

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TACIANA CARNEIRO CHAVES

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA PRODUÇÃO DE H₂**

Maceió

2023

TACIANA CARNEIRO CHAVES

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA PRODUÇÃO DE H₂**

Trabalho de Conclusão de Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Maceió

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

C512c Chaves, Taciana Carneiro.
 Codigestão anaeróbia de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar
 para produção de h₂ / Taciana Carneiro Chaves. – 2023.
 119 f. : il. color.

 Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
 Coorientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.
 Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de
 Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Química. Maceió, 2023.

 Bibliografia: f. 93-108.
 Apêndices: f. 109-119.

 1. Codigestão anaeróbia . 2. Vinhaça. 3. Melaço de cana-de-açúcar. 4.
 Biohidrogênio. I. Título.

CDU: 620.91

Taciana Carneiro Chaves

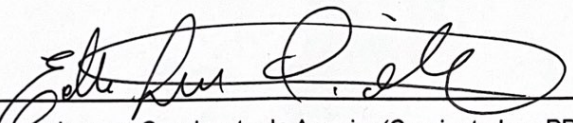
**Codigestão anaeróbia de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar
para produção de H₂**

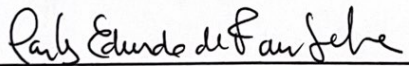
Tese apresentada à Universidade
Federal de Alagoas, como requisito
para a obtenção do Título de Doutora
em Engenharia Química.

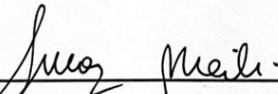
Aprovada em: Maceió, 23 de outubro de 2023.

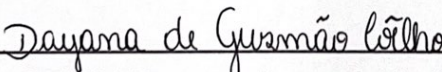
BANCA EXAMINADORA

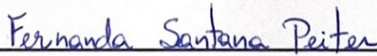

Prof.^a. Dr.^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (Orientadora – PPGEQ/UFAL)


Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (Coorientador - PPGEQ/UFAL)


Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva (PPGEQ/UFAL)


Prof. Dr. Lucas Meili (PPGEQ/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Dayana de Gusmão Coelho (CTEC/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Santana Peiter (F.M.Nassau)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha existência.

A minha querida e inesquecível avó, Amara Caetano da Silva (*In memoriam*), por todo amor e carinho dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças, primeiramente a Deus, e a contribuição de muitas pessoas, as quais tenho a satisfação de agradecer:

A minha filha Tainá Carneiro Chaves, que com sua pureza e amor incondicional, me ajudou a enfrentar os problemas com maior facilidade, pois sempre após uma jornada cansativa de trabalho, ao chegar em casa, ela estava lá me esperando com um abraço apertado e confortável. Te amo incondicionalmente filha!

Ao meu amado esposo, Edeilton de Lima Chaves, pelo apoio e paciência; agradeço por todos esses anos ao meu lado.

As minhas tias Lusinete Carneiro e Inácia Carneiro, por cuidarem da minha filha nos momentos em que estive ausente; obrigada por dedicarem tanto amor e atenção a Tainá.

A minha orientadora Renata Maria Rosas e ao meu coorientador Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, pelos ensinamentos e pela atenção dedicada nas situações em que surgiram problemas e que precisei deles;

A minha grande amiga Georgia Nayane que colaborou com o andamento dos experimentos, operação do reator e análises físico-químicas. A mesma esteve presente sempre quando eu precisava.

A amiga Nadjane Leite que contribuiu com as análises finais da pesquisa. Juntas, aprendemos a utilizar o amostrador automático e aprimoramos o método para a análise de metabólitos líquidos por headspace no cromatógrafo gasoso.

As professoras Fernanda Peiter, Norma Amorim e Dayana Gusmão, que mesmo à distância, sempre responderam a cada dúvida que eu lhes perguntava, tanto sobre a revisão bibliográfica (Norma) quanto sobre o planejamento experimental (Dayana e Fernanda) e a execução prática do experimento (Norma).

Aos professores do PPGEQ em geral, que dedicaram tempo para compartilhar seus conhecimentos teóricos e práticos.

A todos do LSA, por disponibilizarem o espaço laboratorial para o desenvolvimento de parte das análises deste trabalho.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL), campus Penedo, minha instituição de trabalho, por ter permitido meu afastado por 2 anos e meio das atividades do magistério, para poder me dedicar a minha pesquisa e desenvolver cada uma das etapas possíveis. Sem isso, a trajetória teria sido bem mais difícil.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa.

RESUMO

A utilização de resíduos industriais contendo carboidratos, lipídeos e proteínas em abundância representa uma fonte alternativa de energia renovável que vem ganhando destaque na atualidade. Os resíduos da agroindústria sucroalcooleira, a exemplo da vinhaça e do melaço de cana-de-açúcar, são ricos em matéria orgânica e, portanto, quando submetidos ao processo de digestão anaeróbia podem ser convertidos em hidrogênio, ácidos orgânicos e metano. Mantendo-se o controle de parâmetros operacionais específicos é possível inibir a formação de metano e favorecer a produção apenas de H_2 e/ou ácidos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi utilizar a cofermentação de vinhaça e melaço visando a produção de hidrogênio. Para isto, numa primeira fase (F1), baseado no planejamento experimental de mistura Simplex Lattice foram realizados testes em batelada para avaliar os efeitos sinérgicos e/ou antagônicos da vinhaça (V) e do melaço (M) em busca da melhor composição percentual dos substratos (100% de vinhaça: $V_{100}/M_0 = R1$, 75% de vinhaça + 25% de melaço: $V_{75}/M_{25} = R2$, 50% de vinhaça + 50% de melaço: $V_{50}/M_{50} = R3$, 25% de vinhaça + 75% de melaço: $V_{25}/M_{75} = R4$ e 100% de melaço: $V_0/M_{100} = R5$) que resultasse na máxima produção de H_2 e que utilizasse a maior porcentagem possível de vinhaça, por ser este o substrato que na indústria sucroalcooleira é o resíduo final do processo e de grande impacto ambiental. A partir da melhor condição verificada em F1, foi implementada uma segunda fase (F2), também em reatores batelada. Foram testadas a influência da concentração inicial em termos de demanda química de oxigênio (DQO 6 e 9 g/L), a temperatura (T entre 35 e 45 °C) e o pH inicial (5,5 e 6,5) com base num planejamento fatorial completo (2^3). O estudo avaliou duas variáveis resposta: a taxa de produção volumétrica ($VHPR_{DQO_{apl}}$) e o rendimento volumétrico de hidrogênio ($VHY_{DQO_{apl}}$). Em F1, os resultados mostraram que o uso de vinhaça em 75% ou mais causou instabilidade na produção de H_2 . Foram obtidos os valores máximos de 595,63 mL- H_2 /g-DQO_{apl} e 50,63 mL- H_2 /(g-DQO_{apl}.d), ambos verificados na condição V_{50}/M_{50} , que, de acordo com o teste de Tukey, foram resultados estatisticamente semelhantes aos observados em V_{25}/M_{75} e V_0/M_{100} . A vinhaça e o melaço interagiram sinérgicamente nas misturas. Modelos quadráticos altamente significativos ($p \leq 0,05$) e com bons ajustes foram obtidos para o rendimento ($R^2 = 0,98$) e a taxa de produção de H_2 ($R^2 = 0,92$). Em F2, com a composição inicial da alimentação fixa em 50% de cada substrato, foram registrados os valores máximos de $VHY_{DQO_{apl}}$ (1,56 L- H_2 /g-DQO_{apl}) e $VHPR_{DQO_{apl}}$ (54,98 mL- H_2 /g-DQO_{apl}/d) na condição de menor temperatura e maiores DQO e pH. O pH foi o fator mais influente e de efeito positivo sobre as variáveis respostas. A temperatura revelou efeito influente negativo. O efeito da DQO foi de influência desprezível em relação a VHY e $VHPR$. Foram obtidos modelos lineares significativos e bem ajustados para relacionar os fatores DQO, pH e T com cada resposta, todos com $R^2 > 0,9$.

Palavras-chave: fermentação escura; cosubstrato; biohidrogênio; planejamento simplex lattice; planejamento fatorial completo.

ABSTRACT

Industrial residues abundant in carbohydrates, lipids, and proteins are currently gaining prominence as alternative sources of renewable energy. Wastes from the sugar and alcohol agroindustry, such as vinasse and sugarcane molasses, are rich in organic matter and, therefore, when subjected to the anaerobic digestion process, can be converted into hydrogen, organic acids, and methane. Maintaining control of specific operational parameters enables the inhibition of methane formation and favors H₂ and acid production. In this context, the objective of this study was to use the co-fermentation of vinasse and molasses to produce hydrogen. To this end, the first phase of the work (F1) consisted of the experimental planning of the Simplex Lattice mixture with batch tests to evaluate the synergistic and antagonistic effects of vinasse (V) and molasses (M). The purpose of this step was to find the percentage composition of the substrates (100% vinasse: V₁₀₀/M₀ = R1, 75% vinasse + 25% molasses: V₇₅/M₂₅ = R2, 50% vinasse + 50% molasses: V₅₀/M₅₀ = R3, 25% vinasse + 75% molasses: V₂₅/M₇₅ = R4, 100% molasses: V₀/M₁₀₀ = R5) that would result in maximum H₂ production besides using the highest possible percentage of vinasse, given the significative environmental impact of this final residue from the sugar and alcohol industry. From the best condition verified in F1, the second phase (F2), also in batch reactors, tested the influence of the initial concentration regarding chemical oxygen demand (COD 6 and 9 g/L), temperature (T between 35 and 45 °C) and initial pH (5.5 and 6.5) based on a full factorial design (2³). The study evaluated two response variables: the volumetric production rate (VHPR_{COD_{apl}}) and the volumetric hydrogen yield (VHY_{COD_{apl}}). Results obtained in F1 showed that using vinasse at 75% or more caused instability in H₂ production. The maximum values of 595.63 mL-H₂/g-COD_{apl} and 50.63 mL-H₂/(g-COD_{apl}.d) occurred in the V₅₀/M₅₀ condition, which, according to the Tukey test, were statistically similar to those observed at V₂₅/M₇₅ and V₀/M₁₀₀. Vinasse and molasses interacted synergistically in the mixtures. Highly significant ($p \leq 0.05$) quadratic models with good fits were obtained for yield ($R^2 = 0.98$) and H₂ production rate ($R^2 = 0.92$). In F2, with the initial composition of the feed fixed at 50% of each substrate, maximum values of VHY_{COD_{apl}} (1.56 L-H₂/g-COD_{apl}) and VHPR_{DQO_{apl}} (54.98 mL-H₂/g-COD_{apl}/d) were recorded in the condition of lower temperature and higher COD and pH. pH was the factor that exerted the greatest influence with a positive effect on the response variables, while temperature revealed a negatively influential effect. The effect of COD was negligible concerning VHY and VHPR. The linear models obtained were significant and well adjusted (with R² coefficients above 0.9), relating the factors COD, pH, and temperature.

