih, N. K. M., Lananan, I., Hamid, A. A., Kalil, M. S. Biohydrogen production from de-oiled rice bran as sustainable feedstock in fermentative process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 145-156, 2016a.

Azman, N. F., Abdeshahian, P., Kadier, A., Shukor, H., Al-Shorgani, N. K. N., Hamid, A. A., Kalil, M. S. Utilization of palm kernel cake as a renewable feedstock for fermentative hydrogen production. **Renewable Energy**, v. 93, p. 700-708, 2016b.

Beldman, G., Hennekam, J., Voragen, A. G. J. Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 668-671, 1987.

Blasi, C. D., Signorelli, C., Russo, C. D., Rea, G. Product distribution from pyrolysis of wood and agricultural residues. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 6, p. 2216-2224, 1999.

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., Ramakrishnan, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

Cabrera, E., Muñoz, M. J., Martín, R., Caro, I., Curbelo, C., Díaz, A. B. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 1-7, 2014.

Calli, B., Schoenmaekers, K., Vanbroekhoven, K., Diels, L. Dark fermentative H_2 production from xylose and lactose—Effects of on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 522-530, 2008.

Canilha, L., Carvalho, W., Silva, J. B. A. Caracterização do hidrolisado de palha de trigo visando extração da xilose para a bioconversão em xilitol. In: 7º Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e 4º Encontro Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba. Anais: São José dos Campos, Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

Cassales, A., Souza-Cruz, P. B., Rech, R., Ayub, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

Chandolias, K., Pardaev, S., Taherzadeh, M. J. Biohydrogen and carboxylic acids production from wheat straw hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1093-1097, 2016.

Chen, R., Wang, Y-Z., Liao, Q, Zhu, X., Xu, T-F. Hydrolysates of lignocellulosic materials for biohydrogen production. **Biochemistry and molecular biology reports**, v. 46, p. 244-251, 2013.

Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P., Yang, S-T. Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 166-174, 2017.

Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Liu, M., Zhou, J., Cen, K. Physicochemical characterization of typical municipal solid wastes for fermentative hydrogen and methane co-production. **Energy Conversion and Management**, v. 117, p. 297-304, 2016.

Claassen, P. A. M., Vrije, T., Koukios, E., Niel, E., Eroglu, I., Modigell, M., Friedl, A., Wukovits, W., Ahrer, W. Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: HYVOLUTION. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, p. S4-S8, 2010.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. A cultura do arroz. Organizador Aroldo Antonio de Oliveira Neto. Brasília: Conab, p. 180, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf>.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira grãos, v. 6 Safra 2018/19 -Segundo levantamento, Brasília, p. 1-142, novembro 2018. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos >.

Cordeiro, L. G., El-Aouar, Â. A., Gusmão, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 7, p. 20-22, 2012.

Dagnino, E. P., Chamorro, E. R., Romano, S. D., Felissia, F. E., Area, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.

Das, D., Veziroglu, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International journal of hydrogen energy**, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

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

Eker, S., Sarp, M. Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 2562-2568, 2017.

EMATER/RS-ASCAR – Gerência de Planejamento / Núcleo de Informações e Análises. Série histórica das principais culturas do Estado. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/servicos/informacoes-agropecuarias.php#safra>.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Embrapa soja: Dados econômicos. Atualizado em maio de 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>.

Felipe, M. G. A., Vieira, D. C., Vitolo, M., Silva, S. S., Roberto, I. C., Manchilha, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, p. 171-177, 1995.

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

Ferreira, L. C., Nilsen, P. J., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S. I. Biomethane potential of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolysis. Chemical Engineering Journal, v. 242, p. 254-259, 2014.

Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B. C., Bon, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65–76, 2010.

Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Nepomuceno, A. L., Molinari, H. B. C., Bon, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65–76, 2010.

Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Dantas, N. O., Pasquini, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. Industrial Crops and Products, v. 42, p. 480-488, 2013.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Rice market monitor, v. 21, n. 1, 2018. Disponível em: < http://www.fao.org/3/I9243EN/i9243en.pdf >.

