UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

GILBERTO CORREA DOS SANTOS LEITÃO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR DIGESTÃO ANAERÓBIA UTILIZANDO O HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ

RIO DE JANEIRO

2018

GILBERTO CORREA DOS SANTOS LEITÃO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA UTILIZANDO O HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadoras: Viridiana Santana Ferreira-Leitão
Ayla Sant'Ana da Silva
Elba Pinto da Silva Bon

RIO DE JANEIRO
2018

110p Gilberto Correa dos Santos Leitão
Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando o hidrolisado da semente de açaí. Rio de Janeiro, 2018.
Orientadoras: Viridiana Santana Ferreira-Leitão; Ayla Sant'Ana da Silva; Elba Pinto da Silva Bon
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2018.
1. Hidrogênio. 2. Fermentação anaeróbia. 3. Clostridium 4. Manose 5. Euterpe oleracea 6. Açaí

GILBERTO CORREA DOS SANTOS LEITÃO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA UTILIZANDO O HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ

Aprovado em ____/____/_____

_____
Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

_____
Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc., IQ/UFRJ

_____
Magali Christe Cammarota, D.Sc., EQ/UFRJ

_____
Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso, D.Sc., IQ/UFRJ

_____
Maria Antonieta Ferrara, D.Sc., Farmanguinhos - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Às Dr.as Viridiana, Ayla e Elba por me aceitarem como orientando e com quem, nesta trajetória árdua da tese, aprendi o sentido de dedicação ao trabalho, responsabilidade e profissionalismo.

Ao Instituto de Nacional de Tecnologia e à Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado.

Aos amigos do LABIC: Bruno Cesar, João Pedro, Adriana Pequeno, Alvaro Ferreira, Diane Frauches, Julia Finamor, Keysson Vieira Fernandes, Leonardo Vitor Bello Pazutti, Lucas Oliveira Amim, Marina de Castro Ferreira da Costa, Ronaldo Rodrigues, Vinicius Leite e especialmente a Mariana de Oliveira Faber devido ao enorme apoio sem o qual esse projeto não seria viável.

Aos amigos do Bioetanol: Felipe Knopp, Mariana Kuster, Ana Paula, Ricardo Sposina, Lucas Tupi, Elisa Zaparoli, Rodrigo da Rocha, Raul Alves, Miguel Sartori, Maristela Duarte, Pedro Lima, Daniel Santos, Aluan Andrade, Marcello Martins, Jair Jorge, Marcella Souza, Maria Fernanda.

À minha família, especialmente Kellen e família, Nilton & Nilza, Neide, Fábio, Márcio.

À minha mãe Elaine Maise Correa dos Santos Leitão.

Ao meu pai Gilberto e irmãos Alexandre e Duda pelos exemplos motivadores.

Devo agradecer também ao grupo que me aturou nos momentos mais complicados, Carlos, Victor, Teresinha, Marco Aurélio, Alice e Marco.

Aos amigos do zouk. Seria impossível descrever todos; porém, devo um agradecimento especial aos amigos: Irene, Renata, Gabriel e João.

Às agências e fontes de financiamento CAPES e ANP.

Aos que esqueci de citar, por falta de cabeça.

“Quando achamos a matemática e a física teórica muito difíceis, voltamo-nos para o misticismo.”

Stephen Hawking

RESUMO

O açaí, fruto da palmeira *Euterpe oleracea*, contém entre 5% e 20% de parte comestível, sendo o restante de sua massa correspondente à semente, que não é aproveitada na indústria alimentícia. Somente no Pará são geradas anualmente cerca de 1,3 milhões de toneladas de sementes de açaí, não havendo uma destinação apropriada para este resíduo. Contudo, os açúcares presentes na semente de açaí são substratos potenciais para a produção de hidrogênio (H_2) via digestão anaeróbia utilizando culturas mistas de microrganismos presentes no lodo anaeróbio como inóculo da fermentação. A utilização de H_2 como vetor energético apresenta diversas vantagens, uma vez que sua combustão libera uma grande quantidade de energia e produz apenas água como produto de reação. Contudo, nem todo substrato é utilizado na produção de H_2, sendo gerado um efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW – do inglês *Hydrogen Producing Liquid Waste*) que pode ser posteriormente convertido a CH_4. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de H_2 e CH_4 por digestão anaeróbia utilizando os carboidratos presentes na semente de açaí obtidos após hidrólise ácida deste material. Inicialmente, foi realizada uma hidrólise da semente de açaí para obtenção de um hidrolisado rico em monossacarídeos simples, principalmente manose. De forma a reduzir a quantidade de microrganismos consumidores de H_2 presentes no lodo, foi realizado um pré-tratamento térmico (65 °C; 30 min) ou ácido (pH 2,0; 1 h). Ambos os pré-tratamentos testados resultaram em rendimentos de 1,87 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ em 24 h de fermentação; porém, após o pré-tratamento ácido, houve a necessidade de aclimatação do lodo por 20 h a 35 ^{o}C, enquanto o lodo submetido ao tratamento térmico pôde ser utilizado diretamente, sendo, por isso, selecionado para os demais experimentos. Posteriormente, foi avaliada a influência de diferentes razões entre a demanda química de oxigênio do substrato sintético ($DQO_{substrato}$) e a concentração de sólidos suspensos voláteis do inóculo ($SSV_{inóculo}$). A relação 0,25 com 21,33 $g.L^{-1}$ de $SSV_{inóculo}$ resultou no melhor rendimento, de 2,01 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$. Utilizando esta melhor relação, foi realizada uma cinética de produção com hidrolisado de semente de açaí, tendo sido obtido um rendimento de 2,04 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ e uma produtividade de 0,14 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}/h$ em 15 horas. O resíduo líquido desse processo foi usado para a produção de metano, alcançando-se 942,5 mL/L de metano em 6 dias de produção com uma redução de DQO de 3366 mg/L.

Palavras chave: Hidrogênio, Fermentação anaeróbia, *Clostridium*, Manose, *Euterpe*, Açaí

ABSTRACT

The açaí, fruit of the palm *Euterpe oleracea*, contains between 5% and 20% of edible part, the rest of its mass corresponding to the seed, which is not used in the food industry. Only in Pará, about 1.3 million tons of açaí seeds are generated annually, and there is no appropriate destination for this residue. However, the sugars present in the açaí seed are potential substrates for the production of hydrogen (H_2) via anaerobic digestion using mixed cultures of microorganisms present in the anaerobic sludge as inoculum of the fermentation. The use of H_2 as an energy vector has several advantages, since its combustion releases a large amount of energy and produces only water as a reaction product. However, not all substrate is used in the production of H_2, with an effluent being generated during the production of H_2, called Hydrogen Production Liquid Waste (HPLW), that can be later converted to CH_4. Therefore, this work aimed to evaluate the production of H_2 and CH_4 by anaerobic digestion using the carbohydrates present in the açaí seed obtained after the acid hydrolysis of this material. Initially, the açaí seed was hydrolyzed to obtain a hydrolysate rich in simple monosaccharides, mainly mannose. To reduce the amount of H_2-consuming microorganisms present in the sludge, a thermal pretreatment (65 °C; 30 min) or an acid pretreatment (pH 2.0; 1 h) was performed. Both pre-treatments tested resulted in yields of 1.87 $mol_{H2}/mol_{carbohydrate}$ in 24 h of fermentation; however, after the acid pretreatment, there was a need to acclimate the sludge for 20 h at 35 °C, while the sludge submitted to the heat treatment could be used directly and was, therefore, selected for the other experiments. Subsequently, the evaluation of different ratios between the chemical oxygen demand of the synthetic substrate ($COD_{substrate}$) and the concentration of volatile suspended solids of the inoculum ($SSV_{inoculum}$) was carried out. The 0.25 ratio with 21.33 $g.L^{-1}$ of $SSV_{inoculum}$ resulted in the best yield, of 2.01 $mol_{H2}/mol_{carbohydrate}$. Using this best ratio, a production kinetics was performed with the açaí seed hydrolysate, achieving a yield of 2.04 $mol_{H2}/mol_{carbohydrate}$ and a productivity of 0.14 $mol_{H2}/mol_{carbohydrate}.h$ in 15 hours. The liquid stream obtained in this process was used for methane generation, and 942.5 mL/L of methane were produced after 6 days with a COD reduction of 3366 mg/L.

Keywords: Hydrogen, Dark fermentation, *Clostridium*, Mannose, *Euterpe oleracea*, *Açaí*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOV – Ácidos orgânicos voláteis

C/N - Relação carbono/nitrogênio

$CaCO_3$ - Carbonato de cálcio

CEDAE - Companhia Estadual de Águas e Esgotos

CH_4 - Gás metano

CO_2 - Gás carbônico

DQO - Demanda Química de Oxigênio

ETE - Estação de tratamento de esgoto

$g.L^{-1}$ - Grama por litro

H_2 - Gás hidrogênio

HPLW – Efluente da produção de hidrogênio (*hydrogen production liquid waste*)

H_2SO_4 - Ácido súlfurico

HAc - Ácido acético

HBut -Ácido butírico

N_2 – Gás nitrogênio

O_2 - Gás oxigênio

pH - Potencial hidrogeniônico

ppm - Partes por milhão

rpm - Rotações por minuto

S_0 – Quantidade inicial de substrato

SEDAP - Secretaria de Estado de Agricultura do Pará

SSV - Sólidos suspensos voláteis

ST - Sólidos totais

SV - Sólidos voláteis

X_0 - Quantidade inicial de microrganismos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 O açaí: produção e composição 21
2.1.1 Origem e características da planta 21
2.1.2 Produção brasileira de açaí e composição da polpa 22
2.1.3 Características e composição da semente do açaí 23
2.2 O gás hidrogênio: propriedades, aplicações e processos de produção 26
2.3 O processo de digestão anaeróbia aplicado à produção de hidrogênio 31
2.3.1 Aspectos gerais da digestão anaeróbia 31
2.3.2 Pré-tratamentos do lodo anaeróbio para culturas mistas 37
2.3.2.1 Pré-tratamento térmico do inóculo 38
2.3.2.2 Outros pré-tratamentos do inóculo 39
2.3.3 Fatores que influenciam a produção de H_2 41
2.3.3.1 Íons metálicos 41
2.3.3.2 Relação entre substrato e inóculo 42
2.3.3.3 Temperatura 43
2.3.3.4 Concentração de nitrogênio, fosfato e sulfato 44
2.3.3.5 Pressão parcial de hidrogênio 45
2.3.3.6 pH 45
2.3.3.7 Concentração de ácidos orgânicos voláteis 46
2.4 Produção sequencial de hidrogênio e metano 46
3. OBJETIVOS 50
3.1 Objetivo geral 51
3.2 Objetivos específicos 51
4. MATERIAIS E MÉTODOS 52
4.1 Obtenção do hidrolisado de semente de açaí e produção de meio sintético mimetizado. . 54
4.2 Inóculo para a produção de H_2 e metano 55
4.3 Pré-tratamento do lodo anaeróbico 55
4.3.1 Pré-tratamento ácido 55
4.3.2 Pré-tratamento térmico 55
4.4. Condições gerais de digestão anaeróbia 56
4.4.1 Avaliação da manose como substrato para produção de hidrogênio 56

4.3.2 Avaliação do potencial fermentativo do hidrolisado de semente de açaí para produção de hidrogênio 57

4.3.3 Comparação dos pré-tratamentos ácido e térmico do lodo anaeróbio em relação ao tempo de aclimatação 57

4.3.4 Perfil cinético da produção de hidrogênio em meio sintético 57

4.3.5 Avaliação da influência da razão $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ sobre o rendimento em hidrogênio e o consumo de substrato 57

4.3.6 Perfil cinético da produção de hidrogênio utilizando hidrolisado de semente de açaí como matéria-prima 58

4.4 Produção sequencial de hidrogênio e metano 58

4.5.1 Cromatografia em fase gasosa 58

4.5.3 Cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica de pulso 59

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60

5.2 Avaliação da manose padrão como substrato para produção de hidrogênio biológico via fermentação anaeróbia 62

5.3 Avaliação do potencial fermentativo do hidrolisado de semente de açaí para produção de hidrogênio biológico 63

5.4 Hidrólise da semente de açaí e caracterização do hidrolisado obtido (HSA) – Obtenção do lote 2 de HSA 67

5.5 Comparação dos pré-tratamentos ácido e térmico do lodo anaeróbio em meio sintético: efeito do tempo de aclimatação 69

5.6 Perfil cinético da produção de hidrogênio em meio sintético após pré-tratamento térmico do inoculo 74

5.7. Avaliação da influência da razão $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ sobre o rendimento em hidrogênio e o consumo de substrato 75

5.8 Cinética de produção de H_2 a partir do hidrolisado de semente de açaí 79

6. CONCLUSÕES 85

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 88

8. REFERÊNCIAS 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sementes e árvores de (A) *E. precatória* e (B) *E. oleracea* e (C) distribuição geográfica de ambas as espécies (YAMAGUCHI *et al.*, 2015). 21

Figura 2. Produção de açaí no estado do Pará ao longo dos anos (2003-2016) (SEDAP, 2003-2012; IBGE, 2017). 22

Figura 3. Corte transversal do açaí (a) e seu respectivo esquema ilustrativo (b). As partes que constituem a semente estão em vermelho (DRANSFIELD *et al.*, 2008; RABELO, 2012). (c) e (d), Imagens obtidas nesse estudo da semente in natura e corte transversal da semente, respectivamente. 24

Figura 4. Composição da semente de açaí em função de seus carboidratos (MEDINA *et al.*, 2016; RAMBO *et al.*, 2015) e de resíduos lignocelulósicos clássicos (LEE *et al.*, 1997). 25

Figura 5. Densidade energética do hidrogênio frente aos combustíveis mais utilizados atualmente. Adaptado de Santos e Santos (2005) (CATALUÑA *et al*, 2008; Santos; Santos, 2005). 26

Figura 6. Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Figura modificada a partir de SÁ *et al*. (2014). 28

Figura 7. Representação esquemática das principais etapas do processo de fermentação anaeróbia (Adaptado de Machado, 2016). 35

Figura 8. Principais rotas do metabolismo de glicose e manose por *Clostridium spp.* Figura modificada (LEE, 2008). 36

Figura 9. Estequiometria das principais reações envolvidas na digestão anaeróbia (GHIMIRE *et al.*, 2015). 37

Figura 10. Etapas para produção sequencial de H_2 e CH_4 utilizando hidrolisado de semente de açaí 53

Figura 11. Hidrolisado ácido de semente de açái. 54

Figura 12. Representação esquemática das condições utilizadas para produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia. 56

Figura 13. Produção de hidrogênio em meio sintético contendo glicose (azul) ou manose (vermelho) nos tempos de 17 h, 21 h 24 h e 26,5 h. . A fermentação foi conduzida a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5, lodo 1. 62

Figura 14. Rendimento de hidrogênio a partir de HSA (verde – lote 1), manose padrão (vermelho) e glicose padrão (azul). As produtividades obtidas em cada uma das fermentações estão apresentadas em vermelho no topo das colunas. Estes testes foram realizados por 24h, a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,53, lote 1 de lodo anaeróbio. 65

Figura 15. Imagens obtidas durante este trabalho. A) Hidrolisado ácido de semente de açaí; B) Semente de açaí in natura, C) Semente de açái em corte transversal. 66

Figura 16. Avaliação dos pré-tratamentos ácido (azul) e térmico (vermelho) em diferentes tempos de aclimatação utilizando meio sintético como substrato. A fermentação para avaliação da aclimatação foi conduzida por 24 h a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5. 71

Figura 17. Teste em diferentes tempos de aclimatação após pré-tratamento térmico utilizando meio sintético. * $p > 0,05$, ** $p < 0,05$. Foi testado 24 h de produção, a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5. 72

Figura 18. Cinética de produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e consumo de manose em meio sintético mimetizado a composição de açucares do hidrolisado de semente de açaí em até 30 horas de produção, 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5. 75

Figura 19. Rendimento de H_2 e consumo de manose em diferentes relações DQO/SSV em 24 h de produção acumulada. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 35 ^{o}C, a 160 rpm, utilizando-se carboidratos nas concentrações 2,5, 5, 10 e 20 g/L. e 10,66 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo}$ Na condição 0,25*, foram utilizados 5 g/L de carboidratos totais e 21,33 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo}$ 76

Figura 20. Cinética de produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e consumo de manose em hidrolisado de semente de açaí em 160 rpm, 35°C, e 0,25 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$. 80

Figura 21. Estequiometria das reações envolvidas na produção de ácido fórmico. 81

Figura 22. Produção de metano a partir dos ácidos orgânicos voláteis e manose residual presentes no HPLW a 35 ^{o}C e 160 rpm. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das polpas de açaí, em massa seca, provenientes dos estados do Pará e Maranhão e a média brasileira (ROGEZ, 2000). 23

Tabela 2. Culturas puras descritas na literatura para a produção de H_2 a partir de glicose e manose 33

Tabela 3. Exemplos de microrganismos produtores e consumidores de H_2 (WONG; WU; JUAN, 2014). 34

Tabela 4. Produções de hidrogênio reportadas na literatura para processos empregando diferentes tipos de condições de pré-tratamento do inóculo. * ETE, Estação de tratamento de esgoto. 38

Tabela 5. Proporções entre $DQO_{substrato}$ e $SSV_{inóculo}$ utilizados neste trabalho. 58

Tabela 6. Caracterização dos parâmetros pH, DQO e SSV do lodo anaeróbio oriundo de estação de tratamento de esgoto. 61

Tabela 7. Consumo de manose, produção de ácido acético e produção de ácido butírico nos tempos de 0 h, 21 h e 24 h de produção utilizando-se manose padrão ou HSA como substrato. 66

Tabela 8. Caracterização do hidrolisado de semente de açaí produzido por cromatografia de troca de iônica para os carboidratos e por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ácidos e produtos de degradação de açúcares e lignina. *n.d. Não detectado 68

Tabela 9. Comparação entre produção de hidrogênio no lodo anaeróbio aclimatado por 0 h, 6 h e 24 h à 35 ^{o}C após pré-tratamento térmico. 73

Tabela 10. Avaliação da produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e manose residual em variadas relações DQO:SSV em 24 h de produção acumulada de H_2. 77

Tabela 11. Comparação entre diversas relações ($DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$) encontradas na literatura para produção de H_2. 79

Tabela 12. Comparação dos resultados da produção de hidrogênio deste trabalho e outros estudos. 84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais métodos biológicos para produção de biohidrogênio, suas vantagens/desvantagens e microrganismos envolvidos (SÁ *et al*., 2014). 30

Quadro 2. Composição dos carboidratos presentes no hidrolisado da semente de açaí (lote 1) produzidos por MEDINA e colaboradores (2016). 64

1. INTRODUÇÃO

O açaí, fruto da palmeira *Euterpe oleracea*, contém uma parte comestível que representa de 5% a 20% de sua massa (ROGEZ, 2000), sendo a maior parte do fruto constituída pela semente. Atualmente, não existe uma destinação adequada a essa semente e, portanto, esta é considerada um resíduo (CAVALCANTE, 1991; CHAVES, J.M ; PECHNIK, 1948; ROGEZ, 2000). O estado do Pará é o maior produtor de açaí do mundo, produzindo atualmente cerca de 1,3 milhão de toneladas deste fruto por ano e, consequentemente, cerca de 975 mil toneladas de semente (IBGE, 2017). Estas são descartadas, em sua maioria, em lixões a céu aberto e em cursos d'água, gerando impactos ambientais significativos e problemas de valorização da cadeia produtiva (REIS *et al*., 2002).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a composição da semente do açaí não corresponde à composição clássica da biomassa vegetal (celulose, hemicelulose e lignina). Essa semente apresenta manose como monossacarídeo majoritário - cerca de 58% da massa total - seguido de quantidades minoritárias de outros carboidratos, como glicose, galactose, xilose e arabinose (DA SILVA, 2017; MEDINA *et al*., 2016). Os açúcares presentes na semente de açaí são substratos potenciais para a produção de gás hidrogênio (H_2) via fermentação anaeróbia, em um processo interessante tanto do ponto de vista ambiental quanto energético (GHIMIRE *et al.*, 2015).

O gás hidrogênio tem um importante papel em diferentes segmentos da indústria química, sendo, em sua maior parte, destinado à fabricação de amônia e metanol, com uma menor parcela destinada ao processo de refino do petróleo. Outras aplicações incluem a fabricação de semicondutores e seu emprego como agente redutor de minérios e na hidrogenação de óleos na indústria alimentícia (KIRTAY, 2011). Adicionalmente, o hidrogênio tem recebido destaque na literatura como combustível, visto que se torna cada vez mais evidente a necessidade de desenvolvimento e exploração de novos recursos energéticos. Este gás, que pode ser utilizado em células a combustível, possui alto valor calorífico e gera apenas água em sua combustão (DAS, 2001).

Para a produção deste combustível, podem ser utilizados métodos químicos ou biológicos (KOTAY; DAS, 2008). Quando comparada aos métodos químicos, a produção biológica a partir de resíduos agroindustriais, como a semente de açaí, apresenta uma vantagem devido à possibilidade de uma produção descentralizada de

energia em instalações de pequena escala, próximas aos locais de geração do resíduo. (KOTAY; DAS, 2008) Desta maneira, os custos adicionais com a distribuição seriam reduzidos, possibilitando a geração de energia limpa em regiões remotas, como pequenas cidades no interior do estado do Pará. Adicionalmente, esta oportunidade possibilitaria o desenvolvimento econômico e social em regiões desfavorecidas.

A rota biológica de produção de hidrogênio pelo processo de digestão anaeróbia vem sendo investigada para diversas biomassas, porém ainda são relatados alguns gargalos para o processo, como a relação entre inóculo e substrato, a produção de ácidos que podem inibir o processo e o tipo de pré-tratamento do inóculo a ser utilizado. Adicionalmente, nem todo o substrato é utilizado para a produção de H_2 e a maior parte da fração orgânica permanece como produto solúvel da fermentação, não havendo uma redução substancial da demanda química de oxigênio (DQO) (VENKATA *et al*, 2008; VENKATA *et al.*, 2009). Uma solução interessante é a produção de CH_4 de forma sequencial à produção de hidrogênio, uma vez que esse é um combustível atraente que já é utilizado na geração de energia, estando presente no gás natural, e cuja produção pode auxiliar na redução da DQO (KHALIL, 1999).

Portanto, no presente trabalho, foi investigada a aplicação do hidrolisado de semente de açaí, composto majoritariamente por manose, como substrato para a produção de H_2 e CH_4 via digestão anaeróbia, empregando lodo de estação de tratamento de esgoto como inóculo. Foram avaliados parâmetros relacionados ao tratamento e ao teor de inóculo utilizado e investigou-se a fermentação de substratos-padrão de forma a identificar possíveis efeitos inibitórios do hidrolisado de semente de açaí.

A utilização da semente de açaí como matéria-prima para a produção de H_2 e CH_4 é interessante não apenas como forma de geração de energia limpa, renovável e sustentável associada à valorização de um resíduo agroindustrial brasileiro, como também pode gerar empregos e auxiliar no desenvolvimento de regiões que possuem maior fragilidade econômica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O açaí: produção e composição

2.1.1 Origem e características da planta

A literatura menciona 30 espécies de árvores do gênero *Euterpe* que estão presentes nas Américas Central e do Sul (MOORE, 1973 *apud* BICHARA, 2011; UHL, 1991). As espécies cultivadas comercialmente para colheita de seus frutos são *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatória*, que estão apresentadas na Figura 1.

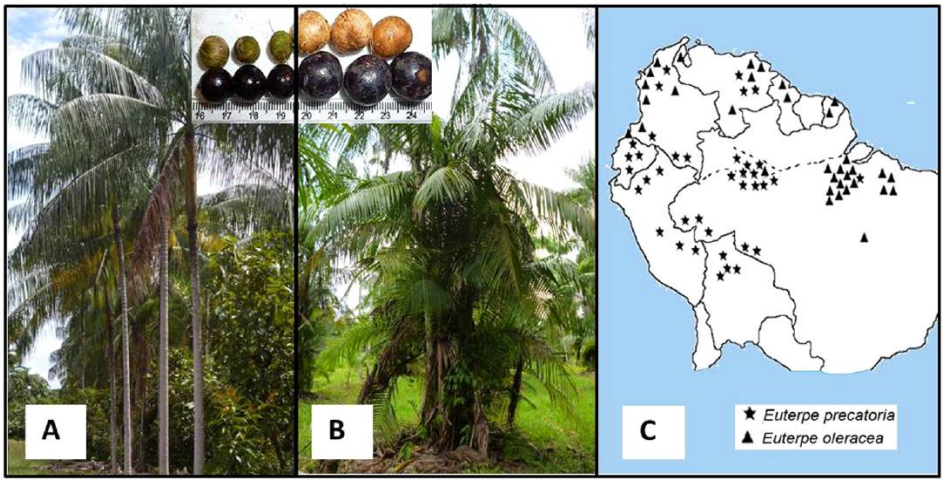

Figura 1. Sementes e árvores de (A) *E. precatória* e (B) *E. oleracea* e (C) distribuição geográfica de ambas as espécies (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

E. precatoria é uma planta nativa do estado do Amazonas, popularmente conhecida como "Açaí-do-amazonas", sendo encontrada na bacia do rio Amazonas, em áreas de planalto e planície, e amplamente presente ao sul do Equador. Já a planta *E. oleracea* é popularmente conhecida como "açaí do Pará", sendo encontrada principalmente na planície e na terra da floresta inundada pelo estuário do Rio Amazonas, nas fazendas do Pará, Maranhão, Tocantins, Amapá, e também na Guiana e na Venezuela (CHOI *et al*., 1998).

A espécie *E. oleracea* é a mais propícia para a exploração de palmitos e frutos devido à presença de perfilhação abundante e por apresentar indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (BOVI, 2000; ROGEZ, 2000), podendo alcançar 20 metros de altura (MIRANDA ; RABELO, 2008). Seu fruto, o açaí, é arredondado, com 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 0,8 a 2,3 g; seu epicarpo é de cor violáceo púrpura, quase negro, e muito fino e seu mesocarpo também é bastante fino, com apenas 1 a 2 mm de espessura. Somente o epicarpo e o mesocarpo constituem a parte comestível do fruto (ROGEZ, 2000).

2.1.2 Produção brasileira de açaí e composição da polpa

A produção brasileira de açaí ocorre principalmente no estado do Pará. Segundo dados da Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agropecuário e da Pesca do Estado do Pará (SEDAP), no ano de 2012 foram produzidas 928 mil toneladas de açaí (extrativismo e agricultura intensiva), sendo geradas em torno de 800 mil toneladas de semente de açaí. Essa produção vem crescendo a cada ano, tanto em extrativismo como em cultura intensiva (SEDAP, 2012). Em 2016, pela primeira vez, o IBGE investigou os dados de agricultura intensiva de açaí; esses dados, quando somados à produção extrativista, ultrapassam 1,3 milhões de toneladas, como pode ser observado na Figura 2 (IBGE, 2017).

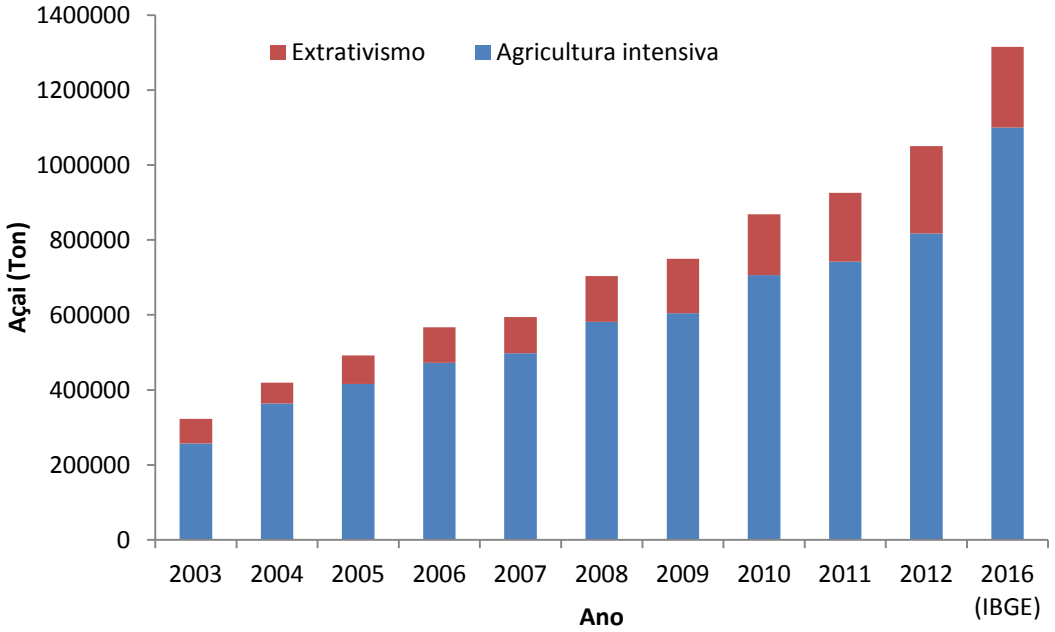

Figura 2. Produção de açaí no estado do Pará ao longo dos anos (2003-2016) (SEDAP, 2003-2012; IBGE, 2017).