Keywords: dark fermentation; cosubstrate; simplex lattice planning; full factorial design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cadeia produtiva de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar com a geração de subprodutos.....	20
Figura 2: Fluxograma da produção etanol a partir de melaço e caldo de cana-de-açúcar.....	22
Figura 3: Diagrama da divisão de fases do processo de digestão anaeróbia.	31
Figura 4: Fluxograma da metodologia desenvolvida no trabalho.	45
Figura 5: Esquema de montagem dos reatores na Fase 2.....	50
Figura 6: Produção acumulada de H ₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado em função da % de vinhaça (V) e melaço (M) nas misturas (R1 = V ₁₀₀ /M ₀ , R2 = V ₇₅ /M ₂₅ , R3 = V ₅₀ /M ₅₀ , R4 = V ₂₅ /M ₇₅ e R5 = V ₀ /M ₁₀₀).	57
Figura 7: Produção acumulada de H ₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para as condições da fase 2.	74
Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para VH _Y _{DQOapl} com $\alpha = 0,05$	78
Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para VH _{PR} _{DQOapl} com $\alpha = 0,05$	78
Figura 10: Gráfico de médias preditas DQO*pH para VH _Y _{DQOapl} (IC = 95%).	79
Figura 11: Gráfico de médias preditas DQO*pH para VH _{PR} _{DQOapl} (IC = 95%).	80
Figura 12: Gráfico de médias preditas DQO*T para VH _Y _{DQOapl} (IC = 95%).	83
Figura 13: Gráfico de médias preditas DQO*T para VH _{PR} _{DQOapl} (IC = 95%).	83
Figura 14: Gráfico de médias preditas pH*T para VH _Y _{DQOapl} (IC = 95%).	85
Figura 15: Gráfico de médias preditas pH*T para VH _{PR} _{DQOapl} (IC = 95%).	86
Figura 16: Gráfico de valores observados versus valores preditos para VH _Y _{DQOapl} (IC = 95%).	89
Figura 17: Gráfico de valores observados versus valores preditos para VH _{PR} _{DQOapl} (IC = 95%).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características composicionais do melaço de cana-de-açúcar.	23
Tabela 2: Características composicionais da vinhaça gerada a partir de derivados da cana-de-açúcar: caldo, melaço e caldo + melaço (continua).	26
Tabela 3: Caracterização do inóculo e substratos utilizados.	46
Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 utilizado na fase 2 (F2).	49
Tabela 5: Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores avaliados na Fase 1.	55
Tabela 6: Produções volumétricas diárias de H_2 para as condições operacionais da fase 1 ($R1 = V_{100}/M_0$, $R2 = V_{75}/M_{25}$, $R3 = V_{50}/M_{50}$, $R4 = V_{25}/M_{75}$ e $R5 = V_0/M_{100}$).	59
Tabela 7: Parâmetros cinéticos do Modelo de Gompertz Modificado para as condições da Fase 1 ($R1 = V_{100}/M_0$, $R2 = V_{75}/M_{25}$, $R3 = V_{50}/M_{50}$, $R4 = V_{25}/M_{75}$ e $R5 = V_0/M_{100}$).	60
Tabela 8: Parâmetros de Gompertz Modificado para diversos estudos de produção de H_2 em batelada.	61
Tabela 9: Parâmetros indicadores de desempenho para as condições avaliadas na Fase 1 ($R1 = V_{100}/M_0$, $R2 = V_{75}/M_{25}$, $R3 = V_{50}/M_{50}$, $R4 = V_{25}/M_{75}$ e $R5 = V_0/M_{100}$).	63
Tabela 10: Comparação entre resultados de estudos de produção de H_2 a partir da digestão anaeróbia de vinhaça e/ou melaço.	66
Tabela 11: ANOVA para os modelos lineares e quadráticos da Fase 1.	67
Tabela 12: Coeficientes de regressão, erro padrão e significados estatísticos do modelo quadrático na fase 1.	68
Tabela 13: Rendimentos e taxas de produção de H_2 experimentais e previstos para as condições da fase 1.	69
Tabela 14: Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores avaliados na Fase 2.	71
Tabela 15: Parâmetros cinéticos do Modelo de Gompertz Modificado, rendimento e taxa de produção para as condições da Fase 2.	75
Tabela 16: Efeitos principais e interativos do planejamento fatorial 2^3	77
Tabela 17: ANOVA para os modelos lineares das variáveis resposta da Fase 2.	87
Tabela 18: Coeficientes de regressão, erro padrão e significados estatísticos dos modelos lineares em F2.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFBR	-	Reator anaeróbio de leito fluidizado
ANOVA	-	Análise de Variância
AnSBBR	-	Reator Anaeróbio de Bateladas Sequenciais
AnSTBR	-	Reator anaeróbio de leito estruturado
AnSTBR-A	-	Reator anaeróbio de leito estruturado acidogênico
APHA	-	American Public Health Association
b₀	-	Parâmetro constante do modelo linear
b₁	-	Parâmetro para o fator codificado DQO no modelo linear
b₂	-	Parâmetro para o fator codificado pH no modelo linear
b₃	-	Parâmetro para o fator codificado temperatura no modelo linear
b₁₂	-	Parâmetro para a interação DQO*pH no modelo linear
b₁₃	-	Parâmetro para a interação DQO*T no modelo linear
b₂₃	-	Parâmetro para a interação pH*T no modelo linear
b_v	-	Coeficiente linear para a vinhaça
b_M	-	Coeficiente linear para o melaço
b_{VM}	-	Coeficiente de interação vinhaça-melaço
2-BES	-	Ácido 2-Bromoetanosulfônico
BRS	-	Bactérias redutoras de sulfato
C_{final}	-	Concentração final de carboidratos
C_{inicial}	-	Concentração inicial de carboidratos
C/N	-	Relação Carbono/Nitrogênio
CONAB	-	Companhia Nacional de Abastecimento
COT	-	Carbono Orgânico Total
COV	-	Carga Orgânica Volumétrica
CSTR	-	Reator contínuo de tanque agitado
DP	-	Desvio padrão
DQO	-	Demanda Química de Oxigênio
DQO_{apl}	-	Concentração de DQO aplicada
DQO_{final}	-	Concentração final de DQO
DQO_{inicial}	-	Concentração inicial de DQO
DQO_{rem}	-	Concentração de DQO removida
e	-	Constante adimensional de Euler
E_C	-	Eficiência de remoção de carboidratos
E_{DQO}	-	Eficiência de remoção de DQO
E1G	-	Etanol de Primeira Geração
E2G	-	Etanol de Segunda Geração
EGSB	-	Reator mesofílico de leito granular expandido
E_{H2}	-	Eficiência de conversão do substrato em hidrogênio

EP	-	Erro puro
EPMQ	-	Erro puro da média quadrática
E_{SVT}	-	Eficiência de remoção de biomassa
ETE	-	Estação de Tratamento de Efluentes
F1	-	Fase 1
F2	-	Fase 2
FID	-	Detector de Ionização em Chama
GC	-	Cromatógrafo gasoso
GL	-	Grau de liberdade
HCl	-	Ácido Clorídrico
HPR	-	Taxa de produção volumétrica de H ₂
HPR_{VR}	-	Taxa de produção volumétrica de H ₂ por volume reacional
H₂S	-	Sulfeto de hidrogênio
H(t)	-	Produção acumulada de H ₂
HY	-	Rendimento molar de H ₂ por substrato consumido
IC	-	Intervalo de confiança
M	-	Melaço
M₀	-	0% de melaço
M₂₅	-	25% de melaço
M₅₀	-	50% de melaço
M₇₅	-	75% de melaço
M₁₀₀	-	100% de melaço
MHPR_{DQOapl}	-	Taxa de produção molar de H ₂ por carga aplicada
MHPR_{SVTapl}	-	Taxa de produção molar de H ₂ por biomassa aplicada
MHY_{DQOapl}	-	Rendimento molar de H ₂ por carga aplicada
MHY_{DQOrem}	-	Rendimento molar de H ₂ por carga removida
MHY_{SVTapl}	-	Rendimento molar de H ₂ por biomassa aplicada
MHY_{SVTrem}	-	Rendimento molar de H ₂ por biomassa removida
MQ	-	Média quadrática
NTK	-	Nitrogênio Total Kejl Dahl
P	-	Potencial máximo de produção de H ₂
P_{H2}	-	Pressão parcial de H ₂
pH_{final}	-	Potencial hidrogeniônico final
P_{total}	-	Fósforo Total
R1	-	Condição do Reator 1 (100% vinhaça)
R2	-	Condição do Reator 2 (75% vinhaça + 25% melaço)
R3	-	Condição do Reator 3 (50% vinhaça + 50% melaço)
R4	-	Condição do Reator 4 (25% vinhaça + 75% melaço)
R5	-	Condição do Reator 5 (100% melaço)
R²	-	Coeficiente de regressão linear
RALF	-	Reator anaeróbico de leito fluidizado

R_m	-	Taxa máxima de produção de H ₂
RM⁶_{5,5}	-	Reator mesofílico a 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5
RM⁶_{6,5}	-	Reator mesofílico a 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5
RM⁹_{5,5}	-	Reator mesofílico a 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5
RM⁹_{6,5}	-	Reator mesofílico a 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5
RT⁶_{5,5}	-	Reator termofílico a 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5
RT⁶_{6,5}	-	Reator termofílico a 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5
RT⁹_{5,5}	-	Reator termofílico a 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5
RT⁹_{6,5}	-	Reator termofílico a 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5
SO₄²⁻_{inicial}	-	Concentração inicial de sulfato
SO₄²⁻_{final}	-	Concentração final de sulfato
SQ	-	Soma quadrática
SST	-	Sólidos Suspensos Totais
SSV	-	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	-	Sólidos Totais
SVT	-	Sólidos Voláteis Totais
SVT_{apl}	-	Concentração aplicada de sólidos voláteis totais
SVT_{final}	-	Concentração final de sólidos voláteis totais
SVT_{inicial}	-	Concentração inicial de sólidos voláteis totais
SVT_{rem}	-	Concentração removida de sólidos voláteis totais
t	-	Tempo
T	-	Temperatura
t(8)	-	Efeito padronizado com 8 graus de liberdade
TCD	-	Detector de Condutividade Térmica
TDH	-	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	-	Reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo
V	-	Vinhaça
V₀	-	0% de vinhaça
V₂₅	-	25% de vinhaça
V₅₀	-	50% de vinhaça
V₇₅	-	75% de vinhaça
V₁₀₀	-	100% de vinhaça
VHY_{DQOapl}	-	Rendimento volumétrico de H ₂ por carga aplicada
VHPR_{DQOapl}	-	Taxa de produção volumétrica de H ₂ por carga aplicada
VHPR_{SVTapl}	-	Taxa de produção volumétrica de H ₂ por biomassa aplicada
VHY_{DQOrem}	-	Rendimento volumétrico de H ₂ por carga removida
VHY_{SVTapl}	-	Rendimento volumétrico de H ₂ por biomassa aplicada
VHY_{SVTrem}	-	Rendimento volumétrico de H ₂ por biomassa removida
V_R	-	Volume reacional
x₁	-	Valor codificado para DQO
x₂	-	Valor codificado para pH

x3	-	Valor codificado para temperatura
xM	-	Porcentagem de melão
xv	-	Porcentagem de vinhaça
y	-	Variável resposta
%	-	Porcentagem
λ	-	Duração da fase lag