Fujino, Y. Rice Lipids. **Cereal Chemistry**, v. 55, p. 559-571, 1978.

Gao, M-T., Kaneko, M., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3659-3664, 2008.

Gencheva, P., Dimitrov, D., Dobrev, G., Ivanova, V. Hydrolysates from malt spent grain with potential application in the bioethanol production. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, p. 135-141, 2012.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., Esposito, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73-95, 2015b.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P. N. L., Esposito, G., Pirozzi, F. Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. **Journal of Environmental Management**, v. 152, p. 43-48, 2015a.

Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trably, E., Escudié, R., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., Esposito, G. Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. **Waste Management**, v. 50, p. 55-64, 2016.

Giordano, A., Cantù, C., Spagni, A. Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4474-4479, 2011.

Gnanasambandam, R., Proctor, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 65, p. 461-467, 1999.

Gokfiliz, P., Karapinar, I. The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.041.

Gonzales, R. R., Kim, S-H. Dark fermentative hydrogen production following the sequential dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of rice husk. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 27577-27583, 2017.

Gonzales, R. R., Kumar, G., Sivagurunathan, P., Kim, S-H. Enhancement of hydrogen production by optimization of pH adjustment and separation conditions following dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 27502-27511, 2017.

Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., Kim, S-H. Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 21678-21684, 2016.

Gouveia, E. R., Nascimento, R. T., Souto-Maior, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

Guerra-Rodríguez, E., Portilla-Rivera, O. M., Jarquín-Enríquez, L., Ramírez, J. A., Vázquez, M. Acid hydrolysis of wheat straw: A kinetic study. **Biomass and bioenergy**, v. 36, n. 346-355, 2012.

Han, W., Huang, J., Zhao, H., Li, Y. Continuous biohydrogen production from waste bread by anaerobic sludge. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 1-5, 2016.

Han, W., Liu, D. N., Shi, Y. W., Tang, J. H., Li, Y. F., Ren, N. Q. Biohydrogen production from food waste hydrolysate using continuous mixed immobilized sludge reactors. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 54–58, 2015.

Haroun, B. M., Nakhla, G., Hafez, H., Nasr, F. A. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. **Renewable Energy**, v. 93, p. 302-311, 2016.

Hay, J. X. W., Wua, T. Y., Ng, B. J., Juan, J. C., Jahim, J. M. Reusing pulp and paper mill effluent as a bioresource to produce biohydrogen through ultrasonicated *Rhodobacter sphaeroides*. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 273-280, 2016.

Hordeski, Michael F. Alternative fuels: the future of hydrogen. Second edition. 2008. https://books.google.com.br/books?id=HXDBf5cmUf4C&printsec=frontcover&dq=Alternative+fuels:the+future+of+hydrogen&hl=pt-BR&sa=X&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMIhcnnhKf7xgIVQowNCh1LZwR5#v=onepage&q&f=false

Hu, B-B., Lic, M-Y., Wang, Y-T., Zhu, M-J. High-yield biohydrogen production from non-detoxified sugarcane bagasse: Fermentation strategy and mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 979-987, 2018.

Hussya, I., Hawkesa, F. R., Dinsdalea, R., Hawkes, D. L. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 471-483, 2005.

Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA. Boletim de resultados da lavoura de arroz safra 2017/18. Elaborado pela Dater – Divisão de Assistência Técnica e Extensão Rural, Seção de Política Setorial e meteorologista Jossana C. Cera, com o apoio das Coordenadorias Regionais e NATEs – Núcleos de Assistência Técnica e Extensão. 2018. Disponível em: < https://irga-admin.rs.gov.br/upload/arquivos/201807/30100758-boletim-final-da-safra-201-18-final.pdf>.

Jiamyangyuen, S., Srijesdaruk, V., Harper, W. J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. Journal of Science and Technology, v. 27, p. 55-64, 2005.

Jiang, H., Gadow, S. I., Tanaka, Y., Cheng, J., Li, Y-Y. Improved cellulose conversion to bio-hydrogen with thermophilic bacteria and characterization of microbial community in continuous bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 57-64, 2015.

