

Produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar

Production of hydrogen from the sugarcane bagasse

• **Data de entrada:**
05/11/2018

• **Data de aprovação:**
09/10/2019


Jakelline Nunes Marques Torres¹ | Dayana de Gusmão Coêlho¹ |
Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim^{1*}

DOI: <https://doi.org/10.36659/dae.2020.090>

ORCID ID

Torres JNM  <https://orcid.org/0000-0003-1658-6272>

Coêlho DG  <https://orcid.org/0000-0002-5170-3449>

Amorim ELC  <https://orcid.org/0000-0002-7349-9055>

Resumo

Este trabalho estudou parâmetros envolvidos na produção fermentativa do H₂ a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Primeiramente estudaram-se os fatores: massa de substrato (10, 20, e 30 g/L) e porcentagem de inóculo (10, 20 e 30%). Fixando o melhor resultado desses fatores, estudaram-se os fatores: tempo de aquecimento na pré-hidrólise (0, 30 e 60 min) e pH inicial (5,6 e 7). Os resultados mostraram que as melhores condições avaliadas foram: massa de substrato de 10g/L, 10% de inóculo, pH inicial de 6 e tempo de aquecimento na pré-hidrólise de 30 min, representado pelo ensaio 567 com uma produção específica de hidrogênio de 2,59 mmolH₂/gSSVdia. Os principais metabólitos solúveis produzidos foram: ácido acético (478–1374,2 mg/L), predominante em todos os reatores, ácido propiônico (56,92–59,45 mg/L), etanol (26,46–79,13 mg/L) e metanol (33,71–79,88 mg/L), o que indica que a rota fermentativa utilizada pelos microrganismos para a produção de hidrogênio foi a do ácido acético.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Inóculo. Pré-Hidrólise. pH. Fermentação. Produção Específica de Hidrogênio. Metabólitos.

Abstract

This work studied the parameters involved in H₂ fermentation production from sugarcane bagasse. First, the following factors were studied: substrate mass (10, 20, and 30 g/L) and percentage of inoculum (10, 20 and 30%), determining the best result of these factors, in the prehydrolysis (0, 30 and 60 min) and initial pH (5, 6 and 7). The results showed that the best conditions evaluated were: substrate mass of 10 g/L, 10% inoculum, initial pH of 6 and heating time in the prehydrolysis of 30 min, represented by the assay 567 with a specific hydrogen production of 2.59 mmolH₂/gSSVday. The major soluble metabolites produced were: acetic acid (478-1374.2 mg/L), predominant in all reactors, propionic acid (56.92-59.45 mg/L), ethanol (26.46-79.13 mg/L) and methanol (33.71-79.88 mg/L). This indicates that the fermentative route used by the microorganisms for the production of hydrogen was that of acetic acid.

Keywords: Sugarcane Bagasse. Inoculum. Prehydrolysis. pH. Fermentation. Specific Hydrogen Production. Metabolites.

¹ Universidade Federal de Alagoas - Maceió - Alagoas - Brasil.

* **Autor correspondente:** eduardo.lucena@ctec.ufal.br.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da procura por fontes de energia conduz à adoção de práticas para o desenvolvimento e a exploração de novos recursos energéticos, e assegurar a geração de energia, com as devidas precauções em relação ao meio ambiente, tem sido um dos mais relevantes desafios atuais (Ghosh e Hallenbeck, 2009; Sá et al., 2014).

Dentro desse contexto, o hidrogênio (H_2) tem despertado grande interesse, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água. O hidrogênio é considerado um combustível limpo; gera água como único produto nas células combustíveis; apresenta alta conversão de energia por unidade de massa (calor de combustão de 122 kJ.g^{-1}), sendo 2,75 vezes mais energético do que os hidrocarbonetos, além de ser renovável (Chen, Lin Cy, 2001).

A produção biológica de hidrogênio pode ser realizada por meio de processos como a fotólise direta da água por algas verdes, fotólise indireta da água por cianobactérias, fotofermentação de ácidos orgânicos por bactérias fotossintéticas, e fermentação escura de substratos orgânicos por bactérias fermentativas anaeróbias. Sob condições anaeróbias, as bactérias fermentadoras podem converter substratos (por exemplo, carboidratos ou açúcares) a gás hidrogênio e ácidos orgânicos (Akutsu et al. 2009; Nasr et al. 2015; Pattra et al. 2008).

Fontes renováveis de bioenergia, como a biomassa, foram relatadas como promissores substratos para produção de hidrogênio fermentativo. Alguns desses resíduos são subprodutos/resíduos de processamento de alimentos, plantas e processos agrícolas (Lay, 2000; Pattra et al. 2008). Diversos estudos utilizaram o bagaço da cana-de-açúcar como substrato, como indicado por Soares et al. (2014), Siqueira et al. (2014) e Ratti et al. (2014),

que obtiveram uma produção de H_2 0,03 mmol, 10,87 ml/g e 7,7 mmol respectivamente

O bagaço da cana-de-açúcar é constituído por três frações principais: celulose, hemicelulose e lignina, e é considerado como uma biomassa lignocelulósica. A presença de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção desses componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose (FELIPE, 2010).