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Grau Celsius
CaCO₃	- Carbonato de cálcio
CaO	- Óxido de cálcio
CH₄	- Metano
CHCl₃	- Clorofórmio
CO₂	- Dióxido de Carbono
D	- Dia
G	- Grama
H	- Hora
H₂	- Hidrogênio
K	- Potássio
K₂O	- Óxido de potássio
L	- Litro
M	- Metro
M	- Mol/L
ml	- Mililitro
Mg	- Miligrama
mm	- Milímetro
mmol	- Milimol
µm	- Micrômetro
N	- Nitrogênio
N₂	- Gás nitrogênio
NaOH	- Hidróxido de sódio
P	- Fósforo
pH	- Potencial hidrogeniônico
Rpm	- Rotação por minutos
SO₄²⁻	- Sulfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA NO BRASIL.....	20
3.1.1 Melão: subproduto da produção de açúcar	21
3.1.2 Vinhaça: subproduto da produção de etanol	24
3.2 FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	30
3.3 PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO.....	32
3.3.1 Influência da temperatura	34
3.3.2 Influência da inibição da metanogênese	36
3.3.3 Influência da concentração e da codigestão de substratos.....	38
3.3.4 Codigestão com vinhaça e/ou melão	40
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 INÓCULO E SUBSTRATOS UTILIZADOS.....	45
4.2 FASE 1: INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE H₂	46
4.2.1 Planejamento de mistura simplex lattice	46
4.2.2 Fermentação acidogênica e monitoramento	47
4.3 FASE 2: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO, DO PH E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE H₂.	48
4.3.1 Planejamento fatorial completo 2 ³	48
4.3.2 Fermentação acidogênica e monitoramento	49
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	50
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS REATORES	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 FASE 1: INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE H₂	54
5.1.1 Caracterização das misturas avaliadas e eficiências de remoção	54

5.1.2	Produção acumulada de H ₂ e parâmetros cinéticos	57
5.1.3	Rendimento e taxa de produção de H ₂	62
5.1.4	Análise estatística	67
5.2	FASE 2: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO, DO PH E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE H₂	70
5.2.1	Caracterização das misturas avaliadas e eficiências de remoção	70
5.2.2	Produção de H ₂ e parâmetros cinéticos	73
5.2.3	Análise de significância dos efeitos	76
5.2.4	Efeito da interação DQO*PH sobre VHY _{DQOapl} e VHPR _{DQOapl}	79
5.2.5	Efeito da interação DQO*T sobre VHY _{DQOapl} e VHPR _{DQOapl}	82
5.2.6	Efeito da interação pH*T sobre R _m , VHY _{DQOapl} e VHPR _{DQOapl}	85
5.2.7	Análise de variância (ANOVA) dos modelos lineares.....	86
6.	CONCLUSÃO.....	90
7.	SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A – DADOS DE PRODUÇÃO VOLUMÉTRICA ACUMULADA DE H₂ AO LONGO DO TEMPO NA FASE 1 E GRÁFICOS INDIVIDUAIS AJUSTADOS AO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO	109
	APÊNDICE B – DADOS DE PRODUÇÃO VOLUMÉTRICA ACUMULADA DE H₂ AO LONGO DO TEMPO NA FASE 2 E GRÁFICOS INDIVIDUAIS AJUSTADOS AO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO	113

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energias renováveis, que agridam menos o meio ambiente quando comparadas as fontes altamente poluidoras já bastantes exploradas vindas de combustíveis fósseis, tem sido cada vez mais abrangente e promissora. A produção de biocombustíveis a partir da digestão anaeróbia é apresentada como uma alternativa viável e eficiente de se produzir energia renovável (KARKI et al., 2021; ARCHANA et al., 2024). O processo fermentativo consiste em várias etapas (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), a partir das quais, por meio dos devidos controles operacionais, substratos ricos em matéria orgânica podem ser convertidos em biogás (principalmente metano e CO₂) e em outros produtos de alto valor agregado como hidrogênio e ácidos graxos (LÜ et al., 2021; LÓPEZ et al. 2023).

O hidrogênio é obtido nas fases acidogênicas e acetogênicas. Visando o favorecimento destas etapas, podem ser aplicados alguns métodos de inibição da metanogênese, como o uso de pH ácido, o tratamento prévio da fonte de inóculo e a aplicação de inibidores químicos (AMORIM et al., 2018; GAVAZZA et al., 2021; WU et al., 2021a).

Vários subprodutos e resíduos têm sido utilizados como fonte de matéria orgânica para o processo digestivo. Nesse sentido, a digestão anaeróbia tem sido utilizada não só para a geração de energia, mas também como forma de tratamento dos resíduos, reduzindo o seu potencial poluidor e resultando em um digestato ainda rico em nutrientes que pode ser reaproveitado, por exemplo, como suplementação nutricional em solos pobres em nutrientes (KHANAL et al., 2021; MAGDALENA et al., 2023; ARCHANA et al., 2024). Os subprodutos da agroindústria têm sido bastante utilizados para este fim. A vinhaça e o melaço de cana de açúcar, por exemplo, advindos da indústria sucroalcooleira, já vem sendo estudados individualmente devido as suas convenientes características (LEE; WEE; CHO, 2014; HAN et al., 2016; BERNAL et al., 2017; FUESS; ZAIAT, 2018; ADARME et al., 2019).

A vinhaça, subproduto da produção de etanol, possui altas concentrações de carbono e de nutrientes, sendo uma grande aliada da digestão anaeróbia, entretanto seus altos níveis de potássio, sulfato, compostos fenólicos e melanoidinas, podem dificultar a sua biodegradabilidade, tornando-a tóxica para o processo digestivo (GODOI et al., 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2020; SILVA et al., 2021). O melaço, por sua vez, é um subproduto da produção de açúcar, altamente rico em carboidratos e, portanto, bastante atrativo para a produção fermentativa de energia renovável, mas, quando utilizado separadamente pode causar inibição no processo digestivo devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio e de sais, logo,

a utilização em conjunto com outro substrato, pode melhorar o processo anaeróbio (ALBANEZ et al., 2018; VILELA et al., 2021; ZHANG; WANG; JIANG, 2021).

Além do substrato, outros fatores também exercem influência na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos via digestão anaeróbia, como o tipo de reator e regime de alimentação, a temperatura, o pH, o inóculo e seu pré-tratamento (quando necessário), a utilização de cossustratos e a relação carbono-nitrogênio (C/N) (ZHANG et al. 2023; CREMONEZ et al., 2021).

A codigestão de substratos pode contribuir para a melhora do processo digestivo, visto que promove a mistura e diluição de compostos tóxicos, o equilíbrio de nutrientes e de pH, bem como a melhora dos efeitos sinérgicos entre os microrganismos existentes (KARKI et al., 2021; VOLPI; FUESS; MORAES, 2021; ZHANG et al. 2023).

Várias combinações envolvendo subprodutos da indústria sucroalcooleira já foram analisadas quanto a geração de biogás. Vrieze et al. (2015) verificaram a utilização de melaço ou resíduos de cozinha com lodo ativado, resultando em uma comunidade microbiana diversa com produção estável de metano. Sousa et al. (2019) alcançaram alta produtividade e rendimento de metano ao realizar a codigestão de vinhaça com soro de queijo em comparação com as monodigestões. González; Reyes; Romero (2017) testaram com efetividade a cofermentação de vinhaça e torta de cana-de-açúcar também em relação a produção de metano.

Apesar de promissores, estudos envolvendo codigestão entre vinhaça e melaço visando a produção de H₂ ainda são escassos. A partir desta fermentação espera-se haver o equilíbrio entre a alta toxicidade da vinhaça e a alta concentração de nitrogênio e de sais do melaço, fatores estes que acabam inibindo a digestão. Além disso, por se tratar de substratos provenientes da mesma cadeia produtiva e de fácil acesso, o processo assume caráter mais sustentável e de menor custo, podendo ainda, durante o período de entressafra da cana-de-açúcar no Brasil, a vinhaça ser substituída unicamente pelo melaço no processo digestivo (ALBANEZ et al., 2016; 2018; SANTANA JUNIOR; DUDA; OLIVEIRA, 2019; CAVALCANTE et al., 2020).

Os trabalhos de Albanez et al. (2016; 2018) realizaram a codigestão de vinhaça e melaço em biorreatores anaeróbios de bateladas sequenciais (AnSBBR) objetivando a produção exclusiva de H₂. Albanez et al. (2016) testaram duas composições afluente (33% melaço + 67% vinhaça e 25% melaço + 75% vinhaça), três concentrações iniciais em termos de demanda química de oxigênio (3, 6 e 9 g-DQO/L), a estratégia de alimentação (batelada e batelada alimentada) e a necessidade ou não de suplementação nutricional e de tratamento térmico do inóculo. Os melhores resultados de eficiência de remoção de matéria orgânica, rendimento

molar de hidrogênio e produtividade foram relatados com a utilização de 67% de vinhaça e 33% de melação, a 6 g-DQO/L, em modo batelada, com choque térmico e sem suplementação.

No estudo de Albanez *et al.* (2018), com concentração afluyente fixa em 3 g-DQO/L, foram avaliadas as composições 25% melação + 75% vinhaça e 67% melação + 33% vinhaça, além da digestão individual de melação. Os autores obtiveram melhor estabilidade nos processos com a monodigestão do melação e com a cofermentação de 67% melação + 33% vinhaça. As investigações de Albanez *et al.* (2016; 2018) não foram baseadas em planejamentos experimentais, de modo que não avaliaram o efeito de vários fatores e de suas interações, positivas ou negativas, na codigestão de vinhaça e melação de cana-de-açúcar para a produção de hidrogênio, havendo várias lacunas no conhecimento desse processo.

Com base nas lacunas existentes, os principais objetivos deste trabalho foi realizar estudos em batelada para primeiramente avaliar os efeitos sinérgicos e/ou antagônicos da vinhaça e do melação em diferentes proporções na mistura, de modo a identificar a melhor composição (% vinhaça / % melação) para alcançar uma produção estável e com alto rendimento de H₂, e, a partir deste dado, em uma segunda fase, avaliar a influência da concentração inicial de substrato em termos de demanda química de oxigênio, o pH inicial da fermentação e a temperatura na produção de H₂.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a produção de hidrogênio a partir da codigestão anaeróbia de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar em reatores batelada.