Kahlon, T. S. Rice Bran: Production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. In: Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits. Edited by Susan Sungsoo Cho and Priscilla Samuel. p. 305-321, 2009.

Kapdan, I. K., Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569-582, 2006.

Kapoor, M., Soam, S., Agrawal, R., Gupta, R. P., Tuli, D. K., Kumar, R. Pilot scale dilute acid pretreatment of rice straw and fermentable sugar recovery at high solid loadings. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 688–693, 2017.

Khan, S., Thakur, V., Jadhav, S. K., Quraishi, A. Effect of chemical pretreatments on de-oiled rice bran for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Biomedical**, v. 1, p. 20-24, 2016.

Kim, D-H., Han, S-K., Kim, S-H., Shin, H-S. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2158-2169, 2006.

Kim, D-H., Shin, H-S., Kim, S-H. Enhanced H_2 fermentation of organic waste by CO_2 sparging. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15563-15568, 2012.

Kirli, B., Karapinar, I. The effect of HRT on biohydrogen production from acid hydrolyzed waste wheat in a continuously operated packed bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 10678-10685, 2018.

Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B., Angelidaki, I. Biohydrogen Production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, 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**, v. 98, p. 1183-1190, 2007.

Kumar, G., Bakonyi, P., Periyasamy, S., Kim, S. H., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 728-737, 2015.

Kumar, G., Sivagurunathan, P., Park, J-H., Park, J-H., Park, H-D., Yoon, J-J., Kim, S-H. HRT dependent performance and bacterial community population of granular hydrogen-producing mixed cultures fed with galactose. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 188-194, 2016.

Kumar, G., Sivagurunathan, P., Sen, B., Kim, S-H., Lin, C-Y. Mesophilic continuous fermentative hydrogen production from acid pretreated de-oiled jatropha waste hydrolysate using immobilized microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 240, p. 137-143, 2017.

Lamaison, F. C., Andrade, P. A. M., Bigaton, A. D., Andreote, F. D., Antônio, R. V., Reginatto, V. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 14124-14133, 2015.

Lee, K-S., Tseng, T-S., Liu, Y-W., Hsiao, Y-D. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15556-15562, 2012.

Levin, D. B., Pitt, L., Love, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical Application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173-185, 2004.

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

Li, Z., Yan, J., Shen, D., Ding, C. Techniques optimization of combined enzymatic hydrolysis on brewers' spent grain from novozymes. **Journal of Life Sciences**, v. 6, p. 1232-1236, 2012.

Lim, J. S., Manan, Z. A., Alwi, S. R. W., Hashim, H. A review on utilization of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084–3094, 2012.

Liu, C-M., Wu, S-Y., Chu, C-Y., Chou, Y-P. Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 19317-19322, 2014.

Lopez-Hidalgo, A. M., Alvarado-Cuevas, Z. D., Leon-Rodriguez, A. de. Biohydrogen production from mixtures of agro-industrial wastes: Chemometric analysis, optimization and scaling up. **Energy**, v. 159, p. 32-41, 2018.

Lopez-Hidalgo, A. M., Sánchez, A., León-Rodríguez, A. Simultaneous production of bioethanol and biohydrogen by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate. **Fuel**, v. 188, p. 19-27, 2017.

Lutpi, N. A., Jahim, J. M., Mumtaz, T., Harun, S., Abdul, P. M. Batch and continuous thermophilic hydrogen fermentation of sucrose using anaerobic sludge from palm oil mill effluent via immobilization technique. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 297-307, 2016.

Marshall, W. E., Wartelle, L. H., Boler, D. E., Johns, M. M., Toles, C. A. Enhanced metal adsorption by soybean hulls modified with citric acid. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 263-268, 1999.

Megawati, Sediawan, W. B., Sulistyo, H., Hidayat, M. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2062-2067, 2011.

Mello Filho, O. L., Sediyama, C. S., Moreira, M. A., Reis, M. S., Massoni, G. A., Piovesan, N. D. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.445-450, 2004.

Menon, V., Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, v. 38, p. 522-550, 2012.