O pré-tratado para quebrar a lignina contém altas quantidades de açúcar, que pode ser convertido em gás hidrogênio por fermentação de bactérias. Os métodos físicos, químicos ou biológicos de pré-tratamento do substrato provaram ser úteis para aumentar o rendimento de hidrogênio (CUI et al., 2010; CUI et al., 2009; NGUYEN et al., 2010; LO et al. 2010; CAO et al., 2009; FAN et al., 2008; WANG et al., 2010; REN et al., 2008).

De acordo com Andrade (2017), o melhor pré-tratamento para biomassa lignocelulósica é o alcalino, utilizando hidróxido de sódio a 0,5%. Além da pré-hidrólise, outros fatores interferem na produção de hidrogênio por meio do processo de fermentação anaeróbia: tipo de substrato, temperatura do processo, pH, tipo de inóculo, pré-tratamento do inóculo, tipo de reator.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção específica de hidrogênio por processo de fermentação anaeróbia em reator batelada utilizando a biomassa (bagaço de cana-de-açúcar) como substrato, além de detectar os metabólitos solúveis produzidos, por meio da influência dos fatores: massa de substrato, porcentagem de inóculo, pH inicial e tempo de aquecimento na pré-hidrólise.

2 METODOLOGIA

2.1 Bagaço e inóculo

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado em uma usina localizada em São Luís do Quitunde-AL. Ele foi seco por 2h a 105°C em uma estufa e depois triturado para tamanho menor que 2 mm.

Foi utilizado como inóculo o lodo proveniente de um reator UASB referente à estação de tratamento de esgoto sanitário. Com o objetivo de inibir a produção de metano, foi realizado um pré-tratamento térmico no inóculo. O pré-tratamento térmico ocorreu da seguinte forma: colocou-se o inóculo em um aquecedor até que atingisse a temperatura de 100°C; quando a temperatura foi atingida, manteve-se por 15 min, e em seguida resfriou-se o inóculo até obter a temperatura de 25°C (MAINTIGUER et al., 2008).

2.2 Procedimentos experimentais

Os experimentos foram conduzidos em duplicata em reatores de 100 mL, sendo que o volume ocupado pela mistura foi de 50% do volume total do recipiente (50mL). Foram escolhidos reatores em batelada devido à maior facilidade de operação e controle (WANG E WAN, 2009).

O experimento foi desenvolvido para avaliar a influência e também para otimizar a condição da massa do substrato, conteúdo de inóculo, pH inicial e tempo de aquecimento na pré-hidrólise para produção de H₂.

Na etapa 1 foram avaliados os efeitos da massa do substrato e do conteúdo de inóculo (% v/v) para produção de hidrogênio sob condições mesofílicas (35±1°C) e pH inicial de 7,0 por meio da utilização de uma incubadora shaker com rotação de 120 rpm (CUI E SHEN, 2012).

O efeito da massa de substrato foi investigado de 0,5 a 1,5 g em um intervalo de 0,5 g para volume reacional de 50 mL.

0,5 g, 1,0 g e 1,5 g de bagaço de cana-de-açúcar foram misturados com 45 mL de solução aquosa de NaOH diluído (0,5% v/v) e aquecido por 30 minutos nos reatores (CHAIRATTANAMANO-KORN, 2009). Depois a mistura foi neutralizada com pH 7,0 com a adição de solução aquosa de NaOH (ou HCl) diluído.

O efeito do conteúdo de inóculo foi investigado de 5 a 15 % (v/v) em um intervalo de 5 % para volume reacional de 50 mL.

Os frascos contendo a mistura e o lodo pré-tratado termicamente foram cobertos com tampas de borracha e cravados com selos de alumínio. O gás nitrogênio foi liberado nos reatores para criar uma condição de cultura anaeróbia.

Para a etapa 1 foi adotado um planejamento experimental fatorial 2k com adição de 3 repetições no ponto central (PtCt). Sete experimentos foram conduzidos (Tabela 1) com base no delineamento experimental.

Tabela 1 – Matriz de ensaios do planejamento fatorial 2² incluindo os pontos centrais, da etapa

Ensaio	Valor do código		Valor real	
	x ₁	x ₂	x ₁ (massa de substrato, g)	x ₂ (conteúdo de inóculo, %)
1	-	-	0,5	5
2	+	-	1,5	5
3	-	+	0,5	15
4	+	+	1,5	15
5	0	0	1,0	10
6	0	0	1,0	10
7	0	0	1,0	10

A etapa 2 iniciou-se; após encontrar as melhores condições para o planejamento experimental anterior, fixaram-se essas condições e variaram-se o pH inicial e o tempo de aquecimento da pré-hidrólise para produção de hidrogênio sob condições mesofílicas ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) por meio da utilização de uma incubadora *shaker* com rotação de 120 rpm (CUI E SHEN, 2012).

O efeito do pH inicial foi investigado de 5,0 a 7,0 em um intervalo de 1,0.

O efeito do tempo de aquecimento da pré-hidrólise foi investigado de 0 a 60 minutos em um intervalo de 30 minutos.

Para a etapa 2 foi adotado um planejamento experimental fatorial 2^k com adição de 3 repetições no ponto central (PtCt). Sete experimentos foram conduzidos (Tabela 2) com base no delineamento experimental.

Tabela 2 – Matriz de ensaios do planejamento fatorial 22 incluindo os pontos centrais, da etapa 2.