2.2 Específicos

- Avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO, de carboidratos e de sólidos voláteis totais na produção de H₂;
- Avaliar a influência da proporção de vinhaça e melaço e os seus efeitos interativos (sinérgicos ou antagônicos) na produção de hidrogênio a partir planejamento experimental simplex lattice.
- Obter modelos preditivos para a produção de H₂ (rendimento e a taxa de produção) em função da composição do substrato a partir do planejamento de mistura;
- Avaliar a influência da concentração do substrato, do pH e da temperatura na produção de H₂ a partir do planejamento fatorial completo com 2 níveis e obter modelos preditivos para o rendimento volumétrico de H₂ e a taxa de produção volumétrica de H₂ em função dos três fatores investigados.

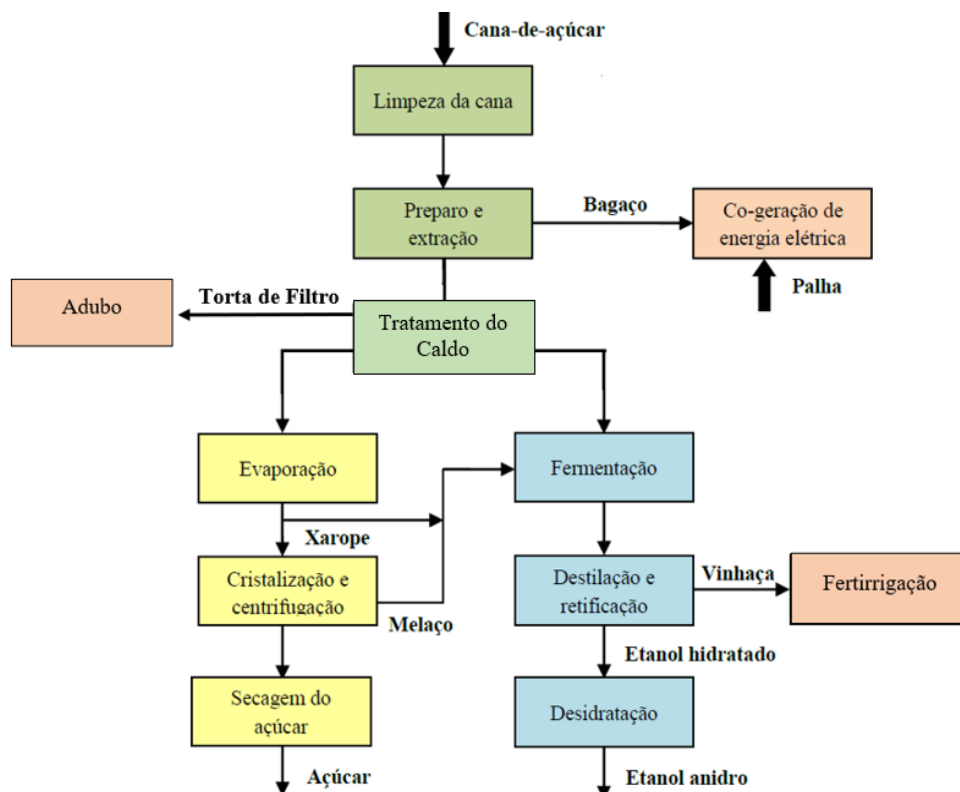
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Subprodutos da indústria sucroalcooleira no Brasil

No Brasil, a indústria sucroalcooleira utiliza a cana-de-açúcar como fonte principal de matéria orgânica para obtenção de açúcar e álcool. O país possui clima, extensão territorial e tecnologias favoráveis ao seu desenvolvimento como grande produtor da matéria-prima. De acordo com o segundo levantamento da safra brasileira 2023/24 de cana-de-açúcar, apresentado em 17/08/2023 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), há estimativa de alcance de 652,9 milhões de toneladas de cana na safra atual, com produção total de 40,9 milhões de toneladas de açúcar e 27,72 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2023).

A cadeia produtiva dessa agroindústria gera vários subprodutos (Figura 1). Bagaço, palha da cana, torta de filtro, melão e vinhaça são os principais e apresentam aplicações diversas, podendo ser reaproveitados em outros segmentos industriais (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; OLIVEIRA et al., 2020a; VILELA et al., 2021).

Figura 1: Cadeia produtiva de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar com a geração de subprodutos.



Fonte: Adaptado de Moraes; Zaiat; Bonomi (2015).

Entre os resíduos sólidos gerados pelo setor sucroalcooleiro, a palha e o bagaço, resultantes das etapas de colheita e extração do caldo da cana, respectivamente, são compostos lignocelulósicos com ampla aplicação para geração de vapor e eletricidade em quantidades suficientes para suprir a demanda energética das usinas e ainda garantir um excedente a ser vendido para redes elétricas. Outra finalidade é a conversão da celulose e hemicelulose presentes nestes subprodutos em carboidratos mais simples a serem fermentados visando a produção de etanol de segunda geração (E2G). Neste sentido, cada tonelada de cana processada gera cerca de 140 kg de bagaço em base seca (LOVATO et al., 2019).

A torta de filtro, rica em nutrientes (ex.: cálcio, nitrogênio, fósforo e magnésio), gerada após o tratamento do caldo por filtração, é geralmente aplicada como adubo no plantio (GONZÁLEZ et al., 2015; GONZÁLEZ; REYES; ROMERO, 2017; ADARME et al., 2019).

O melaço, subproduto líquido, resultante após a centrifugação do açúcar, é comumente destinado para a cadeia produtiva do álcool ou para ração animal. A vinhaça, resíduo fluido advindo da produção de etanol após a etapa de destilação e retificação, é amplamente utilizada como fertilizante por meio da aplicação direta no sistema de irrigação da cana-de-açúcar (FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018; LOVATO et al., 2019; ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020).

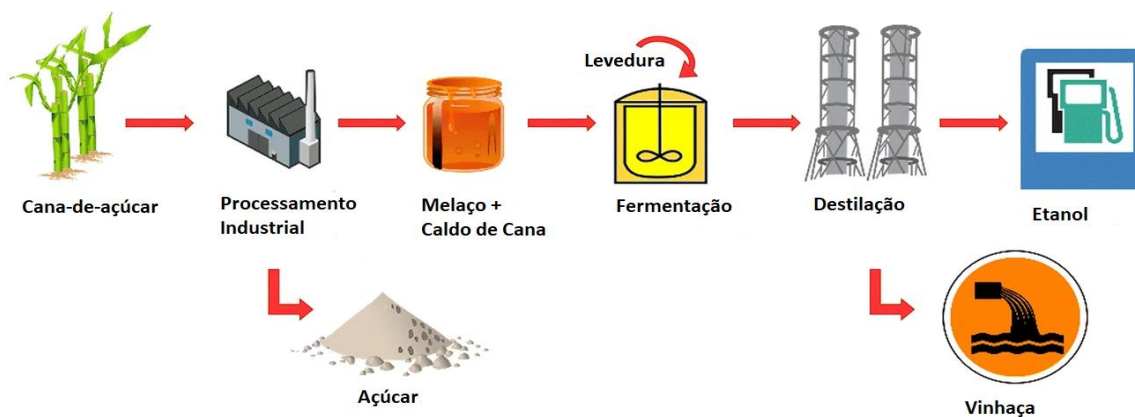
As biomassas advindas da agroindústria contêm quantidades elevadas de carbono orgânico e isto as torna substratos adequados ao processo de digestão anaeróbia para produção de biogás, biohidrogênio e ácidos carboxílicos (ADARME et al., 2019; CHAVES et al., 2021; GAVAZZA et al., 2021). A fermentação a partir de subprodutos orgânicos apresenta as vantagens de utilização de fontes renováveis aliada ao fato de evitar a competição de terra com culturas alimentares (CAVALCANTE et al., 2017). Estudos utilizando subprodutos da cana-de-açúcar na digestão anaeróbia tem apontado para ganhos energéticos e ambientais e visam a necessidade de avaliar o efeito da mistura de dois ou mais desses substratos em relação aos ganhos mencionados (VOLPI; FUESS; MORAES, 2021).

3.1.1 Melaço: subproduto da produção de açúcar

Na cadeia produtiva do açúcar obtido a partir da cana-de-açúcar, durante as etapas de cristalização e centrifugação, ocorre a separação dos cristais de sacarose, havendo a geração de uma solução residual concentrada, o melaço. Nas usinas com destilaria anexa, por ainda conter alta quantidade de açúcares, o melaço é encaminhado para as destilarias onde é misturado ao caldo da cana para auxiliar na produção de etanol, conforme exposto na Figura 2 (GODOI et

al., 2019). É também utilizado para produção de cachaça, rum, fermentos biológicos e rações animais servindo como fonte de energia para ruminantes que fermentam rapidamente os açúcares presentes (TORRES et al., 2021; ZHANG; WANG; JIANG, 2021; ZHENG et al., 2021).

Figura 2: Fluxograma da produção etanol a partir de melão e caldo de cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Godoi et al. (2019).

A cada tonelada de cana são gerados cerca de 40 a 60 kg de melão. O substrato possui uma demanda química de oxigênio (DQO) elevada, em torno de 1000 g/L e é rico em carboidratos, principalmente na forma de sacarose, glicose e frutose (VILELA et al., 2019; CHAVES et al., 2021). De acordo com Meng et al. (2017), a partir da produção de 4 toneladas de açúcar é gerada uma tonelada de melão, que por sua vez, resulta em 0,2 toneladas de etanol.

Palmonari et al. (2020), caracterizaram 16 amostras de melão, coletadas em vários locais do Brasil e observaram a sacarose como principal açúcar fermentescível e o ácido lático como o principal ácido orgânico. Foram encontradas as seguintes variações percentuais na composição das amostras: 75,7 a 79,6% de matéria seca; 2,2 a 9,3% de proteínas totais; 57 a 71% de açúcares totais; 39,2 a 67,3% de sacarose; 1,3 a 12,1% de glicose; 2,3 a 14,3% de frutose; 1,6 a 12,8% de ácido lático; 0,2 a 1% de ácido acético; 10,2 a 16,3% de cinzas; 0,8 a 3,1% de Ca; 0,3 a 7,9% de K e 0,8 a 4,1% de sulfatos, além de outros constituintes em porcentagens menores.

Na Tabela 1 são apresentadas algumas características composicionais do melão de cana-de-açúcar, as quais variam conforme o clima da região, o tipo e grau de maturação da cana em uso. São destacáveis os elevados valores de DQO, carboidratos e nitrogênio total (NTK).

Tabela 1: Características composicionais do melaço de cana-de-açúcar.

Referência	pH	DQO	Carboidratos totais	NTK	P _{total}	SO ₄ ²⁻
		(g/L)				
Park et al. (2010)	4,3	1.082,2	828,9*	37,8	0,59	26,4
Albanez et al. (2016)	-	1.100	-	-	-	-
Albanez et al. (2018)	-	1.100	-	-	-	-
Freitas; Menezes; Silva (2020)	-	844,7	564,7	12,9	-	-
Fuess; Zaiat; Nascimento (2020)	-	1.275,8*	932,9*	8,4*	-	10*
Miyntat; Argun (2020)	-	1.480	740	12,8*	0,27*	-
Oliveira et al. (2020b)	-	1.125*	-	4,1*	-	35,9*
Chaves et al. (2021)	5,6	1.089	970	31,4	0,46	-
Fuess et al. (2021a)	6,12	1.088,1*	958,5*	-	-	124,2*
Vilela et al. (2021)	-	1.177,2*	644*	36,3*	-	9,5*

*Valores calculados considerando a densidade média do melaço = 1,35 g/mL; DQO - demanda química de oxigênio; NTK - nitrogênio total Kejl Dahl; P_{total} - fósforo total; SO₄²⁻ - sulfato.