Michel Junior, R. J. S., Canabarro, N. I., Alesio, C., Maleski, T., Laber, T., Sfalcin, P., Foletto, E. L., Mayer, F. D., Kuhn, R. C., Mazutti, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature. **Biosystems Engineering**, v. 142, p. 110-116, 2016.

Mielenz, J. R., Bardsley, J. S., Wyman, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532-3539, 2009.

Miller, G.L. Use of dinitrosalisylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Noike, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 59-65, 2000.

Montane, D., Farriol, X., Salvadó, J., Jollez, P., Chornet, P. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 261-276, 1998.

Moodley, P., Kana, E. B. G. 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**, v. 21, p. 107-116, 2018.

Moreno-Andrade, I., Carrillo-Reyes, J., Santiago, S. G., Bujanos-Adame, M. C. Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 17246-17252, 2015.

Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.

Mussatto, S. I., Roberto, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2453-2460, 2005.

Nam, J-Y., Kim, D-H., Kim, S-H., Lee, W., Shin, H-S., Kim, H-W. Harnessing dark fermentative hydrogen from pretreated mixture of food waste and sewage sludge under sequencing batch mode. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 7155-7161, 2015.

Nasr, N., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Naggar, M. H. E., Nakhla, G. Biohydrogen production from pretreated corn cobs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 19921-19927, 2014.

Nathao, C., Sirisukpoka, U., Pisutpaisal, N. Production of hydrogen and methane by one and two stage fermentation of food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 15764-15769, 2013.

Nichols, N. N., Hector, R. E., Saha, B. C., Frazer, S. E., Kennedy, G. J. Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 79-88, 2014.

Oh, Y-K., Seol, E-H., Lee, E. Y., Park, S. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas Palustris* P4. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1373-1379, 2002.

Oh, Y-K., Seol, E-H., Lee, Kim, J. R., Park, S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 28, p. 1353-1359, 2003.

Pachapur, V. L., Sarma, S. J., Brar, S. K., Bihan, Y. L., Buelna, G., Verma, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

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

Poladyan, A., Trchounian, K., Vassilian, A., Trchounian, A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: Optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. **Renewable Energy**, v. 115, p. 931-936, 2018.

Puhulwella, R. G., Beckers, L., Delvigne, F., Grigorescu, A. S., Thonart, P., Hiligsmann, S. Mesophilic biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in trickling biofilter reactor. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, p. 16902-16913, 2014.

Pukasiewicz, S. R. M., Oliveira, I. L., Pilatti, L. A. Estudo de caso: gerenciamento de resíduos sólidos industriais em uma indústria processadora de soja. XI SIMPEP Bauru, SP, Brasil, 08 a 10 de novembro de 2004.

Qi, N., Hu, X., Zhao, X., Li, L., Yang, J., Zhao, Y., Li, X. Fermentative hydrogen production with peanut shell as supplementary substrate: Effects of initial substrate, pH and inoculation proportion. **Renewable Energy**, v. 127, p. 559-564, 2018.

Quispe, I., Navia, R., Kahhat, R. Energy potential from rice husk through direct combustion and fast pyrolysis: A review. **Waste Management**, v. 59, p. 200–210, 2017.

Rajan, K., Carrier, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 222-227, 2014.

Reddy, K., Nasr, M., Kumari, S., Kumar, S., Gupta, S. K., Enitan, A. M., Bux, F. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, *S/X*, Fe2+, and magnetite nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 8790-8804, 2017.

Ren, N-Q., Cao, G-L., Guo, W-Q., Wang, A-J., Zhu, Y-H., Liu, B-F, Xu, J-F. Biological hydrogen production from corn stover by moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 2708-2712, 2010.

Ren, N-Q., Zhao, L., Chen, C., Guo, W-Q., Cao, G-L. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H_2: Key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 92-99, 2016.

Rojas, M. J., Siqueira, P. F., Miranda, L. C., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C. Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls foroligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 202-210, 2014.

Rorke, D., Kana, E. B. G. Biohydrogen process development on waste sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves: Optimization of saccharification, hydrogen production and preliminary scale up. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 12941-12952, 2016.