A polpa de açaí tem recebido muita atenção nos últimos anos como uma das novas "superfrutas". O consumo de açaí vem aumentando, principalmente devido aos benefícios que estão sendo apontados por trabalhos científicos. Os frutos são utilizados na preparação de bebidas com alto valor calórico, que são exportadas mundialmente (YAMAGUCHI *et al.*, 2015). O açaí também é considerado um nutracêutico face ao seu rico conteúdo de antioxidantes, que são pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela cor violácea do fruto (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005).

Como pode ser observado na Tabela 1, a polpa de açaí é rica em lipídeos e apresenta boa qualidade nutricional, contendo certos minerais, como cálcio e potássio, que participam de reações metabólicas importantes (ROGEZ, 2000).

Tabela 1. Composição das polpas de açaí, em massa seca, provenientes dos estados do Pará e Maranhão e a média brasileira (ROGEZ, 2000).

Componente (/100g)	Localidade		Média(BR)
	PARÁ	MARANHÃO	
Lipídios totais (g)	62,4	40,7	48
Proteínas (g)	14,5	19,8	13
Açúcares totais (g)	3,8	4,8	1,5
Fibras totais (g)	32,1	43,8	34
Cálcio (mg)	417,5	596,3	286
Fósforo (mg)	210	322,5	124
Magnésio (mg)	161,3	157,5	174
Sódio (mg)	123,8	235	56,4
Potássio (mg)	915	1000	932
Cobre (mg)	1,8	2,8	1,7
Ferro (mg)	3,7	6,4	1,5
Zinco (mg)	1,9	3,7	7
Manganês (mg)	10,8	10,2	-
Vitamina E	-	-	45,0

Em resposta à demanda crescentemente do mercado, foi recentemente noticiada uma implantação do programa de desenvolvimento da cadeia produtiva do açaí no estado do Pará (Pró-Açaí), que consiste em um conjunto de ações visando à expansão da área de produção de açaí em 50 mil hectares. Elaborado pelo SEDAP do Pará, em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Amazônia Oriental, entre outras instituições, o programa pretende aumentar a produção de açaí em 360 mil toneladas até 2024. Considerando a expansão pretendida pelo Pró-Açaí, seriam gerados mais de 1,6 milhões de toneladas de semente de açaí por ano em decorrência desta produção (SEDAP, 2012).

2.1.3 Características e composição da semente do açaí

A semente do açaí é formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento. Juntamente com um endocarpo não comestível e pouco lenhoso, constitui cerca de 85% da massa total do fruto, como pode ser observado no esquema da Figura 3 (CHAVES ; PECHNIK, 1948; ROGEZ, 2000).

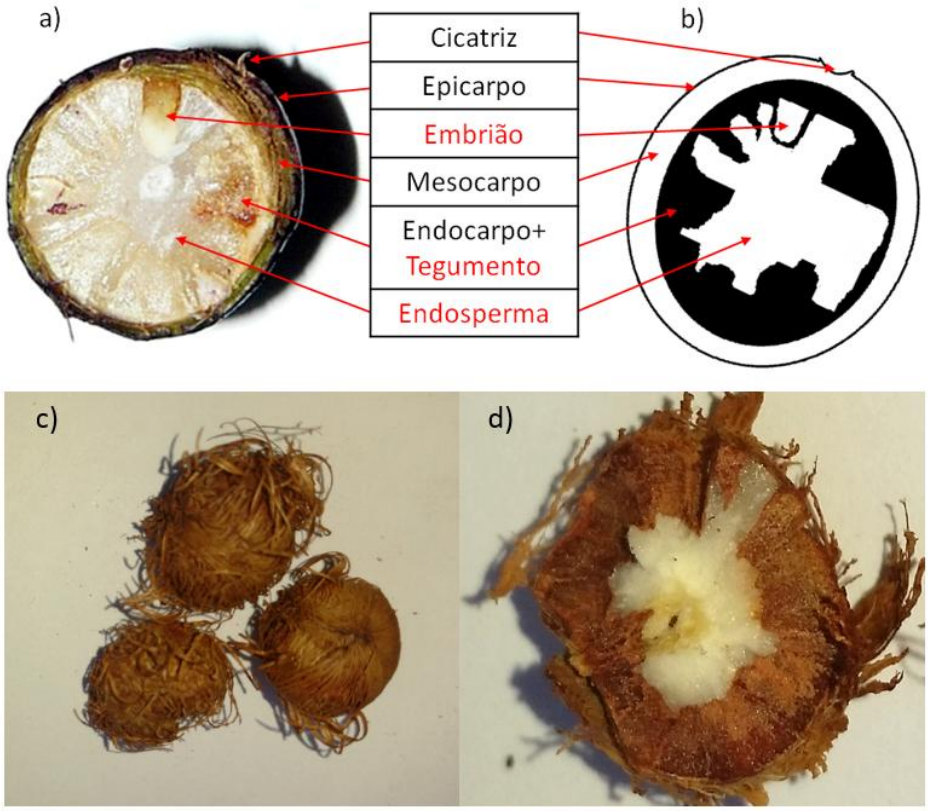

Figura 3. Corte transversal do açaí (a) e seu respectivo esquema ilustrativo (b) - as partes que constituem a semente estão em vermelho (DRANSFIELD *et al.*, 2008; RABELO, 2012). Imagens obtidas nesse estudo da semente *in natura* (c) e do corte transversal da semente (d).

A fim de obter o maior valor possível de um determinado resíduo e dessa forma buscar aplicações adequadas, é de extrema importância conhecer sua composição, mas poucos estudos sistemáticos foram realizados com sementes açaí. Trabalhos anteriores relataram que as sementes de açaí contêm altas quantidades de carboidratos (~70%), com celulose como polissacarídeo principal (ALTMAN, 1956; WYCOFF *et al.*, 2015). Em contraste, estudos de nosso grupo de pesquisa e de RAMBO et al. (2015) mostraram que 53,8% da semente é composta de manana, um polímero de manose. Portanto, a confirmação da composição real da semente do açaí e o estudo dos métodos de processamento para liberar seus açúcares é extremamente relevante, já que o teor de manose possivelmente sem precedentes torna as sementes açaí um material valioso e inexplorado. Segundo Lobato, a parede polissacarídica de palmeiras costuma ser formada por uma extensa cadeia linear de manoses unidas por ligações β-1,4, contendo poucas ramificações. Nas sementes, a manana promove resistência mecânica e, consequentemente, maior proteção embrionária, atuando como reserva de carboidratos para a nutrição das mudas durante seu desenvolvimento (LOBATO *et al.*, 2010). Na

Figura 4, está apresentada a composição da semente de açaí em comparação às de biomassas lignocelulósicas clássicas.

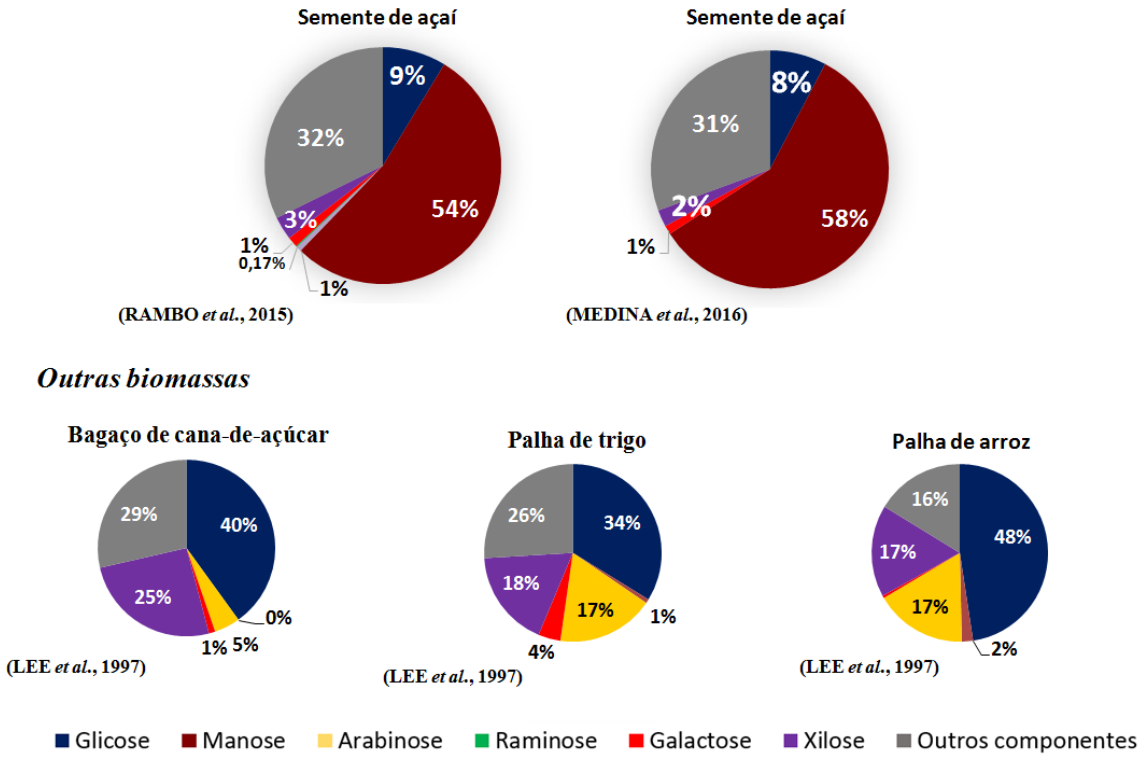

Figura 4. Composição da semente de açaí em função de seus carboidratos (MEDINA *et al.*, 2016; RAMBO *et al.*, 2015) e de resíduos lignocelulósicos clássicos (LEE *et al.*, 1997).

Apesar de apresentar quantidades significativas de carboidratos, a semente de açaí ainda é pouco aproveitada em processos industriais, sendo quase sempre descartada sem qualquer controle ou transformada em produtos com baixo valor agregado, como bijuterias e adubo (RODRIGUES *et al.*, 2006; ROGEZ, 2000). É interessante ressaltar que a manose, presente em altos teores na semente de açaí, é um importante produto metabólico na biossíntese da maioria das proteínas secretoras e glicoproteínas no corpo humano (ETCHISON, 1997). Este carboidrato simples demonstra ter diversos efeitos benéficos sobre o sistema imunológico (LYONS, 1994) e atua contra síndrome metabólica (LYONS, 1994), diabetes (VUKSAN *et al.*, 1999), doenças intestinais(PR FERKET *et al.*, 2004) e infecções do trato urinário (ALTARAC, 2014). A manose pode ser utilizada como substrato de baixo custo para a síntese de agentes imunoestimuladores, agentes antitumorais, vitaminas e como substrato para produção de D-manitol, que é utilizado na síntese de medicamentos (HU *et al.*, 2016).

A manose também possui grande importância na indústria cosmética, pois o polímero de manose exibe excelente capacidade de hidratação, boa textura e deixa a

pele menos esticada, menos seca e mais hidratada (SCHMIDT; FORTNA, 1991). Já na indústria alimentícia, a manose tem sido adicionada a sorvetes, em frutas processadas e molhos de salada, de forma a melhorar a textura dos produtos (SUTTON, 1998).

2.2 O gás hidrogênio: propriedades, aplicações e processos de produção

O gás hidrogênio é formado por duas unidades do elemento hidrogênio, que é o mais simples que existe. Este gás não possui cor nem odor, é inflamável entre as concentrações de 4% a 75% de H_2 por volume total e apresenta 11 $L.g^{-1}$ de volume em pressão atmosférica (SILVA, 2016). Como pode ser observado na Figura 5, o hidrogênio apresenta elevada densidade energética, da ordem de 140 $kJ.g^{-1}$, valor aproximadamente três vezes superior ao de combustíveis mais usuais (BALAT; KIRTAY, 2010; SÁ *et al.*, 2014). Adicionalmente, em sua combustão é produzida apenas água como subproduto (KOTAY; DAS, 2008; MATHEWS; WANG, 2009; SÁ *et al.*, 2014).

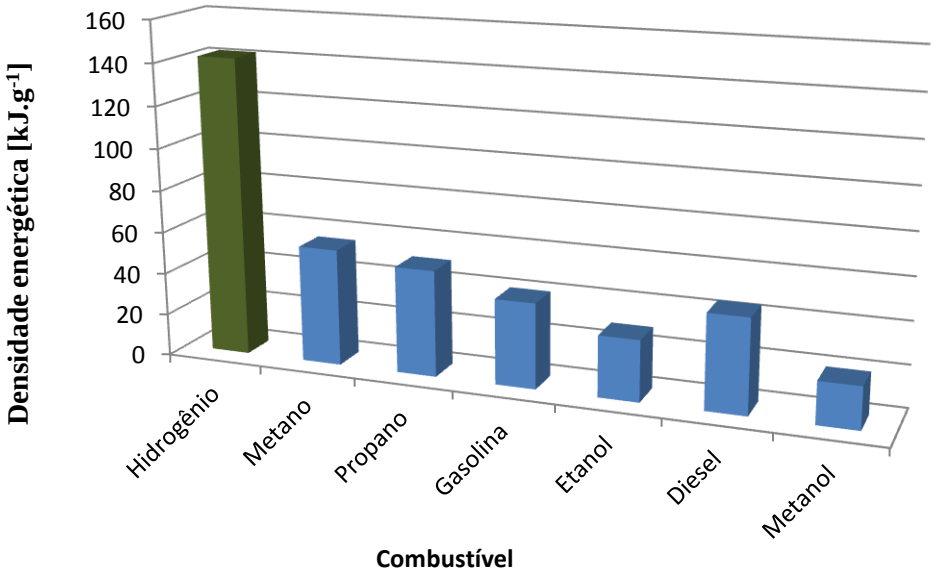

Figura 5. Densidade energética do hidrogênio frente aos combustíveis mais utilizados atualmente. Adaptado de Santos e Santos (2005) (CATALUÑA *et al*, 2008; Santos; Santos, 2005).

Os principais setores responsáveis pelo consumo global de H_2 são as indústrias de fertilizantes, para produção de amônia, e as indústrias químicas/refinarias de petróleo, para produção e melhoramento de combustíveis. Adicionalmente, esse gás é utilizado pelas indústrias eletrônica, na fabricação de semicondutores, siderúrgica e alimentícia, para produção de gorduras hidrogenadas (CHAUBEY *et al.*, 2013).

Segundo Hosseini e Wahid (2016), os recursos renováveis irão corresponder a 36% e 69% do total da demanda de energia global em 2025 e 2050, respectivamente, com o hidrogênio sendo responsável por uma contribuição energética de 11% em 2025 e 34% em 2050. Portanto, o hidrogênio biológico será um combustível potencialmente importante no futuro para atender a esta demanda (EHTESHAMI; CHAN, 2014; HOSSEINI; WAHID, 2016; VAN MARIS *et al.*, 2007).

No Brasil, o Ministério de Minas e Energia vem se empenhando para planejar a estruturação da economia do hidrogênio no país. No entanto, a inserção comercial de H_2, como combustível e fonte de energia, é prevista para depois de 2030 (MOREIRA *et al.*, 2013). Para esta tecnologia se tornar uma realidade para o setor de energia, existem diversas barreiras a serem vencidas. É necessário aperfeiçoar a infraestrutura de manuseio e distribuição desse combustível (LEE *et al.*, 2006) garantindo assim a manutenção da relação custo/eficácia, e elaborar uma estratégia sustentável para promover a aceitação do consumidor (SOLOMON ; BANERJEE, 2006).

Para a produção de H_2, podem ser utilizadas tanto fontes renováveis quanto não renováveis que contenham átomos de hidrogênio em sua composição, tal como combustíveis fósseis, água e biomassa, como pode ser observado na Figura 6 (LAMTEC, 2014; PAGE; KRUMDIECK, 2009; SÁ *et al*., 2014; SOUZA, 2009). A produção mundial total do gás hidrogênio representa cerca de 2% da demanda de energia primária (SOUZA, 2012), sendo mais de 90% dessa produção oriunda de combustíveis fósseis (DA SILVA *et al.*, 2017; EWAN; ALLEN, 2005).

Apesar da existência de diversas matérias-primas potenciais, quase metade do H_2 utilizado no mundo é oriundo da reforma a vapor de gás natural, que é a rota mais economicamente favorável (SOUZA, 2012). Este processo envolve uma reação do gás natural com vapor de água em altas temperaturas, usando uma superfície de platina como catalisador, de forma a separar os átomos de hidrogênios presentes no metano, tendo como subprodutos CO e CO_2 (KAPDAN ; KARGI, 2006).

Outra rota ainda muito utilizada é a produção via oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados (SOUZA, 2009). Nesse processo, o combustível reage com uma quantidade limitada de oxigênio e parte dele sofre total combustão, liberando uma grande quantidade de energia capaz de elevar a temperatura para 1300-1500 °C. Após todo o consumo do oxigênio, a energia liberada nessa primeira reação é usada para a

segunda etapa de reações, em que o hidrocarboneto que não foi consumido reage com os produtos da primeira etapa (H_2O e CO_2), formando CO e H_2 (SOUZA, 2012).

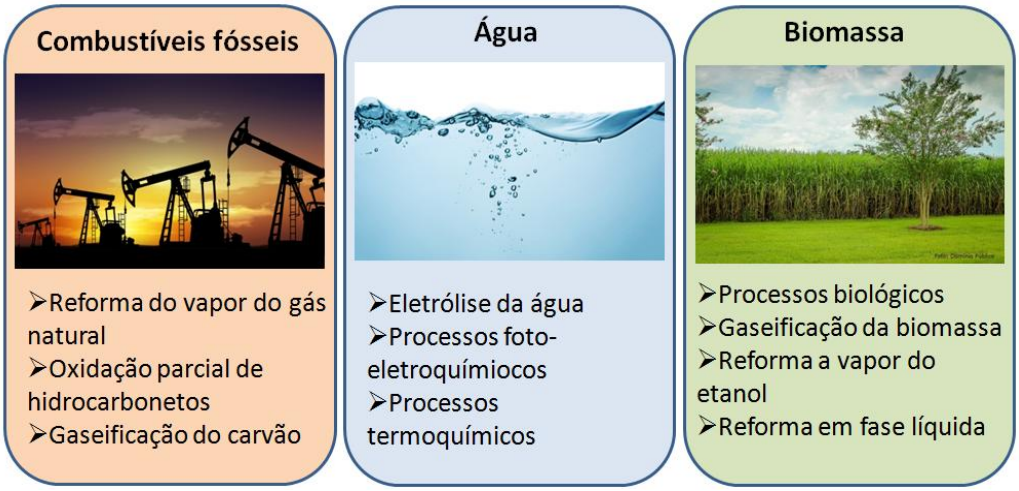

Figura 6. Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Figura modificada a partir de SÁ *et al*. (2014).

A água pode ser utilizada para produção de H_2 através da eletrólise, um método muito conhecido para produção do gás (PALHARES *et al.*, 2018). Este processo consiste na quebra da molécula de H_2O em H_2 e O_2 com a passagem de eletricidade, apresentando um rendimento de 95%, porém com um investimento energético muito elevado. Por isso, estima-se que apenas cerca de 5% da produção mundial de hidrogênio utilize este processo (SANTOS; SANTOS, 2005).

Outra possibilidade de utilização da água como substrato para a produção de H_2 é através do emprego de microrganismos em processos biológicos (DA SILVA *et al.*, 2017; HALLENBECK; GHOSH, 2009), como biofotólise direta, biofotólise indireta e foto-fermentação. A biofotólise direta costuma ser realizada por algas verdes na ausência de oxigênio e consiste na decomposição da água, havendo formação de H_2. Já a biofotólise indireta é realizada por cianobactérias, que utilizam a energia dos carboidratos, formados a partir da fotossíntese, para a produção de H_2. No processo foto-fermentativo, a energia luminosa é utilizada por bactérias púrpuras não sulfurosas para transformar ácidos orgânicos em H_2 e CO_2 (ARGUN; KARGI, 2010; SÁ *et al*., 2014).

Outra rota biológica, conhecida como fermentação anaeróbia, utiliza bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, tais como *Clostridium*, *Escherichia* e *Enterobacter*, para conversão de diversos substratos em H_2, CO_2 e outros subprodutos em um processo que independe de luz (BRENTNER *et al.*, 2010). Alguns grupos de pesquisa sugerem que a integração dos processos de fermentação anaeróbia e foto-fermentação poderia

resultar em uma melhor utilização do substrato e um maior rendimento de H_2 (RAI; SINGH, 2016). Os principais métodos com as suas respectivas vantagens e desvantagens estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Principais métodos biológicos para produção de biohidrogênio, suas vantagens/desvantagens e microrganismos envolvidos (SÁ *et al*., 2014).

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Microrganismos	Referências
Biofotólise direta	Produção de H_2 a partir da água; Não necessita de ATP	Necessita de iluminação constante; Inibição das hidrogenases pelo O_2	*Chlamydomonas reinhardii* *Platymonas subcordiformis*	(ARGUN; KARGI, 2010) (RAN *et al.*, 2009)
Biofotólise indireta	Produção de H_2 a partir da água; Habilidade de fixação de N_2 e produção de H_2 pelas nitrogenases; Separação espacial do O_2 e H_2 nas células diferenciadas (heterocistos)	Necessita de iluminação constante; Necessita de biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; Necessidade de ATP pelas nitrogenases; Síntese e manutenção dos heterocistos; CO_2 presente no gás	*Plectonema boryanum* *Anabaena siamensis* *Anabaena variabilis* *Synechocystis sp.* *Cyanothece sp.* *Nostoc sp.*	(HUESEMANN *et al.*, 2010) (KHETKORN, 2010) (BERBEROĞLU; JAY; PILON, 2008) (NAVARRO *et al.*, 2009) (MIN; SHERMAN, 2010) (YOSHINO *et al.*, 2007)
Foto-fermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias fotossintéticas	Necessita de iluminação; Necessita de biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; CO_2 presente no gás	*R. palustris* *Rhodobacter sp.* *Rhodobacter sphaeroides* *Rhodobacter capsulatus*	(SUWANSAARD *et al.*, 2010) (KAWAGOSHI *et al.*, 2010) (ZHU, ZHINAN *et al.*, 2010) (OBEID *et al.*, 2010)
Fermentação anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado; Não há limitações com relação ao O_2	Necessita de tratamento do efluente após fermentação; CO_2 presente no gás	*Clostridium sp.* *Clostridium butyricum* *Clostridium beijerinckii* *Citrobacter freundii* *Enterobacter cloacae* *Enterobacter aerogenes* *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*	(KAMALASKAR *et al.*, 2010) (TAI *et al.*, 2010) (SKONIECZNY;, 2009) (BECKERS *et al.*, 2010) (MANDAL; NATH, 2006) (JAYASINGHEARACHCHI *et al.*, 2009) (GHOSH; HALLENBECK, 2009) (NIU *et al.*, 2010)

De forma a suprir a futura necessidade de hidrogênio e reduzir os custos de produção, os recursos renováveis, tais como resíduos agroindustriais e lignocelulósicos, têm sido utilizados amplamente para a produção desse gás através da digestão anaeróbia (BHARATHIRAJA *et al.*, 2016). Existem ainda poucas informações sobre a viabilidade econômica do processo de fermentação anaeróbia e a maioria dos trabalhos de avaliação abordaram a produção em escala de laboratório. Assim, para a produção de H_2 em escalas maiores e comerciais, o custo de produção deve ser avaliado de uma perspectiva abrangente do ciclo de vida e da cadeia de fornecimento, levando-se em conta todos os custos diretos de produção, como tributação, depreciação, aluguel, seguro, administração e despesas, e custos indiretos, como despesas brutas de financiamento, pesquisa e desenvolvimento, distribuição e marketing (DINCER; ZAMFIRESCU, 2012).

Sathyaprakasan e Kannan (2015) relataram uma avaliação econômica em diversas produções biológicas baseando-se no tipo e quantidade de microrganismos, configuração do reator, capital e custos operacionais. Foi observado que o custo da matéria-prima contribuiu para 88% do custo total de produção de H_2 em fermentação anaeróbia com glicose como substrato. Portanto, a utilização de resíduos como matéria-prima, tal como a semente de açaí, pode reduzir significativamente o custo de produção de H_2 (SUWANSAARD *et al.*, 2010). Um segundo estudo foi realizado por James e colaboradores (2009), que estimaram o custo do hidrogênio usando um sistema de fermentação do hidrolisado obtido a partir do resíduo lignocelulósico do processamento de palha de milho. O processo envolveu as seguintes etapas: pré-processamento da matéria-prima, hidrólise, sacarificação, fermentação, separação sólido/líquido e separação do gás hidrogênio. Foi aferido que o custo de produção, a partir do material lignocelulósico através do processo de fermentação anaeróbia, foi de US$ 4,33 por kg de H_2, o que seria um custo interessante comparado aos outros processos biológicos (JAMES; BAUM; PEREZ, 2009).

2.3 O processo de digestão anaeróbia aplicado à produção de hidrogênio

2.3.1 Aspectos gerais da digestão anaeróbia

A produção biológica de hidrogênio pelo processo de digestão anaeróbia tem ganhado destaque entre os sistemas biológicos para produção deste gás. A digestão anaeróbia é a estratégia biológica que produz a maior quantidade m H_2 em relação às

demais e permite a utilização de diversos tipos de biomassas como matéria-prima (SÁ *et al.*, 2014). Outras vantagens deste processo são as condições de operação, uma vez que este é conduzido a temperaturas mais brandas, a pressão ambiente e faz uso de reatores mais simples e independentes de luz, com consequente menor demanda energética (BALAT; KIRTAY, 2010; DAS 2001; SÁ *et al.*, 2014).

Diversos organismos participam da produção de H_2, tais como microrganismos anaeróbios estritos, como os pertencentes ao gênero *Clostridium*, e bactérias anaeróbias facultativas, como *Escherichia coli* (LI; FANG, 2007). Existem diversos estudos que exploraram o uso de culturas simples para produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos (LIN *et al.*, 2007, GHIMERE, *et al.*, 2015; DE SÁ *et al.*, 2014), sendo os gêneros *Clostridium* e *Enterobacter* os mais utilizados pela literatura. As espécies do gênero *Clostridium*, como *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum* e *C. pasteurianum*, são gram-positivas, em forma de bastonete, anaeróbias e formadoras de endosporos, enquanto as do gênero *Enterobacter*, como *E. cloacae* e *E. aerogenes*, são gram-negativas, em forma de bastão e anaeróbias facultativas (LI, CHENLIN; FANG, 2007). *E. cloacae* e *E. aerogenes* podem produzir hidrogênio anaerobicamente com altos rendimentos, de 2,2 $mol_{H2}/mol_{glicose}$ (KUMAR; DAS, 2000), mas a maioria dos estudos utiliza bactérias do gênero *Clostridium* por estas apresentarem rendimentos de hidrogênio superiores (2,8 $mol_{H2}/mol_{glicose}$) (LIN *et al.*, 2007). A Tabela 2 apresenta diversas culturas puras utilizadas na literatura com exemplos de substratos simples, já que o hidrolisado ácido de semente de açaí possui açúcares simples em sua composição.

As culturas puras são conhecidas por apresentarem rendimentos mais elevados que culturas mistas, porém elas possuem desvantagens, como a necessidade de esterilização rigorosa e de manutenção de meios anaeróbicos, resultando em um alto custo de processo na escala industrial (KUMAR; DAS, 2000). A utilização de culturas mistas facilita o controle e a operação do processo e não requer condições estéreis (GHIMIRE *et al.*, 2015), o que resulta na redução do custo de produção. Populações mistas são mais adaptáveis a diversos estresses e seu uso pode resultar em um aumento do rendimento de H_2 devido a uma atuação em sinergia (FABER *et al*, 2016; WANG; WAN; WANG, 2008; WONG; WU; JUAN, 2014).

Esses consórcios microbianos podem ser obtidos de diversas fontes, tais como lodo anaeróbio (MORIMOTO *et al.*, 2004; ZHU; BÉLAND, 2006), microflora natural de organismos (CAI *et al.*, 2009), solo (LOGAN *et al.*, 2002) e compósitos orgânicos

(FAN, *et al.*, 2004). Independentemente da origem, estes podem ser utilizados para a fermentação de açúcares simples, como glicose e sacarose (MU *et al.*, 2006), ou de substratos complexos, como resíduos de alimentos, ácidos graxos e misturas de cervejaria (CHEN *et al.*, 2005). Essa versatilidade é consequência da capacidade da comunidade de hidrolisar substratos complexos e gerar hidrogênio de forma eficiente a partir de uma ampla diversidade de produtos liberados durante o processo (PARK *et al.*, 2005a).