Ensaio	Valor do código		Valor real	
	x_1	x_2	x_1 (pH inicial)	x_2 (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise, min)
1'	-	-	5,0	0
2'	+	-	7,0	0
3'	-	+	5,0	60
4'	+	+	7,0	60
5'	0	0	6,0	30
6'	0	0	6,0	30
7'	0	0	6,0	30

O conteúdo de hidrogênio foi determinado por meio de cromatografia gasosa (Shimadzo, GC 2010-plus), equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna Supelco 1010 Plot, com uma temperatura do injetor, detector e coluna = 30, 200 e 230 $^\circ\text{C}$, respectivamente. O argônio foi usado como gás de arraste a um fluxo de $21,9 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (MAINTINGUER et al., 2008).

A evolução acumulada de hidrogênio e a taxa de produção de hidrogênio foram simuladas pela equação de Gompertz modificada, com o auxílio do software Origin 2018b, onde avaliou-se a relação existente entre a variável dependente “P”, que fornece a produção de H_2 acumulada (mmol), e os demais parâmetros independentes (Rm , t , e , λ).

A escolha do modelo utilizado levou em consideração a indicação de Ahmad (2017) e Cui e Sheng (2012), onde os dados experimentais (valores médios de reatores duplicados) obtidos foram ajustados usando a equação de Gompertz modi-

ficada (ZWIETERING et al., 1990) com a versão do pacote de software Origin por meio da Eq. 1.

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Onde P é o potencial de produção (mmol), Rm é a taxa de produção (mmol/dia), t é o tempo de incubação no reator (dia), e é o Número de Euler (2.71828) e o λ é a Fase Lag (dia). Para que possam ser comparados os resultados obtidos das produções de hidrogênio dos reatores durante o experimento, foram calculadas as produções específicas de hidrogênio de cada reator. Essa produção é calculada utilizando-se a Eq. 2 a seguir, e tem o intuito de fornecer a capacidade que uma determinada comunidade microbológica apresenta para converter o substrato em gás, nesse caso, o hidrogênio.

$$\text{PEH} = \text{mmolH}_2/\text{gSSVdia} \quad (2)$$

Onde PEH é a produção específica ($\text{mmolH}_2/\text{gSSVdia}$), $\text{mmolH}_2/\text{dia}$ é a taxa máxima de produção de H_2 por dia e a gSSV é a quantidade inicial de inóculo presente nos reatores.

A detecção dos metabólitos solúveis (ácidos orgânicos voláteis, acetona e álcoois) foi determinada ao final do experimento pelo método de extração por headspace de acordo com metodologia adaptada de Adorno et al. (2014). Para isso foi utilizado um amostrador automático HS-20 acoplado a um cromatógrafo gasoso (shimadzu, GC 2010-Plus) com hidrogênio como gás de arraste e detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor, do detector (FID) e da coluna foram 250, 280 e 35 °C, respectivamente; os fluxos do gás de arraste (H_2), do make-up ou gás auxiliar (N_2) e do gás de chama (ar sintético) foram 30, 30 e 300 mL/min, respectivamente, e as temperaturas do forno, da linha de amostra e da linha de transferência do HS-20 foram de 105,3; 150 e 118 °C, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da massa do substrato e do conteúdo de inóculo - Etapa 1

Foram avaliados os fatores: massa de substrato e % de inóculo. Observou-se que os reatores que apresentaram os melhores resultados na produção acumulada de H_2 , conforme a Fig. 1, foram para os ensaios 1 (0,5g de bagaço e 10% de lodo de ETE) com 0,59 mmol de H_2 acumulado, e o ensaio 4 (1,0g de bagaço e 20% de lodo de ETE) com 0,55 mmol de H_2 acumulado.

Ratti et al (2014) estudaram proporções de massa de substrato e inóculo de 1:1 em todos os 6 sistemas. Comparando os resultados da Fig. 1, observamos que a proporção influencia na produção, onde para os três maiores resultados (R1, R4 e R567) a proporção também foi de 1:1, enquanto para os ensaios 2 e 3 a proporção foi de 3:1 e 1:3.

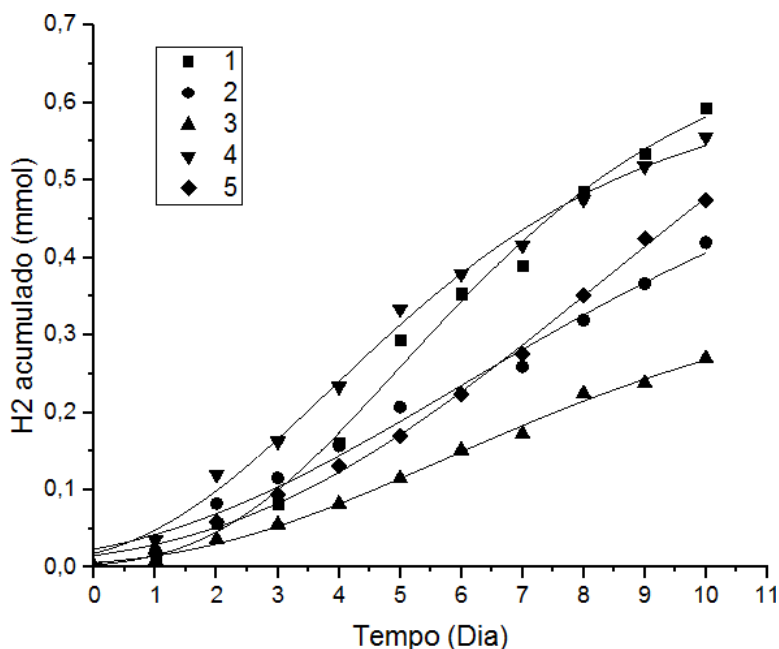


Figura 1 – Ajustes dos dados dos ensaios utilizando o modelo de Gompertz modificado - Etapa
Legenda: Ensaios 1(m=0,5g de bagaço, inóculo=5mL); 2(m=1,5g de bagaço, inóculo=5mL); 3(m=0,5g de bagaço, inóculo=15mL);
 4(m=1,5g de bagaço, inóculo=15mL); 567(m=1,5g de bagaço, inóculo=10ml).