Fonte: Autora (2023).

Aliado a alta concentração de açúcares redutores, o melaço também contém aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e algumas substâncias formadoras de cor, como as melanoidinas. Apresenta calor específico em torno de 0,5 cal/kg/°C, o qual assim como a viscosidade varia com o teor de sólidos, água e temperatura. Sua produção anual é de aproximadamente 55 milhões de toneladas no mundo (ZHANG; WANG; JIANG, 2021).

Enquanto no Brasil o melaço é proveniente da cana-de-açúcar, em países como a China e a Índia, a beterraba também é bastante utilizada como fonte de carboidratos. Uma comparação entre as características do melaço de cana e o melaço de beterraba foi exposta por Satyawali; Balakrishnan (2008). Conforme apresentado pelos autores, em relação aos teores de açúcares totais, sólidos totais e proteínas, o melaço de cana contém cerca de 75%, 46% e 3%, enquanto o melaço de beterraba possui em média 77%, 48% e 6%, respectivamente.

Alguns autores avaliaram as concentrações de sólidos em amostras de melaço de cana. Park et al. (2010), ao caracterizarem uma amostra, encontraram 578 g/L de sólidos totais (ST), 501,2 g/L de sólidos voláteis totais (SVT), 11,6 g/L de sólidos suspensos totais (SST) e 7,2 g/L de sólidos suspensos voláteis (SSV). Freitas; Menezes; Silva (2020) contabilizaram 6,2 g/L de SST e 1,3 g/L de SSV. Chaves et al. (2021) encontraram 8,65 g/L de SSV.

Devido a composição rica em açúcares, o subproduto apresenta-se como uma fonte viável de matéria orgânica para o processo fermentativo de produção biológica de hidrogênio (PARK et al., 2010; HAN et al., 2016; VILELA et al., 2021). A exemplo, melão proveniente de uma indústria chinesa de refino de açúcar de beterraba, foi utilizado por alguns pesquisadores no processo de fermentação anaeróbia. O substrato continha: 78 a 85% de matéria seca; 48 a 58% de açúcares totais; 28 a 34% de carbono orgânico total (COT); 0,2 a 2,8% de nitrogênio total Keijldahl (NTK); 0,15 a 0,8% de CaO, e, 2,2 a 4,5% de K₂O como principais constituintes (REN et al., 2006; LI et al., 2007; GUO et al., 2008; CHANG; LI; LIU, 2011; HAN et al., 2012a, 2012b; LI; AI; REN, 2013; WANG; LI; REN, 2013; ZHU et al., 2013).

3.1.2 Vinhaça: subproduto da produção de etanol

A produção mundial de etanol tem sido feita a partir de diversas matérias-primas, as quais podem ser classificadas em: biomassa açucarada, rica em açúcares fermentescíveis facilmente extraídos por pressão ou difusão (ex.: cana-de-açúcar, beterraba, uva e sorgo sacarino); biomassa amilácea, rica em amido (ex.: milho, trigo, mandioca, cevada e batata doce); e, biomassa lignocelulósica, composta por lignina, celulose e hemicelulose (ex.: palha e bagaço de cana-de-açúcar). Os materiais amiláceos e lignocelulósicos necessitam de uma etapa de pré-tratamento (ex.: pirólise, explosão a vapor, hidrólise ácida e alcalina) para transformar os carboidratos complexos em açúcares fermentescíveis (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; PARSAAE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol (30%), utilizando como matéria-prima principalmente a cana-de-açúcar. É ultrapassado apenas pelos Estados Unidos (53%) onde a produção é feita a partir do milho (HUANG et al., 2020; RFA, 2021). No geral, as destilarias brasileiras produzem o etanol a partir do caldo da cana ou de uma mistura de melão com caldo quando há usina de açúcar anexa, conforme já apresentado na Figura 2. O álcool etílico produzido com estes materiais é denominado etanol de primeira geração (E1G) (ADARME et al., 2019; GODOI et al., 2019; FUESS et al., 2021b).

Na China e Índia, respectivamente quarto e quinto maiores produtores de etanol do mundo, a produção é feita exclusivamente com a utilização de melão (ARIMI et al., 2014; GEBREEYESSUS et al., 2020; RFA, 2021). Em território nacional, durante os períodos de entressafra, em que não há geração de caldo, o melão acumulado do processamento de açúcar e devidamente estocado é utilizado como única fonte de carboidratos nas destilarias (FREITAS; MENEZES; SILVA, 2020). Há também, em menor proporção, a produção nacional de etanol

de segunda geração (E2G), onde a matéria-prima é proveniente de materiais lignocelulósicos, a exemplo da palha e do bagaço da cana (ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020; FUESS et al., 2021b; VOLPI; FUESS; MORAES, 2021).

De acordo com Huang et al. (2020), em 2019, o cenário brasileiro passou a contar com 370 unidades sucroalcooleiras (capacidade nominal de 43.105 milhões de litros de etanol) e três refinarias de E2G (capacidade de 127 milhões de litros) destinando 0,25 milhões de toneladas de bagaço a produção de etanol 2G no referido ano.

A água residual proveniente das destilarias de etanol, a denominada vinhaça, é gerada em temperaturas entre 85 e 90 °C e apresenta características que dependem primeiramente do tipo de material utilizado (açucarado, amiláceo ou lignocelulósico) e, mesmo em se tratando do efluente derivado da mesma matéria-prima, a exemplo do caldo e/ou melaço da cana-de-açúcar, são observadas algumas particularidades, conforme apresentado na Tabela 2. Algumas dessas diferenças são refletidas nas concentrações de DQO, sulfato, açúcares e sólidos do resíduo (GODOI et al., 2019; ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020; VILELA et al., 2021).

Conforme é possível observar na Tabela 2, o efluente das destilarias exclusivas de melaço conta com maiores valores de DQO, potássio e fósforo (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). De acordo com Arimi et al. (2014), geralmente a vinhaça apresenta DQO entre 50 e 100 g/L, sólidos dissolvidos totais (SDT) > 50 g/L, pH entre 4 e 6, aproximadamente 1 g/L de nitrogênio total, 0,1 g/L de fósforo total e teor de potássio acima de 4 g/L.

No geral, a vinhaça proveniente de matérias-primas derivadas da cana-de-açúcar (caldo e/ou melaço), apresenta menores concentrações de DQO em relação ao efluente advindo de outros materiais (ex.: milho, trigo, mandioca), porém, quanto a concentração de nutrientes (N, P e K) e sulfato os valores são não sofrem muitas alterações (SILVA et al., 2021).

Silva et al. (2021) afirmam que a eficiência das etapas envolvidas na produção de etanol nas destilarias bem como a variedade e a maturação da cana-de-açúcar utilizada alteram as frações orgânicas (parte biodegradável, principalmente açúcares e ácidos orgânicos) e inorgânicas do efluente líquido resultante, e por isso, são fatores que interferem diretamente na composição da vinhaça. Wilkie; Riedesel; Owens (2000), citam que além da matéria-prima, aspectos como a água de lavagem usada para limpar os fermentadores, a purga da água de resfriamento e da caldeira misturadas a vinhaça contribuem para sua a variabilidade.

Tabela 2: Características composicionais da vinhaça gerada a partir de derivados da cana-de-açúcar: caldo, melação e caldo + melação (continua).

Referência	Matéria-Prima	pH	COT (ppm)	DQO (g/L)	Carboidratos totais	NTK	K	P _{total}	SO ₄ ²⁻	ST	SVT	SST	SSV
Wilkie, Riedesel e Owens (2000) *		4,4	-	89	-	1,23	5,12	0,19	3,48	-	-	-	-
España-Gamboa et al. (2011)*		4,63	-	90	-	0,69	7,95	0,10	2,49	-	-	-	-
España-Gamboa et al. (2012)		4	-	121	-	1,34	7,26	0,14	5,34	65,82	-	20,27	-
Lee; Wee; Cho (2014)	Melação	3,5	-	128,40	11,41	0,03	-	-	-	89,70	86,20	4,27	4,27
Leme; Seabra (2017)*		4,6	-	65	-	1,03	5,79	0,20	6,40	81,50	60,00	-	-
Gebreeyessus et al. (2020)		4,0	-	172,92	-	1,72	-	5,28	-	232,72	164,01	34,13	18,16
Lertsriwong; Glinwong (2020)		4,6	50.750	126,59	-	2,27	-	-	-	121,88	-	26,30	-
Ramos et al. (2021)		nd	-	100,62	9,07	-	-	-	48,75	-	-	14,97	11,67
Wilkie, Riedesel e Owens (2000)*		4,2	-	38,25	-	0,54	2,56	0,06	2,08	-	-	-	-
Siqueira; Damiano; Silva (2013)*		4,43	-	41,33	-	0,98	2,77	0,07	2,63	30,00	21,00	-	-
Santos et al. (2014a)*		4,29	4.748	32,96	13,46	1,49	4,50	0,22	2,50	-	-	-	1,89
Santos et al. (2014b)*	Caldo + Melação	4,84	3.789	32,10	-	0,65	-	0,16	2,00	-	-	-	-
Santos et al. (2014c)*		4,97	4.917	31,71	-	0,95	4,15	0,21	2,20	-	-	-	-
Reis et al. (2015)		5,00	-	42,82	-	0,24	4,50	3,80	1,40	-	-	-	0,29
Leme; Seabra (2017)*		4,5	-	45,00	-	0,60	3,34	0,11	3,72	52,70	40,00	-	-
Niz et al. (2019)		4,8	-	32,30	5,50	-	-	-	-	-	-	-	5,50
Santos et al. (2019)		4,63	-	42,93	4,73	-	-	-	2,00	-	21,57	-	-

Tabela 2: Características composicionais da vinhaça gerada a partir de derivados da cana-de-açúcar: caldo, melão e caldo + melão.