Tabela 2. Culturas puras descritas na literatura para a produção de H_2 a partir de glicose e manose

Inóculo	Substrato	Modo de condução	$mol_{H2}/mol_{substrato}$	Temp (°C)	Referência
Clostridium beijerinckii	Glicose	Batelada	2,81	35	(LIN *et al.*, 2007)
Clostridium butyricum	Glicose	Batelada	2,29	35	(LIN *et al.*, 2007)
Clostridium acetobutylicum	Glicose	Batelada	1,80	35	(LIN *et al.*, 2007)
Clostridium tyrobutyricum	Glicose	Batelada	1,47	35	(LIN *et al.*, 2007)
Clostridium pasteurianum	Glicose	Contínuo	2,16	37	(HEYNDRICKX *et al.*, 1990)
Clostridium sp.	Glicose	Contínuo	2,36	36	(TAGUCHI *et al.*, 1992)
Enterobacter cloacae	Glicose	Batelada	2,20	36	(KUMAR; DAS, 2000)
Enterbacter aerogenes	Glicose	Batelada	1,00	35	(YOKOI *et al.*, 1995)
Clostridium butyricum	Glicose	Batelada	3,10	37	(HU *et al.*, 2013)
Enterobacter aerogenes	Manose	Batelada	2,62	37	(REN, YUNLI *et al.*, 2009)
Thermoanaerobacterium aotearoense	Manose	Batelada	1,86	55	(LAI et al., 2014)

O consórcio de microrganismos é constituído por uma população de diversas espécies, como as pertencentes aos gêneros *Clostridium* (FANG *et al.*, 2002), *Enterobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Thermoanaerobacterium*, *Ethanoligenens*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, entre outros (WONG *et al.*, 2014). Na Tabela 3 são apresentados os principais produtores e consumidores de hidrogênio relatados na literatura.

Tabela 3. Exemplos de microrganismos produtores e consumidores de H_2 (WONG; WU; JUAN, 2014)

Organismos	Função	Características	Referências
Clostridium spp. *Ex. C. butyricum, C. acetobutylicum, C. tyrobutyricum, C. saccharolyticum*	Produção de H_2	Anaeróbios obrigatórios e mesofílicos; São os produtores de H_2 mais conhecidos; Fermentam diversos carboidratos	(ADAV *et al.*, 2009; BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2005)
Thermoanaerobacterium spp *Ex. T. thermosacchalyticum*	Produção de H_2	Anaeróbios obrigatórios e termofílicos	(O-THONG; PRASERTSAN; BIRKELAND, 2009)
Ethanoligenens spp. *Ex. Ethanoligenens harbinens*	Produção de H_2	Anaeróbios obrigatórios; Produzem solventes durante a produção de H_2	(REN *et al.*, 2008)
Bacillus spp. *Ex. Bacillus megaterium*	Produção de H_2	Anaeróbios facultativos; Podem possuir importantes características, como tolerância a sais	(LIU *et al.*, 2012)
Enterobacter spp. *Ex. Enterobacter aerogenes*	Produção de H_2	Anaeróbios facultativos; Possuem boa tolerância ao estresse oxidativo	(WU *et al.*, 2008)
Klebsiella spp. *Ex. Klebsiella pneumonia*	Produção de H_2	Anaeróbios facultativos; Possuem boa tolerância ao estresse oxidativo	(REN, *et al.*, 2008)
Metanogênicos *Ex Methanobacterium spp., Methanococcus spp.*	Consumo de H_2	Anaeróbios obrigatórios; Utilizam o H_2 para produção de metano	(WHITMAN; BOWEN; BOONE, 2006)
Outros consumidores *Ex . Lactobacillus spp,. Bifidobacterium spp.*	Consumo de H_2	Anaeróbios obrigatórios e facultativos; Utilizam H_2 como doador e precursor para compostos metabólicos	(BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009)

A digestão anaeróbia de matéria orgânica utilizando o lodo anaeróbio como inóculo costuma ser representada em quatro etapas, conforme apresentado na Figura 7: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Inicialmente, os organismos hidrolíticos produzem enzimas extracelulares que degradam materiais particulados complexos, que, por sua vez, se tornam permeáveis às membranas celulares. A etapa seguinte é denominada acidogênese, em que organismos metabolizam os produtos da hidrólise, convertendo-os em ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 e H_2. Esta etapa é conhecida pela ocorrência da maior parte do crescimento microbiano. Na fase acetogênica, ocorre a oxidação dos produtos gerados na acidogênese, resultando na produção de H_2, CO_2 e acetato. Nesta etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. Por fim, as arqueas metanogênicas convertem H_2, CO_2 e ácido acético em CH_4 e CO_2. Dependendo do substrato utilizado, as arqueas metanogênicas podem ser divididas em dois tipos: metanogênicas acetoclásticas, que utilizam o ácido acético como substrato, e metanogênicas hidrogenotróficas, que utilizam o hidrogênio como substrato. Por fim,

outros tipos de bactérias, conhecidas como redutoras de nitrato e redutoras de sulfato, são capazes de utilizar o H_2 para formação de amônia e sulfeto; contudo, esses organismos necessitam da presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo (CHERNICARO, 2007; SÁ *et al*., 2014).

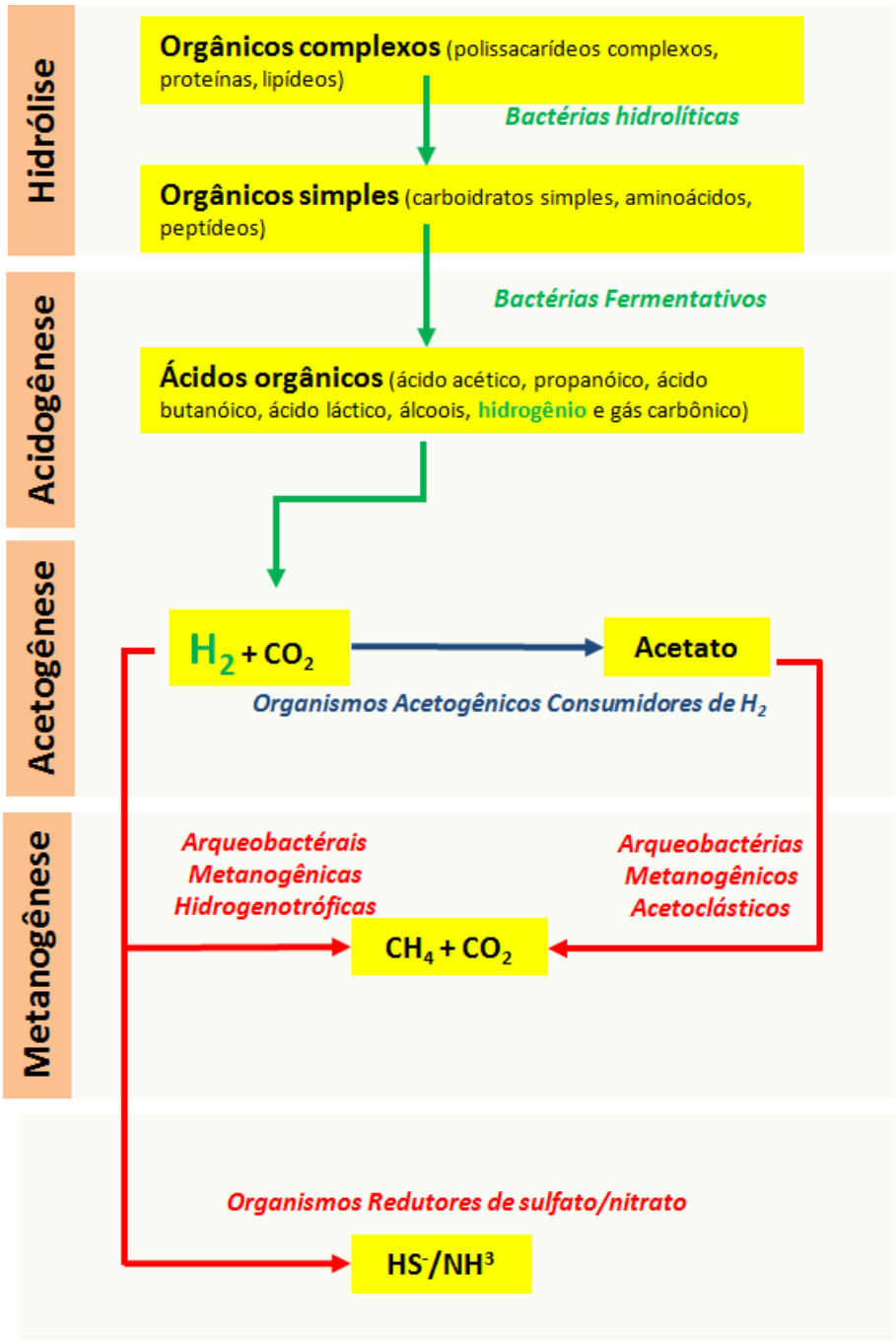

Figura 7. Representação esquemática das principais etapas do processo de fermentação anaeróbia (Adaptado de Machado, 2016).

Os microrganismos produtores de hidrogênio podem converter a glicose, e outros açúcares, em piruvato através da via glicolítica, tal como pode ser observado na Figura 8. O piruvato é oxidado a acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono (CO_2) e H_2 pelas enzimas piruvato ferredoxina redutase e hidrogenase. O H_2 é produzido, pois os prótons (H^+) atuam como aceptores de elétrons para neutralizar elétrons gerados pela oxidação de substratos orgânicos (DEBABRATA ; VERIZOGLU, 2008; WANG ; WAN, 2009b).

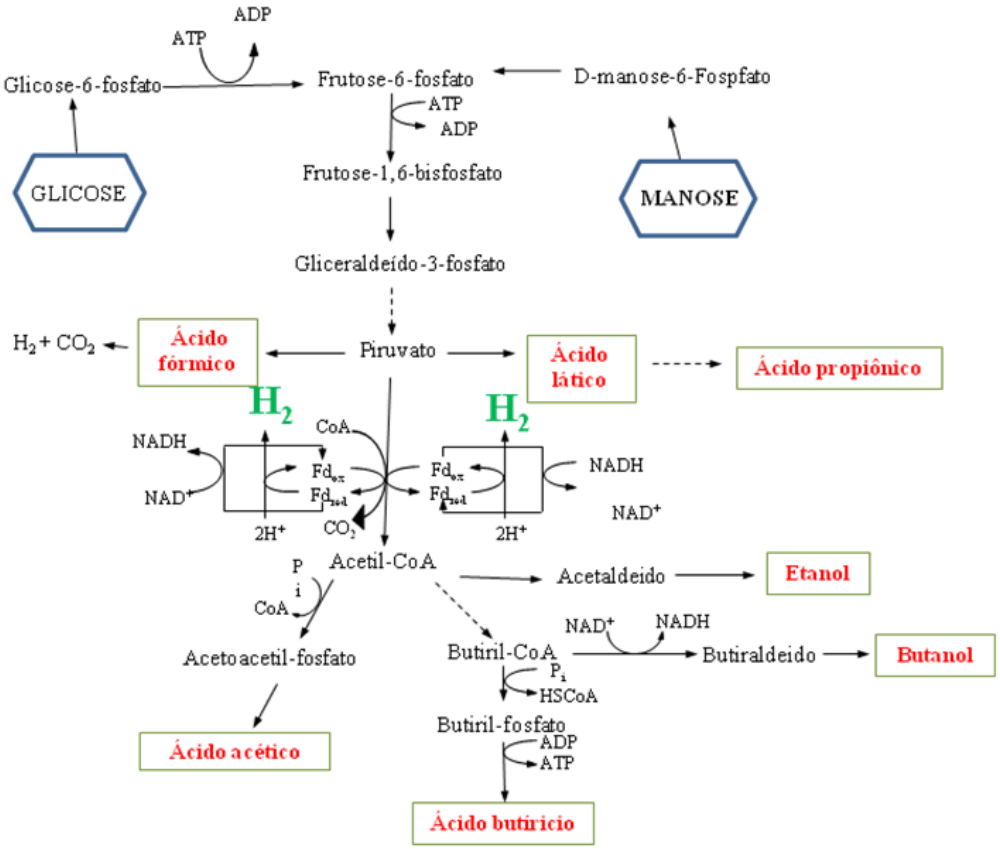

Figura 8. Principais rotas do metabolismo de glicose e manose por *Clostridium spp.* Figura modificada (LEE, 2008).

Diversos produtos podem ser formados durante a digestão anaeróbia, sendo o ácido butírico e o ácido acético os subprodutos mais frequentes (HAWKES *et al.*, 2007). Na via que culmina na produção de ácido acético, é observada uma relação de quatro mols de H_2 produzidos para cada mol de glicose consumido. Quando o produto final é o ácido butírico, observa-se uma menor relação, em que são produzidos dois mols de H_2 para cada mol de glicose consumido. No entanto, Guo e colaboradores (2013) mostraram que a relação entre os ácidos butírico e acético produzidos e o H_2 produzido pode ser modificada devido à ação de bactérias homoacetogênicas. Estas

bactérias podem provocar a diminuição da concentração de H_2, transformando-o em acetato pela utilização de gás carbônico como substrato (GUO, *et al*., 2013).

Sob certas condições, as vias metabólicas podem levar também à produção de etanol concomitante à geração de acetato, resultando em uma estequiometria menor, de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose. O piruvato pode também ser convertido a acetil-CoA e ácido fórmico, os quais podem ou não ser futuramente convertidos em H_2 e CO_2. Adicionalmente, algumas rotas podem resultar em ácido lático ou ácido propiônico sem geração de H_2 (LI ; FANG, 2007). As principais vias estão representadas na Figura 9.

(Eq. 1) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow \overset{\text{(Ácido acético)}}{2CH_3COOH} + 2CO_2 + \mathbf{4H_2}$

(Eq. 2) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow \overset{\text{(Ácido butírico)}}{CH_3CH_2CH_2COOH} + 2CO_2 + \mathbf{2H_2}$

(Eq. 3) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow \overset{\text{(Etanol)}}{CH_3CH_2OH} + \overset{\text{(Ácido acético)}}{CH_3COOH} + 2CO_2 + \mathbf{2H_2}$

(Eq. 4) $C_6H_{12}O_6 + \mathbf{2H_2} \rightarrow \overset{\text{(Ácido propiônico)}}{2CH_3CH_2COOH} + 2H_2O$

(Eq. 5) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow \overset{\text{(Etanol)}}{2CH_3CH_2OH} + 2CO_2$

(Eq. 6) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow \overset{\text{(Ácido lático)}}{CH_3CHOHCOOH} + 2CO_2$

Figura 9. Estequiometria das principais reações envolvidas na digestão anaeróbia (GHIMIRE *et al.*, 2015).

Considerando as reações apresentadas na Figura 9, a produção real de hidrogênio é sempre menor que a produção teórica (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; NATH 2004). Portanto, a comercialização de H_2 produzido através da fermentação anaeróbia exige uma compreensão clara dos vários mecanismos que podem reduzir sua produtividade e o seu rendimento e o estudo de soluções para esses gargalos, como o pré-tratamento do inóculo (ELBESHBISHY *et al.*, 2017).

2.3.2 Pré-tratamentos do lodo anaeróbio para culturas mistas

Visando selecionar os microrganismos produtores de H_2 em detrimento daqueles que consomem este gás de interesse, pré-tratamentos de lodos anaeróbios de estações de tratamento de esgoto (ETE) são comumente empregados. O princípio do pré-tratamento consiste em eliminar os organismos consumidores de hidrogênio pela imposição de alguma condição adversa. Estes microrganismos são mais suscetíveis a certas condições

por não serem formadores de esporos, ao contrário dos microrganismos produtores de H_2 (FALOYE *et al.*, 2014; MU *et al.*, 2007; REN, *et al.*, 2008; WONG, 2014).

Os métodos de pré-tratamento são divididos em físicos e químicos, e alguns destes estão exemplificados na Tabela 4. Os pré-tratamentos físicos podem realizados utilizando temperaturas elevadas, ultrasonicação, irradiação ultravioleta, aeração e congelamento/descongelamento, enquanto os pré-tratamentos químicos estão relacionados a variações de pH e ativação/inibição química. A seleção do pré-tratamento é muito importante, pois a população microbiana presente no lodo anaeróbio reage de forma diferente em relação ao tipo de estresse que será provocado (WONG; WU; JUAN, 2014).

Tabela 4. Produções de hidrogênio reportadas na literatura para processos empregando diferentes tipos de condições de pré-tratamento do inóculo (ETE - Estação de tratamento de esgoto).

Inóculo	Substrato	Rendimento ($mol_{H2}/mol_{açúcar}$)	Condição de pré-tratamento	Referência
Lodo de ETE	Glicose	2,38	100 °C, 15 min	(WANG; WAN, 2008a)
Lodo de ETE	Glicose	2,30	65 °C, 30 min	(BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008)
Lodo de ETE	Glicose	1,95	95 °C, 30 min	(BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008)
Lodo de ETE	Glicose	1,03	Ultrasonicação, 20 min	(ELBESHBISHY; HAFEZ; NAKHLA, 2010)
Lodo de ETE	Glicose	0,7	Aeração, 24 horas	(CHANG; LI; LIU, 2011)
Água de zona entre-marés	Glicose	~0,15	Congelamento/ descongelamento	(LIU *et al.*, 2009)
Lodo anaeróbio de produção de etanol	Glicose	1,7	Adição de ácido linoleitoco	(CHANG; LI; LIU, 2011)
Lodo ativado de ETE	Glicose	1,51	Tratamento ácido	(NAGARAJAN *et al.*, 2017)
Lodo de ETE	Glicose	2,19	pH 2,0, 1 hora	(SÁ, 2011)
Lodo de ETE	Galactose	2,23	100 °C, 30 min	(XIA *et al.*, 2016)
Lodo de ETE	Frutose	1,68	Tratamento ácido	(LEE, e*t al.*, 2007)
Lodo de ETE	Frutose	2,09	pH 2,0, 1 hora	(SÁ et al., 2011)

2.3.2.1 Pré-tratamento térmico do inóculo

O pré-tratamento físico mais comum é o térmico (WONG; WU; JUAN, 2014), sendo este um método simples para eliminar organismos consumidores de hidrogênio. O desafio do pré-tratamento térmico é identificar a melhor temperatura e duração para aumentar o rendimento de H_2, pois existem diversas combinações possíveis desses parâmetros, como pode ser observado na Figura 10. Entre as condições de pré-tratamento térmico testadas na literatura, as mais promissoras foram em 65 °C por 30 min (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008) e 100 °C por 15 min (WANG, JIANLONG; WAN, 2008a). Esses resultados sugerem que baixas temperaturas requerem um pré-

tratamento mais longo, e alta temperaturas requerem um tempo mais curto, de forma a se obter uma melhoria na produção de H_2. Adicionalmente, o pré-tratamento por longas durações e altas temperaturas pode ser letal para os organismos produtores de hidrogênio, reduzindo a produção de H_2 (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008; WONG; WU; JUAN, 2014).

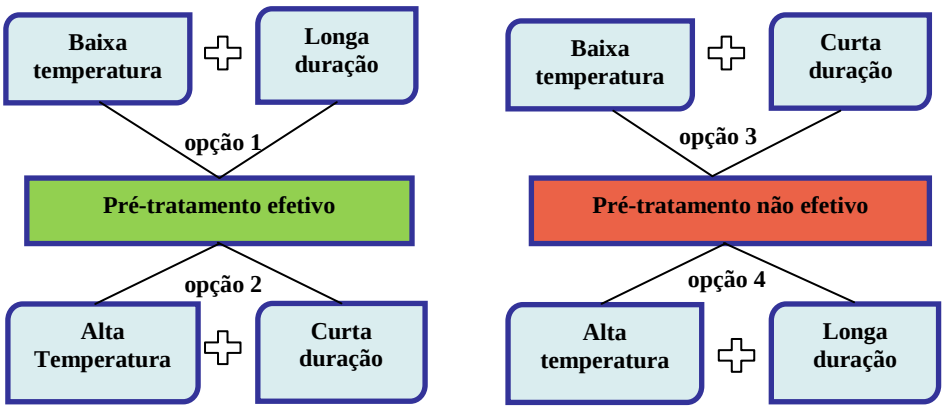

Figura 10. Relação entre a temperatura de pré-tratamento do inóculo e o tempo de execução. Pré-tratamento efetivo: realizado a partir da combinação de temperatura baixa com longo duração (opção 1) ou alta temperatura com baixa duração (opção 2). Pré-tratamento não efetivo: ocorre da combinação de baixa temperatura com curta duração (opção 3) ou alta temperatura com duração prolongada (opção 4). Modificado de WONG; WU; JUAN (2014).

Em um estudo de Baghchehsaraee e colaboradores (2008), foi observado que o pré-tratamento utilizando 65 °C resultou em maiores rendimentos de hidrogênio (2,3 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$), bem como em maiores taxas de produção de hidrogênio em lodo anaeróbico. Em contrapartida, pré-tratamentos com temperaturas mais elevadas resultaram em menores rendimentos e menores taxas de produção de hidrogênio e maiores produções de acetato e butirato. Em testes utilizando um inóculo pré-tratado a 95 °C, a produção de hidrogênio foi reduzida e as vias metabólicas se deslocaram para produção de ácido láctico. Os autores também observaram a redução significativa da diversidade das comunidades microbianas em maiores temperaturas (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008).

2.3.2.2 Outros pré-tratamentos do inóculo

Além do pré-tratamento térmico, existem outros pré-tratamentos físicos que são constantemente avaliados na literatura. Na ultrasonicação, por exemplo, são utilizadas ondas de som para eliminar bactérias consumidoras de hidrogênio. Este método destrói

as paredes celulares das bactérias; porém, para evitar danos em organismos que produzem hidrogênio, o tempo de duração e a intensidade devem ser controlados (GUO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Adicionalmente, as ondas quebram as partículas do lodo em tamanhos menores, aumentando a interação entre organismos produtores e seus substratos. Contudo, o máximo rendimento reportado para esse método foi de apenas 1,03 $mol_{H2}/mol_{glicose}$ (KHANAL ; GREWELL, 2007).

Outro pré-tratamento empregado é a irradiação ultravioleta, que possui ação microbicida, eliminando organismos consumidores e aumentando em 0,39 vezes a produção quando comparada à obtida com o lodo não tratado. Contudo, o UV pode ser utilizado de forma eficiente apenas em partículas de lodo pequenas e de cores claras. Visto que organismos consumidores de H_2 podem estar em partículas grandes e escuras, estes são por muitas vezes protegidos da radiação, reduzindo a eficácia do método (LOGE *et al*., 1999).

O método de pré-tratamento por aeração aplica um estresse oxidativo nas bactérias consumidoras de H_2 com foco na eliminação de organismos metanogênicos, que são sensíveis à ação do oxigênio. Todavia, o estresse oxidativo também danifica organismos anaeróbios obrigatórios produtores de H_2, reduzindo a eficácia do tratamento e resultando em uma baixa produção (0,7 $mol_{H2}/mol_{glicose}$). Portanto, esse método não é eficiente para enriquecimento do lodo anaeróbio (KAPDAN; KARGI, 2006).

Outro pré-tratamento físico pouco efetivo é o congelamento e descongelamento do lodo, que apresenta um rendimento baixo de 0,15 $mol_{H2}/mol_{glicose}$. Este rendimento reduzido é decorrente da lise tanto de organismos produtores quanto de consumidores de hidrogênio (FENG *et al.*, 2010).

Em relação aos tratamentos químicos, a variação de pH é o método mais comumente utilizado para enriquecer o lodo de organismos produtores de H_2. Esse procedimento envolve o ajuste de pH do lodo para valores extremos, como 3 ou 12, o que acarreta a eliminação dos organismos consumidores de hidrogênio (CHANG; LI; LIU, 2011; ELBESHBISHY; HAFEZ; NAKHLA, 2010; LIU *et al.*, 2009). O pré-tratamento ácido é mais efetivo do que o pré-tratamento alcalino, sugerindo que organismos produtores de hidrogênio são mais suscetíveis a valores de pH elevados (MISHRA *et al.*, 2016; WHITE *et al.*, 2006).

Outro método utilizado é conhecido como ativação e inibição química. Esse tratamento consiste na utilização de meios reacionais que estimulem o crescimento de organismos específicos da cultura mista (O-THONG *et al.*, 2009) ou que promovam sua inibição. Essa última pode ser alcançada pelo uso de compostos tóxicos, como clorofórmio ou 2-bromoetanosulfato, que são capazes de inibir os organismos consumidores (MOHAMMADI *et al.*, 2011; O-THONG; *et al*, 2009). Contudo, esses compostos apresentam uma alta toxidade e periculosidade, tanto para humanos quanto para o ambiente; desta forma, este é um método pouco indicado (WONG; WU; JUAN, 2014).

Além dos métodos tradicionais apresentados, outros pré-tratamentos podem ser empregados. Ausiello e colaboradores (2017), por exemplo, utilizaram uma nova metodologia para a seleção de microrganismos produtores de H_2 em detrimento dos metanogênicos, na qual não foram empregados tratamentos físicos ou químicos do consórcio microbiano. Os autores conduziram um pré-cultivo em meio específico de forma a selecionar as bactérias produtoras por adaptação progressiva do consórcio bacteriano. Neste estudo, foram obtidos rendimentos elevados de até 3,06 $mol_{H2}/mol_{glucose}$, comparáveis ou superiores aos obtidos com pré-tratamentos comumente reportados na literatura em um processo novo de baixo custo (AUSIELLO *et al.*, 2017).

2.3.3 Fatores que influenciam a produção de H_2

O processo de digestão anaeróbia pode ser influenciado por diversas condições que podem afetar a produção de H_2. Estas podem ser parâmetros físico-químicos ou condições operacionais, como temperatura, pH, inóculo, pressão parcial de hidrogênio e modo de operação do reator (SÁ *et al.*, 2014; WANG; WAN, 2009a). Adicionalmente, diversos fatores podem causar inibição do processo fermentativo; estes podem estar presentes desde o começo do processo, tal como a microflora ou o próprio substrato, ou podem ser produzidos durante o processo de digestão anaeróbia (BUNDHOO; MOHEE, 2016).

2.3.3.1 Íons metálicos

Diversos íons metálicos em baixas concentrações podem estimular o crescimento celular, funcionar como cofatores para enzimas e afetar outros processos metabólicos da digestão anaeróbia. Porém, concentrações elevadas podem resultar em

inibição por vários mecanismos, como variação de pH, ação de agentes quelantes, dificuldade no transporte de nutrientes, acumulação de metais e destruição da membrana (LE; NITISORAVUT, 2015; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

É relatado um grande protagonismo no efeito do ferro, devido à sua importância na atuação da enzima hidrogenase (HAWKES *et al.*, 2002). Já os íons de metais leves, como cálcio, sódio e magnésio, são necessários para o crescimento microbiano e afetam a taxa de crescimento como qualquer outro nutriente (LUONGO *et al.*, 2017). Cao e Zhao (2009) reportaram que a adição de Na^+ melhorou o rendimento de H_2 em cerca de quatro vezes. No entanto, quando a concentração de sódio foi aumentada para 28,70 $g.L^{-1}$, o processo foi inibido e o rendimento de H_2 diminuiu significativamente. Os autores concluíram que a concentração de Na^+ deve ser mantida abaixo de 20 $g.L^{-1}$ de forma a garantir altos rendimento H_2 (CAO, XIANYAN; ZHAO, 2009). O cálcio está presente em bactérias esporulantes, sendo necessário como cofator de alfa-amilase e diversas proteases, além de apresentar um importante papel estrutural em proteínas celulares e em polímeros extra-celulares (LUONGO *et al.*, 2017). O magnésio (Mg^{2+}), por sua vez, é um dos elementos mais abundantes em microrganismos, sendo indispensável para diversas reações celulares e funções e atuando como ativador de quinases e sintetases. No citoplasma, existem dez enzimas envolvidas na glicólise e a maioria necessita de íons de magnésio como cofatores (WANG *et al.*, 2007).

2.3.3.2 Relação entre substrato e inóculo

O controle da concentração de microrganismos durante a fermentação pode resultar em um processo mais eficiente, tanto em termos energéticos quanto operacionais. Adicionalmente, o controle do substrato inicial é essencial, pois uma concentração alta de substrato pode favorecer a germinação e evitar a re-esporulação de microrganismos produtores; se essa concentração for muito elevada, pode ocorrer a formação prematura de ácidos orgânicos, resultando na inibição da produção (GINKEL, 2005; KIM *et al.*, 2006; WANG; WAN, 2008b). Portanto, o controle dessas variáveis é de extrema importância do ponto de vista produtivo (HAFEZ *et al.*, 2010a; KIM *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a relação entre o substrato e a carga de microrganismos é fundamental para evitar fenômenos de inibição, sendo observado que uma alta ou baixa relação entre substrato e inóculo ($DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$) pode reduzir substancialmente o rendimento de H_2 (HAFEZ *et al.*, 2010).

A adição controlada de substrato é eficaz para evitar que o mesmo cause inibição na digestão anaeróbia. No entanto, esta abordagem pode não ser sempre viável para aplicação comercial (SHEN *et al.*, 2010). De uma perspectiva de engenharia, seria mais viável projetar e operar a fermentação baseando-se em uma relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ otimizada do que utilizar uma taxa de adição de substrato (BAKONYI *et al.*, 2014).

2.3.3.3 Temperatura

A temperatura é um fator que pode afetar significativamente a produção de hidrogênio por influenciar a taxa de degradação de substrato, a atividade de enzimas e o metabolismo dos produtores de H_2 (SINHA; PANDEY, 2011; STEYER *et al.*, 2010). Este fator pode até mesmo redirecionar vias metabólicas e selecionar microrganismos (SINHA; PANDEY, 2011). Alguns autores indicam que o aumento da temperatura durante um intervalo de tempo específico pode melhorar significativamente a produção de H_2, uma vez que a temperatura operacional pode suprimir a atividade dos consumidores de H_2, como metanogênicos e homoacetógenos (NATH; DAS, 2004; SAADY, 2013; SINHA; PANDEY, 2011).