Com os dados cinéticos encontrados pelo Origin 2018b utilizando o modelo de Gompertz Modificado, como recomenda Ahmad (2017), tivemos

as maiores taxas de produção de H_2 para os ensaios 567 (2,5 mmol/dia) e 1 (2,0 mmol/dia), conforme nos mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Dados cinéticos do modelo de Gompertz Modificado nos ensaios

Constantes	Etapa 1					Etapa 2				
	1	2	3	4	567	1'	2'	3'	4'	567'
K (mmol/dia)	2,01	0,97	1,69	0,80	2,53	0,33	0,34	2,04	1,97	2,07
PeH_2 (mmol H_2 /gSSVdia)	2,51	1,21	0,7	0,33	1,58	0,41	0,43	2,55	2,46	2,59

Avaliando a produção específica dos reatores dessa etapa, confirmamos, de acordo com o apontado na produção acumulada e na taxa de produção, que a maior produção específica, conforme Fig. 1, foi para os ensaios 1 e 567, com 2,51 e 1,58 mmol H_2 /gSSVdia, respectivamente.

Isso nos mostra que, quanto maior a fase lag, maior será a taxa de produção de hidrogênio por dia e maior será a produção específica de hidrogênio, ou seja, a produção específica de hidrogênio depende do crescimento microbiano no

meio, onde representa a capacidade de uma determinada comunidade microbiológica em converter o substrato em gás, para comparação de sistemas. No nosso caso, os melhores sistemas foram os ensaios 1 e 567.

A Tabela 4 apresenta a saída do Statistic 7 para a ANOVA, referente à produção de hidrogênio utilizando bagaço de cana-de-açúcar, usada para determinar ao nível de 5% de significância se as médias foram ou não significativamente diferentes entre si.

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA)

Fontes de Variação	G.L	Soma Quadrática (SQ)	Quadrado Médio Ajustado (QM_{aj})	p- valor
A - Massa de substrato (g)	1	0,003025	0,003025	0,569
B - % de inóculo	1	0,009025	0,009025	0,364
AB - Interação Massa x pH	1	0,050625	0,050625	0,109
Falta de ajuste	1	0,000430	0,000430	0,823
Puro Erro	2	0,013267	0,006633	
Total	6	0,076371		

$R^2 = 82,07$

LEGENDA: G.L: Graus de liberdade.

A ANOVA apresentou, para os fatores massa de substrato e % de inóculo (fatores A, B e AxB), o valor de p igual a 0,569, 0,364 e 0,109, que é maior que 0,05. Pode-se afirmar, então, com 95% de confiança, que as médias são iguais entre si, portanto não influenciaram na variável resposta (Produção de H_2). Isso significa que, para o inter-

valo estudado nos fatores, não há qualquer influência na variável resposta.

Como não obteve curvatura, o modelo a ser adotado não deve ser o quadrático, e sim o linear.

A partir da ANOVA e do gráfico de probabilidade, pode-se obter o modelo que está expresso na Eq. 3:

$$\hat{Y}(H_2) = 0,4643 + 0,0275 \cdot \text{Massa} - 0,0475 \cdot \% \text{ de inóculo} + 0,1125 \cdot \text{Massa} \cdot \% \text{ de inóculo} \quad (3)$$

Segundo a Tabela 4, o valor do coeficiente de determinação (R²) foi igual a 82,07%; dessa forma 82,07% dos dados são explicados pelo modelo.

Substituindo os níveis das massas e das % de inóculos de cada ensaio (-1 e -1; +1 e -1; -1 e +1; +1 e +1), no modelo encontrado representado pela Eq. 3 as melhores condições previstas pelo modelo foram para o ensaio 1, onde $\hat{Y}_1 = 60\%$, o que significa que as melhores condições para produção de H₂ foram para o ensaio 1, massa de substrato de 0,5g e % de inóculo de 10%, confirmando o melhor resultado exposto no item anterior.

3.2 Efeito do pH inicial e do tempo de pré-hidrólise - Etapa 2

Para essa etapa foram fixados os fatores massa de bagaço e conteúdo de inóculo, avaliados como melhores resultados de acordo com a etapa anterior, ou seja massa de 0,5g de bagaço e 10% de inóculo.

Conforme a Fig. 2, observou-se que os reatores que apresentaram os melhores resultados na produção acumulada de H₂ foram para os ensaios 4' com 0,85 mmol de H₂ acumulado, e o reator 567' com 0,83 mmol de H₂ acumulado, para o 1' que obteve a 3^a maior produção, alcançando 0,57 mmol de H₂ acumulado.