Referência	Matéria-Prima	pH	COT (ppm)	(mg/L)									
				DQO	Carboidratos totais	NTK	K	P _{total}	SO ₄ ²⁻	ST	SVT	SST	SSV
Fuess et al. (2021b)		4,57	-	43,10	3,76	-	-	-	2,85	-	21,50	-	-
Bernal; Menezes; Silva (2021)		4,6	-	32,03	7,68	-	-	-	-	-	-	3,26	2,66
Gois et al. (2021)	Caldo + Melão	4,42	-	37,88	12,93	0,08	-	0,08	-	-	20,26	20,37	-
Piffer et al. (2021)		5,78	-	28,09	2,61	0,65	-	-	1,59	-	-	-	3,06
Ramos et al. (2021)		-	-	29,47	7,54	-	-	-	1,97	-	-	1,91	1,41
Sánchez et al. (2021)		4,7	-	48,20	5,20	0,59	-	0,04	2,05	-	-	-	-
Silva et al. (2021)*		4,32	-	30,00	5,37	0,58	2,57	0,22	1,45	16,8	-	-	-
Wilkie, Riedesel e Owens (2000)*		3,97	-	26,00	-	0,67	1,55	0,17	1,65	-	-	-	-
España-Gamboa (2011)*		4,05	-	30,40	-	0,37	1,84	0,10	1,36	-	-	-	-
Leme; Seabra (2017) *		4,15	-	24,00	-	0,43	1,65	0,11	0,68	23,70	20,00	-	-
Del Nery et al. (2018)	Caldo	4,2	-	19,22	-	0,35	1,47	0,10	0,65	14,57	9,34	2,21	1,88
Santos et al. (2019)		4,5	-	17,85	3,93	-	-	-	1,23	-	14,04	-	-
Adarme et al. (2019)		-	8.570	18,07	-	0,41	2,24	2,51	1,99	23,01	-	-	17,16
Fuess et al. (2021b)		4,23	-	19,00	3,90	-	-	-	1,45	-	14,00	-	-

* Valores médios calculados a partir dos dados apresentados pelos autores. COT - carbono orgânico total; DQO- demanda química de oxigênio; NTK - nitrogênio total Kejl Dahl; P - fósforo total como PO₄³⁻; K - potássio; SO₄²⁻ - sulfato; ST - sólidos totais; SVT - sólidos voláteis totais; SST - sólidos suspensos totais; SSV - sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Autora (2023).

A vinhaça de cana-de-açúcar contém altas concentrações de álcoois, açúcares, ácidos orgânicos (ex.: acético, butírico, fórmico e láctico) e, em menor quantidade, compostos que lhe conferem cor escura e que apresentam baixa biodegradabilidade, além da presença de metais pesados como cobre, níquel e zinco. Trata-se de um líquido escuro, de odor forte, pH ácido, bastante corrosivo, com elevada DQO e teor de nutrientes, principalmente potássio. Destaca-se também as expressivas quantidades de sólidos e de sulfato. Estas características a tornam um efluente com grande potencial poluidor (GODOI et al., 2019; PARSAAE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019; SILVA et al., 2021).

Os ácidos orgânicos e álcoois presentes na vinhaça variam bastante. Bernal; Menezes; Silva (2021), encontraram principalmente ácido láctico (7,79 g/L), etanol (4,59 g/L) e glicerol (849 mg/L) em uma amostra de vinhaça de caldo + melaço. Já Piffer et al. (2021) observaram em maiores quantidades a presença de glicerol (1,37 a 3,12 g/L), ácido láctico (305 a 967 mg/L), ácido acético (141 a 1.392 mg/L) e etanol (125 a 525 mg/L), enquanto Ramos et al. (2021) destacaram os altos valores de ácido butírico (2,93 g/L), isobutírico (2,7 g/L), propiônico (1,56 g/L), láctico (1,55 g/L), acético (1,36 g/L) e glicerol (850 mg/L).

Godoi et al. (2019) realizaram a caracterização composicional de 13 amostras de vinhaça de uma biorrefinaria brasileira com produção de açúcar anexa durante as safras 2015 a 2017. Alguns resultados foram: pH $4,72 \pm 0,67$; 1,54 a 3,96 g/L de potássio; 209 a 3.550 mg/L de cloreto; 343 a 669 mg/L de magnésio; 292 a 641 mg/L de cálcio; 27 a 57 mg/L de sódio; 0,13 a 0,44 mg/L de fluoreto; dureza aproximada de 3,4 g-CaCO₃/L; ST em torno de 27 g/L, SST de cerca 5 g/L; 33 ± 4 g/L de DQO; 0,75 a 1,32 mg/L de fenóis totais, além de ácido láctico (0,61 a 6,45 g/L), metanol (0,34 a 4,55 g/L), glicerol (0,30 a 5,44 g/L) e ácido acético (0,06 a 3,80 g/L) como principais compostos orgânicos solúveis.

Nas destilarias brasileiras são geradas de 10 a 15 L de vinhaça por litro de etanol (ADARME et al., 2019; BERNAL; MENEZES; SILVA, 2021; GOIS et al., 2021). A cor escura é resultante da presença de corantes naturais, a exemplo de carotenóides, clorofila, melanoidina, polifenóis (ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) e de produtos resultantes da degradação de hexoses em meio ácido (ex.: 2- metilhexano, metilbenzeno e ácido acético) (ARIMI et al., 2014; GEBREEYESSUS et al., 2020).

As melanoidinas são polímeros complexos de cor marrom originados a partir do aquecimento de açúcares e aminas principalmente durante a etapa de evaporação do caldo da cana. Sua presença causa a inibição de enzimas que degradam proteínas e de vários microrganismos envolvidos na degradação de substratos (ARIMI et al., 2014;

KORNILŁOWICZ-KOWALSKA; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, 2021; RATNA; RASTOGI; KUMAR, 2021).

Os polifenóis são antioxidantes naturais que contêm fenol, de coloração clara a amarelo-castanho, liberados na etapa de moagem da cana para extração do caldo e possuem atividades antimicrobianas, em menor efeito do que as melanoidinas, mas ainda assim podem afetar o crescimento de microrganismos e a capacidade de remoção de DQO (ARIMI et al., 2014; CONTRERAS-CONTRERAS et al., 2020).

A depender da destinação final, a água residual da produção de etanol pode causar enormes impactos ambientais. O descarte direto em rios e lagos apresenta efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos em peixes e humanos. A aplicação no solo durante o plantio da cana como fertilizante visando a devolução de nutrientes, prática muito comum pelas destilarias brasileiras, apesar de aumentar a produtividade agrícola e substituir o uso de fertilizantes químicos, causa vários problemas devido a sua alta carga poluidora. Alguns exemplos que podem ser citados são: emissões de gases do efeito estufa, salinização do solo, lixiviação de metais e de compostos sulfurosos e contaminação dos lençóis freáticos (BERNAL; MENEZES; SILVA, 2021; RATNA; RASTOGI; KUMAR, 2021; SÁNCHEZ et al., 2021).

Conforme mencionado por Ratna; Rastogi; Kumar (2021), nos ecossistemas aquáticos os principais efeitos tóxicos da vinhaça são a redução da penetração da luz solar, do oxigênio dissolvido e da atividade fotossintética, prejudicando a flora e a fauna aquática. Nos ecossistemas terrestres tem-se o aumento da salinização, da acidificação, da desestabilização estrutural e de metais tóxicos no solo, além da diminuição da diversidade microbiana. Quanto a intensidade desses efeitos terrestres, os autores enfatizam que depende da concentração da água residual e da duração da exposição no solo.

Diante do caráter poluidor demonstrado pelo uso direto da vinhaça na fertirrigação, veem sendo estudadas novas estratégias para o seu tratamento antes da destinação final, incluindo métodos físico-químicos avançados (ex.: adsorção, oxidação, eletrólise e osmose reversa), biológicos (aeróbios e anaeróbios) e combinados. Uma alternativa viável é a utilização como substrato para a digestão anaeróbia por meio da qual obtém-se energia renovável (biogás ou biohidrogênio) destinada a geração de eletricidade e energia térmica, além de vinhaça biodigerida com teor de matéria orgânica reduzido e níveis de nutrientes inalterados que possibilitam a permanência da aplicação como biofertilizante. (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; FUESS et al., 2021b; VOLPI; FUESS; MORAES, 2021).

3.2 Fundamentos da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo que ocorre basicamente em quatro etapas, na ausência de oxigênio, convertendo matéria orgânica complexa em biogás (principalmente metano e CO₂) e em um efluente orgânico estabilizado que pode ser aplicado como biofertilizante. É reconhecida como uma alternativa viável para o tratamento e estabilização de resíduos orgânicos agroindustriais, utilizando-os como fontes alternativas renováveis de matéria-prima para geração de energia, e, portanto, agrega valor as cadeias produtivas já consolidadas (CREMONEZ et al., 2021; KARKI et al., 2021; KHANAL et al., 2021).

Wu et al. (2021a) enfatizam que a digestão anaeróbia diminui a dependência por combustíveis fósseis na geração de energia, a deposição de resíduos orgânicos em aterros sanitários e as emissões de carbono, logo, contribui para a redução de impactos ambientais.

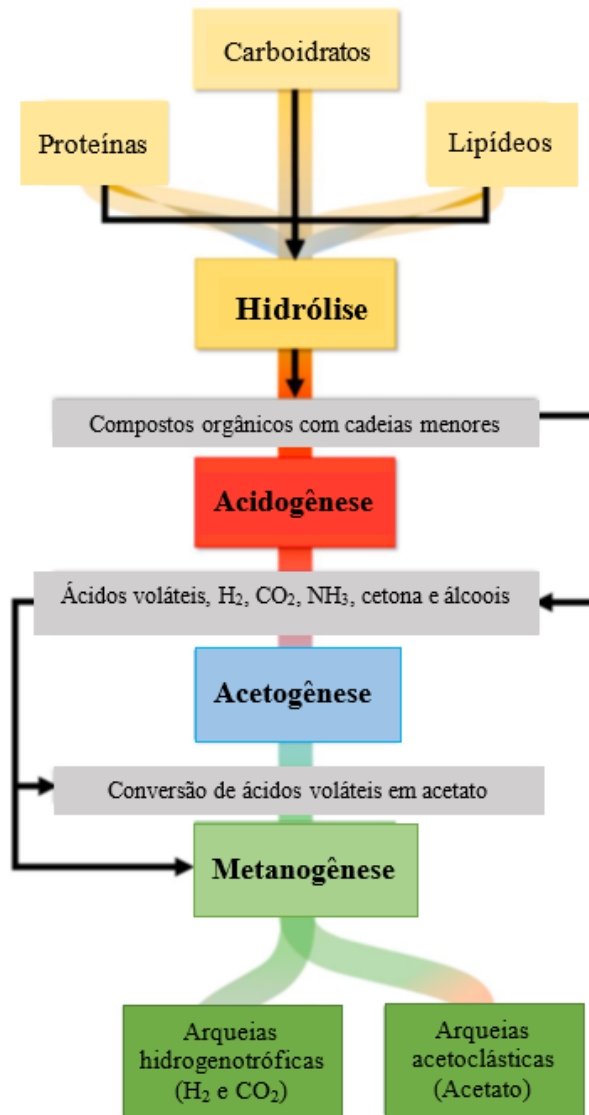
Durante a digestão, diferentes grupos de microrganismos predominam em cada fase com funções distintas. Na hidrólise, primeira etapa, mais lenta e limitante do processo, bactérias hidrolíticas fermentativas liberam enzimas extracelulares para digerirem a matéria orgânica complexa (polissacarídeos, lipídeos e/ou proteínas) e transformá-las em compostos mais simples e solúveis (açúcares, ácidos graxos e aminoácidos) (KAINTHOLA; KALAMDHAD; GOUD, 2019; ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020; SILVA et al., 2021).