De maneira geral, as reações de fermentação podem ser conduzidas em amplas faixas de temperatura: mesofílica (25-40 ºC), termofílica (40-65 ºC), termofílica extrema (65-80 ºC) e hipertermofílica (>80 ^{o}C). O microrganismo *Pyrococcus furiosus*, por exemplo, pode realizar um eficiente metabolismo mesmo em altas temperaturas, como 95 ^{o}C (LEVIN; PITT; LOVE, 2004; SCHUT; ADAMS, 2009).

A temperatura ideal para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis e das condições operacionais do sistema (GUO *et al.*, 2010). Contudo, temperaturas muito elevadas podem inibir os produtores de H_2 através da inativação de enzimas essenciais para o crescimento celular, bem como pela desnaturação de proteínas celulares (SINHA; PANDEY, 2011). Foi observado que diferentes temperaturas podem resultar em uma variação nos subprodutos fermentativos; porém, o motivo para essa alteração pode estar relacionado à utilização de culturas diferentes em cada trabalho avaliado, e não à mudança de temperatura (VALDEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2002). Diversos estudos consideram a faixa mesofílica, de cerca de 35 ºC, a mais indicada por apresentar bons rendimentos e menor gasto energético do que sistemas operando a temperaturas termofílicas (REN *et al.*, 2008).

2.3.3.4 Concentração de nitrogênio, fosfato e sulfato

O nitrogênio é um nutriente essencial para os microrganismos fermentativos (LIN; LAY, 2004; TYAGI *et al.*, 2014). Em contrapartida, uma alta concentração de nitrogênio ou uma baixa relação C/N pode reduzir a produção de H_2 por digestão anaeróbia (ARGUN *et al.*, 2008b). O desbalanço da relação C/N pode ocorrer durante a fermentação, uma vez que os microrganismos fermentativos anaeróbicos consomem carbono de 25 a 30 vezes mais rapidamente do que nitrogênio (KALIL *et al.*, 2008). Adicionalmente, altos níveis de amônia podem inibir a atividade dos produtores de H_2, possivelmente devido a interferência no pH intracelular, aumento da necessidade de energia das células microbianas e inibição da atividades de enzimas responsáveis pela produção de H_2 (BISAILLON; TURCOT; HALLENBECK, 2006; LAY *et al.*, 2005; SALERNO *et al.*, 2006). A digestão anaeróbia normalmente opera a pH ácido, em que a maioria do amoníaco permanece na forma ionizada, que apresenta menor toxidade.

O fosfato é um dos principais nutrientes inorgânicos e funciona como um tampão de pH. Esse nutriente pode modificar o metabolismo microbiano, dependendo da concentração utilizada, e pode apresentar influência no rendimento de H_2 na fermentação anaeróbia. Portanto, manter uma concentração ótima de fosfato no sistema de fermentação pode reduzir a fase lag de crescimento e facilitar a produção de H_2, melhorando a taxa de produção (HAWKES *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2016; LIN; LAY, 2004; ZHOU; ELBESHBISHY; NAKHLA, 2013). Hawkes e colaboradores (2002) recomendaram manter a relação C/P em 130 para uma operação ótima de digestão anaeróbia. No entanto, estudos recentes sugeriram que a concentração de fosfato ideal pode ser influenciada pela presença de outros nutrientes, como íons metálicos, nitrogênio e ferro (OZTEKIN *et al.*, 2008).

Sulfato (SO_4^{2-}) é uma forma comum de enxofre inorgânico que ocorre em muitos resíduos orgânicos utilizados como substrato para fermentação anaeróbia (HWANG *et al.*, 2011). Adicionalmente, este composto pode ser produzido por meio da biodegradação do enxofre contido nos aminoácidos cisteína e metionina (HWANG *et al.*, 2011). Durante a fermentação, o sulfato pode ser reduzido a sulfeto (S^{2-}) por bactérias redutoras de sulfeto sob ambiente anaeróbico. Um alto teor de sulfeto foi identificado como tóxico ou inibitório para os organismos responsáveis pela produção de H_2, podendo também reduzir a biodisponibilidade de nutrientes essenciais, como metais-traço, através da formação de sulfetos metálicos insolúveis (DHAR;

ELBESHBISHY; NAKHLA, 2012). O sulfeto de hidrogênio (H_2S) foi descrito como altamente tóxico para os microrganismos fermentativos. Este componente é capaz de penetrar a membrana dos microrganismos e desnaturar proteínas celulares, formando ligações cruzadas entre cadeias polipeptídicas (BECK *et al.*, 2007). Embora a inibição por sulfeto tenha sido amplamente estudada no processo de digestão anaeróbica para produção de metano (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008), poucas publicações relatam a interferência do mesmo na produção de hidrogênio. Contudo, Dhar e colaboradores (2012) estudaram a toxicidade direta do sulfeto para os produtores de H_2, verificando que concentrações de sulfeto acima de 100 $mg.L^{-1}$ poderiam inibir completamente o processo de digestão anaeróbia. Por outro lado, uma concentração de sulfeto de 25 $mg.L^{-1}$ foi essencial para uma melhor produção de H_2 (DHAR *et al.*, 2012).

2.3.3.5 Pressão parcial de hidrogênio

A pressão parcial de hidrogênio pode influenciar a produção de H_2 em um processo de digestão anaeróbia (GHIMIRE *et al.*, 2015). Um aumento da pressão parcial dificulta a transferência de massa do hidrogênio do líquido para a fase gasosa (BASTIDAS-OYANEDEL *et al.*, 2012; MANDAL; NATH, 2006). Como, no processo de fermentação, a enzima hidrogenase está envolvida na oxidação reversível e na redução da ferredoxina, se a concentração de hidrogênio na fase líquida aumenta, a oxidação de ferredoxina torna-se menos favorável e a redução da ferredoxina ocorre, o que reduz a produção (CHONG *et al.*, 2009; GHIMIRE *et al.*, 2015). É reconhecido que uma alta pressão de hidrogênio inibe as vias metabólicas que culminam na produção de H_2 e favorece a ocorrência de ácido láctico e de alguns solventes, como etanol, butanol e acetona (PLAYNE, 1985). Existe uma gama de estudos focados em diminuir a pressão parcial de H_2 no biorreator de forma a aumentar a síntese de hidrogênio (SÁ *et al.*, 2014; VALDEZ-VAZQUEZ, POGGI-VARALDO, 2009).

2.3.3.6 pH

Diversos trabalhos indicam que o pH ideal para produção biológica de hidrogênio em culturas mistas está situado na faixa de 5 a 7 (GOSTEVA; VORONIN; KARYAKIN, 2007). O pH pode influenciar o processo fermentativo de produção de H_2 principalmente por inibir os organismos metanogênicos, afetar a atividade de hidrogenases e modificar o metabolismo para solventogênese (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). Um meio fermentativo com pH abaixo de 6 pode reduzir a atividade das arqueas metanogênicas (LI *et al.*, 2007). É observado que, em

fermentações com um pH muito baixo ou elevado, há predominância de espécies do gênero *Clostridium*, enquanto que valores próximos à neutralidade favorecem uma maior diversidade microbiana (TEMUDO *et al.*, 2008).

2.3.3.7 Concentração de ácidos orgânicos voláteis

Os ácidos acético e butírico são os principais ácidos orgânicos voláteis gerados durante a produção de gás hidrogênio. Como comentado anteriormente, o acúmulo significativo destes ácidos pode inibir a produção de hidrogênio, possivelmente devido ao estresse iônico ou mesmo à acidificação celular (CIRANNA *et al.*, 2014). Os ácidos podem penetrar a membrana plasmática, liberando prótons dentro da célula e reduzindo o pH. A dissociação de ácidos no citoplasma tem um efeito negativo no metabolismo e no crescimento microbiano (GRUPE; GOTTSCHALK, 1992).

Wang e colaboradores (2008) estudaram várias concentrações de acetato, butirato e propionato (0-300 mM), adicionados externamente. Os autores reportaram que a utilização do substrato e consequente produção de H_2 foram totalmente inibidas com a adição de 300 mM, porém foi observada uma inibição parcial a partir de 50 mM (WANG; WAN; WANG, 2008). Ginkel e Logan (2005) observaram que a adição de 60 mM de ácido acético ou butírico seria responsável pela inibição total da produção de H_2 devido à mudança da via metabólica para a solventogênese. Estes autores também descobriram que os ácidos voláteis produzidos internamente por microrganismos fermentativos seriam mais críticos do que os adicionados em meio reacional, onde uma concentração de 19 mM já poderia inibir a produção de H_2 e desencadear a solventogênese (GINKEL *et al*., 2005).

2.4 Produção sequencial de hidrogênio e metano

Durante a digestão anaeróbia, nem todo substrato é utilizado na produção de hidrogênio, pois uma grande parte é convertida em vários outros metabólitos (REDDY *et al.*, 2014). Essa é uma das principais desvantagens da produção de hidrogênio, principalmente se os produtos gerados não forem recuperados. Os resíduos líquidos de produção de hidrogênio são conhecidos na literatura por HPLW (*hydrogen production liquid waste*) e podem ser convertidos em outros produtos de valor agregado, tal como o metano, através da metanogênese (SU *et al.*, 2009).

O metano é o principal constituinte do gás natural, possui a fórmula química CH_4 e é o alcano mais simples. Por estar presente em uma abundância relativamente alta

no planeta, podendo ser encontrado abaixo do solo, o metano tornou-se um combustível atraente (KHALIL, 1999). Este gás pode ser transportado como um líquido (gás natural liquefeito ou GNL), sendo usado como combustível para fornos, lares, aquecedores de água, automóveis, entre outros (WEINSCHENK, 2016). O metano é utilizado também para a geração de eletricidade em grandes turbinas a gás ou ainda para a geração de vapor. Em comparação com outros combustíveis de hidrocarbonetos, esse gás produz menos dióxido de carbono para cada unidade de calor liberada, sendo considerado mais ecológico do que outros combustíveis fósseis, como gasolina e diesel (CORNELL, 2008).

O metano derivado da digestão anaeróbia é denominado de biometano. A qualidade do biometano é regulamentada pela ANP por meio da Resolução ANP n° 8/2015 e a especificação do produto encontra-se no Regulamento Técnico ANP n° 1/2015, parte integrante da citada resolução. O biometano de procedência qualificada pode ser misturado ao gás natural e comercializado por meio de conexão à rede de distribuição de gás canalizado, ou, então, na forma de gás comprimido (ANP, 2016).

A produção sequencial de metano a partir do HPLW pode ser realizada em um processo relativamente simples, conforme apresentado na Figura 11. Este processo é promissor, pois, além de gerar dois produtos importantes, ainda possui a capacidade de reduzir a carga orgânica, com a redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) durante a produção de metano. Desta forma, possíveis impactos ambientais podem ser minimizados (TÄHTI; KAPARAJU; RINTALA, 2013; THI; LIN; KUMAR, 2015).

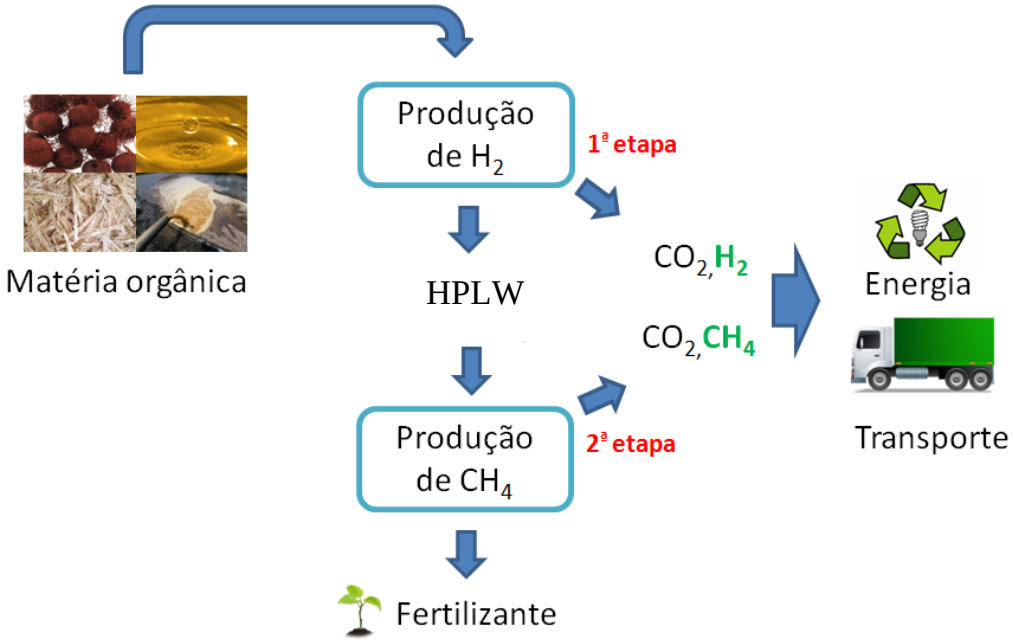

Figura 11. Produção biológica de hidrogênio e metano em duas fases (elaboração própria).

Durante a digestão anaeróbia em duas etapas, o processo de acidogênese e metanogênese operam separadamente, aumentando a estabilidade do processo como um todo e permitindo um controle da fase de acidificação na produção de hidrogênio, impedindo a inibição da população metanogênica durante a fase de produção de metano (YU *et al.*, 2015). Adicionalmente, a produção de hidrogênio culmina na produção dos ácidos acético e butírico, o que é benéfico para o estágio de produção de metano (NUALSRI; REUNGSANG; PLANGKLANG, 2016).

Algumas desvantagens da digestão anaeróbia em dois estágios estão relacionadas a uma maior complexidade e ao custo do aparato operacional, agravadas pela falta de experiência no processo, uma vez que existem poucas unidades comerciais projetadas com essa característica (NASR *et al.*, 2011). No entanto, diversos grupos de pesquisa realizam a produção de metano por processo de fermentação em dois estágios a partir de variados tipos de biomassa. Trevisan e Monteggia (2009), utilizando reatores sequenciais em batelada para tratamento de efluente líquido da suinocultura, obtiveram concentrações de hidrogênio de 7 a 9% no reator acidogênico (TDH de 26 horas) e de 65 a 70% de metano no reator metanogênico (TDH de 60 horas). O sistema apresentou eficiência na faixa de 60 e 69% na remoção da matéria orgânica com DQO inicial variando de 7945,95 a 9257,14 mg L^{-1} (TREVISAN; MONTEGGIA, 2009). Mamimin e colaboradores (2017) realizaram um processo de fermentação em dois estágios de

efluente do moinho de óleo de palma (POME), verificando rendimentos de hidrogênio e metano de 210 e 315 L/kgDQO, respectivamente, e alcançando rendimentos de energia de 15,34 MJ/kgDQO (MAMIMIN; PRASERTSAN; KONGJAN, 2017). Kumari e Das (2016) investigaram o processo de fermentação em dois estágios do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, obtendo rendimentos máximos de hidrogênio e metano de 93,4 e 221,8 mL/gVS, respectivamente. A eficiência de conversão de energia de 44,8% alcançada no processo em duas etapas foi maior que a obtida um único estágio no processo de produção de hidrogênio, de 5,4% (KUMARI; DAS, 2016). Wang e colaboradores (2003) utilizaram uma fermentação contínua em dois estágios para produzir hidrogênio e metano de águas residuais, obtendo rendimentos de hidrogênio e metano de 106 e 340 mL por grama de substrato, respectivamente (WANG *et al.*, 2003). Sitthikitpanya e colaboradores (2017) realizaram o processo em dois estágios utilizando o microrganismo termofílico *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e o hidrolisado obtido do óleo de palma como substrato. O potencial máximo de produção de hidrogênio foi de 2179 $mL_{H2}/L_{substrato}$. O efluente ácido foi utilizado para produzir metano na segunda fase, com um rendimento de metano de 272,4 mL/g de demanda química de oxigênio (DQO). A produção de hidrogênio e metano em duas etapas resultou em um rendimento de energia de 10,6 kJ/g_{DQO} e houve 83% de redução de DQO (SITTHIKITPANYA *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de hidrogênio por digestão anaeróbia dos carboidratos presentes na semente de açaí, obtidos após hidrólise ácida, e utilizar o efluente gerado na produção de H_2 para a obtenção sequencial de metano.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os carboidratos presentes no hidrolisado da semente de açaí;
- Analisar comparativamente o rendimento de hidrogênio em meio sintético contendo manose ou glicose;
- Avaliar comparativamente a produção de H_2 a partir do hidrolisado de semente de açaí (HSA) e de meio sintético que mimetiza o HSA;
- Avaliar os pré-tratamentos ácido e térmico do inóculo e o efeito de diversos tempos de aclimatação do mesmo na produção de H_2;
- Investigar a cinética de produção de H_2 e ácidos acético e butírico a partir da digestão anaeróbia do HSA;
- Avaliar a produção de metano utilizando o efluente da produção de hidrogênio (HPLW).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Um esquema geral das etapas realizadas neste trabalho é apresentado na Figura 10. Na primeira etapa, a utilização da manose como substrato para a produção de H_2 teve como objetivo principal a verificação da viabilidade do bioprocesso anterior ao desenvolvimento do trabalho. Posteriormente, foram realizados experimentos utilizando hidrolisado de semente de açaí para verificar o seu potencial fermentativo na produção de H_2. Por fim, foram concluídas etapas a fim de melhorar o processo de produção de gás hidrogênio e também para produção de metano.

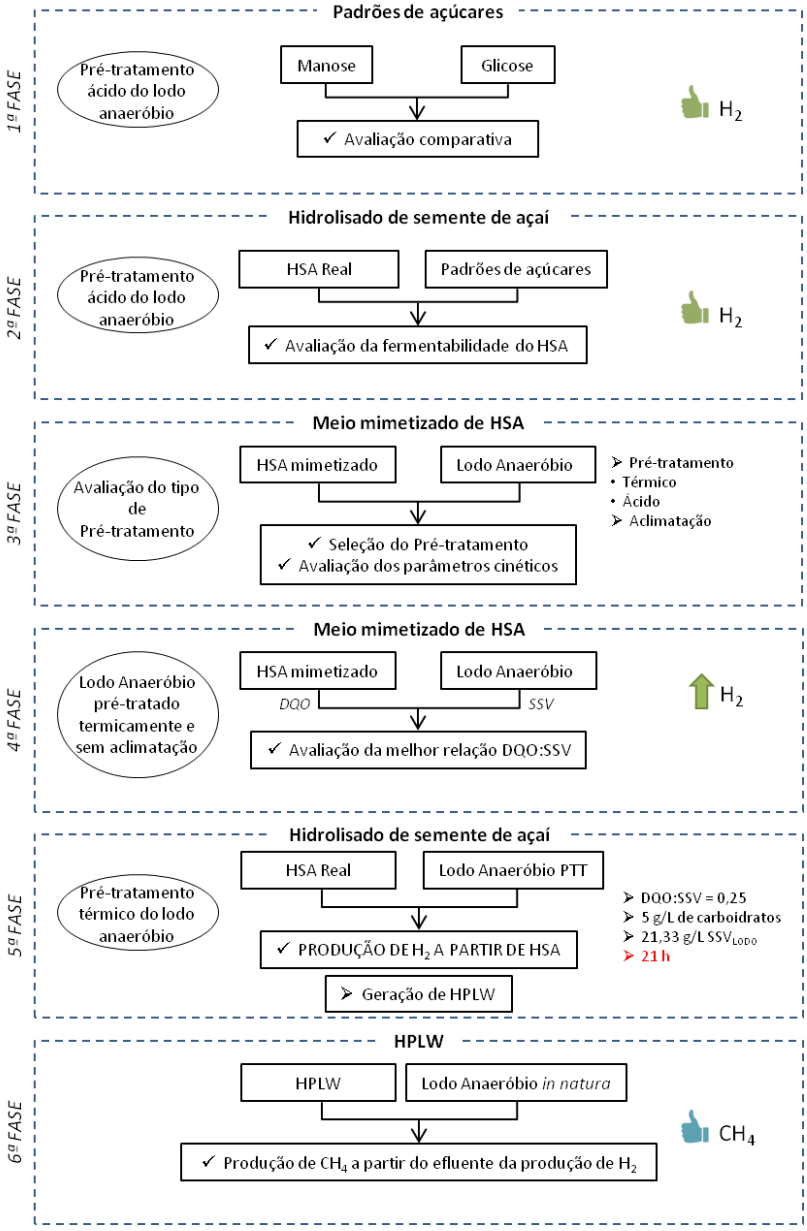

Figura 10. Etapas para produção sequencial de H_2 e CH_4 utilizando hidrolisado de semente de açaí

4.1 Obtenção do hidrolisado de semente de açaí e produção de meio sintético mimetizado.

Para os testes preliminares, foi utilizado o hidrolisado produzido por Medina e colaboradores (2016), que foi produzido com uma solução de H_2SO_4 1,75% (v/v) e uma relação sólido:líquido de 1:1,7. O tempo de residência em autoclave foi de 93 min a 121 ^oC (MEDINA *et al*., 2016). O meio mimetizado continha a composição de carboidratos baseados ao hidrolisado obtido por Medina e colaborados. Porém as condições para obtenção do hidrolisado da semente de açaí utilizada nos outros experimentos desse estudo foram baseadas no trabalho de Silva e colaboradores (SILVA *et al*., 2017). Contudo, os volumes foram adaptados para 100 mL totais em fracos de 1 L de volume. Para tal, 20 g (massa seca) de semente moída foram transferidas para frascos de 1 L nos quais foram adicionados 80 mL de uma solução de H_2SO_4 3,0% (v/v), com o objetivo de se obter uma relação sólido:líquido de 1:4. Os frasco foram incubados em autoclave por 60 min a 121 ^oC. Ao final do tratamento, os frascos foram deixados em banho de gelo por aproximadamente 20 minutos até que atingissem uma temperatura próxima a 20 ^oC. Posteriormente, o conteúdo dos mesmos foi filtrado a vácuo. O hidrolisado obtido foi neutralizado com $CaCO_3$ para posterior caracterização química em cromatografia líquida de alta eficiência e também confirmados utilizando cromatografia de troca iônica de alto desempenho. A Figura 11 exibe uma foto do frasco contendo HSA, podendo ser observado a cor a vermelhada.

Figura 11. Hidrolisado ácido de semente de açaí.

4.2 Inóculo para a produção de H_2 e metano

Neste estudo, foi utilizado como inóculo o lodo anaeróbio proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto localizada no bairro Penha, na cidade do Rio de Janeiro (Latitude: -22.841561, Longitude: -43.2399822). Durante o estudo, foram coletados três lotes de lodo, que serão chamados de lodo 1, lodo 2 e lodo 3. Os lotes foram armazenados em recipientes plásticos de 2 L e preservados em câmara fria a 4 ^{o}C (KIM *et al.*, 2012). As determinações de sólidos suspensos (SS) e demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas de acordo com as normas recomendadas por métodos oficiais (APHA, 1998). A concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) foi utilizada para padronizar o inóculo. Essa medida corresponde à fração de sólidos suspensos totais que se perdem após calcinação em mufla a 600 °C; para lodos biológicos, a concentração de SSV é comumente relacionada à quantidade de biomassa microbiana presente neste material (CHERNICARO, 2007).

4.3 Pré-tratamento do lodo anaeróbico

4.3.1 Pré-tratamento ácido

Com a finalidade de inibir a atividade dos microrganismos metanogênicos, foi realizado um tratamento químico ácido, no qual o pH do lodo anaeróbio *in natura* foi ajustado para pH 2,0 utilizando uma solução de HCl 10 mol.L^{-1}. Foram utilizados volumes de lodo que variaram de 200 a 1000 mL, dependendo do experimento, e este foi mantido no pH ácido durante 60 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH 5 mol.L^{-1} para posterior uso na fermentação anaeróbia (SÁ *et al.*, 2013).

4.3.2 Pré-tratamento térmico

Alternativamente ao tratamento ácido, conduziu-se um pré-tratamento térmico, que consistiu na incubação do lodo anaeróbio a 65 ^{o}C por meia hora (WANG ; WAN, 2008). Este pré-tratamento foi realizado em banho-maria, com uma curva de aquecimento que durou cerca de 20 minutos. Os volumes de lodo que foram tratados em cada batelada variaram de 200-1000 mL e, após o tempo de incubação, o lodo foi resfriado a temperatura ambiente, com seu pH ajustado para 5,5 para posterior iniciação da digestão anaeróbia.

4.4. Condições gerais de digestão anaeróbia

Os experimentos de fermentação foram conduzidos em frascos tipo penicilina com volume de 100 mL, contendo 45 mL de meio reacional composto pelo inóculo pré-tratado e pela fonte de carbono, podendo esta ser carboidrato padrão, hidrolisado de semente de açaí (HSA) ou meio sintético similar ao HSA. Os frascos foram purgados com gás N_2 durante 45s para garantir um ambiente anaeróbio. Todos os experimentos foram realizados em um agitador rotativo a 35 °C e 160 rpm (SÁ *et al.*, 2013) e amostras de cerca de 2 mL foram coletadas e centrifugadas a 10000 rpm por 15 min e filtradas para posterior análise de ácidos orgânicos produzidos e consumo de substrato. A Figura 12 mostra um esquema da produção de hidrogênio biológico realizada neste trabalho.

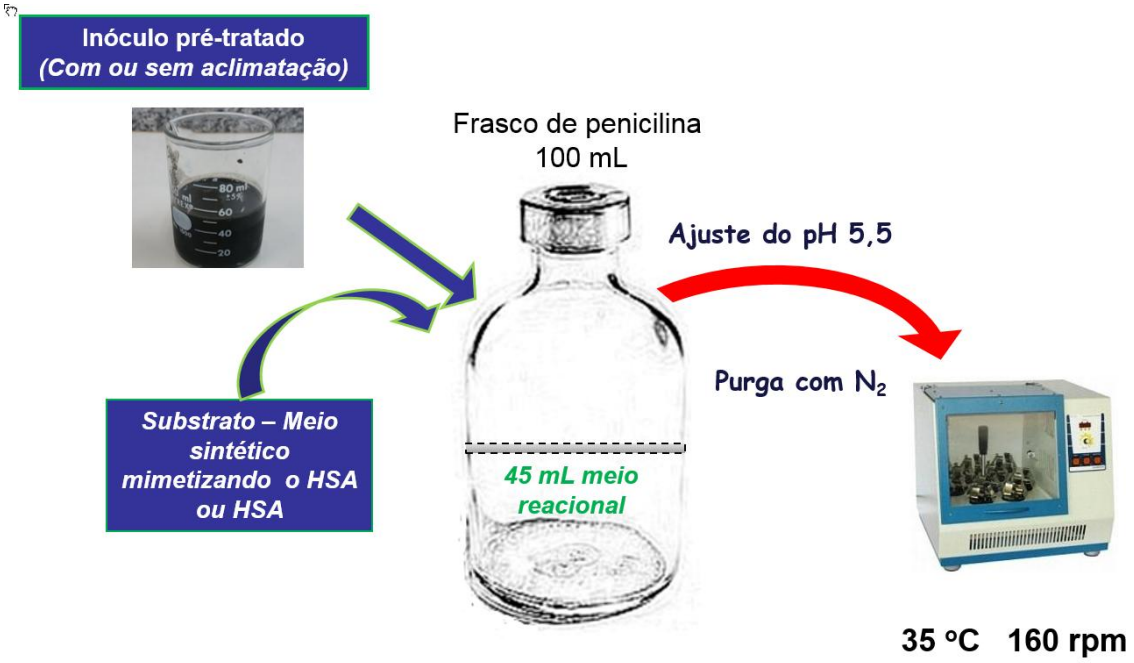

Figura 12. Representação esquemática das condições utilizadas para produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia.

4.4.1 Avaliação da manose como substrato para produção de hidrogênio

O teste para avaliar se a manose seria um bom substrato para a produção de hidrogênio foi conduzido com 5 $g.L^{-1}$ de manose ou 5 $g.L^{-1}$ de glicose como controle positivo. Foi utilizado o lote 1 do lodo pré-tratado com ácido e foram utilizados 10.000 $mg.L^{-1}$ de SSV e uma relação de 0,53 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo.}$ Para ambos os substratos, a produção acumulativa de H_2, o consumo de substrato e a produção de ácidos orgânicos foram avaliados em 17 h, 21 h, 24 h e 26,5 h de produção.

4.3.2 Avaliação do potencial fermentativo do hidrolisado de semente de açaí para produção de hidrogênio

A fim de verificar a possibilidade da produção de H_2 a partir do hidrolisado ácido de semente de açaí, foi conduzido um teste preliminar utilizando o hidrolisado produzido por Medina e colaboradores (2016). Este hidrolisado foi diluído para uma concentração inicial de 5 $g.L^{-1}$ de manose no meio reacional. Foi utilizado o primeiro lote de lodo (lodo 1) padronizado para 10.000 $mg.l^{-1}$ SSV, portanto com uma relação de 0,53 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$. A produção acumulativa de H_2, o consumo de substrato e a produção de ácidos orgânicos foram avaliados em 21 h e 24 h de produção.