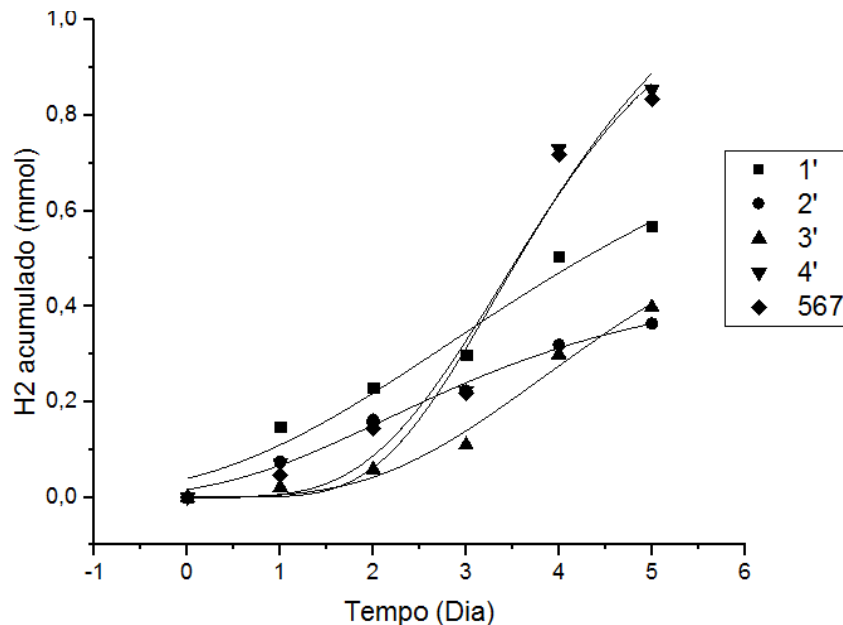


Figura 2 - Ajustes dos dados dos ensaios (reatores) utilizando o modelo de Gompertz modificado - Etapa 2

Legenda: Ensaios 1' (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=0 min, pH inicial=5); 2' (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=60 min, pH inicial=5); 3' (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=0 min, pH inicial=7); 4' (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=60 min, pH inicial=7); 567' (Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=30 min, pH inicial=6).

Os reatores 2' e 3' tiveram a menor produção de acumulado, 0,36 e 0,39 mmol. De acordo com Schuchardt et al., (2001), durante a quebra da lignina alguns compostos podem ser formados: Compostos aromáticos, benzeno, fenol, ácido

acético e vanilina, obtenção de óleos com características semelhantes ao petróleo, produção de resinas fenol-formaldeído, dispersantes, emulsificantes, sequestrantes de metais, adesivos, aglomerantes, obtenção de gás de síntese

utilizado na produção de metanol. Dependendo do método de extração, com isso, a produção de hidrogênio fica desfavorecida.

Braga et al. (2014), Ratti et al. (2014) e Soares et al. (2014) alcançaram produções de H_2 de 0,23, 7,7 e 0,09 mmol respectivamente. Comparando com os nossos resultados, podemos observar que a maior produção alcançada (0,85 mmol) se mostrou dentro do esperado, considerando que o substrato é o mesmo.

Observando a influência dos fatores para os reatores que mais produziram hidrogênio acumulado, para os ensaios 4', 567' e 1', os tempos de aquecimento na pré-hidrólise foram de 60, 30 e 0 min respectivamente, o que comprova que, para esse fator estudado, quanto maior o tempo de aquecimento, maior será a produção de H_2 .

Outro fator estudado como influenciador na produção de H_2 foram os pHs iniciais. É possível perceber, após a realização do experimento, que a produção de H_2 está bastante relacionada com os valores de pH dos reatores, que ficaram entre 5,0 e 7,0 (valores médios de pH), demonstrando ser a faixa ideal para promover o consumo do substrato devido ao aumento da taxa de fermentação anaeróbia provocada por esses valores de pHs, valores estes que estão de acordo com Infantes et al. (2011), pois as bactérias que realizam as quatro fases da digestão possuem exigências individuais quanto ao pH.

Para os reatores que melhor apresentaram produção, o pH inicial e final foram: 7/6,3, 6/6 e 5/5,2 respectivamente, confirmando, assim, que o parâmetro pH também é um dos principais interferentes na produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia, uma vez que valores abaixo

de 4,0 inibem a atividade da hidrogenase e, conseqüentemente, a produção de H_2 , e valores altos como 9,0 também causam queda na produção específica do H_2 (ZHANG et al., 2008).

O pH ideal para as hidrolíticas e fermentativas varia de 4,5 – 6,3 (Beckers, 2010). No entanto, o pH pode sofrer alterações durante o processo de digestão, devido aos metabólitos que se acumulam no sistema, fazendo com que o meio fique mais ácido ou alcalino (CAMPOS et al., 2006).

Nessa etapa do experimento, avaliamos os fatores tempo de aquecimento (min) no pré-tratamento e pH inicial e plotamos o gráfico no Origin 2018b utilizando o modelo de Gompertz Modificado para ajustar nossos dados experimentais. Obtivemos as maiores taxas de produção de H_2 para os ensaios 567' (2,07 mmol/dia), 3' (2,04 mmol/dia) e 4' (1,97 mmol/dia), conforme nos mostra a Tabela 3.

Avaliando a produção específica dos reatores dessa etapa, as maiores produções específicas, conforme Tabela 3, foram para os ensaios 567', 3' e 4', com 2,59, 2,55 e 2,46 mmol H_2 /gSSVdia, respectivamente. Utilizando a produção específica para comparação de sistemas, o reator que apresentou o melhor desempenho considerando a simultaneidade das variáveis para produção de hidrogênio, foi o ensaio 567', com tempo de aquecimento da pré-hidrólise=30 min e pH inicial=6.