Em uma segunda fase, denominada acidogênese, os produtos da hidrólise, sob ação de bactérias fermentativas acidogênicas, são transformados em ácidos orgânicos de cadeia curta (ex.: ácido acético, butírico e propiônico), hidrogênio, CO₂, álcoois, cetona e amônia. A produção de ácidos promove a diminuição do pH do meio. Posteriormente, na acetogênese, bactérias sintróficas acetogênicas convertem os produtos da acidogênese em acetato, hidrogênio e CO₂, os quais, na quarta e última fase são digeridos por arqueias metanogênicas estritamente anaeróbias sendo transformados em metano e CO₂ (LI; CHEN; WU, 2019; ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020; SILVA et al., 2021).

Na Figura 3 é apresentado um esquema da divisão de fases no processo digestivo.

As bactérias produtoras de acetato são denominadas de homoacetogênicas. As arqueias que consomem H₂ e CO₂ para produzir metano são chamadas hidrogenotróficas, enquanto aquelas que consomem o acetato são as acetoclásticas. Todos os microrganismos envolvidos no processo digestivo devem agir sinergicamente para que a degradação da matéria orgânica ocorra de forma eficiente (KAINTHOLA; KALAMDHAD; GOUD, 2019).

Figura 3: Diagrama da divisão de fases do processo de digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Cremonese et al. (2021).

Para os casos em que o substrato fonte de matéria orgânica contém presença significativa de sulfato, pode haver uma quinta fase, a sulfetogênese, onde bactérias redutoras de sulfato (BRS), agem reduzindo o sulfato a sulfeto e competem por H_2 e matéria orgânica com as arqueias metanogênicas. A presença de sulfeto no biogás o torna corrosivo e tóxico, sendo necessária a aplicação de tratamentos pós-digestivos para a remoção do enxofre (LI; CHEN; WU, 2019; CHEN; YIN; WANG, 2021; SILVA et al., 2021).

Além do biogás contendo cerca de 70% de metano, que há bastante tempo tem sido o principal objeto de estudo ao considerar a condução completa da digestão anaeróbia, outros produtos de maior valor agregado como o hidrogênio, ácidos graxos voláteis, ácido láctico e ácidos carboxílicos de cadeia média tem ganhado destaque. Visando a geração desses produtos

de alta valoração são necessárias à aplicação de técnicas que possibilitem a inibição da metanogênese. Desta forma, controlando-se os fatores que interferem na digestão anaeróbia, a mesma pode ser direcionada para a produção específica ou sequencial de biohidrogênio, biometano e ácidos orgânicos (KHANAL et al., 2021; LÜ et al., 2021; SILVA et al., 2021).

3.3 Produção fermentativa de hidrogênio

O hidrogênio é o combustível gasoso com maior conteúdo energético por unidade de peso (143 kJ/g), sendo considerado uma alternativa promissora para a redução de emissões de gases do efeito estufa já que a partir da sua combustão o único subproduto é a água (CHEN; YIN; WANG, 2021; NAIR; AGRAWAL; VERMA, 2022). É um gás incolor, inodoro e inflamável cuja eficiência energética é cerca de três vezes maior do que a oferecida por combustíveis originados de hidrocarbonetos. Pode ser utilizado como uma fonte alternativa de energia eficaz, ecológica e renovável (SARAVANAN et al., 2021; 2022). Sua produção ocorre a partir de combustíveis fósseis, água ou biomassa por meio de processos físico-químicos ou biológicos (CHAVES et al., 2021).

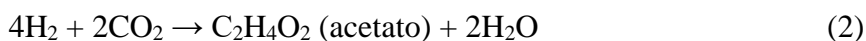
A produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia é um processo biológico que promove a fermentação de biomassas. Neste caso, é gerado nas fases acidogênica e acetogênica. A união das 3 fases iniciais da digestão, conhecida como fermentação na ausência de luz, é um método produtivo que promove benefícios energéticos e ambientais devido a possibilidade de utilização de resíduos orgânicos como fonte barata de matéria-prima renovável, promovendo o seu tratamento e a geração de energia sem a necessidade de uso de fonte luminosa (NIZ et al., 2019; CHAVES et al., 2021).

Durante a acidogênese também são gerados ácidos orgânicos de cadeia curta os quais podem favorecer ou prejudicar a produção de hidrogênio. Assim, existem várias rotas metabólicas que podem ser seguidas pelos microrganismos fermentativos a depender dos ácidos produzidos, conforme representado pelas Equações (1) a (5) (CHAVES et al., 2021). Geralmente, a formação de hidrogênio é favorecida pela produção dos ácidos acético (4 mol-H₂/mol-glicose) e butírico (2 mol-H₂/mol-glicose), enquanto o consumo é realizado pelos microrganismos produtores de ácido propiônico (BANU et al., 2021; DAHIYA et al., 2021).

Rota do ácido acético:



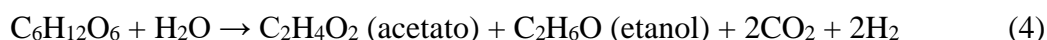
Rota ácido acético a partir de bactérias homoacetogênicas:



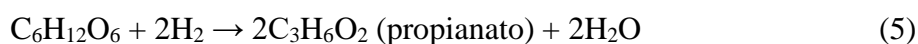
Rota do ácido butírico:



Rota do etanol:

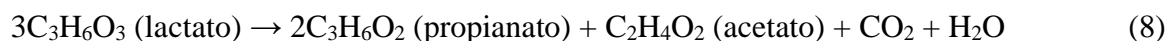
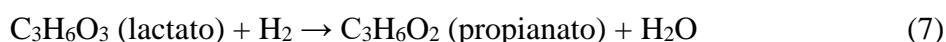
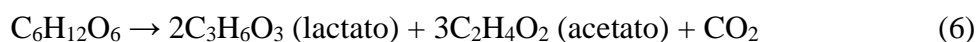


Rota do ácido propiônico:



Um outro ácido orgânico que também pode acompanhar a produção de hidrogênio é o ácido láctico, não volátil, conforme apresentado pelas Equações (6) a (8) (BERNAL; MENEZES; SILVA, 2021). O ácido láctico pode consumir hidrogênio para produzir ácido propiônico (7) ou ainda se transformar em ácido propiônico e ácido acético sem haver consumo nem produção de hidrogênio (8). Já a formação de hidrogênio a partir de ácido láctico pode ser representada pela Equação (9) (FREITAS; MENEZES; SILVA, 2020).

Rotas do ácido láctico:



As principais bactérias fermentativas responsáveis pela produção de biohidrogênio são as espécies de *Clostridium*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. e *Bacillus* pp (LERTSRIWONG; GLINWONG, 2020; BANU et al., 2021). Estes microrganismos podem ser classificados em anaeróbios obrigatórios formadores de esporos (ex.: *Clostridium* sp.) ou não (ex.: *Ethanoligenens harbinense*) e anaeróbios facultativos (ex.: *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp). Os formadores de esporos são os produtores essenciais enquanto os microrganismos competitivos são: metanogênicos, homoacetogênicos, produtores de ácido propiônico e de ácido láctico (CASTELLÓ et al., 2020; DAHIYA et al., 2021).

A produção de hidrogênio via fermentação escura é favorecida a partir do controle de diversos parâmetros operacionais, destacando-se o tipo de substrato fonte de matéria orgânica, a utilização de cossustratos, a relação Carbono/Nitrogênio (C/N), a manutenção de ambiente ácido, a utilização de inóculos pré-tratados por métodos que possibilitem a destruição das arqueias metanogênicas e a temperatura reacional.

3.3.1 Influência da temperatura

A temperatura do meio fermentativo afeta o crescimento, a diversidade e as atividades enzimáticas dos microrganismos. Influencia, portanto, a transformação da matéria orgânica complexa em compostos mais simples e a hidrólise dos substratos que é a etapa limitante para a produção de hidrogênio (SILVA et al., 2021; HAQUE et al., 2022).

A fermentação na ausência de luz é geralmente conduzida sob condições psicrófilas (15 a 25 °C), mesófilas (25 a 45 °C) e termofílicas (45 a 65 °C), sendo as duas últimas as faixas mais aplicadas. Como a maioria dos microrganismos se desenvolve bem em temperaturas mesófilas, este ambiente é o que apresenta mais estabilidade. Por outro lado, temperaturas termofílicas diminuem a solubilidade do CO₂, que por sua vez, produzirá menos ácido carbônico, o qual estando presente em baixa concentração não aumentará a acidez do sistema (SIDDIQUE; WAHID, 2018; ELREEDY; FUJII; TAWFIK, 2019).

A temperatura ótima para a produção de hidrogênio ainda não é bem definida. Há inúmeras divergências quanto a faixa ideal, visto que é específica para cada substrato. No geral, ambientes termofílicos fornecem taxa de hidrólise mais rápida, porém a operação em faixa mesofílica é mais estável e consome menos energia. Além disso, a aplicação de temperaturas altas pode causar desativação e perda de enzimas, taxa rápida de morte celular microbiana e conversão incompleta do substrato (CHEN et al., 2022; HAQUE et al., 2022).

Algumas pesquisas sugerem que a faixa ideal seria entre 25 e 40 °C, onde as espécies de *Clostridium* são os principais microrganismos produtores atuantes (ELBESHBISHY et al., 2017; LOVATO et al., 2018). Entretanto, vários estudos relatam altas produções em temperaturas maiores, onde prevalecem muitos microrganismos anaeróbios estritos com capacidade de esporulação e de geração de enzimas hidrolíticas (HAQUE et al., 2022).

Haque et al. (2022) enfatizam o uso de temperaturas termofílicas moderadas (55 a 60 °C) e termofílicas extremas (65 a 90 °C) como abordagem potencial para melhorar a produção de hidrogênio a partir de resíduos agroindustriais, desde que sejam utilizados microrganismos termofílicos no processo fermentativo. Essas culturas toleram maior estresse e pH do que as

mesofílicas, o que resulta em maiores taxas de produção e rendimentos. Os autores também citam a necessidade de manutenção de baixas pressões parciais de hidrogênio no meio fermentativo visando o aperfeiçoamento de processos termofílicos. Ainda segundo os mesmos pesquisadores, para casos de resíduos agroindustriais ricos em matéria orgânica descartados em temperaturas altas, o uso de fermentações termofílicas pode aprimorar o rendimento produtivo.

Fermentações em batelada que digeriram melaço de cana-de-açúcar foram conduzidas a 30 °C e 37 °C. No estudo conduzido a 30 °C houve rendimento de 6,02 mmol-H₂/L/g-açúcar aliado a taxa de 142 mL-H₂/h (KUMAR et al., 2018). A 37 °C, o rendimento foi de 7,7 mL-H₂/mL-reator com produtividade de 21,47 mL-H₂/h ou 9,38 mmol-H₂/L-reator/h (MIYNAT; ARGUN, 2020).