4.3.3 Comparação dos pré-tratamentos ácido e térmico do lodo anaeróbio em relação ao tempo de aclimatação

A aclimatação do lodo anaeróbio após tratamento ácido ou térmico foi conduzida a 35 ^{o}C em incubadora sem agitação em fracos com tampa fechada em diversos tempos. Primeiramente, foi realizado um teste nos tempos de 17 h, 21 h, 24 h e 26,5 h. Após este teste, foi definido o pré-tratamento térmico como padrão para futuros experimentos; portanto, foi feito para este pré-tratamento uma nova avaliação nos tempos de 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 20 h,22 h, 24 h, 28 h e um teste controle sem pré-tratamento. As fermentações após o período de aclimatação foram conduzidas por 24h, utilizando uma relação de 0,5 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ em um meio sintético de composição similar ao HSA com uma DQO igual a 5,333 $gO_2.L^{-1}$.

4.3.4 Perfil cinético da produção de hidrogênio em meio sintético

Para avaliar o perfil cinético da fermentação, foi conduzida uma cinética até 30,5 h de produção de hidrogênio utilizando meio sintético mimetizando o hidrolisado de semente de açaí. A fermentação foi conduzida com uma relação de 0,5 sendo, 5,333 $gO_2.L^{-1}$ $DQO_{substrato}$ e 10,666 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo.}$

4.3.5 Avaliação da influência da razão $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ sobre o rendimento em hidrogênio e o consumo de substrato

Para averiguar a melhor relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$, foram conduzidas fermentações para produção de hidrogênio após o pré-tratamento térmico do inóculo. As proporções utilizadas geraram relações de 0,25, 0,5, 1 e 2, como pode ser observado na Tabela 5. Foi utilizado como substrato uma solução de carboidratos mimetizando a composição do hidrolisado de semente de açaí. A produção de H_2 e o consumo de

substrato foram avaliadas em 24 horas de fermentação. A proporção 0,25* foi uma variação de 0,25 onde foram utilizados o dobro tanto de DQO quanto de SSV.**Tabela 5.** Proporções entre $DQO_{substrato}$ e $SSV_{inóculo}$ utilizadas neste trabalho

$DQO_{substrato}$ ($gO_2.L^{-1}$)	$SSV_{inóculo}$ ($g.L^{-1}$)	Relação ($DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$)
2,665	10,666	0,25
5,333	10,666	0,5
1,066	10,666	1
2,132	10,666	2
2,665	21,332	0,25*

4.3.6 Perfil cinético da produção de hidrogênio utilizando hidrolisado de semente de açaí como matéria-prima

Após a definição da melhor relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$, de 0,25 com uma $SSV_{inóculo}$ de 21,332 $g.L^{-1}$, foi realizada uma cinética utilizando o hidrolisado de semente de açaí para avaliar o perfil cinético da fermentação conduzida por 57h.

4.4 Produção sequencial de hidrogênio e metano

Foram realizadas bateladas de fermentações anaeróbias sequenciais para obtenção de H_2 e CH_4. A etapa de produção de hidrogênio foi conduzida por 21 h. Após a fermentação, o volume dos frascos de penicilina foi centrifugado, de forma a decantar o meio fermentativo, e o sobrenadante deste processo, HPLW, foi reservado. O gás produzido foi analisado por cromatografia gasosa. Para a produção de CH_4, o meio fermentativo foi composto de HPLW e inóculo *in natura* em uma proporção 1:1, também em frascos de penicilina, porém com volume de 40 mL, devidamente purgados com N_2 e lacrados. O processo foi conduzido em pH 7 a 35 ^oC, condições ótimas para bactérias metanogênicas, por 38 dias**,** em shaker (GARRITANO *et al.*, 2017; KRAEHENBUEHL *et al.*, 2017).

4.5 Metodologia analítica

4.5.1 Cromatografia em fase gasosa

A análise do biogás com relação ao teor de H_2 e CH_4 foi realizada por cromatografia gasosa (CG). Neste trabalho, utilizou-se um micro-cromatógrafo a gás modelo 3000A da Agilent (Agilent Technologies), equipado com dois canais e um detector de condutividade térmica (TCD). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Cerity QA-QC (Agilent Corporation). As colunas

cromatográficas utilizadas foram: HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 μm) e HP-PLOT Molecular sieve 5A (10 m x 0,32 mm x 12 μm) à temperatura de 60 ^{o}C e 100 ^{o}C, respectivamente. A temperatura do injetor foi de 90 ^{o}C e a temperatura de entrada da amostra foi de 110 ^{o}C. Os gases utilizados para arraste foram hélio e nitrogênio nas colunas HP-PLOT U e HP-PLOT Molecular sieve 5 A, respectivamente.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para detecção de monossacarídeos e ácidos graxos voláteis, foram realizadas análises de cromatografia líquida utilizando as colunas Aminex HPX-87H (para manose, glicose e arabinose) em um fluxo de 0,6 ml/min de fase móvel H_2SO_4 0,05M com temperatura de 55 ^{o}C e Aminex HPX-87P (para glicose, xilose, galactose e manose) em um fluxo de 0,6 ml/min de água ultrapura como fase móvel e temperatura de 80 ^{o}C. Os açúcares foram detectados por índice de refração e os ácidos e demais possíveis inibidores foram detectados através de detector UV em 210 nm de absorbância.

4.5.3 Cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica de pulso

As análises dos açúcares (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose, sacarose, frutose, rhamnose e manose) foram também avaliadas no equipamento Ion Chromatography System 5000 (ICS-5000, Dionex Ltd., Canadá) utilizando um sistema de HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography and Pulse Amperometric Detection*). O software utilizado foi o Chromeleon 6.8 (Dionex Ltd., Canadá). O sistema de colunas utilizado foi composto pela pré-coluna CarboPac PA1 (4 x 50 mm, Thermo Scientific Ltd., EUA) e coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm, Thermo Scientific Ltd., EUA); ambas foram mantidas a 15 °C. A fase móvel utilizada foi água deionizada (Milli-Q) grau reagente tipo I (18 ou mais megaohm-cm de resistividade), descarbonatada e filtrada em filtro de 0,2 μm, com fluxo de 1,25 mL por minuto; entre os tempos 42 min e 52 min de corrida, a fase móvel foi substituída por NaOH 300 mM. No pós-coluna, foi adicionada uma solução de NaOH 450mM com fluxo de 0,4 mL por minuto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do lodo anaeróbico

O lodo anaeróbio oriundo de estação de tratamento de esgoto é de fácil acesso, grande abundância e possui uma população diversificada de microrganismos. Devido a essas características, este é um inóculo interessante para o processo de digestão anaeróbia, que vem sendo estudado por inúmeros grupos de pesquisa devido ao seu potencial na produção de gás hidrogênio e também outros produtos, tais como metano e ácidos orgânicos voláteis (ARGUN; DAO, 2017; AUSIELLO *et al.*, 2017; EKER; SARP, 2017; GARRITANO *et al.*, 2017; HE; MCNUTT; YANG, 2017; MA; LI; SU, 2017).

Dependendo do momento da coleta, pode ocorrer certa variação na composição do lodo; portanto, uma padronização adequada é imprescindível para a reprodutibilidade dos experimentos. Neste trabalho, foram utilizados três lotes de lodo anaeróbio, que foram caracterizados em função dos seguintes parâmetros: pH, DQO, sólidos suspensos totais(SST), sólidos suspensos fixos(SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV), conforme apresentado na Tabela 6. Os SSV foram utilizados para avaliar indiretamente a presença de biomassa microbiana presente no inóculo, como descrito na metodologia.

Tabela 6. Caracterização dos parâmetros pH, DQO e SSV do lodo anaeróbio oriundo de estação de tratamento de esgoto.

Parâmetros	**Lodo 1**	**Lodo 2**	**Lodo 3**
pH	**7,28**	**7,38**	**7,32**
DQO ($gO_2.L^{-1}$)	**71,6±0,2**	**60,4 ±0,1**	**34,7 ±0,5**
Sólidos suspensos totais (SST) ($g.L^{-1}$)	**98,3 ±0,3**	**35,3 ±2,3**	**46,4 ±1,3**
Sólidos suspensos fixos (SSF) ($g.L^{-1}$)	**60,3 ±0,8**	**10,7 ±1,5**	**18,5±0,7**
Sólidos suspensos voláteis (SSV) ($g.L^{-1}$)	**37,5 ±1,8**	**24,7 ±1,4**	**27,9±0,7**

5.2 Avaliação da manose padrão como substrato para produção de hidrogênio biológico via fermentação anaeróbia

Antes de iniciar o trabalho utilizando o hidrolisado proveniente da biomassa da semente de açaí, foram realizados testes preliminares utilizando manose padrão como substrato para avaliar a fermentabilidade deste carboidrato, pois poucos trabalhos relataram a produção de gás hidrogênio utilizando manose como substrato e especialmente utilizando uma cultura mista. Para uma avaliação comparativa, além da produção utilizando manose, foi conduzido paralelamente uma fermentação com glicose padrão (Figura 13).

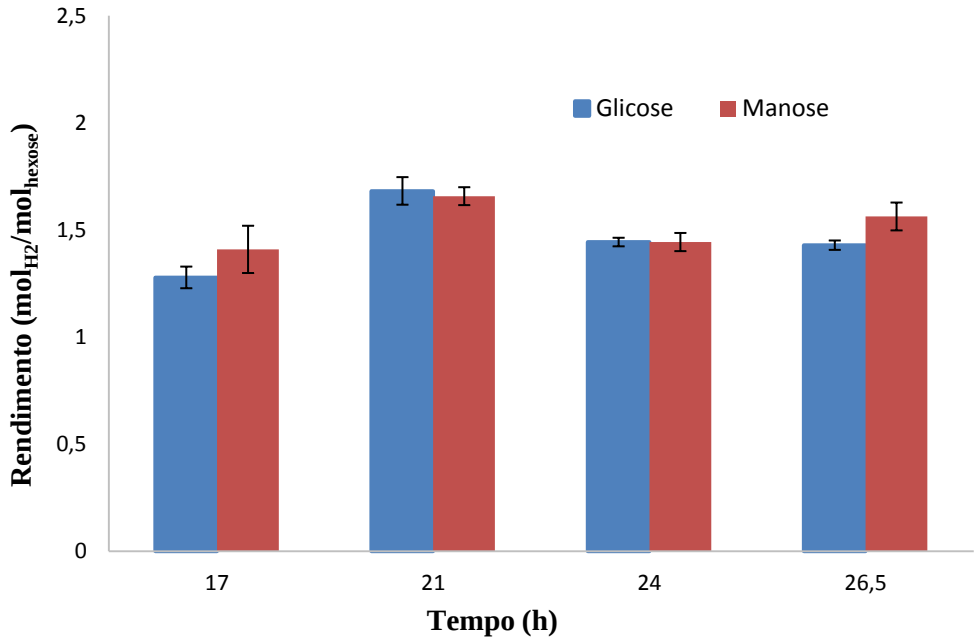

Figura 13. Produção de hidrogênio em meio sintético contendo glicose (azul) ou manose (vermelho) nos tempos de 17, 21, 24 e 26,5 horas. A fermentação foi conduzida a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5 utilizado-se o lodo 1.

Como pode-se observar, ambos os meios, contendo 5 g.L^{-1} de glicose ou manose padrão, apresentaram um rendimento similar acumulado em 21 horas, com produção de 1,68 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ e 1,66 $mol_{H2}/mol_{carboidrato,}$ respectivamente. A melhor produtividade de hidrogênio, em ambos os meios, foi de 0,08 $mol_{H2}/(mol_{carboidrato}.h)$ em 21 horas de produção.

Este resultado corrobora outros estudos que relatam a manose como um substrato potencial para a produção de hidrogênio. Ren e colaboradores (2009) relataram uma produção de 2,62 mol_{H2}/mol_{manose} a partir de 5 g.L^{-1} de manose utilizando

uma cultura pura de *Enterobacter aerogenes*. Datar e colaboradores (2007), ao utilizar uma cultura mista de microrganismos tratada termicamente a 105 ^{o}C por duas horas, observaram uma produção de 1,4 mol de gás de hidrogênio para cada mol de manose a partir de uma concentração inicial de 3 $g.L^{-1}$, resultado similar ao encontrado no presente trabalho. Adicionalmente, rendimentos semelhantes utilizando manose ou glicose como substrato eram esperados, uma vez que a manose aflui pela via glicolítica, tal como a glicose, mediante a ação de duas enzimas: hexoquinase e fosfomanose isomerase (HU *et al.*, 2016). Primeiramente, a enzima hexoquinase (EC 2.7.1.1) fosforila a manose, como ocorre com a glicose ou a frutose (JACINTO *et al.*, 2004). Em seguida, a enzima fosfomanose isomerase (EC 5.3.1.8) catalisa a isomerização reversível de manose-6-fosfato a frutose-6-fosfato, viabilizando a entrada da manose na via glicolítica (PRIVALLE, 2002).

Os resultados encontrados também indicam que o lodo anaeróbio coletado estava funcional, possuindo microrganismos produtores de hidrogênio viáveis após o pré-tratamento ácido aplicado. Ambas as fermentações (com manose ou glicose como substrato) atingiram 41% do rendimento teórico máximo já neste teste preliminar.

5.3 Avaliação do potencial fermentativo do hidrolisado de semente de açaí para produção de hidrogênio biológico

De forma a disponibilizar os carboidratos presentes na semente de açaí para a produção de hidrogênio, esta deve ser tratada em etapa anterior à fermentação. Uma das estratégias possíveis é a hidrólise com ácido diluído, que é amplamente utilizada no fracionamento de diversas biomassas (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). O ácido é capaz de catalisar a quebra das ligações glicosídicas, liberando os monômeros para que estejam disponíveis para o processo de digestão anaeróbia. A eficiência deste tipo de tratamento depende de fatores como razão sólido/líquido, concentração de ácido, temperatura e tempo (NEUREITER, 2002). A fração líquida obtida após a hidrólise ácida da semente de açaí é rica em manose, principal constituinte dessa biomassa.

Após a confirmação da produção de hidrogênio utilizando manose padrão como substrato, foi realizado um experimento preliminar utilizando hidrolisado de semente de açaí (HSA – lote 1) para avaliar a fermentabilidade deste hidrolisado, uma vez que o mesmo possui uma coloração avermelhada intensa, que pode estar associada a extração de compostos antioxidantes. A fermentação foi conduzida por 21 horas, período que resultou no melhor rendimento em meio sintético utilizando manose. O hidrolisado de

semente de açaí utilizado neste teste foi produzido em um estudo preliminar conduzido em nosso laboratório (MEDINA, *et al.*, 2016) e os carboidratos foram quantificados por HPLC, como pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2. Composição dos carboidratos presentes no hidrolisado da semente de açaí (lote 1) produzidos por MEDINA e colaboradores (2016).

Componente	***($g.L^{-1}$)***
Manose	*103,33*
Glicose	*5,45*
Arabinose	*2,8*
Xilose	*7,85*
Galactose	*0,21*

O hidrolisado foi diluído para uma concentração inicial de 5 $g.L^{-1}$ de manose. Como pode ser observado na Figura 14, a fermentação do hidrolisado diluído resultou em um rendimento de 1,76 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ após 21 h de fermentação, com produtividade de 0,084 $mol_{H2}/(mol_{carboidrato}.h)$. Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos em meio sintético, foi observado que a fermentação do HSA resultou em um rendimento estatisticamente similar ao dos processos contendo apenas manose ou glicose.

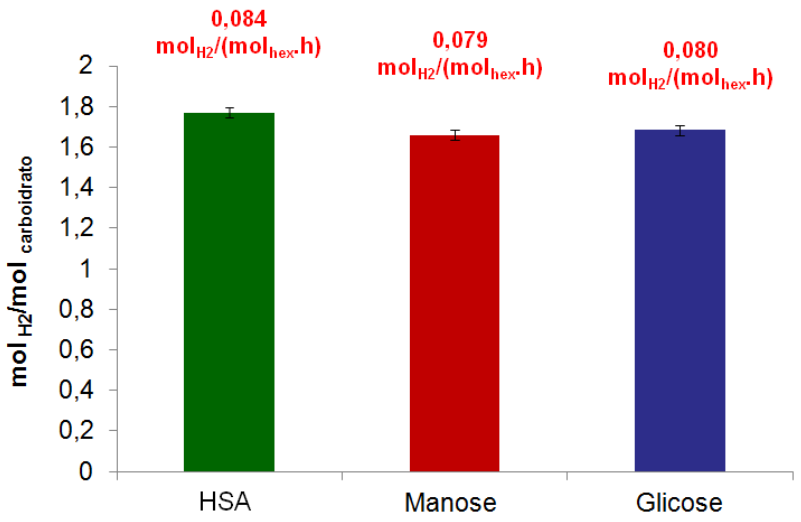

Figura 14. Rendimento de hidrogênio a partir de HSA (verde – lote 1), manose padrão (vermelho) e glicose padrão (azul). As produtividades obtidas em cada uma das fermentações estão apresentadas em vermelho no topo das colunas. Estes testes foram realizados por 21h, a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,53, utilizando-se o lote 1 de lodo anaeróbio.

Este dado é importante, pois indica que o hidrolisado de semente de açaí não apresentou componentes que atuassem significativamente como inibidores. Esses poderiam ser ácidos e compostos fenólicos, que podem ser produzidos durante o processo de hidrólise ácida (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015), ou pigmentos (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005) e compostos antioxidantes, como polifenóis totais, taninos e antocianinas (FELSSNER *et al.*, 2015), que fazem parte da composição da semente de açaí. Esses últimos podem estar presentes em concentrações significativas, como pode ser observado pela cor avermelhada do hidrolisado (MARÇO *et al.*, 2008). Desta forma, reforça-se a ideia de utilizar este material abundante e sem valor comercial para produção de H_2.

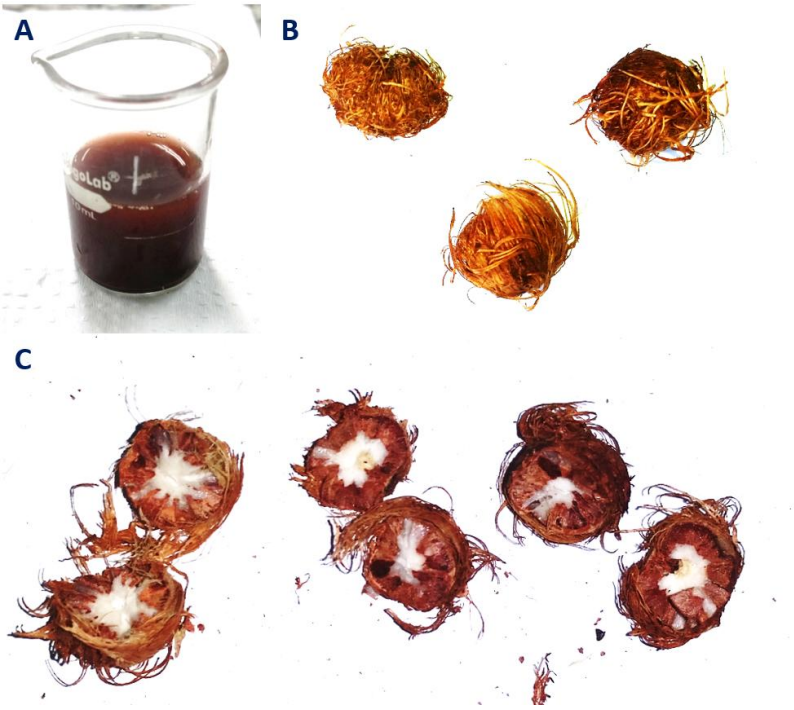

Figura 15. Imagens obtidas durante este trabalho: A) Hidrolisado ácido de semente de açaí; B) Semente de açaí *in natura*; C) Semente de açaí em corte transversal.

O consumo de manose e a produção de ácidos orgânicos voláteis durante o processo podem ser observados na Tabela 7. Quando o HSA foi utilizado, houve consumo de apenas 52% da manose inicial, similarmente ao que foi observado quando a manose comercial foi utilizada. Tal fato indicou a necessidade de um melhoramento no processo para evitar desperdícios consideráveis do substrato presente no meio de cultura. Como esperado, houve a formação dos ácidos acético e butírico, que são subprodutos comuns durante a digestão anaeróbia. Esses ácidos voláteis são bem conhecidos por serem gerados durante a produção de gás hidrogênio; todavia, os mesmos podem causar inibição do processo fermentativo (CIRANNA *et al.*, 2014). Possivelmente, estes subprodutos podem acarretar um desvio da produção de H_2, gerando desperdício neste processo.

Tabela **7**. Consumo de manose, produção de ácido acético e produção de ácido butírico nos tempos de 0, 21 e 24 horas de produção utilizando-se manose padrão ou HSA como substrato.

	Meio contendo manose			**Meio contendo HSA**		
Tempo	**Manose (g/L)**	**HAc (g/L)**	**HBut (g/L)**	**Manose (g/L)**	**HAc (g/L)**	**HBut (g/L)**
0h	4,81	0	0	4,84	0	0
21h	2,76 ± 0,07	0,73 ± 0,01	0,19 ± 0,02	2,53 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,91 ± 0,02
24h	2,10 ± 0,03	0,80 ± 0,12	0,39 ± 0,10	2,20 ± 0,20	0,95 ± 0,04	1,00 ±0,04

5.4 Hidrólise da semente de açaí e caracterização do hidrolisado obtido (HSA) – Obtenção do lote 2 de HSA

Apesar da quantidade significativa de carboidratos presentes no HSA utilizado no experimento preliminar apresentado no item 5.3, as condições de hidrólise utilizadas foram mais severas, consistindo de um longo tempo de residência em autoclave (93 min), o que geraria um aumento significativo nos custos globais do processo e poderia também aumentar a formação de inibidores.

Desse modo, para a continuidade desse estudo, o hidrolisado de semente de açaí foi produzido com base no trabalho de Silva e colaboradores (2017), que realizaram um estudo de avaliação de diversas condições de hidrólise ácida da semente de *Euterpe oleracea.* Observou-se que a melhor condição para a liberação de manose e outros carboidratos presentes na semente de açaí (rendimento de 28,57%) foi com 3,0% H_2SO_4 e um tempo de residência de 60 minutos em autoclave vertical a 121 ^{o}C. Apesar de outras condições resultarem em rendimentos similares, a condição destacada foi a menos severa, sendo considerada então a condição mais adequada de tratamento, dentre as avaliadas, para recuperação de açúcares (SILVA *et al*., 2017).

Após a hidrólise, foi realizada a identificação e quantificação dos carboidratos, ácidos e produtos de degradação de açúcares e da lignina presentes no hidrolisado da semente de açaí, como pode ser observado na Tabela 8. Estes produtos são potenciais inibidores para a produção de H_2 (MONLAU *et al.*, 2014; QUÉMÉNEUR *et al.*, 2012; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

Tabela 8. Caracterização do hidrolisado de semente de açaí produzido por cromatografia de troca de iônica para os carboidratos e por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ácidos e produtos de degradação de açúcares e lignina (n.d. - não detectado).

	Componente	**($g.L^{-1}$)**
Carboidratos	Arabinose	1,49
	Rhamnose	0,56
	Galactose	3,45
	Glicose	2,35
	Xilose	3,66
	Manose	39,92
	Celobiose	0,20
	Total	51,63
	Componente	**(ppm)**
Produtos de degradação e ácidos	Ácido gálico	n.d.
	5-HMF	78,57
	Furfural	n.d.
	Ácido hidroxibenzoico	62,27
	Vanilina	n.d.
	Ácido ferúlico	n.d.
	Ácido cinâmico	n.d.
	Ácido acético	n.d.
	Ácido fórmico	n.a.
	Ácido levulínico	n.a.

O principal carboidrato encontrado no hidrolisado foi a manose, representando 77,4% dos carboidratos totais, similarmente ao relatado por Rambo e colaboradores (2015), que encontraram 79,2% de manose na composição de carboidratos no hidrolisado de semente de açaí e 2,3% de outros açúcares (glicose, xilose, arabinose ramnose, galactose). Além de glicose e manose, a hexose galactose e as pentoses xilose e arabinose também são substratos conhecidos para a produção de gás hidrogênio (DANKO *et al.*, 2008; DE SÁ, *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2016); contudo, estes açúcares estão presentes em quantidades minoritárias no HSA.

A composição do hidrolisado se mostra interessante por ser diferente de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas clássicas, que podem apresentar diversos compostos resultantes da decomposição da lignina, como ácido valínico, siringaldeído, além de outros compostos fenólicos com potencial inibitório (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). No presente trabalho, somente foi identificado e quantificado o ácido hidroxibenzóico, que pode apresentar ação inibitória para produção de H_2 mais

significativa do que furanos como o HMF e o furfural. Porém, Siqueira e Reginato (2015) avaliaram a inibição na produção de H_2 por ácido hidroxibenzóico e verificaram inibição significativa somente a partir de 150 mg/L e um IC_{50} em 380 mg/L, valor significativamente abaixo do encontrado no hidrolisado, de 62,27 mg/L.

Adicionalmente, foi encontrado no HSA o composto 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), que é derivado da desidratação das hexoses que estão presentes no hidrolisado de semente de açaí (LIU, Z. L. *et al.*, 2004). A maioria dos estudos relata que a concentração mínima desses compostos para inibição da produção de H_2 está na faixa de 250 a 1000 mg/L (MONLAU *et al.*, 2014; QUÉMÉNEUR *et al.*, 2012), superior à encontrada no hidrolisado, de 78,57 mg/L. É conhecido que, devido à instabilidade de 5-HMF, este pode formar os ácidos levulínico e fórmico (DANON, *et al*., 2013), porém esses compostos não foram identificados.

O ácido acético é um produto comum de hidrolisados de biomassa devido a hidrólise do grupamento acetil presente na hemicelulose (JÖNSSON; MARTÍN, 2016); a ausência deste composto pode indicar que a semente de açaí não possui acetilações. A concentração reduzida de diversos compostos inibitórios tradicionalmente encontrados em hidrolisados ácidos de biomassas tornam o HSA ainda mais interessante para a produção de H_2.

5.5 Comparação dos pré-tratamentos ácido e térmico do lodo anaeróbio em meio sintético: efeito do tempo de aclimatação

Os experimentos preliminares realizados neste estudo utilizaram um inóculo pré-tratado com ácido. Apesar de o pré-tratamento ácido do inóculo se mostrar interessante para a produção de H_2, foi realizado um teste de produção utilizando o pré-tratamento térmico, que é um dos mais reportados na literatura (BAGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008; WONG; WU; JUAN, 2014). Wang e Wan (2008) realizaram testes de produção de H_2, a partir de glicose como fonte de carbono, utilizando cinco tipos de pré-tratamentos para o lodo (ácido, base, choque térmico, aeração e clorofórmio). Os autores obtiveram os melhores resultados com o pré-tratamento térmico, tanto em produção máxima de H_2 quanto em produtividade, rendimento de H_2 e eficiência de degradação de substrato (WANG ; WAN, 2008).

As condições selecionadas para ambos os tratamentos foram baseadas em estudos prévios (SÁ, *et al.*, 2011), e os ensaios foram realizados com o segundo lote de lodo (lodo 2) e avaliados em relação a diferentes tempos de aclimatação a 35 ^{o}C sem

agitação. A aclimatação do lodo anaeróbio é um fator importante a ser avaliado, pois uma quantidade considerável de microrganismos é eliminada após o pré-tratamento; portanto, essa prática pode favorecer a reprodução de organismos produtores de hidrogênio, que são predominantes após o pré-tratamento (LAI *et al.*, 2014; NASR *et al.*, 2011; OZKAN, *et al.*, 2010).

Como pode ser observado na Figura 16, ambos os pré-tratamentos resultaram em um rendimento de 1,87 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ em 24 h de fermentação; porém, após o pré-tratamento ácido, houve a necessidade de aclimatação do lodo por 20 h a 35 ^{o}C, enquanto o lodo submetido ao tratamento térmico pôde ser utilizado logo após o pré-tratamento. Provavelmente, o pré-tratamento térmico foi mais brando em relação ao pré-tratamento ácido testado ou apresentou uma maior especificidade para eliminação de microrganismos consumidores de H_2.

A ausência da necessidade de aclimatação motivou a utilização do pré-tratamento térmico para a continuidade dos experimentos fermentativos ao longo deste trabalho, otimizando o tempo global de produção. Desta forma, pode-se evitar a necessidade de uma aclimatação e evita-se custo global ao processo de digestão anaeróbia. Adicionalmente, o pré-tratamento térmico possui a vantagem de não produzir sais, tal como ocorre ao final do pré-tratamento ácido, que necessita uma correção de pH com adição de base antes do início da fermentação. Estes sais podem aumentar a osmolaridade do sistema sendo potencialmente um causador de inibição na digestão anaeróbia.