A Tabela 5 apresenta a saída do Statistic 7 para a ANOVA, referente à produção de hidrogênio utilizando bagaço de cana-de-açúcar, usada para determinar ao nível de 5% de significância se as médias foram ou não significativamente diferentes entre si.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA)

Fontes de Variação	G.L	Soma Quadrática (SQ)	Quadrado Médio Ajustado (QM _{aj})	p- valor
A - Tempo de aquecimento na pré-hidrólise (min)	1	0,0169	0,0169	0,733
B - pH inicial	1	0,0256	0,0256	0,677
AB - Interação Tempo x pH	1	0,1089	0,1089	0,424
Falta de ajuste	1	0,0289	0,0289	0,659
Puro Erro	2	0,2198	0,1099	
Total	6	0,4002		
R ² = 37,83				

LEGENDA: G.L: Graus de liberdade.

A ANOVA apresentou para os fatores tempo de aquecimento na pré-hidrólise e pH inicial (fatores A, B e AxB) o valor de p igual a 0,733, 0,677 e 0,424, que é maior que 0,05. Pode-se afirmar, então, com 95 % de confiança, que as médias são iguais entre si. Portanto, não influenciaram na variável resposta (Produção de H₂). Isso significa que, para o intervalo estudado nos fatores, também não houve qualquer influência na variável resposta. Como não obteve curvatura, o modelo a ser adotado não deve ser o quadrático e sim o linear, conforme a Eq. 4.

A partir da ANOVA e do gráfico de probabilidade, pode-se obter o modelo que está expresso na Eq. 4:

$$\hat{Y}(H_2) = 0,484286 + 0,065*\text{Tempo} + 0,08*\text{pH} + 0,165*\text{Tempo}*\text{pH} \quad (4)$$

Segundo a Tabela 5, o valor do coeficiente de determinação (R²) foi igual a 37,83%; dessa forma, 37,83% dos dados são explicados pelo modelo.

Substituindo os níveis dos tempos de aquecimentos e do pH inicial de cada ensaio (-1 e -1;

+1 e -1; -1 e +1; +1 e +1) no modelo encontrado representado pela Eq. 4, as melhores condições previstas pelo modelo foram para o ensaio 4, onde $\hat{Y}_4 = 80\%$, o que significa que as melhores condições para produção de H₂ foram para o ensaio 4' tempo de aquecimento de 60min e pH inicial 7, o que não confirma o melhor resultado exposto no item anterior, que seria o ensaio 567'. Isso se explica pelo fato de o modelo para essa parte 2 não ser tão confiável, visto que o modelo explica apenas 37,83% dos dados, o que não podemos considerar um modelo representativo.

3.3 Metabólitos solúveis produzidos - Etapa 2

Durante a acidogênese dos açúcares, vários metabólitos foram produzidos junto com o hidrogênio, em diferentes concentrações. Após a realização da etapa da cromatografia para analisar e quantificar a presença de ácidos e álcoois via headspace, foi possível chegar a algumas conclusões a partir dos resultados mostrados na Tabela 6, onde são expostas as concentrações médias em mg.L⁻¹ dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores.

Tabela 6 – Concentrações médias, em mg/L, dos metabólitos solúveis produzidos nos ensaios – Etapa

Constantes	Reator 1'	Reator 2	Reator 3'	Reator 4'	Reator 567'
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Acetona	21,53	0,00	0,00	0,00	0,00
Metanol	79,88	33,71	34,49	33,73	34,63
Etanol	79,13	26,46	83,29	39,51	36,46
n-Butanol	24,49	13,12	13,21	13,04	13,23
Ácido acético	478,41	1162,10	660,42	1083,91	1374,20
Ácido propiônico	0,00	56,92	0,00	0,00	59,45
Ácido isobutírico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido butírico	0,00	0,00	76,09	0,00	0,00
Ácido isovalérico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido valérico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido capríco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

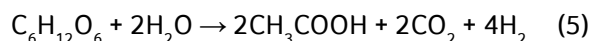
^(a)LD1 - Limite de detecção da acetona = 14,9 mg/L; ^(b)LD2 - Limite de detecção do metanol = 19,3 mg/L; ^(c)LD3 - Limite de detecção do etanol = 15,6 mg/L; ^(d)LD4 - Limite de detecção do n-butanol = 12,0 mg/L; ^(e)LD5 - Limite de detecção do ácido acético = 63,8 mg/L; ^(f)LD6 - Limite de detecção do ácido propiônico = 49,3 mg/L; ^(g)LD7 - Limite de detecção do ácido isobutírico = 54,6 mg/L; ^(h)LD8 - Limite de detecção do ácido butírico = 51,9 mg/L; ⁽ⁱ⁾LD9 - Limite de detecção do ácido isovalérico = 54,9 mg/L; ^(j)LD10 - Limite de detecção do ácido valérico = 62,4 mg/L; ^(k)LD11 - Limite de detecção do ácido capríco = 11,1 mg/L.