Ruiz, H. A., Ruzene, D. S., Silva, D. P., Quintas, M. A. C., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw – effect of particle size and process conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 88-94, 2011.

Russ,W., Mörtel, H., Meyer-Pittroff, R. Application of spent grains to increase porosity in bricks. **Construction and Building Materials**, v. 19, p. 117-126, 2005.

Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 279-291, 2003.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 816-822, 2005.

Saha, B. C., Nichols, N. N., Qureshi, N., Kennedy, G. J., Iten, L. B., Cotta, M. A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 17-22, 2015.

Santos, M., Jiménez, J. J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Nozal, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, v. 80, p. 17-21, 2003.

Saratale, G. D., Kshirsagar, S. D., Saratale, R. G., Govindwar, S. P., Oh, M-K. Fermentative hydrogen production using sorghum husk as a biomass feedstock and process optimization. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 733-743, 2015.

Satar, I., Ghasemi, M., Aljlil, S. A., Isahak, W. N. R. W., Abdalla, A. M., Alam, J., Daud, W. R. W., Yarmo, M. A., Akbarzadeh, O. Production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* in an immobilized cell reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 9024-9030, 2017.

Sattar, A., Arslan, C., Ji, C., Sattar, S., Mari, I. A., Rashid, H., Ilyas, F. Comparing the bio-hydrogen production potential of pretreated rice straw co-digested with seeded sludge using an anaerobic bioreactor under mesophilic thermophilic conditions. **Energies**, v. 9, p. 1-14, 2016b.

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

Schievano, A., D'Imporzano, G., Adani, F. Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 2537-2541, 2009.

Schirmer-Michel, A. C., Flôres, S. H., Hertz, P. F., Matos, G. S., Ayub, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898-2904, 2008.

Sen, B., Chou, Y-P., Wu, S-Y., Liu, C-M. Pretreatment conditions of rice straw for simultaneous hydrogen and ethanol fermentation by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 4421-4428, 2016.

Sereewatthanawut, I., Prapintip, S., Watchiraruji, K., Goto, M., Sasaki, M., Shotipruk, A. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 555-561, 2008.

Shanmugam, S., Hari, A., Ulaganathan, P., Yang, F., Krishnaswamy, S., Wu, Y-R. Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified

thermostable laccase from *Trichoderma asperellum* strain BPLMBT1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 7, p. 3618-3628, 2018.

Sigurbjornsdottir, M. A., Orlygsson, J. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK_{54}, isolated from hot spring. **Applied Energy**, v. 97, p. 785-791, 2012.

Silva, M. A. da; Sanches, C.; Amante, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 487–491, 2006.

Silva, J. S., Mendes, J. S., Correia, J. A. C., Rochaa, M. V. P., Micoli, L. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal of Biotechnology**, v. 286, p. 71–78, 2018.

Singh, A., Tuteja, S., Singh, N., Bishnoi, N. R. Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave–alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1773-1782, 2011.

Singhal, Y., Singh, R. Effect of microwave pretreatment of mixed culture on biohydrogen production from waste of sweet produced from *Benincasa hispida*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 7534-7540, 2014.

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass - NREL/TP-510-42618. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Revised August 2012 ed.: National Renewable Energy Laboratory.

Spalková, V., Lazor, M., Smolinská, M., Takácová, A., Hutnan, M., Bodík, I., Ryba, J., Gá, M., Zemlicka, L., Pangallo, D., Mackul'ak, T. Enhanced hydrogen bioproduction from bird-cherry leaves using enzyme mixture. **Monatshefte Fur Chemie**, v. 147, p. 201-206, 2016.

Suzuki, Y. On hydrogen as fuel gas. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 7, n. 3, p. 227-230, 1982.

Tandon, M., Thakur, V., Tiwari, K. L., Jadhav, S. K. *Enterobacter ludwigii* strain IF2SW-B4 isolated for bio-hydrogen production from rice bran and de-oiled rice bran. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 345-354, 2018.