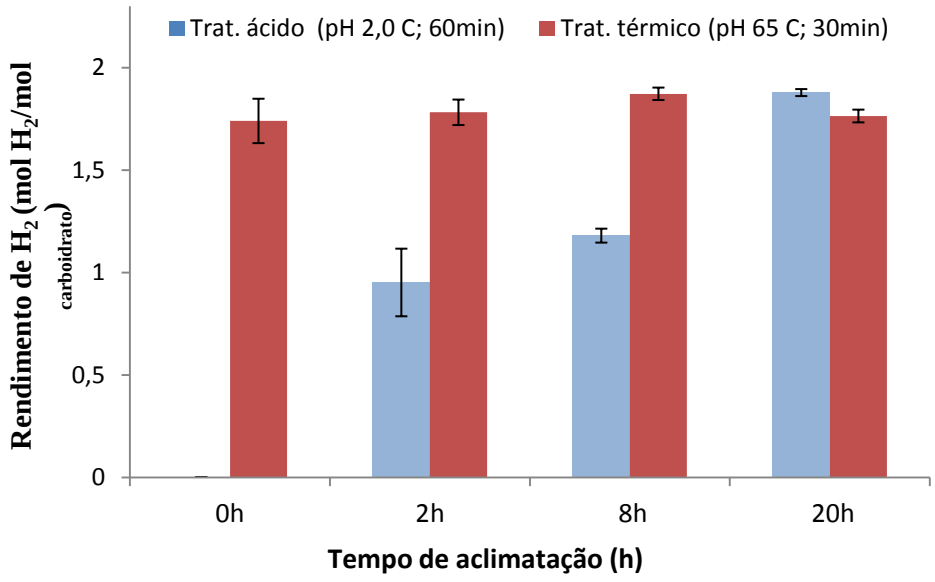

Figura 16. Avaliação dos pré-tratamentos ácido (azul) e térmico (vermelho) em diferentes tempos de aclimatação utilizando meio sintético como substrato. A fermentação para avaliação da aclimatação foi conduzida por 24 h a 35 ^{o}C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5.

É importante ressaltar que este resultado é válido apenas para as condições de pré-tratamento utilizadas, pois um pré-tratamento ácido mais brando, por exemplo, poderia gerar resultados diferenciados, existindo ainda uma gama de condições a serem exploradas em ambos os pré-tratamentos.

Diversos estudos têm utilizado razões de tempo e temperatura variadas para o pré-tratamento do lodo. No entanto, de acordo com Li e colaboradores (2007), é impossível definir uma condição ótima de temperatura e duração do tratamento térmico, pois existe uma variação em cada inóculo em caso de culturas mistas. Lin *et al.* (2012) submeteram uma cultura acidogênica a um tratamento térmico com quatro temperaturas diferentes. Os tratamentos térmicos a 50 e 60 °C não foram eficientes para aumentar o desempenho da cultura mista na produção de H_2. Porém, os tratamentos térmicos a 70 e 80 °C aumentaram significativamente o conteúdo de H_2 no biogás. Segundo os autores, os tratamentos térmicos a 70 e 80 °C foram efetivos na eliminação de bactérias não produtoras de H_2 e possibilitaram um rápido reestabelecimento das populações acidogênicas (LIN, *et al.*, 2012). Adicionalmente, Wong e colaboradores (2016) realizaram um pré-tratamento térmico em autoclave a 100 ^{o}C, por 15-30 min e alcançaram altos rendimentos de hidrogênio (WONG; WU; JUAN, 2014; XIA *et al.*, 2016).

Zinatizadeh e colaboradores (2017) buscaram explicar a eficiência do tratamento térmico, mostrando que esse pré-tratamento apresenta efeitos significativos nas características morfológicas e estruturais dos grânulos do lodo anaeróbio., enquanto que os grânulos quimicamente pré-tratados permaneceram estruturalmente estáveis e relativamente intactos. Neste estudo, o pré-tratamento térmico aumentou a produção cumulativa de hidrogênio em 40% em relação ao pré-tratamento químico e em 76% em relação ao controle não tratado (ZINATIZADEH *et al.*, 2017).

Após a escolha do pré-tratamento térmico como método a ser utilizado, foi realizado um novo experimento em uma faixa mais ampla de tempos de aclimatação a 35 °C para uma análise mais detalhada do processo e para entender melhor como seria o perfil da produção em relação ao tempo de aclimatação. Adicionalmente, uma fermentação com o lodo *in natura* foi conduzida como controle.

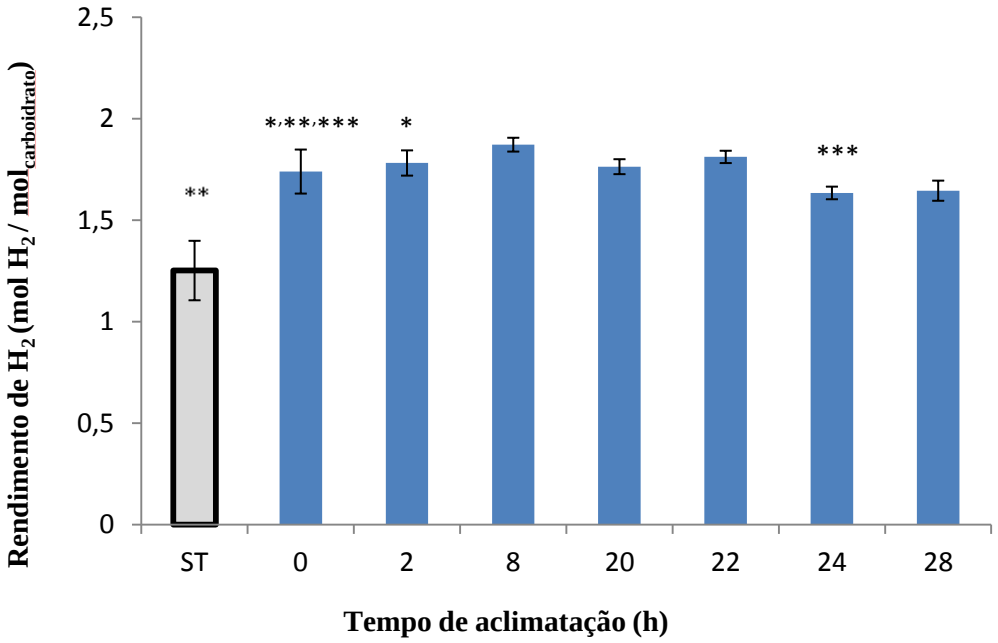

Figura 17. Rendimentos de hidrogênio obtidos após diferentes tempos de aclimatação do lodo pré-tratado termicamente. * $p > 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ A produção foi conduzida por 24 h, a 35 °C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5 em meio sintético.

Não houve uma diferença significativa entre os rendimentos de H_2 obtidos com lodos aclimatados nos períodos de 0, 2, 8, 20 e 22h de aclimatação, porém após 24h de aclimatação foi observado uma redução no rendimento de H_2 estatisticamente significativo. Portanto, foram quantificados também o consumo de manose e a produção de ácidos orgânicos após três diferentes tempos de aclimatação de forma a melhor

analisar os resultados obtidos (Tabela 9). Nem todas as condições analisadas apresentaram resultados similares e em relação ao tempo de aclimatação, contudo, não foi necessário uma aclimatação do lodo anaeróbio após o pré-tratamento térmico e que houve estabilidade após o pré-tratamento, diferentemente do observado no pré-tratamento ácido.

Tabela 9. Comparação entre produção de hidrogênio no lodo anaeróbio aclimatado por 0, 6 e 24 horas a 35 ^{o}C após pré-tratamento térmico

Tempo de aclimatação (horas)	Produção de hidrogênio ($molH_2/mol_{carb}$)	Consumo de manose (%)	Produção de Ac. Acético ($g.L^{-1}$)	Produção de Ac. Butírico ($g.L^{-1}$)
0	1,78 ± 0,08	45,57 ± 2,9	0,42 ± 0,01	0,55 ± 0,06
6	1,76 ± 0,02	49,84 ± 3,04	0,44 ± 0,01	0,47 ± 0,07
24	1,64 ± 0,02	44,04 ± 3,52	0,26 ± 0,02	0,47 ± 0,04

Foi confirmada também a importância do pré-tratamento para a produção de H_2, uma vez que o lodo tratado apresentou cerca de 30% de aumento no rendimento acumulado de H_2 em relação ao lodo *in natura.* No entanto, Luo *et al.* (2010) alertam para os riscos em se extrapolar o aumento da produção de H_2 por cultura mista pré-tratada, observado em testes em batelada, para o processo contínuo, operado por longos períodos. Os autores aplicaram diferentes pré-tratamentos em lodo anaeróbio, verificando em seguida que o mais eficiente na produção de gás hidrogênio foi o tratamento a 60 °C. Após a primeira etapa realizada em batelada, os biorreatores foram operados em modo contínuo por 3 dias. Durante o estado estacionário de operação desses biorreatores, foi observado que o lodo anaeróbio, sem qualquer tipo de pré-tratamento, exibiu a maior produção de H_2, contradizendo relatos anteriores de que pré-tratamentos do inóculo melhoram significativamente a produção de H_2 (LUO *et al.*, 2010).

5.6 Perfil cinético da produção de hidrogênio em meio sintético após pré-tratamento térmico do inoculo

Para conhecer o perfil fermentativo, uma cinética de produção de hidrogênio foi acompanhada e está apresentada na Figura 18. Além da produção de H_2, foram também avaliados o consumo de substrato e produção dos ácidos acético e butírico a partir de carboidratos padrão em concentrações que mimetizam o HSA proveniente do pré-tratamento ácido com H_2SO_4 diluído a 3%.

A produção de H_2 iniciou-se entre 6 e 14 h de fermentação, estendendo-se até 28 h de produção. Neste ensaio, atingiu-se um rendimento de 1,78 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ em 24 h de produção, o que é compatível com os experimentos anteriores; porém, o melhor rendimento observado foi em 28h de produção com 2,06 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$, e a melhor produtividade foi de 0,0771 $mol_{H2}/(mol_{carboidrato.}h)$ em 26 h de produção.

Em 24h de produção, foi observada uma razão molar de 0,77 de HAc/HBut. Diversos autores sugerem a razão molar de acético e butírico (HAc/HBut) como indicador quantitativo para o rendimento de H_2; tal fato pode ser associado às vias metabólicas microbianas (SÁ *et al.*, 2011, SÁ *et al.*, 2013; HAWKES *et al.*, 2007; KIM; HAN; SHIN, 2006). Sá e colaboradores (2013) correlacionaram produções mais altas de H_2 com o aumento da relação HAc/HBu, verificando que, quando o inóculo pré-tratado (tratamento alcalino e térmico) foi comparado ao inóculo sem pré-tratamento, houve uma maior produção de H_2 e uma maior uma maior razão de HAc/HBu no inóculo tratado (SÁ, *et al.*, 2013). Contudo, Guo e colaboradores (2013) mostram, em um estudo realizado com substrato lignocelulósicos, que esta proporção pode não dar uma boa indicação, particularmente em testes em batelada onde a atividade homoacetogênica prevalece (GUO *et al.*, 2013). Por exemplo, organismos pertencentes ao gênero *Clostridium* (ex. *C. aceticum*) podem reduzir o rendimento de H_2 por conversão de H_2 e CO_2 em ácido acético, ou ainda pela conversão de hexoses diretamente em ácido acético (HAWKES *et al.*, 2007; KIM *et al.*,2006).

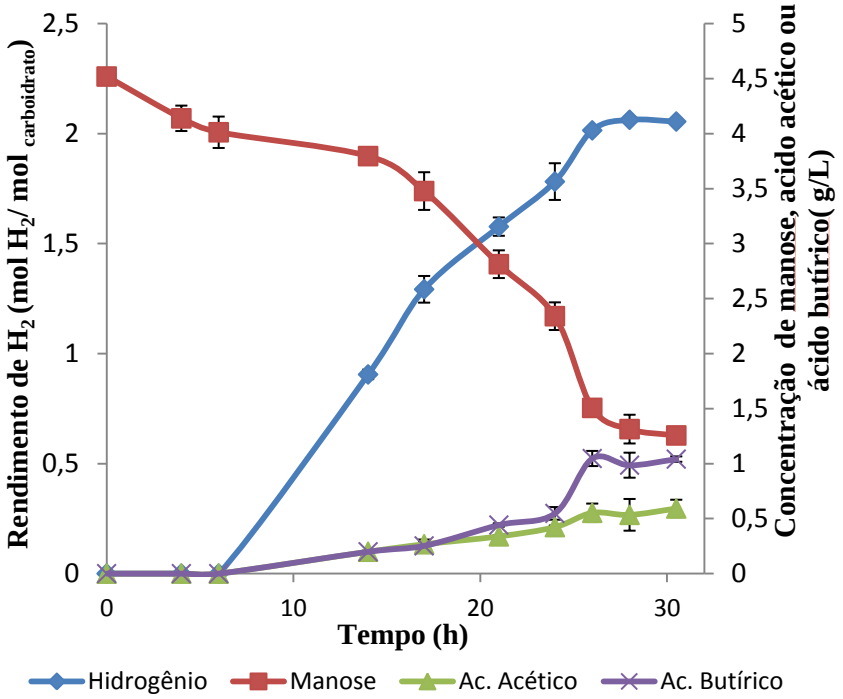

Figura 18. Cinética de produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e consumo de manose em meio sintético mimetizado a composição de açúcares do hidrolisado de semente de açaí em até 30 horas de produção, 35 °C, 160 rpm e relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,5.

5.7. Avaliação da influência da razão $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ sobre o rendimento em hidrogênio e o consumo de substrato

Como apresentado anteriormente, o controle da proporção entre o substrato e a carga de microrganismos inicial é importante para melhorar a produção de H_2 por digestão anaeróbia. Para cada concentração de biomassa, existe uma faixa adequada de substrato que varia com a natureza e atividade da cultura de microrganismos. Por isto, estes estudos devem ser realizados, individualmente, para cada cultura mista.

Com base neste fundamento, foi avaliada a influência de diferentes razões entre a demanda química de oxigênio do substrato ($DQO_{substrato}$) e a concentração de sólidos suspensos voláteis do inóculo ($SSV_{inóculo}$), conforme apresentado na Figura 19.

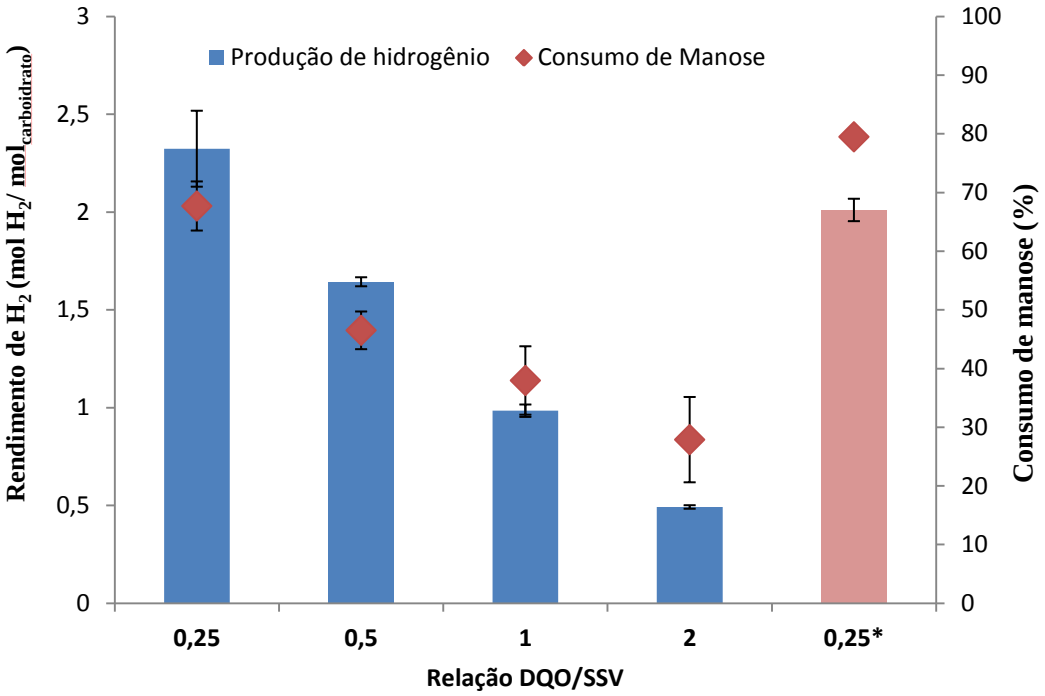

Figura 19. Rendimento de H_2 e consumo de manose em diferentes relações DQO/SSV em 24 h de produção acumulada. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 35 °C, a 160 rpm, utilizando-se carboidratos nas concentrações 0,25, 5, 10 e 20 $g.L^{-1}$ e 10,66 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo}$ Na condição 0,25*, foram utilizados 5 $g.L^{-1}$ de carboidratos totais e 21,33 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo}$.

A relação de 0,25 com 10,666 $g.L^{-1}$ de $SSV_{inóculo}$ resultou no melhor rendimento, de 2,32 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$; a mesma relação, porém com o dobro de inóculo e substrato iniciais, apresentou um rendimento próximo, de 2,01 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$. A redução da razão de 0,5, utilizada nos experimentos anteriores, para 0,25 resultou em um aumento do rendimento em 40%. Já o aumento dessa razão para 1 e 2 resultou em uma redução na conversão de carboidratos em hidrogênio de 40% e 70%, respectivamente.

Em relação ao consumo de manose, houve um aumento do consumo percentual com a redução da razão de substrato e inóculo. Quando analisado a quantidade absoluta de H_2 produzida pela quantidade absoluta de manose consumida, foram obtidos rendimentos de 3,39, 3,30, 2,22, 1,42 e 2,56 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$ para as condições de 0,25, 0,5, 1, 2, e 0,25* $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$, respectivamente. Apesar de o melhor rendimento em relação ao substrato consumido ter sido alcançado com a razão de 0,5, essa condição apresentou um consumo de manose de apenas 47% da concentração inicial. A razão de 0,25 apresentou rendimento similar com um maior consumo percentual de manose, de 69,9%. A mesma razão de 0,25, porém com o dobro de substrato e inóculo, resultou em

um aumento ainda maior no consumo de manose, atingindo 79,5%, possivelmente devido à maior quantidade de substrato e de microrganismos para a realização da fermentação anaeróbia com maior eficiência. Adicionalmente, essa condição permitiu uma fermentação sem praticamente nenhuma diluição do meio reacional, utilizando-se somente o lodo após o pré-tratamento e o meio sintético com a mesma composição do hidrolisado de semente de açaí, o que pode ter influenciado positivamente o processo.

Para as condições estudadas, foram também analisadas as produções totais de hidrogênio e de ácidos orgânicos, apresentadas na Tabela 10. Pode-se observar que a relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ de 0,25* com 5 $g.L^{-1}$ de carboidrato e 21,33 $g.L^{-1}$ $SSV_{inóculo}$ apresentou a maior produção bruta de H_2, de 2,55 mmol. Relações maiores que 0,25 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ resultaram também em alta produção, entre 2,09 e 2,50 mmol, porém com baixos rendimentos e baixo consumo de substrato, indicando que não seriam recomendadas para o processo.

Tabela 10. Avaliação da produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e manose residual em variadas relações DQO/SSV em 24 h de produção acumulada de H_2. Os frascos foram incubados em shaker a 35 ^{o}C, a 160 rpm, utilizando-se 10,66 $g.L^{-1}$ SSV inóculo e carboidratos nas concentrações 2,5, 5, 10 e 20 $g.L^{-1}$ para obtenção das diferentes relações. Na condição 0,25*, utilizou-se 21,33 $g.L^{-1}$ SSV inóculo e 5 $g.L^{-1}$ de carboidratos totais.

$DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$	H_2 (mmol)	HAc** (mmol)	HBut*** (mmol)	Manose inicial (mmol)	Manose final (mmol)
0,25	1,48 ±0,12	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,54	0,17 ± 0,02
0,5	2,09 ±0,03	0,19 ±0,01	0,24 ± 0,02	1,07	0,58 ± 0,03
1	2,50 ±0,08	0,35 ± 0,03	0,49 ± 0,03	2,15	1,3 ± 0,13
2	2,50 ±0,05	0,41 ± 0,04	0,65 ± 0,044	4,31	3,10 ±0,31
0,25*	2,55 ±0,07	0,42 ± 0,003	0,55 ± 0,01	1,07	0,22 ± 0,009

HAc, ácido acético; * HBut, ácido butírico

Apesar dos resultados obtidos, uma comparação equitativa com a literatura baseada na relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ não é possível devido às diferenças no substrato, no modo de alimentação, no caso de sistema contínuo (LIU *et al*., 2000) e também na composição do inóculo. Portanto, a comparação do desempenho da produção de hidrogênio com base apenas na relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ não é interessante, podendo ser melhor empregada para fermentações conduzidas em

condições semelhantes (ARGUN; DAO, 2017). Por exemplo, Nasr *et al.* (2011) estudaram a produção de H_2 a partir de vinhaça, comparando dois tipos de lodos, ADS (lodo de digestor anaeróbio) e AADS (lodo de digestor anaeróbio aclimatado). Os autores relataram que a razão substrato/biomassa experimental ótima de foi de 1-2 g DQO/SSV, usando o ADS, e 3-6 g DQO/gSSV, usando o AADS. A velocidade de produção de H_2, na segunda condição (AADS) foi 3,5 vezes maior que a primeira condição (ADS). Em relação à influência do tipo de substrato, Kim e Kim (2012) estudaram várias fontes de carbono, incluindo xilose, glicose, galactose, sacarose, celobiose e amido para fermentação anaeróbia, sob condições termofílicas (60 °C). Os autores concluíram que os rendimentos de H_2 em ordem crescente foram: sacarose (3,17) > galactose (3,07) > glicose (3,01) > celobiose (2,45) > amido (2,08) > xilose (1,77 mol $_{H2}$/mol$_{hexose}$). Embora os ácidos acético e butírico sejam os metabólitos principais, o ácido lático foi detectado na fermentação da xilose, celobiose e amido, que tiveram baixa produção de H_2. Os autores concluíram que as fontes de carbono podem conduzir a vias metabólicas diferentes (KIM; KIM, 2012). Portanto, dependendo da origem do lodo anaeróbio e dos substratos disponíveis, pode ocorrer grande variação da melhor relação entre a concentração desses. Alguns exemplos podem ser observados na Tabela 11.

Um estudo detalhado, considerando a composição do inóculo e dos diversos resíduos, proporcionaria uma compreensão e uma comparação mais abrangentes que poderiam ser feitas em trabalhos futuros.

Tabela 11. Comparação entre diversas relações $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ encontradas na literatura para produção de H_2.

Substrato	Inóculo	(DQO/SSV)	Rendimento	Produtividade	Referência
Trigo	Lodo anaeróbio	8	57,1mLH_2/g $_{amido}$	7,76 mLH_2/h	(ARGUN *et al.*, 2008a)
Soro de queijo	Lodo anaeróbio	12,19	1,5 molH_2/mol$_{glicose}$	3,45 mLH_2/h	(KARGI, 2012)
Açúcar de beterraba	Lodo anaeróbio	10,25	3,2 molH_2/mol$_{glicose}$	84 mLH_2/h	(DHAR *et al.*, 2015)
Água residual da indústria de laticínio	Lodo anaeróbio	0,357	306 ml/gVSS	99 mL H_2/Lh	(WICHER *et al.*, 2013)
Resíduo da indústria de etanol	Lodo anaeróbio (ADS)	1-2	1,41 molH_2/mol$_{carb}$	16,8 mLH_2/h	(NASR *et al.*, 2011)
Resíduo da indústria de etanol	Lodo anaeróbio (AADS)	4-6	3,2 molH_2/mol$_{carb}$	57,9 mLH_2/h	(NASR *et al.*, 2011)
Resíduo de polpa de pêssego	Lodo anaeróbio	111g ST/g $_{biomass}$	123,27 mLH_2/gCOT*	28,7 mLH_2/h	(ARGUN; DAO, 2017)
Resíduo de polpa de pêssego	Lodo anaeróbio	8	0,93 molH_2/mol$_{glicose}$	1,54 mLH_2/h	(ARGUN; ONARAN, 2016)
Hidrolisado de lignocelulose sintético	Lodo anaeróbio	4	1.83 mol H_2/mol $_{sugar}$	----------	(AKOBI *et al.*, ; 2016)
HSA	Lodo anaeróbio	0,25	2,23 molH_2/mol$_{carb}$	4,01 mLH_2/h	Este trabalho

*Carbono orgânico total, carb: carboidrato

5.8 Cinética de produção de H_2 a partir do hidrolisado de semente de açaí

Utilizando a melhor relação $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$ determinada anteriormente, de 0,25 com 21,33 g.L^{-1} de $SSV_{inóculo}$, foi realizada uma cinética de produção de H_2 a partir do hidrolisado ácido de semente de açaí produzido no presente trabalho (HSA – lote 2), conforme apresentado na Figura 20. O resultado foi compatível ao encontrado no meio que mimetizava a concentração de açucares do hidrolisado da semente de açaí, indicando que os componentes gerados durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 não apresentaram interferência significativa na produção.

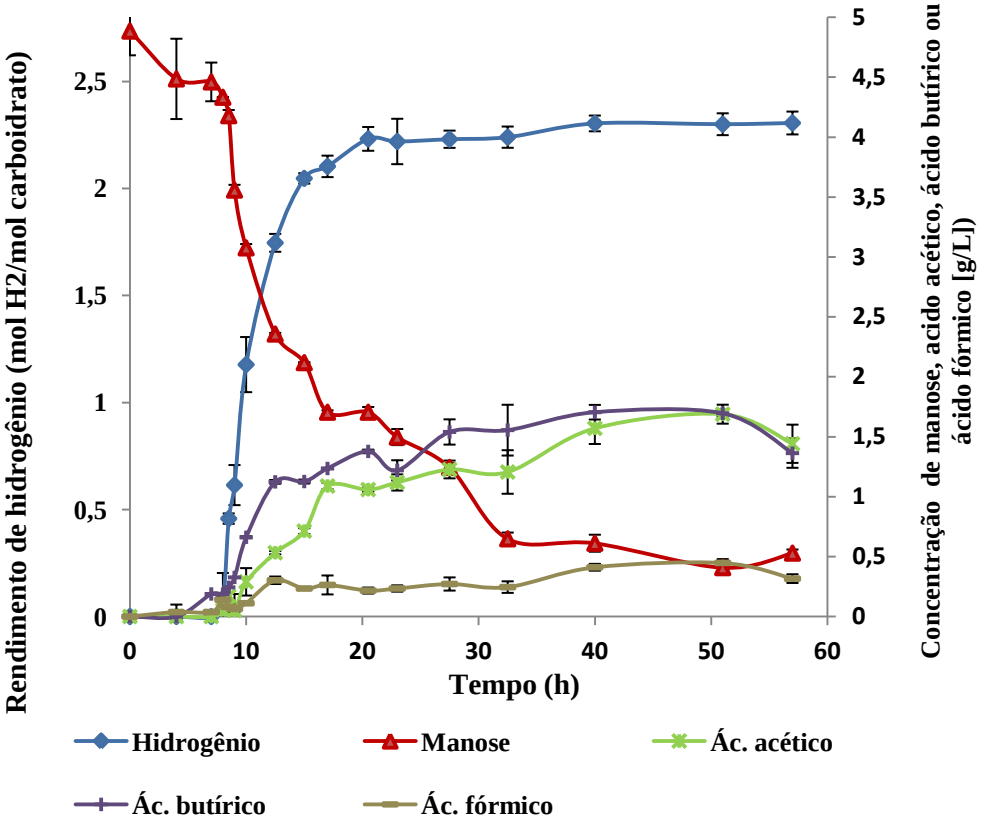

Figura 20. Cinética de produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico e consumo de manose em hidrolisado de semente de açaí em 160 rpm, 35 °C e 0,25 $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$.

A produção de hidrogênio se iniciou em 7 h de fermentação, juntamente com a geração de ácidos orgânicos voláteis, terminando após 20,5 h de fermentação. Durante esse período, 65,90% da manose foi consumida, ocorrendo o consumo posterior de até 92% da manose, porém apenas com produção de ácidos orgânicos e sem geração concomitante de hidrogênio. Tal fato se deve possivelmente à presença dos ácidos orgânicos voláteis, que foram produzidos ao longo do processo.

O melhor rendimento foi obtido em 20,5 horas de produção, equivalente a 2,23 $mol_{H2}/mol_{carboidrato}$. Neste tempo, foi observado uma razão molar de HAc/HBut de 0,77, similarmente à encontrada na fermentação em meio sintético. A melhor produtividade, no entanto, foi de 0,14 $mol_{H2}/(mol_{carboidrato}.h)$ em 15 horas, superior à observada com o meio sintético, de 0,0771 $mol_{H2}/(mol_{carboidrato.}h)$ em 26 h de produção.

A produção dos ácidos orgânicos acético e butírico ocorreu conforme esperado, atingindo concentrações máximas de 1,68 $g.L^{-1}$ e 1,70 $g.L^{-1}$ em 51 h, respectivamente. Foi observada também a produção de ácido fórmico, atingindo um máximo de 0,45 $g.L^{-1}$ em 51 h de fermentação. A presença de ácido fórmico não havia sido observada em

experimentos anteriores; porém, sabe-se que, em contraste ao que ocorre com o gênero *Clostridium*, organismos anaeróbios facultativos, tal como aos pertencentes ao gênero *Enterobacteriaceae*, podem metabolizar o piruvato a ácido fórmico e outros produtos (Figura 21, Eq.1 e 2). No entanto, em condições anaeróbicas, o ácido fórmico pode ser degradado a hidrogênio e dióxido de carbono, conforme a reação 3 representada na Figura 21 (LEE *et al.*, 2011).