Os principais subprodutos gerados nesse trabalho foram: ácido acético, ácido propiônico, etanol e metanol. A presença do ácido propiônico como o segundo metabólito em maior quantidade nas amostras verificadas (reator 2' e reator 567') indica que o pré-tratamento básico pode ter relação com a formação deste, e que o aprimoramento de técnicas para controlar esses inibidores é necessário, confirmando estudos realizados por Siqueira e Reginatto (2015). Em todos os reatores o metabólito produzido em maior quantidade foi o ácido acético, reator R567' com 1374,20 mg/L, em seguida o reator 2' com 1162,10 mg/L, e em terceiro o reator 4' com 1083,91 mg/L. Esse é um fator importante por indicar que a rota fermentativa utilizada pelos microrganismos para a produção de hidrogênio foi a do ácido acético, proporcionando o maior rendimento possível de H₂ por mol de glicose, quando comparada às rotas do etanol, ácido butírico e ácido propiônico (ANTONOPOULOU et al. 2008).

Andrade (2017), Tavares (2016) e Chaves (2018) também concluíram que em seus metabólitos a maior produção também foi para o ácido acético, chegando a alcançar concentrações de 445 a 2329 mg/L.

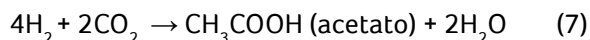
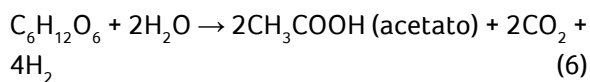
Segundo Reis (2010), quanto maior a formação de ácido acético maior será a quantidade de hidrogênio obtido, pois ele é um indicador, já que a produção desse ácido leva à formação de 4 mol de hidrogênio por mol de glicose conforme a Eq. 5.

Produção do ácido acético:

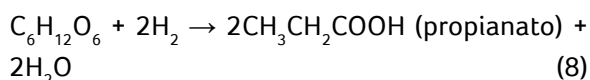


O reator 4' apresentou a maior porcentagem em moles (89,64%) de ácido acético, juntamente com 567'(88,91%).

No reator 2', que obteve 88,27% de ácido acético, a terceira maior porcentagem, isso se deve ao fato de que, apesar de a rota do ácido acético ser a mais favorável quando se tem como objetivo produzir o hidrogênio, precisamos ter cuidado com a homoacetogênese, onde os microrganismos homoacetogênicos que resistiram ao tratamento térmico do inóculo consomem o hidrogênio e o gás carbônico para produzir o ácido acético, e devido às suas altas concentrações se torna um inibidor da fermentação, desfavorecendo o objetivo do trabalho, conforme Equações 6 e 7 (ARGUN et al. 2008).



Como também pode ser justificada pela presença da concentração do ácido propiônico, que atingiu seu ápice (3,5 %) no reator 2', também pode ter contribuído para a diminuição da sua eficiência em relação aos outros reatores, pois na rota fermentativa desse metabólito são consumidos 2 mols de H_2 para produzir 2 mols do mesmo, como nos mostra a Eq. 8 (LEVIN et al. 2004; VARDAR et al. 2007).



Já o reator 1' apresentou a menor produção de ácido acético (61,86%), além de observar que houve uma grande produção de metanol (19,36%) e etanol (13,34%) para este reator em relação aos outros reatores, o que nos leva a entender que também foi utilizada a rota do etanol. O mesmo comportamento podemos observar para o reator 3' com 73,69% de ácido acético, e produção de metanol (7,21%) e etanol (12,11%).

4 CONCLUSÃO

Conforme a ANOVA realizada, para as duas etapas, a média dos fatores não foi significativa, o que indica que o intervalo dos fatores estudados não interfere na variável resposta; para isso, o intervalo deve ser ampliado para que as médias sejam diferentes.

Os principais subprodutos gerados neste trabalho foram: ácido acético, etanol e metanol. Em todos os reatores o metabólito produzido em maior quantidade foi o ácido acético, o que in-

dica que a rota fermentativa utilizada pelos microrganismos para a produção de hidrogênio foi a do ácido acético, proporcionando o maior rendimento possível de H_2 por mol de açúcar, quando comparada às outras rotas.

Como as melhores condições avaliadas para este projeto, os melhores fatores foram: massa de substrato de 0,5g, 10% de inóculo, pH inicial de 6 e tempo de aquecimento na pré-hidrólise de 30 min.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da Fapeal (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas).

6 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram de forma igualitária.

7 REFERÊNCIAS

- ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.A. Development And Validation Of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry* **2014**; 5: 406-414. <http://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>
- AHMAD, F. **Methane production in response to sulfuric acidic and hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse**. 2017. 224f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos.
- AKUTSU, Y.; LEE, D-Y.; LI, Y-Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *Internatl J Hydrog Energy*, 2009, 34:5365-5372. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.052>
- ANDRADE, S. L. P. **Produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica**. 2017. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process.