Tang, D-S., Yin, G-M., He, Y-Z., Hu, S-Q., Li, B. Li, L., Liang, H-L., Borthakur, D. Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 1-5, 2009.

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C-H., Chu, C-Y., Leu, H-J., Marone, A., Lin, C-Y., Kim, D-H., Trably, E., o Ruiz-Filippi, G. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 761-785, 2015.

Tien, H. M., Le, K. A., Tran, A. T., Le, P. K. Effect of fermentation conditions on biohydrogen production from cassava starch by anaerobic mixed cultures. **AIP Conference Proceedings**, 1737, 060003, 2016. Doi: 10.1063/1.4949310.

Todhanakasem, T., Areerat, K., Thanonkeo, P., Klinjapoand, R., Young,G. M. The composition of rice bran hydrolysate and its possibility to use in the ethanol production by *Zymomonas mobilis* biofilm. International **Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 6, p. 1126-1130, 2012.

Todhanakasem, T., Narkmit, T., Areerat, K., Thanonkeo, P. Fermentation of rice bran hydrolysate to ethanol using *Zymomonas mobilis* biofilm immobilization on DEAE-cellulose. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 196–201, 2015.

Todhanakasem, T., Sangsutthiseree, A., Areerat, K., Young, G. M., Thanonkeo, P. Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. **New Biotechnology**, v. 31, p. 451-459, 2014.

Tosuner, Z. V., Taylan, G. G., Özmıhçı, S. Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.230.

Urbaniec, K., Grabarczyk, R. Hydrogen production from sugar beet molasses – a techno-economic study. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 324-329, 2014.

Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., Poggi-Varaldo, H. M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H_2 production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1383-1391, 2005.

Vasconcelos, S. M. de, Santos, A. M. P., Rocha, G. J. M., Souto-Maior, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46–52, 2013.

Vera-Toledo, P., Moreno-Andrade, I., García-Lara, C. M. Influencia del origen del inóculo sobre la producción de biohidrógeno, **Biotecnología y Ciencias Agropecuarias**, v. 10, p. 63-71, 2016.

Vijayaraghavan, K., Ahmad, D., Ibrahim, M. K. B. Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 569-579, 2006.

Virmond, E., Sena, R. F., Albrecht, W., Althoff, C. A., Moreira, R. F. P. M., José, H. J. Characterisation of agroindustrial solid residues as biofuels and potential application in thermochemical processes. **Waste Management**, v. 32, p. 1952-1961, 2012.

Wang, B., Li, Y., Ren, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 4361-4367, 2013.

Wang, J., Wan, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 2934-2941, 2008.

Wang, J., Wan, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799-811, 2009.

Wang, Y., Cai, D., He, M., Wang, Z., Qin, P., Tan, T. Open fermentative production of L-lactic acid using white rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 664-672, 2015.
Wang, Y-Y; Ai, P.; Hu, C-X.; Zhang, Y-L. Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 390-396, 2011.

Wongthanate, J.; Chinnacotpong, K.; Khumpong, M. Impacts of pH, temperature and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, 5:76, 2014.

Yamin, J. A. A., Gupta, H. N., Bansal, B. B., Srivastava, O. N. Effect of combustion duration on the performance and emission characteristics of a spark ignition engine using hydrogen as a fuel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 25, p. 581-589, 2000.

Yang, C-Y., Sheih, I-C., Fang, T. J. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 687-691, 2012.

Yin, Y., Wang, J. Biohydrogen production using waste activated sludge disintegrated by gamma irradiation. **Applied Energy**, v. 155, p. 434-439, 2015.

Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y. characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 571-574, 1995.

Yu, L., Xu, M., Tang, I., Yang, S.T. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production through co-utilization of glucose and xylose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 10, p. 2134-2141, 2015.

Zhang, J., Zhang, J., Zang, L. Thermophilic bio-hydrogen production from corn-bran residue pretreated by calcined-lime mud from papermaking process. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 564-570, 2015.

Zhang, W., Lin, Y., Zhang, Q., Wang, X., Wu, D., Kong, H. Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production. **Fuel**, v. 112, p. 331-337, 2013.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 869-873, 2006.