(Eq. 1) $C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ \rightarrow 2CH_3COCOOH + NADH_2 + 2H_2$

(Eq. 2) $CH_3COCOOH \rightarrow CH_3COCoA + HCOOH$

Figura 21. Estequiometria das reações envolvidas na produção de ácido fórmico.

Fan e colaboradores (2016) verificaram um aumento no rendimento total de H_2 à medida que a quantidade de ácido fórmico aumentava durante a fermentação. Foi observado um aumento significativo do rendimento de hidrogênio, de 0,16 para 10,07 mol/(kg de matéria orgânica) com a formação de 6% de ácido fórmico ao longo da fermentação. Os resultados indicaram que esse ácido atuou como um agente de hidrólise ácida, facilitando a degradação dos carboidratos e inibindo sua polimerização (FAN *et al.*, 2016).

Panagiotopoulos e colaboradores (2011) também verificaram que o ácido fórmico, em uma concentração de até 5 $g.L^{-1}$, aumentou o rendimento de H_2 em relação aos carboidratos presentes. Os autores relataram que uma parte do ácido fórmico poderia ser utilizado como substrato para a produção de H_2 (PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). Posteriormente, Kumar e colaboradores (2014) verificaram que a taxa de produção de H_2 e o rendimento caíram abaixo de 50% na presença de 20 $g.L^{-1}$ de ácido fórmico. Em contrapartida, a produção cumulativa de H_2 aumentou de 233 mL, no experimento controle, para 238 e 269 mL na presença de 3 e 10 $g.L^{-1}$ de ácido fórmico, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2014).

Como pode ser observado na Tabela 12, o rendimento de H_2 a partir de HSA foi compatível aos descritos pela literatura para outras biomassas, incluindo os obtidos a partir de carboidratos simples. Desta forma, ressalta-se a importância da biomassa de semente de açaí para a fermentação anaeróbia e pode-se concluir que não há, de fato, uma inibição significativa exercida pelos componentes formados após a hidrólise desta biomassa.

Tabela 12. Comparação dos resultados da produção de hidrogênio deste trabalho e outros estudos.

Biomassa	Rendimento	Referência
Resíduo de milho	346 mL H_2/g TVS	(FAN, *et al.*, 2009)
Resíduo da indústria de cerveja	53,03 mL H_2/g peso seco	(CUI *et al.*, 2009)
Polpa de beterraba	115,6 mL H_2/g DQO	(OZKAN et al., 2011)
Citrus limetta	3,59 mol H_2/kg DQO	(VENKATA *et al.*, 2009)
Palha de milho	3305 mL H_2/L meio	(CAO, *et al.*, 2009)
Espiga de milho	107,9 mL H_2/g TVS	(PAN, CHUNMEI *et al.*, 2010)
Palha de milho	209,8 mL H_2/g SVT	(PAN, CHUN MEI *et al.*, 2011)
Grama	72,21 mL H_2/g	(CUI; SHEN, 2012)
Grama	4,9 mol H_2/g TS	(SIGURBJORNSDOTTIR; ORLYGSSON, 2012)
Resíduo de cogumelo	2,52 mol H_2/g DQO	(LI, YA CHIEH *et al.*, 2011)
Óleo de palma	0,71 mol H_2/mol açúcar	(KHAMTIB *et al.*, 2011)
Folhas de álamo	44,92 mL H_2/g seca	(CUI *et al.*, 2010)
Palha de arroz	0,76 mol H_2/mol xilose	(LO *et al.*, 2010)
Palha de soja	60,2 mL H_2/g seca	(HAN *et al.*, 2012)
Bagaço de cana-de-açúcar	1,73 mol H_2/mol açúcar	(PATTRA *et al.*, 2008)
Bagaço de sorgo sacarino	2,6 mol H_2/mol hexose	(PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2010)
Resíduo de tofu	1,48 mol H_2/mol hexose	(KIM, DONG HOON; LEE; KIM, 2011)
Palha de trigo	168,4 mL H_2/g VS	(NASIRIAN *et al.*, 2011)
Resido de alimentos	2,26 mol H_2/mol hexose	(IM *et al.*, 2012)
Soro de queijo	1,5 mol H_2/mol glicose	(KARGI, 2012)
Açúcar de beterraba	3,2 mol H_2/mol glicose	(DHAR *et al.*, 2015)
Resíduo da indústria de etanol	1,41 mol H_2/mol carboidrato	(NASR *et al.*, 2011)
Resíduo da indústria de etanol (lodo aclimatado)	3,2 mol H_2/mol carboidrato	(NASR *et al.*, 2011)
Resíduo de polpa de pêssego	0,93 mol H_2/mol glicose	(ARGUN e*t al*., 2016)
Hidrolisado sintético de lignocelulose	1,83 mol H_2/mol carboidrato	(AKOBI *et al*., ; 2016)
Galactose	2,23 mol H_2/mol hexose	(XIA *et al.*, 2016)
Frutose	2,09 mol H_2/mol hexose	(SÁ, 2011)
Glicose	2,30 mol H_2/mol hexose	(AGHCHEHSARAEE *et al.*, 2008)
Manose	2,30 mol H_2/mol manose	(DATAR *et al.*, 2007)
HSA	2,32 mol H_2/mol carboidrato	Este estudo

5.9 Produção de metano utilizando o HPLW resultante da produção de hidrogênio

Como mencionado anteriormente, durante a produção de hidrogênio, nem todo substrato é direcionado para a geração desse gás, pois uma grande parte do substrato é convertida em vários outros metabólitos. Esses metabólitos estão em grande parte presentes no efluente do processo de produção de H_2, conhecido por HPLW (*Hydrogen*

Production Liquid Waste), que pode ser convertido a metano através da metanogênese (SU *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2014).

Para o experimento de produção de metano, foi utilizado o lodo 3 em uma fermentação conduzida por 24 horas nas condições selecionadas anteriormente neste trabalho, com 0,25 de $DQO_{substrato}/SSV_{inóculo}$, nesta fermentação foi obtido um rendimento de 2,19 $molH_2/mol_{carb}$ (Figura 22).

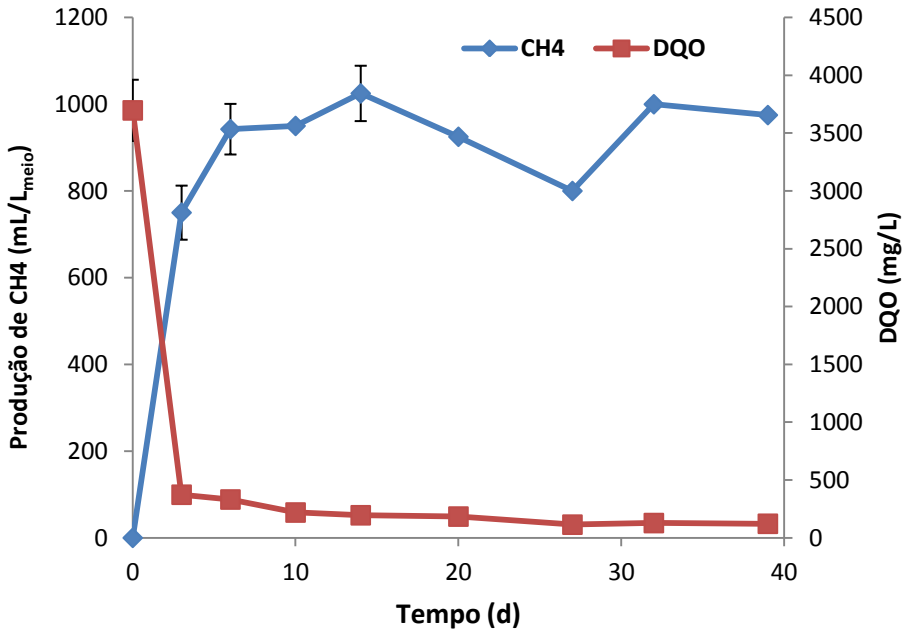

Figura 22. Produção de metano a partir dos ácidos orgânicos voláteis e manose residual presentes no HPLW a 35 °C e 160 rpm.

O meio utilizado para produção de metano (HPLW) apresentou 0,20 $g.L^{-1}$ de manose, além de ácido fórmico, ácido acético e ácido butírico a 0,05 $g.L^{-1}$, 0,42 $g.L^{-1}$ e 1,02 $g.L^{-1}$, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 23, foi observada uma alta produção de metano e consequente redução da DQO já no terceiro dia. Após seis dias de fermentação, alcançou-se uma produção de 942,5 $mL_{CH4}.L_{meio}^{-1}$ de metano com uma redução de DQO de 3366 $mg.L^{-1}$. A partir do terceiro dia de produção, não foi observado a presença de ácidos ou de manose e foi alcançada uma redução da DQO de 89,9%. Valores de produção similares aos obtidos por Prapinagsorn e colaboradores que produziram 902 e 1002 mL_{CH4}/L_{meio} a partir de efluente hidrogenado de uma co-digestão de grama com esterco de vaca e silagem com esterco, repectivamente. (PRAPINAGSORN *et al.*, 2018).

Estes resultados indicam que a aplicação da produção de hidrogênio e metano em dois estágios a partir da produção sequencial de semente de açaí é viavel, podendo-se utilizar completamente a semente de açaí e ainda minimizar a quantidade de resíduos no final do processo de digestão anaeróbica.

6. CONCLUSÕES

- A manose é um substrato potencial para a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbica, apresentando rendimentos similares aos obtidos com glicose, e a composição do HSA é favorável para a produção de hidrogênio devido à presença de açúcares simples;

- Não foi observada inibição do processo fermentativo de produção de hidrogênio a partir do HSA, indicando que os subprodutos gerados na produção deste hidrolisado, derivados da degradação de açúcares e fenólicos e da extração de antioxidantes presentes na semente do açaí, não prejudicaram o processo;

- Os métodos de pré-tratamento ácido e térmico do inóculo foram adequados ao processo, mostrando-se eficientes na seleção dos microrganismos produtores de H_2 e apresentando um rendimento de 1,87 mol_{H2} /$mol_{carboidrato}$ em 24 h de fermentação;

- O pré-tratamento ácido do lodo necessitou de um período de aclimatação anterior ao processo fermentativo, enquanto que o lodo pré-tratado termicamente pôde ser utilizado diretamente, sendo o mais indicado para o processo;

- A relação DQO/SSV apresentou grande influência no rendimento de H_2, indicando ser este um importante fator a ser explorado. A relação de 0,25 DQO/SSV com 21,33 $g.L^{-1}$ de SSV aumentou o rendimento de hidrogênio em 24 horas de produção em 18% quando comparado à relação de 0,5 DQO/SSV com 10,67 g/L-^{1} de SSV, utilizada inicialmente;

- O rendimento obtido com hidrolisado de semente de açaí foi de 2,23 mol_{H2}/$mol_{carboidrato}$ em 20,5 h, dado que é compatível com os melhores resultados encontrados na literatura para carboidratos simples, indicando que o HSA é um substrato adequado para a produção de hidrogênio;

- Foi observado uma produção de 942,5 mL/L de metano em 6 dias de produção com uma redução de DQO de 3366 mg/L, correspondendo a uma redução de cerca de 90% da DQO inicial e indicando o potencial do processo sequencial proposto para geração de energia e concomitante tratamento do efluente;

- Este trabalho demonstra, de forma pioneira, que a semente de açaí, após hidrólise ácida, pode ser convertida em hidrogênio e metano de forma sequencial, sendo este um processo altamente interessante do ponto de vista energético, ambiental e que tem potencial de valorizar regiões brasileiras, produtoras de açaí, pouco favorecidas economicamente;

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento de um planejamento experimental com as variáveis pH, relação $DQO_{substrato}/SSV_{inoculo}$ e temperatura de pré-tratamento, a fim de averiguar possíveis melhorias ou mesmo uma otimização mais completa do processo fermentativo de H_2;

- Variação das condições de pré-tratamento do lodo anaeróbio utilizadas no presente trabalho, como a utilização de um tratamento ácido mais brando, e avaliação de outros pré-tratamentos sugeridos pela literatura;

- Avaliação de meios de cultivo que favoreçam o crescimento de organismos produtores de hidrogênio como alternativa ao emprego de pré-tratamentos do lodo de forma a reduzir o custo global do processo;

- Identificação dos microrganismos presentes no lodo anaeróbio ao longo do processo de fermentação anaeróbia a fim de ampliar a compreensão sobre o processo e averiguar a possível variação microbiana que pode ser encontrado neste material em caso de um processo em larga escala.

- Avaliar o reciclo do inóculo utilizando na digestão anaerobia para produção de H_2

8. REFERÊNCIAS

ADAV, Sunil S. *et al.* Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: Concentration-to-extinction approach. **Bioresource Technology** v. 100, n. 9, p. 2546–2550 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.014>.1873-2976 (Electronic)r0960-8524 (Linking).

AKOBI, Chinaza; HAFEZ, Hisham; NAKHLA, George. The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. **Bioresource Technology** v. 221, p. 598–606 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.067>.

ALTARAC S, Pape's D. Use of D-mannose in prophylaxis of recurrent urinary tract infections (UTIs) in women. **BJU Int** p. 113:9–10. , 2014.

ALTMAN, R. F. A. O caroço do açaí. **Embrapa Amazônia Oriental.** , 1956.

ANP. *Biometano*. *www.anp.gov.br*

APHA. APHA: Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation,** v. 552 , 1998.

ARGUN, Hidayet *et al.* Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 21, p. 6109–6115 , 2008a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.004>.0360-3199.

ARGUN, Hidayet *et al.* Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 7, p. 1813–1819 , 2008b.0360-3199.

ARGUN, Hidayet; DAO, Siaka. Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 42, n. 4, p. 2569–2574 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.225>.

ARGUN, Hidayet; KARGI, Fikret. Effects of light source, intensity and lighting regime on bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and photo-fermentations. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 4, p. 1604–1612 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.033>.0360-3199.

ARGUN, Hidayet; ONARAN, G??lizar Gülizar G??lizar G??lizar. Hydrogen gas production from waste paper by sequential dark fermentation and electrohydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 19, p. 8057–8066 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.170>.

AUSIELLO, Angelo *et al.* Biohydrogen production by dark fermentation of Arundo donax using a new methodology for selection of H 2 -producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** p. 1–14 , 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319917339186>.

BAGHCHEHSARAEE, Bita *et al.* Fermentative hydrogen production by diverse microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 10, p. 5021–5027 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.072>.0360-3199.

BAGHCHEHSARAEE, Bita *et al.* The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. v. 33, p. 4064–4073 , 2008.

BAKONYI, P *et al.* Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. v. 40, p. 806–813 , 2014.

BALAT, Havva; KIRTAY, Elif. *Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects* .**International Journal of Hydrogen Energy**. [S.l: s.n.]. , 2010

BASTIDAS-OYANEDEL, Juan-rodrigo *et al.* Bioresource Technology Gas controlled hydrogen fermentation. **Bioresource Technology** v. 110, p. 503–509 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.122>.

BECK, Iris-Constanze *et al.* 13C-NMR study of propionate metabolism by sludges from bioreactors treating sulfate and sulfide rich wastewater. **Biodegradation** v. 9, n. 1–2, p. 179–186 , 2007. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/3436040?seq=1#page_scan_tab_contents%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/ac034210g%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135496003697%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022062%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/sc>.0923-9820 (Print)r0923-9820 (Linking).

BECKERS, Laurent *et al.* Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum CWBI1009 and Citrobacter freundii CWBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnology agrofuels** v. 14, n. JANUARY, p. 541–548 , 2010.

BERBEROĞLU, Halil; JAY, Jenny; PILON, Laurent. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by Anabaena variabilis ATCC 29413. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 4, p. 1172–1184 , 2008.

BHARATHIRAJA, B *et al.* Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. **Fuel** v. 185, p. 810–828 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.030>.

BICHARA, C M G. **Açai (Euterpe oleracea Martius)**. [S.l.]: Woodhead Publishing Limited, 2011. 1-27 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857092762.1>. .

BISAILLON, Ariane; TURCOT, Jonathan; HALLENBECK, Patrick C. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of Escherichia coli. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 31, n. 11, p. 1504–1508 , 2006.03603199.

BOVI, M. E. Biodiversidade Amazônica: Exemplos e estratégias de utilização. **Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico** p. 44–55 , 2000.

BRENTNER, Laura B. LB *et al.* Challenges in Developing Biohydrogen as a Sustainable Energy Source: Implications for a Research Agenda. **Environmental Science & Technology** v. 44, n. 7, p. 2243–2254 , 2010. Disponível em:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9030613>.

BUNDHOO, M. A Zumar; MOHEE, Romeela. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 16, p. 6713–6733 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.

CAI, Jin Ling *et al.* Enrichment and hydrogen production by marine anaerobic hydrogen-producing microflora. **Chinese Science Bulletin** v. 54, n. 15, p. 2656–2661 , 2009.

CAO, Guangli *et al.* Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 17, p. 7182–7188 , 2009.0360-3199.

CAO, Xianyan; ZHAO, Youcai. The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. **Journal of Material Cycles and Waste Management** v. 11, n. 3, p. 244–250 , 2009.1438-4957.

CATALUÑA, R; Eliana Weber de Menezes; Renato. Rendimento térmico e emissões de contaminantes atmosféricos de gasolinas formuladas com etanol, MBTE e TAEE. **Química Nova** , 2008.

CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. **Belém: CEJUP** p. 271 , 1991.

CHANG, Sheng; LI, Jian-zheng; LIU, Feng. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy** v. 36, n. 5, p. 1517–1522 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.11.023>.

CHAUBEY, Rashmi *et al.* A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 23, p. 443–462 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.02.019>.1364-0321.

CHAVES, J.M., PECHNIK, E. O assaí, um dos alimentos básicos da Amazônia, Anais do 4º Congresso da Associação de Química do Brasil. **Anais do 4º Congresso da Associação de Química do Brasil** p. 169 – 172 , 1948.

CHEN, Wen-ming *et al.* Fermentative hydrogen production with CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 30, n. 10, p. 1063–1070 , 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319904003192>.03603199.

CHEN, Ye; CHENG, Jay J.; CREAMER, Kurt S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology** v. 99, n. 10, p. 4044–4064 , 2008.0960-8524 (Print)n0960-8524 (Linking).

CHERNICARO, C.A.L.; Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios. **UFMG: Belo Horizonte,** , 2007.

CHOI, Won-Sik *et al.* Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and

oriental medicinal plants. **Agricultural Chemistry and Biotechnology** v. 41, n. 7, p. 556–559 , 1998.

CHONG, Mei-ling *et al.* Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 8, p. 3277–3287 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>.

CIRANNA, Alessandro *et al.* Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile Caloramator celer: Kinetic, metabolic and transcription analyses. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 39, n. 12, p. 6391–6401 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.047>.0360-3199.

CORNELL, Clayton B. Natural Gas Cars: CNG Fuel Almost Free in Some Parts of the Country. **Gas2** , 2008.

CUI, Maojin *et al.* Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 9, p. 4041–4047 , 2010.0360-3199.

CUI, Maojin *et al.* Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 19, p. 7971–7978 , 2009.0360-3199.

CUI, Maojin; SHEN, Jianquan. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 1, p. 1120–1124 , 2012.

DA SILVA, J.P. Avaliação de pré-tratamento ácido de semente de açaí para hidrólise enzimática e produção de açúcares fermentáveis. , 2017.

DA SILVA VERAS, Tatiane *et al.* Hydrogen: Trends, production and characterization of the main process worldwide. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 42, n. 4, p. 2018–2033 , 2017.

DANKO, Anthony S.; ABREU, Ângela A.; ALVES, M. Madalena. Effect of arabinose concentration on dark fermentation hydrogen production using different mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 17, p. 4527–4532 , 2008.

DANON, B.; VAN DER AA, L.; DE JONG, W. Furfural degradation in a dilute acidic and saline solution in the presence of glucose. **Carbohydrate Research** v. 375, p. 145–152 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.04.030>.0008-6215.

DAS, D. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 26, n. 1, p. 13–28 , 2001.0360-3199.

DAS, Debabrata; VEZIROGLU, T. Nejat. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 21, p. 6046–6057 , 2008.0360-3199.

DATAR, Rohit *et al.* Hydrogen production from the fermentation of corn stover

biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 32, n. 8, p. 932–939 , 2007.0360-3199.

DE FÁTIMA PALHARES, Dayana D.Arc; VIEIRA, Luiz Gustavo Martins; DAMASCENO, João Jorge Ribeiro. Hydrogen production by a low-cost electrolyzer developed through the combination of alkaline water electrolysis and solar energy use. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 3, p. 0–10 , 2018.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos *et al.* Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 7, p. 2986–2997 , 2013.03603199.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 23, p. 15177–15186 , 2011.0360-3199.

DHAR, Bipro Ranjan *et al.* Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. **Bioresource Technology** v. 198, p. 223–230 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.048>.0960-8524.

DHAR, Bipro Ranjan; ELBESHBISHY, Elsayed; NAKHLA, George. Influence of iron on sulfide inhibition in dark biohydrogen fermentation. **Bioresource Technology** v. 126, p. 123–130 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.043>.0960-8524.

DINCER, I; ZAMFIRESCU, C. Renewable-energy-based multigeneration systems. , 2012.

DRANSFIELD, John. *et al.* Genera Palmarum. The Evolution and Classification of Palms. **Kew Publishing** v. 2, p. 744 , 2008. Disponível em: <http://tna.europarchive.org/20090124062953/http://kew.org/publications/ai_generapalm.pdf>.1842461826.

E., Moore H. The major groups of palms and their distribuitoin. **Gentes Herb** v. 11, p. 27–141 , 1973.

EHTESHAMI, Seyyed Mohsen Mousavi; CHAN, S. H. The role of hydrogen and fuel cells to store renewable energy in the future energy network - potentials and challenges. **Energy Policy** v. 73, p. 103–109 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2014.04.046>.0301-4215.

EKER, Serkan; SARP, Meltem. Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 42, n. 4, p. 2562–2568 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.020>.

ELBESHBISHY, Elsayed *et al.* A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 79, n. October 2015, p.

656–668 , 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117307153>.

ELBESHBISHY, Elsayed; HAFEZ, Hisham; NAKHLA, George. Enhancement of biohydrogen producing using ultrasonication. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 12, p. 6184–6193 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.119>.

ETCHISON JR, Freeze HH. Enzymatic assay of D-mannose in serum. **Clin Biochem** p. 43:533–8 , 1997.

EWAN, B. C.R.; ALLEN, R. W.K. A figure of merit assessment of the routes to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 30, n. 8, p. 809–819 , 2005.0360-3199.

FABER, Mariana de Oliveira; FERREIRA-LEIT??O, Viridiana Santana. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology** v. 219, p. 365–370 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.141>.

FALOYE, F. D.; GUEGUIM KANA, E. B.; SCHMIDT, Stefan. Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique - Semi pilot scale production assessment. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 39, n. 11, p. 5607–5616 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.163>.

FAN, Y. J. *et al.* Catalytic gasification of dewatered sewage sludge in supercritical water: Influences of formic acid on hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 7, p. 4366–4373 , 2016.1865207098.

FAN, Yaoting *et al.* Bioconversion of aging corn to biohydrogen by dairy manure compost. **Industrial and Engineering Chemistry Research** v. 48, n. 5, p. 2493–2498 , 2009.

FAN, Yaoting *et al.* Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology** v. 91, n. 2, p. 189–193 , 2004.0960-8524.

FANG, H. H P; ZHANG, T.; LIU, H. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 58, n. 1, p. 112–118 , 2002.0175-7598.

FELSSNER, Karla S *et al.* CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DO AÇAÍ (Euterpe oleraceae Mart .) COMO INGREDIENTE EM ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES (Dados preliminares) ACAI (Euterpe oleraceae Mart .) SEED CHARACTERIZATION AS AN INGREDIENT Resultados e Discussão : O caroço do açaí apres. n. 1995, p. 25–26 , 2015.

FENG, Xiaoqiong *et al.* Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 7, p. 3058–3064 , 2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.015>.

GARRITANO, Alessandro do Nascimento *et al.* Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolized palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. **International Journal of Hydrogen Energy** p. 1–9 , 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036031991733923X>.

GHIMIRE, Anish *et al.* A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy** v. 144, p. 73–95 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>.0306-2619.

GHOSH, Dipankar; HALLENBECK, Patrick C. Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered Escherichia coli DJT135. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 19, p. 7979–7982 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.004>.

GINKEL, Steven W Van; Ã, Bruce Logan. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. v. 39, p. 3819–3826 , 2005.

GLEYSSON B. MACHADO. *Acetogênese na Biodigestão Anaeróbia*. Disponível em: <http://www.portaldobiogas.com/acetogenese-na-biodigestao-anaerobia/>.

GOSTEVA, K S; VORONIN, O G; KARYAKIN, A A. Measuring the pH Dependence of Hydrogenase Activities. v. 72, n. 9, p. 968–973 , 2007.

GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological events in Clostridium acetobutylicum during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. **Applied and Environmental Microbiology** v. 58, n. 12, p. 3896–3902 , 1992.0099-2240.

GUO, Xin Mei *et al.* Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. **International Journal of Hydrogen Energy** 2013 03603199.

GUO, Yiping *et al.* Effect of ultrasonic treatment of digestion sludge on bio-hydrogen production from sucrose by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 8, p. 3450–3455 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.090>.

HAFEZ, Hisham *et al.* Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 1, p. 81–92 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>.

HALLENBECK, Patrick C.; BENEMANN, John R. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. 2002, [S.l: s.n.], 2002. p.1185–1193. 0360-3199. .

HALLENBECK, Patrick C.; GHOSH, Dipankar. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology** v. 27, n. 5, p. 287–297 , 2009.0167-7799.

HAN, Hongliang *et al.* Optimization of biohydrogen production from soybean straw

using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 17, p. 13200–13208 , 2012.0360-3199.

HAWKES, F. R. *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. 2002, [S.l: s.n.], 2002. p.1339–1347. 0360-3199. .

HAWKES, Freda R. *et al.* Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 32, n. 2, p. 172–184 , 2007.0360-3199.

HE, Quan (Sophia); MCNUTT, Josiah; YANG, Jie. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 71, n. January 2016, p. 63–76 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>.

HEYNDRICKX, M; DE VOS, P; DE LEY, J. H 2 production from chemostat fermentation of glucose byClostridium butyricum andClostridium pasteurianum in ammonium-and phosphate limitation. **Biotechnology letters** v. 12, n. 10, p. 731–736 , 1990. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/v75120j1313x2524/>.

HOSSEINI, Seyed Ehsan; WAHID, Mazlan Abdul. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: Promising green energy carrier for clean development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 57, p. 850–866 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.112>.1364-0321.

HU, Cheng Cheng *et al.* Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 35, p. 15686–15692 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.131>.

HU, Xing *et al.* d-Mannose: Properties, Production, and Applications: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 15, n. 4, p. 773–785 , 2016.

HUESEMANN, Michael H. *et al.* Hydrogen generation through indirect biophotolysis in batch cultures of the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium plectonema boryanum. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 162, n. 1, p. 208–220 , 2010.0273-2289.

HWANG, Jae-hoon Hoon *et al.* Hydrogen production from sulfate- and ferrous-enriched wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 21, p. 13984–13990 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.156>.0360-3199.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*.

IM, Wan Taek *et al.* Bacterial community analyses by pyrosequencing in dark fermentative H 2-producing reactor using organic wastes as a feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 10, p. 8330–8337 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.167>.0360-3199.

JACINTO, E *et al. Bioquimica (VOET).pdf* .**Nature Cell Biology**. [S.l: s.n.]. , 2004

JAMES BD, BAUM GN, PEREZ J, Baum KN. Technoeconomic Boundary Analysis of Biological Pathways to Hydrogen Production. Report to National Renewable. **Energy Lab, Golden, Colorado.** , 2009.

JAYASINGHEARACHCHI, H. S. *et al.* Fermentative hydrogen production by two novel strains of Enterobacter aerogenes HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 17, p. 7197–7207 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.06.079>.

JIANLONG WANG, Wei Wan. Comparison of different pre-treatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from intertidal sludge. **International Journal of Green Energy** v. 13, n. 3, p. 292–297 , 2008.0360-3199.

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology** v. 199, p. 103–112 , 2016.1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking).

KALIL, Mohd Sahaid *et al.* Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Production using C . acetobutylicum. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** v. 4, n. 4, p. 393–401 , 2008.15533468 (ISSN).

KAMALASKAR, Leena B. *et al.* High biohydrogen yielding Clostridium sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 19, p. 10639–10644 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.020>.0360-3199.

KAPDAN, Ilgi Karapinar; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology** v. 38, n. 5, p. 569–582 , 2006.0141-0229.

KARGI, Fikret; EREN, Nur Seza; OZMIHCI, Serpil. Effect of initial bacteria concentration on hydrogen gas production from cheese whey powder solution by thermophilic dark fermentation. **Biotechnology Progress** v. 28, n. 4, p. 931–936 , 2012.8756-7938.

KAWAGOSHI, Yasunori *et al.* Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 24, p. 13365–13369 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.121>.0360-3199.

KHALIL, M a K. NON-CO2 GREENHOUSE GASES IN THE ATMOSPHERE. **Energy** p. 3 , 1999.