- Ind. Eng. Chem** 2008. Res. 47, 5227. <http://doi.org/10.1021/ie071622x>
- BECKERS, L.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; MASSET, J.; THONART, P.; Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. **Bio- technology Agro- nomie Societe et Environmental** 2010, 14, 541. <http://doi.org/10.1021/ie071622x>
- BRAGA, J. K.; SOARES, L. A.; VARESCHE, M. B. A. Influência da origem do inóculo na produção de hidrogênio em condição mesofílica. In: 1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio 2014, São Carlos - SP, Brasil. **Anais...**
- CAMPOS, C. M.M. Desenvolvimento e operação de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) no tratamento dos efluentes da suinocultura em escala laboratorial. **Ciênc. Agrotec** 2006. Lavras, v. 30, n. 1, p. 140-147. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000100020&lng=en&nrm=iso >. Acesso em: 21 jan 2017. <http://doi.org/10.1590/S1413-70542006000100020>
- CAO G.; REN N.; WANG A.; LEE D. J.; GUO W.; LIU B. et al. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **Int J Hydrogen Energy** 2009;34:7182e8. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>
- CHAVES, T. C. **Produção de hidrogênio a partir do melão de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leite fluidificado**. 2018. 108f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**. 7: 695-699, 2001. [http://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00035-7](http://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00035-7)
- CUI M.; YUAN Z.; ZHI X.; SHEN J. Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria. **Int J Hydrogen Energy** 2009;34:7971e8. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.022>
- CUI, M.; YUAN, Z.; ZHI, X.; WEI, L.; SHEN, J. Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. **Int J Hydrogen Energy** 2010;35: 4041e7. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.035>
- CUI, M.; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **Int. J. Hydrogen Energy** 2012, v.37, p. 1120- 1124. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.078>
- FAN, Y.; XING, Y.; MA, H.; PAN, C.; HOU, H. Enhanced cellulosehydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. **Int J Hydrogen Energy** 2008;33:6058e65. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.005>
- FELIPE, M. G. A. **Em Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade**; Cortez, L. A. B., ed.; Edgard Blücher Ltda: São Paulo, cap. 7, 2010.
- GHOSH, D.; HALLENBECK, P.C.; Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135. **Int. J. Hydrogen Energy** 2009, 34, 7979. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.004>
- GUILHERME, A. de A. **Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de açúcar para produção de etanol**. 2014. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- LAY, J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnol Bioeng**, 2000, 68:269-278. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<269::AID-BIT5>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<269::AID-BIT5>3.0.CO;2-T)
- LEVIN, D.B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **Int J Hydrogen Energy** 2004;29:173-89. [http://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](http://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- LO, Y.C.; LU, W.C.; CHEN, C.Y.; CHANG, J. S. Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum* CGS5. **Bioresour Technol** 2010;101:5885e91.
- MAINTINGUER, S I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C.S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy** 2008. Vol 33. P. 4309-4317. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.053>
- MOREIRA, R., CARVALHO, F. M. S. DE; BERGAMASCHI, V. S. R. P. Patentes depositadas em âmbito nacional como indicador de desenvolvimento das tecnologias de produção de hidrogênio. **Química Nova** 2013, v. 36, n. 05, p. 748-751. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422013000500023>
- NASR, M.; TAWFIK, A.; OOKAWARA, S.; SUZUKI, M.; KUMARI, S.; BUX F. Continuous biohydrogen production from starch wastewater via sequential dark-photo fermentation with emphasize on maghemite nanoparticles. **J Industrial Eng Chem**, 2015, 21:500-506. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.03.011>
- NGUYEN, T.A.D.; KIM, K.R.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Thermophilic hydrogen fermentation from Korean rice straw by *Thermotoga neapolitana*. **Int J Hydrogen Energy** 2010;35:13392e8. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.112>
- PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **Internatl J Hydrog Energy**, 2008, 33:6058-6065. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.008>
- RATTI, R. P.; DELFORNO, T. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Produção de bio-hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açú-

car pré-tratado. In: 1º Workshop Latino-Americano de Bio- Hidrogênio 2014, São Carlos - SP, Brasil. **Anais...**

REIS, C.M. **Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidificado**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

REN, N.; WANG, A.; GAO, L.; XIN, L.; LEE, D.J.; SU, A. Bioaugmented hydrogen production from arboxymethyl cellulose and partially delignified corn stalks using isolated cultures. **Int J Hydrogen Energy** **2008**;33:5250e5.

ROSA, P.R.F.; SILVA, E.L. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbio de leite fluidificado: impacto da proporção de glicose e soro de queijo. In: II seminário do projeto temático 2012, p. 222 – 228. **Anais...**

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTAC, M C.; LEITÃO, V. S. F. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova** **2014**, v. 37, n. 05, p. 857-867. <http://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>

SANTOS FILHO, E. N. **Produção de metano com resíduos de biotério utilizando fluido ruminal como inóculo**. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis by products of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy** **2015**, Ribeirão Preto, v. 80, p. 109- 116. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.070>

SOARES, L. A.; RATTI; VARESCHE, R. E M. B. A. Influência do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio em condição termofílica. In: 1º Workshop Latino-Americano de Bio- Hidrogênio 2014, São Carlos - SP, Brasil. **Anais...**

TAVARES, T. de G. A. **Produção de hidrogênio a partir da manipueira em reator anaeróbio de leite fluidificado sob condições termofílicas**. 2016. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbiol Biotechnol** **2007**;1:107–25.

WANG, Y.; WANG, H.; FENG, X.; WANG, X.; HUANG, J. Biohydrogen production from cornstalk wastes by anaerobic fermentation with activated sludge. **Int J Hydrogen Energy** **2010**;35:3092e9. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.024>

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International journal of hydrogen energy** **2009**. Vol 34. P. 799-811. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>

ZHANG, Y.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J Ind Microbiol Biotechnol** **35**, 367–375 (2008). <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0293-6>

ZWIETERING, M. H. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990. ISSN 0099-2240 1098-5336. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/> >.