KHAMTIB, Sontaya; PLANGKLANG, Pensri; REUNGSANG, Alissara. Optimization of fermentative hydrogen production from hydrolysate of microwave assisted sulfuric acid pretreated oil palm trunk by hot spring enriched culture. 2011, [S.l: s.n.], 2011. p.14204–14216. 0360-3199. .

KHETKORN, Wanthanee; LINDBLAD, Peter; INCHAROENSAKDI, Aran. Enhanced biohydrogen production by the N2-fixing cyanobacterium Anabaena siamensis strain TISTR 8012. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 23, p. 12767–

12776 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.135>.

KIM, Dong Hoon; KIM, Mi Sun. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 2, p. 2021–2027 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.043>.0360-3199.

KIM, Dong Hoon; LEE, Dong Yeol; KIM, Mi Sun. Enhanced biohydrogen production from tofu residue by acid/base pretreatment and sewage sludge addition. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 21, p. 13922–13927 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.085>.0360-3199.

KIM, Mijung *et al.* Hydrogen production by anaerobic co-digestion of rice straw and sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 4, p. 3142–3149 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.10.116>.0360-3199.

KIM, Sang Hyoun; HAN, Sun Kee; SHIN, Hang Sik. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry** v. 41, n. 1, p. 199–207 , 2006.1359-5113.

KIM, Sangho *et al.* A Computer-Based Method for Determination of the Cell-Free Layer Width in Microcirculation. n. October 2005, p. 199–207 , 2006.

KIRTAY, Elif. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion and Management** v. 52, n. 4, p. 1778–1789 , 2011.01968904.

KOTAY, S M; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 1, p. 258–263 , 2008.0360-3199.

KRAEHENBUEHL, Karin *et al.* Selective enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid lactones in a model system and in a coffee extract. Application to reduction of coffee bitterness. **Food Chemistry** v. 218, p. 9–14 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.055>.0308-8146.

KUMAR, Gopalakrishnan *et al.* Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 57, p. 879–891 , 2016.1364-0321.

KUMAR, Gopalakrishnan; CHEON, Hyo Chang; KIM, Sang Hyoun. Effects of 5-hydromethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H2production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 39, n. 30, p. 16885–16890 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.063>.0360-3199.

KUMAR, Narendra; DAS, Debabrata. Enhancement of hydrogen production by Enterobacter cloacae IIT-BT 08. **Process Biochemistry** v. 35, n. 6, p. 589–593 , 2000.1359-5113.

KUMARI, Sinu; DAS, Debabrata. Biologically pretreated sugarcane top as a potential raw material for the enhancement of gaseous energy recovery by two stage biohythane process. **Bioresource Technology** v. 218, p. 1090–1097 , 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.070>.

LAI, Zhicheng *et al.* Optimization of key factors affecting hydrogen production from sugarcane bagasse by a thermophilic anaerobic pure culture. **Biotechnology for Biofuels** v. 7, n. 1, p. 1–11 , 2014.1754-6834.

LAMTEC. Energias renov_aveis: hidrogênio. , 2014.

LAY, J J *et al.* Factors affecting hydrogen production from food wastes by Clostridium-rich composts. **Journal of Environmental Engineering-Asce** v. 131, n. 4, p. 595–602 , 2005.0733-9372.

LE, Diep Thi Hong; NITISORAVUT, Rachnarin. Modified hydrotalcites for enhancement of biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 40, n. 36, p. 12169–12176 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.142>.

LEE, Duu Jong; SHOW, Kuan Yeow; SU, Ay. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresource Technology** v. 102, n. 18, p. 8393–8402 , 2011.0960-8524.

LEE, Hyung-Sool; SALERNO, Michael B.; RITTMANN, Bruce E. Thermodynamic Evaluation on H 2 Production in Glucose Fermentation. **Environmental Science & Technology** v. 42, n. 7, p. 2401–2407 , 2008. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es702610v>.

LEE, Jeewon. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology** v. 56, n. 1, p. 1–24 , 1997.0168-1656.

LEE, Kuo Shing *et al.* Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 32, n. 8, p. 950–957 , 2007.0360-3199.

LEE, Sing *et al.* Stigmatizing experience and structural discrimination associated with the treatment of schizophrenia in Hong Kong. **Social Science and Medicine** v. 62, n. 7, p. 1685–1696 , 2006.0277-9536 (Print)r0277-9536 (Linking).

LEMIRE, Joseph A.; HARRISON, Joe J.; TURNER, Raymond J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology** v. 11, n. 6, p. 371–384 , 2013. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro3028>.1740-1526.

LEVIN, David B.; PITT, Lawrence; LOVE, Murray. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 29, n. 2, p. 173–185 , 2004.0360-3199.

LI, Chenlin; FANG, Herbert H. P. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** v. 37, n. 1, p. 1–39 , 2007. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380600729071>.1064-3389.

LI, Ya Chieh *et al.* Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step

acid hydrolysis process. 2011, [S.l: s.n.], 2011. p.14245–14251. 0360-3199. .

LICHTENTHÄLER, Ramona *et al.* Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition** v. 56, n. 1, p. 53–64 , 2005.0963-7486 (Print)r0963-7486 (Linking).

LIN, C. Y.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 29, n. 1, p. 41–45 , 2004.8864245197.

LIN, Pei Ying *et al.* Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 32, n. 12, p. 1728–1735 , 2007.0360-3199.

LIN, Yen Hui; ZHENG, Hong Xiang; JUAN, Mu Ling. Biohydrogen production using waste activated sludge as a substrate from fructose-processing wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection** v. 90, n. 3, p. 221–230 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2012.02.004>.

LIU, Hongyan *et al.* Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 24, p. 9696–9701 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.025>.

LIU, Hongyan; WANG, Guangce. Hydrogen production of a salt tolerant strain Bacillus sp. B2 from marine intertidal sludge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 28, n. 1, p. 31–37 , 2012.

LIU, Y. The So/Xo-dependent dissolved organic carbon distribution in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. **Water Research** v. 34, n. 5, p. 1645–1651 , 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135499002936>.

LIU, Z. L. *et al.* Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 31, n. 8, p. 345–352 , 2004.1029500401.

LO, Yung Chung *et al.* Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by Clostridium butyricum CGS5. **Bioresource Technology** v. 101, n. 15, p. 5885–5891 , 2010.0960-8524.

LOGAN, Bruce E. *et al.* Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. **Environmental Science and Technology** v. 36, n. 11, p. 2530–2535 , 2002.0013-936X (Print)r0013-936X (Linking).

LOGE, FRANK J.; EMERICK, ROBERT W.; THOMPSON, DONALD E.; NELSON, DOUGLAS C.; DARBY, Jeannie L. Factors Influencing Ultraviolet Disinfection Performance Part I: Light Penetration to Wastewater Particles. **Water Environment Research** v. 71, n. 3 , 1999.

LOUÍSE MARTINS MEDINA, CAMILA ALMEIDA OLIVEIRA DA SILVA,

MARIA ANTONIETA PEIXOTO GIMENES COUTO, ARMANDO. Caracterização da farinha do caroço de açaí (Euterpe oleracea mart.) e avaliação do pré tratamento ácido, com vistas ao aproveitamento para a produção de manitol. 2016, [S.l: s.n.], 2016.

LUO, Gang *et al.* Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. **Bioresource Technology** v. 101, n. 3, p. 959–964 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.090>.0960-8524.

LUONGO, Vincenzo *et al.* Photofermentative production of hydrogen and poly-B-hydroxybutyrate from dark fermentation products. **Bioresource Technology** v. 228, p. 171–175 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.079>.

LYONS TP, Jaques KA. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. Proceedings of the Alltech's. **Biotechnology in the feed industry.** p. 167–74 , 1994.

MA, Zhihong; LI, Chan; SU, Haijia. Dark bio-hydrogen fermentation by an immobilized mixed culture of Bacillus cereus and Brevumdimonas naejangsanensis. **Renewable Energy** v. 105, p. 458–464 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.046>.

MAMIMIN, Chonticha; PRASERTSAN, Poonsuk; KONGJAN, Prawit. 2017 Effects of volatile fatty acids in biohydrogen effluent on biohythane production from palm oil mill effluent under thermophilic condition. **Electronic Journal of Biotechnology** , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.07.006>.

MANDAL, Biswajit; NATH, Æ Kaushik. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H 2 by Enterobacter cloacae. v. 2, p. 831–835 , 2006.1052900690088.

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. Procedimentos anal??ticos para identifica????o de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quimica Nova** v. 31, n. 5, p. 1218–1223 , 2008.0100-4042.

MATHEWS, Juanita; WANG, Guangyi. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 17, p. 7404–7416 , 2009.0360-3199.

MIN, Hongtao; SHERMAN, Louis A. Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic cyanobacterium cyanothece sp. Strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. **Applied and Environmental Microbiology** v. 76, n. 13, p. 4293–4301 , 2010.0099-2240, 1098-5336.

MIRANDA, I. P. DE A. & RABELO, A. Guia de identificação das palmeiras de Porto. **Editora da Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia** , 2008.

MISHRA, Puranjan *et al.* Enhanced hydrogen production from palm oil mill effluent using two stage sequential dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 41, p. 18431–18440 , 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.138>.

MMM., Souza. Processos inorgânicos. . Rio de Janeiro. **Synergia: FAPERJ;** n. 713, p. 244 , 2012.

MOHAMMADI, Parviz *et al.* Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed micro fl ora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill ef fl uent. v. 19, p. 1654–1658 , 2011.

MONLAU, F. *et al.* Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances** v. 32, n. 5, p. 934–951 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>.1873-1899 (Electronic)r0734-9750 (Linking).

MOREIRA, Renata *et al.* Patentes depositadas em âmbito nacional como indicador de desenvolvimento das tecnologias de produção de hidrogênio. **Quimica Nova** v. 36, n. 5, p. 748–751 , 2013.

MORIMOTO, M. *et al.* Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 29, n. 7, p. 709–713 , 2004.0360-3199.

MU, Y *et al.* Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 31, n. 6, p. 780–785 , 2006. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036031990500220X>.03603199.

MU, Yang; YU, Han Qing; WANG, Gang. Evaluation of three methods for enriching H2-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, n. 4, p. 947–953 , 2007.0141-0229.

MUSSATTO, Solange Inês; ROBERTO, Inês Conceição. *Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review* .**Bioresource Technology**. [S.l: s.n.]. , 2004

NAGARAJAN, Dillirani *et al.* Recent insights into biohydrogen production by microalgae ??? From biophotolysis to dark fermentation. **Bioresource Technology** v. 227, n. 1, p. 373–387 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>.09608524.

NASIRIAN, Nima *et al.* Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 1, p. 411–420 , 2011.0360-3199.

NASR, Noha *et al.* Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 20, p. 12761–12769 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.032>.0360-3199.

NATH, Kaushik; DAS, Debabrata. *Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches* .**Applied Microbiology and Biotechnology**. [S.l: s.n.]. , 2004

NAVARRO, E. *et al.* Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in Synechocystis sp. PCC6803. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 21, p. 8828–8838 , 2009.0360-3199.

NETO, Marco Antônio Menezes *et al.* Seed and seedling anatomy in Euterpe oleracea Mart. during the germination process. **Journal of Food, Agriculture and Environment** v. 8, n. 2, p. 1147–1152 , 2010.1459-0255.

NEUREITER, M et al. Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. **applied biochemistry and biotechbnology** , 2002.

NIU, Kun *et al.* Characteristics of fermentative hydrogen production with Klebsiella pneumoniae ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 1, p. 71–80 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.071>.03603199.

NUALSRI, C.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Biochemical hydrogen and methane potential of sugarcane syrupusing a two-stage anaerobic fermentation process. **Industrial Crops and Products** v. 82, p. 88–99 , 2016.

O-THONG, Sompong; PRASERTSAN, Poonsuk; BIRKELAND, Nils-kåre. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology** v. 100, n. 2, p. 909–918 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.036>.

OBEID, Jamila *et al.* State estimation of a batch hydrogen production process using the photosynthetic bacteria Rhodobacter capsulatus. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 19, p. 10719–10724 , 2010. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319910003332>.

OLIVEIRA, Maria do Socorro Padilha De; NETO, João Tomé de Farias; PENA, Rosinelson da Silva. Açaí: técnicas de cultivo e processamento. **Instituto Frutal** p. 104 p. , 2007. Disponível em: <http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Cursoacai_Frutal_2007_000gbz4ubex02wx5ok01dx9lc36pq0js.pdf>.

OZKAN, Leyla; ERGUDER, Tuba H.; DEMIRER, Goksel N. Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 1, p. 382–389 , 2011.0360-3199.

OZKAN, Leyla; ERGUDER, Tuba H.; DEMIRER, Goksel N. Investigation of the effect of culture type on biological hydrogen production from sugar industry wastes. **Waste Management** v. 30, n. 5, p. 792–798 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2009.11.002>.0956-053X.

OZTEKIN, Rukiye *et al.* Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 15, p. 4083–4090 , 2008.0360-3199.

PAGE, Shannon; KRUMDIECK, Susan. System-level energy efficiency is the greatest

barrier to development of the hydrogen economy. **Energy Policy** v. 37, n. 9, p. 3325–3335 , 2009.0301-4215.

PAN, Chun Mei *et al.* Bioaugmented cellulosic hydrogen production from cornstalk by integrating dilute acid-enzyme hydrolysis and dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 8, p. 4852–4862 , 2011.0360-3199.

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

PANAGIOTOPOULOS, I. A. *et al.* Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource Technology** v. 102, n. 24, p. 11204–11211 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.090>.0960-8524.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. *et al.* Pretreatment of sweet sorghum bagasse for hydrogen production by Caldicellulosiruptor saccharolyticus. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 15, p. 7738–7747 , 2010.0360-3199.

PARK, Wooshin *et al.* SUPPRESSION OF HYDROGEN CONSUMING BACTERIA IN ANAEROBIC HYDROGEN FERMENTATION. **Environmental Engineering Research** v. 10, n. 4, p. 181–190 , 30 ago. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4491/eer.2005.10.4.181>.

P SATHYAPRAKASAN, G Kannan. Economics of bio-hydrogen production. **International Journal of Theoretical** , 2015.

PATTRA, Sakchai *et al.* Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 19, p. 5256–5265 , 2008.0360-3199.

PLAYNE, Martin J. Determination of Ethanol , Volatile Fatty Acids , Lactic and Succinic Acids in Fermentation Liquids by Gas Chromatography. p. 638–644 , 1985.

PR., Ferket. Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. **Alltech's Annual Symposium** p. 20:54–67. , 2004.

PRAPINAGSORN, Wipa; SITTIJUNDA, Sureewan; REUNGSANG, Alissara. Co-digestion of napier grass and its silage with cow dung for bio-hydrogen and methane production by two-stage anaerobic digestion process. **Energies** v. 11, n. 1 , 2018.6643362121.

PRIVALLE, Laura S. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system: potential allergenicity assessment. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 964, p. 129–38 , 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023200>.

QUÉMÉNEUR, Marianne *et al.* Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 4, p. 3150–3159 , 2012.0360-3199.

RABELO, Afonso. *Açaí-do-Pará (Euterpe oleracea Martius) e Açaí-do-Amazonas (Euterpe precatoria Martius), duas fruteiras amazônicas de grande valor alimentar e comercia*. Disponível em: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/03/>.

RAI, Pankaj K.; SINGH, S. P. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 44, p. 19957–19971 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>.

RAMBO, M. K D; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta** v. 144, p. 696–703 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.045>.0022-4456.

RAN, Chunqiu *et al.* Effect of culture medium on hydrogen production by sulfur-deprived marine green algae Platymonas subcordiformis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** v. 14, n. 6, p. 835–841 , 2009.1226-8372.

REIS, B.O.; SILVA, I.T.; SILVA, I.M.O.; ROCHA, B.R.P. Produção de briquetes energéticos a partir de caroços de açaí. **In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL** , 2002.

REN, Nan Qi *et al.* Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 16, p. 4318–4324 , 2008.0360-3199.

REN, Yunli *et al.* Hydrogen production from the monomeric sugars hydrolyzed from hemicellulose by Enterobacter aerogenes. **Renewable Energy** v. 34, n. 12, p. 2774–2779 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2009.04.011>.0960-1481.

RODRIGUES, Roberta B. *et al.* Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, n. 12, p. 4162–4167 , 2006.0021-8561 (Print)r0021-8561 (Linking).

ROGEZ, H. Açaí: Preparo, composição e Melhoramento da Composição. **EDUFPA** , 2000.

SÁ, Lívian R. Vasconcelos De; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO S., Viridiana. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA – ASPECTOS GERAIS E POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS (Revisão). **Química Nova** v. 37, n. 5, p. 857–867 , 2014.

SAADY, Noori M.Cata Cata. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 30, p. 13172–13191 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.0360-3199.

SALERNO, Michael B. *et al.* Inhibition of biohydrogen production by ammonia. **Water**

Research v. 40, n. 6, p. 1167–1172 , 2006.0043-1354.

SAMIR KUMAR KHANAL , DAVID GREWELL, Shihwu Sung & J. (Hans) van Leeuwen. Ultrasound Applications in Wastewater Sludge Pretreatment: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** v. 37, n. 4 , 2007.

SANTOS, Fernando Miguel Dos; SANTOS, Fernando António Dos. O Combustível "Hidrogénio". **Milenium on.line (www.ipv.pt/millenium)** v. 31, p. 252–270 , 2005.

SCHMIDT RR, FORTNA RH, Beyer HH. Mild skin cleansing aerosol mousse with skin feel and moisturization benefits. **US Patent 5,002,680** , 1991.

SCHUT, Gerrit J.; ADAMS, M. W W. The iron-hydrogenase of Thermotoga maritima utilizes ferredoxin and NADH synergistically: A new perspective on anaerobic hydrogen production. **Journal of Bacteriology** v. 191, n. 13, p. 4451–4457 , 2009.1098-5530 (Electronic)r0021-9193 (Linking).

SEDAP. *No Title*.

SEDAP. *No Title*. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/>.

SHEN, Lihong *et al.* Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. **Journal of Membrane Science** v. 360, n. 1–2, p. 226–233 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.05.019>.

SIGURBJORNSDOTTIR, Margret Audur; ORLYGSSON, Johann. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by Thermoanaerobacterium AK54, isolated from hot spring. **Applied Energy** v. 97, p. 785–791 , 2012.03062619 (ISSN).

SILVA, Inara Amoroso Da. Hydrogen : Future Fuel. **Ensaios e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde** v. 20, n. 2, p. 122–126 , 2016. Disponível em: <http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/ensaioeciencia/article/view/4051/3277>.

SINHA, Pallavi; PANDEY, Anjana. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 13, p. 7460–7478 , 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>.0923540806.

SIQUEIRA, Marcos Rechi; REGINATTO, Valeria. Inhibition of fermentative H2production by hydrolysis byproducts oflignocellulosic substrates. **Renewable Energy** v. 80, p. 109–116 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.070>.

SITTHIKITPANYA, Saruda *et al.* Two-stage thermophilic bio-hydrogen and methane production from oil palm trunk hydrolysate using Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKU19. **International Journal of Hydrogen Energy** p. 1–11 , 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.09.136>.

SKONIECZNY, Monika T.; YARGEAU, Viviane. Biohydrogen production from wastewater by Clostridium beijerinckii: Effect of pH and substrate concentration.

International Journal of Hydrogen Energy v. 34, n. 8, p. 3288–3294 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.044>.0360-3199.

SOLOMON, Barry D.; BANERJEE, Abhijit. A global survey of hydrogen energy research, development and policy. **Energy Policy** v. 34, n. 7, p. 781–792 , 2006.0301-4215.

SOUZA, M.M.V.M. Tecnologia do hidrogênio. Rio de Janeiro. **Synergia Editora** , 2009.

STEYER, Jean-philippe Philippe *et al.* Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 19, p. 10660–10673 , 2010.0360-3199.

SU, Huibo *et al.* Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 4, p. 1780–1786 , 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.045>.0360-3199.

SUTTON RL, Wilcox J. Recrystallization in model ice cream solutions as affected by stabilizer concentration. **J Food Sci** p. 63:9–11. , 1998.

SUWANSAARD, Maneewan *et al.* Phototropic H2 production by a newly isolated strain of Rhodopseudomonas palustris. **Biotechnology Letters** v. 32, n. 11, p. 1667–1671 , 2010.

TAGUCHI, F *et al.* Efficient Hydrogen-Production From Starch By a Bacterium Isolated From Termites. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 73, n. 3, p. 244–245 , 1992.

TÄHTI, Hanne; KAPARAJU, Prasad; RINTALA, Jukka. Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 12, p. 4997–5002 , 2013.0360-3199.

TAI, Jung *et al.* Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using Clostridium butyricum. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 24, p. 13345–13349 , 2010. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319909019442>.

TEMUDO, Margarida F *et al.* Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations : impact of the pH and carbon source. p. 1121–1130 , 2008.

THI, Ngoc Bao Dung; LIN, Chiu Yue; KUMAR, Gopalakrishnan. **Waste-to-wealth for valorization of food waste to hydrogen and methane towards creating a sustainable ideal source of bioenergy**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015. 29-41 p. 122 v. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.034>. This review provides the insights for the conversion of food waste (FW) to electricity and heat energy and also to use FW as a source of bioenergy. The evaluations of bioenergy from FW conversion to commercially fulfil the energy demands of various nations were elucidated. Five countries attained the highest heating values from annual FW were: Canada - 4915

MJ/capita, The Netherlands - 3367 MJ/capita, the United Kingdom - 1497 MJ/capita, Japan - 1608 MJ/capita, and Sweden - 1278 MJ/capita. It is also shown that some countries could derive electricity from annual FW production and contribute a high percentage of total national electricity generation, such as The Netherlands - 2.9% (164.4 kW h/capita), Canada - 1.35% (240 kW h/capita), Japan - 0.92% (78.5 kW h/capita), the United Kingdom-1.31% (73.1 kW h/capita), and Ireland-1.23% (68 kW h/capita). Moreover, an analysis of Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT) was used to assess three forms of FW bio-treatment processes including composting, anaerobic digestion, fermentation for bio-hythane gas, and thereby illustrating future directions in the development of fermenting FW to hydrogen and methane. The SWOT analysis indicates that the fermentative hydrogen and methane production was a promising option for commercializing FW into bioenergy. However, there is also a need to implement specific prevailing policies and regulations to stimulate this environment-friendly form of bioenergy production technology. Based on the above considerations, a conceptual model to develop the FW fermentation of bioenergy production was suggested.8864350721.

TREVISAN, V; MONTEGGIA, Lo. Produção de biogás a partir de efluente da suinocultura utilizando digestão anaeróbia em dois estágios. **Simposio Internacional Sobre …** p. 264–268 , 2009. Disponível em: <http://www.sbera.org.br/sigera2009/downloads/obras/062.pdf>.

TUNÇAY E.G ET AL. Investigating the effects of initial COD, VSS and PH to improve dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses. **Biofuel Research Journal** , [S.d.].

TYAGI, Vinay Kumar *et al.* Enhancement in hydrogen production by thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge - Optimization of treatment conditions. **Bioresource Technology** v. 164, p. 408–415 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.013>.0960-8524.

UHL C., Dransfield J. Gerera Palmarum: a classificacation of palms based on the work Harold E. Moore Jr., Allen Press. **Kansas** p. 354–357 , 1991.

VALDEZ-VAZQUEZ, Idania *et al.* Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H 2 production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 30, n. 13–14, p. 1383–1391 , 2005.0360-3199.

VALDEZ-VAZQUEZ, Idania; POGGI-VARALDO, H??ctor M. *Hydrogen production by fermentative consortia* .**Renewable and Sustainable Energy Reviews**. [S.l: s.n.]. , 2009

VAN MARIS, Antonius J A *et al.* Development of efficient xylose fermentation in <i>Saccharomyces cerevisiae<i/>: xylose isomerase as a key component. **Advances in biochemical engineering/biotechnology** v. 108, n. April, p. 179–204 , 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846724>.

VENKATA MOHAN, S. *et al.* Harnessing of biohydrogen by acidogenic fermentation of Citrus limetta peelings: Effect of extraction procedure and pretreatment of biocatalyst. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 15, p. 6149–6156 ,

2009.0360-3199.

VENKATA MOHAN, S.; LALIT BABU, V.; SARMA, P. N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology** v. 99, n. 1, p. 59–67 , 2008.0960-8524.

VENKATESWAR REDDY, M. *et al.* Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using Bacillus tequilensis: Integration with dark-fermentative hydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 39, n. 14, p. 7616–7626 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.157>.0360-3199.

VUKSAN V, JENKINS DJA, SPADAFORA P, SIEVENPIPER JL, OWEN R, VIDGEN E, BRIGHENTI F, JOSSE R, LEITER LA, BRUCE-THOMPSON C.VUKSAN V, JENKINS DJA, SPADAFORA P, SIEVENPIPER JL, OWEN R, VIDGEN E, BRIGHENTI F, JOSSE R, LEITER LA, Bruce-Thompson C. Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes: a randomized controlled metabolic trial. **Diabetes care** v. 22, p. 913–9 , 1999.

W.M., Alalayah. Bio-Hydrogen production using a two-stage fermetation process. **Pakistan Journal of Biological Sciences** v. 12, n. 22, p. 1462–1467 , 2009.

WANG, Bo; WAN, Wei; WANG, Jianlong. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 23, p. 7013–7019 , 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.027>.0360-3199.

WANG, Chi-chung *et al.* Sequential Production of Hydrogen and Methane from Wastewawter Sludge Using Anaerobic Fermentation. **J. Chin. Inst. Chem. Engrs.** v. 34, n. 6, p. 683–687 , 2003.

WANG, Hui *et al.* Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. **Bioresource Technology** v. 101, n. 22, p. 8731–8735 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.131>.

WANG, Jianlong; WAN, Wei. Bioresource Technology Influence of Ni 2 + concentration on biohydrogen production. v. 99, p. 8864–8868 , 2008a.

WANG, Jianlong; WAN, Wei. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 20, p. 5392–5397 , 2008b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.010>.

WANG, Jianlong; WAN, Wei. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 2, p. 799–811 , 2009.0360-3199.

WANG, Xiang Jing *et al.* Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative

bacterial B49. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 32, n. 6, p. 748–754 , 2007.0360-3199.

WEINSCHENK, Carl. Lumber Company Locates Kilns at Landfill to Use Methane. **Energy Manager** , 2016.

WHITE, C M; STEEPER, R R; LUTZ, A E. The hydrogen-fueled internal combustion engine : a technical review. v. 31, p. 1292–1305 , 2006.

WHITMAN, William B; BOWEN, Timothy L; BOONE, David R. **The Methanogen i c Bacter i a**. [S.l: s.n.], 2006. 165-207 p. .0387307435.

WICHER, E. *et al.* Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 19, p. 7767–7773 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.008>.

WONG, Yee Meng; WU, Ta Yeong; JUAN, Joon Ching. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 34, p. 471–482 , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>.1364-0321.

WU, Ken J. *et al.* Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a Klebsiella sp. strain isolated from sewage sludge. **Bioresource Technology** v. 99, n. 17, p. 7966–7970 , 2008.0960-8524.

WYCOFF, Wei *et al.* Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white a??a?? (Euterpe oleracea Mart.). **Journal of Food Composition and Analysis** v. 41, p. 181–187 , 2015.0889-1575.

XIA, Ao *et al.* Fermentative bio-hydrogen production from galactose. **Energy** v. 96, p. 346–354 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2015.12.087>.0360-5442.

YAMAGUCHI, Klenicy Kazumy De Lima *et al.* Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry** v. 179, p. 137–151 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>.5592990367.

YOKOI, Haruhiko *et al.* Characteristics of hydrogen production by aciduric Enterobacter aerogenes strain HO-39. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 80, n. 6, p. 571–574 , 1995.0922-338X.

YOSHINO, Fuminori *et al.* High photobiological hydrogen production activity of a Nostoc sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. **Marine Biotechnology** v. 9, n. 1, p. 101–112 , 2007.1436-2228.

YU, Bao *et al.* Methane-rich biogas production from waste-activated sludge with the addition of ferric chloride under a thermophilic anaerobic digestion system. **RSC Adv.** v. 5, n. 48, p. 38538–38546 , 2015. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA02362A>.

YU, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen**

Energy v. 27, n. 11–12, p. 1359–1365 , 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902000733>.0360-3199.

ZHAO, Xuebing; CHENG, Keke; LIU, Dehua. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 82, n. 5, p. 815–827 , 2009.0025300918831.

ZHOU, Peiqing; ELBESHBISHY, Elsayed; NAKHLA, George. Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. **Bioresource Technology** v. 130, p. 710–718 , 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>.0960-8524.

ZHU, Heguang; BÉLAND, Michel. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 31, n. 14, p. 1980–1988 , 2006.0360-3199.

ZHU, Zhinan *et al.* Photo-fermentation of Rhodobacter sphaeroides for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. **Process Biochemistry** v. 45, n. 12, p. 1894–1898 , 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.017>.8621642522.

ZINATIZADEH, A.A. A. *et al.* An anaerobic hybrid bioreactor of granular and immobilized biomass for anaerobic digestion (AD) and dark fermentation (DF) of palm oil mill effluent: Mass transfer evaluation in granular sludge and role of internal packing. **Biomass and Bioenergy** v. 103, p. 1–10 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.05.006>.