Em se tratando de processos fermentativos contínuos utilizando melaço, Chaves et al. (2021), em temperatura ambiente, obtiveram taxa produtiva ótima de 1,44 L-H₂/L/h, enquanto Fuess et al. (2021a) relataram o máximo de 0,35 L-H₂/(L.h) a 55 °C. Chaves et al. (2021) conduziram o processo em um reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF), com alimentação de 25 g-DQO/L e sob tempo de detenção de hidráulica (TDH) de 6 horas. Fuess et al. (2021a) optaram por um reator anaeróbico de leito estruturado (AnSTBR), TDH de 10 horas e carga orgânica volumétrica (COV) de 86.0 kg-DQO/(m³.d).

Vinhaça de cana-de-açúcar foi avaliada em reator batelada operado a 37 °C (11,6 g-DQO/L), produzindo 58,41 mL-H₂/g-DQO_{inicial} ou 649,07 mL-H₂/g-DQO_{removida} (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019). Lazaro et al. (2014) verificaram a produção em batelada de H₂ também a partir de vinhaça, entretanto sob duas condições, mesofílicas (37 °C) e termofílicas (55 °C). A máxima taxa de produção (1,02 mmol-H₂/h), aliada ao rendimento de 1,88 mmol-H₂/g-DQO_{afluente} foi alcançada a 37 °C enquanto o rendimento ótimo de 2,31 mmol-H₂/g-DQO_{afluente} e taxa de apenas 0,06 mmol-H₂/h foram obtidos a 55 °C.

A partir da fermentação contínua da vinhaça de cana-de-açúcar, em um RALF operado a temperatura ambiente (26 a 35°C), TDH de 4 horas e COV de 155 kg-DQO/(m³.d) foi obtido rendimento de 2,4 mol-H₂/mol-carboidrato e produtividade de 0,33 L-H₂/(L.h) (GOIS et al.; 2021). Já a 55 °C (RALF, TDH 4 horas e COV 60 kg-DQO/m³/d), Santos et al. (2014a) conseguiram obter 2,77 mmol-H₂/g-DQO_{adicionada} e 0,67 L-H₂/(L.h). Sob temperatura termofílica extrema de 70 °C em um AnSTBR conduzido com TDH de 19 horas e sob 39,1 g-DQO/(L.d), Niz et al. (2019) relataram 690 mL-H₂/(L.d) e 1,8 mol-H₂/mol-glicose.

Resíduos como a vinhaça, que são gerados a altas temperaturas, podem ser beneficiados pela digestão em ambientes termofílicos, descartando necessidade do seu resfriamento ou

mistura com outro líquido para diminuir a temperatura antes de seguir para a fermentação em caso de reatores mesofílicos (ALBUQUERQUE et al., 2019).

3.3.2 Influência da inibição da metanogênese

Os microrganismos consumidores de hidrogênio podem ser suprimidos por meio da aplicação de métodos que inibem a metanogênese. Dentre esses métodos destacam-se o pré-tratamento do inóculo e a redução de pH abaixo do valor adequado para as arqueias metanogênicas (WAINAINA et al., 2019; GAVAZZA et al., 2021; WU et al., 2021a).

Os pré-tratamentos do inóculo, com exceção do choque térmico, são métodos específicos pois agem sobre moléculas das células microbianas, enquanto o pH e a aplicação de calor influenciam as funções gerais dos microrganismos, sendo considerados métodos não específicos. São exemplos de inibidores específicos os tratamentos ácidos e básicos, a adição de acetileno, 2-BES (ácido 2-Bromoetanosulfônico) e de clorofórmio (CHCl_3) (CAVALCANTE et al., 2017; AMORIM et al., 2018; DAHIYA et al., 2021).

Além de inibir as arqueias metanogênicas, o clorofórmio também pode dificultar a ação de bactérias redutoras de sulfato, homoacetogênicas e acetogênicas sintróficas (CHIDTHAISONG; CONRAD, 2000; LIU et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2017).

O choque térmico é uma alternativa barata e eficiente onde os microrganismos metanogênicos, não formadores de esporos, são destruídos pelas altas temperaturas impostas, propiciando o aumento de espécies formadoras de esporos, principalmente *Clostridium* sp. Isto favorece as rotas dos ácidos acético e butírico, logo, aumenta a produção de H_2 (AMORIM et al., 2018; WAINAINA et al., 2019; DAHIYA et al., 2021).

Amorim et al. (2018) testaram a inibição da metanogênese utilizando acetileno (1% v/v) e tratamento térmico em autoclave (120 °C, 1 atm, 30 min) e verificaram que ambos os métodos foram eficientes, visto que não houve produção de metano. Entretanto, a maior produção de H_2 (a partir de manípueira) foi verificada com a aplicação de tratamento térmico ao lodo.

Viana et al. (2019) aplicaram três tratamentos para inibir a metanogênese (adição de 0,05 % v/v de clorofórmio, adição de HCl 2M e choque térmico a 90°C por 10 min seguido de banho de gelo até 25 °C), obtendo maior rendimento de biohidrogênio (0,208 mol- H_2 /mol-glicerol) a partir do inóculo (líquido ruminal) pré-tratado com clorofórmio.

O pH influencia a solubilização da matéria orgânica, a comunidade microbiana e os produtos formados. Os diversos microrganismos envolvidos na digestão exigem diferentes faixas de pH ideais. Enquanto as arqueias metanogênicas têm seu pH ótimo entre 6,5 e 7,5, as

bactérias produtoras de H_2 são favorecidas em pH entre 5,5 e 6,5 (ROMÃO et al., 2018; SIDDIQUE; WAHID, 2018; WAINAINA et al., 2019; WU et al., 2021a). No entanto a faixa ideal de pH para a produção de hidrogênio por fermentação escura depende também de outros fatores a exemplo do tipo de substrato. Ziara et al (2019) citam o pH entre 5 e 6 para resíduos de alimentos, valores de pH mais próximo da neutralidade para águas residuais de processamento animal e pH entre 6.5 e 8.5 para águas residuais de lactato.

Silva et al. (2021) enfatizam a importância do pH para as rotas metabólicas envolvidas na produção ou consumo de hidrogênio. Segundo os autores, o acetato e o butirato são metabólitos predominantes em pH de 4 a 7 e o propionato em pH 7. Além disso, altas pressões parciais de H_2 podem inibir a formação de acetato e butirato e favorecer a formação de propionato (ALI et al., 2021; DAHIYA et al., 2021). Isto porque a atividade da enzima hidrogenase, responsável pela produção de bio- H_2 , é diminuída em pressões parciais altas. Por outro lado, pressões parciais baixas favorecem a transferência de H_2 da fase líquida para a fase gasosa (SILVA et al., 2021).

Apesar da aplicação de pH ácido favorecer a produção de hidrogênio, esta mesma condição também pode bloquear a atividade enzimática das hidrogenases, aumentando a duração da fase lag e inibindo o processo de fermentação escura (HAQUE et al., 2022).

Romão et al. (2018) avaliaram a produção de H_2 com soro de queijo em pH 5,5 e 6,5, havendo maior produtividade (129,33 mmol- H_2 /dia/L) e rendimento (4,04 mol- H_2 /mol-substrato consumido) em pH 5,5. Kumar; Mohan (2018) analisaram condições de pH entre 4 e 10 aplicadas a resíduos sólidos vegetais e alcançaram o máximo de 1,22 L- H_2 em pH 6.

Oliveira et al. (2020b) citam pH ideal entre 5 e 5,3 para sistemas acidogênicos utilizando vinhaça e pH em torno de 4,5 quando o melaço é o substrato da fermentação. Em seu estudo, os autores conseguiram produzir hidrogênio termofílico a longo prazo a partir do melaço de cana-de-açúcar sob pH baixo (3,8). A principal via metabólica foi a cofermentação de acetato e lactato gerando ácido butírico e hidrogênio, sendo obtido 1,18 mol- H_2 /mol-carboidratos totais em COV de 60 g/(L.d).

A produção de hidrogênio termofílica a partir da vinhaça de cana-de-açúcar foi maximizada em valores de pH entre 5 e 5,5. Em pH acima de 6 foi estabelecido um sistema sulfidogênico-acidogênico e valores de pH abaixo 5 favoreceram a formação de lactato. Foi registrado o máximo de 2074 mL- H_2 /(L.d) em COV de 70 kg-DQO/(m³.d) (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019).

3.3.3 Influência da concentração e da codigestão de substratos

A concentração do substrato também é um fator importante na produção de hidrogênio, visto que pode influenciar as vias metabólicas e a atividade microbiana. Concentrações baixas implicam em falta de carbono, inibindo a atividade das bactérias fermentativas. Por outro lado, concentrações altas podem provocar o acúmulo de ácidos orgânicos, decaimento do pH e aumento da pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}), o que também acaba retardando o metabolismo bacteriano (YANG; WANG, 2019).

A fermentação escura em reatores batelada utilizando biomassas residuais da agroindústria tem sido realizada com concentrações variadas de substrato. Essas concentrações são comumente expressas em g/L, g-DQO/L ou g-SV/L.

Kumar et al. (2018) otimizaram a concentração de melação de cana (10, 20, 40 e 50 g/L) para bioconversão em hidrogênio. As menores concentrações de substrato (10 e 20 g/L) mostraram-se inadequadas para fornecer carbono ao sistema visto que apresentaram menor crescimento de bactérias. A maior concentração (50 g/L) inibiu o crescimento microbiano. A taxa máxima de produção (142 mL- H_2 /h) e o rendimento (6,02 mM- H_2 /g-açúcar) foram alcançados na concentração de substrato de 40 g/L.

Concentrações de vinhaça entre 1,7 e 49,8 g-DQO/L foram avaliadas por Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi (2019). Nos testes em batelada, o aumento da concentração do substrato de 1,7 a 11,6 g-DQO/L beneficiou o rendimento de hidrogênio enquanto em concentrações superiores houve inibição. O rendimento máximo (58,41 mL- H_2 /g-DQO_{inicial}) foi obtido na DQO de 11,60 g/L.

Resíduos de alimentos foram digeridos sob diversas concentrações (7,5 a 37,5 g-SV/L). O maior rendimento (75,3 mL- H_2 /g-VS) foi verificado a 15 g-SV/L. Concentrações de substrato abaixo de 15 g-SV/L podem ter fornecido matéria orgânica insuficiente enquanto teores maiores modificaram as vias metabólicas da fermentação do hidrogênio para a fermentação do ácido láctico, reduzindo o pH, a atividade enzimática e o rendimento (PU et al., 2019).

Quando o processo digestivo é realizado com mais de um substrato fonte de matéria orgânica, passa a ser denominado de codigestão anaeróbia e é realizado com o objetivo de melhorar a eficiência da fermentação (SIDDIQUE; WAHID, 2018; KARKI et al., 2021).

A aplicação de cossustratos visa solucionar os problemas enfrentados pela monodigestão por meio da diluição de compostos tóxicos de resíduos concentrados, do equilíbrio de nutrientes, da capacidade de tamponamento e da melhora dos efeitos sinérgicos entre os microrganismos. Promove a estabilidade do sistema e facilita a biodegradação dos

componentes (ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; VOLPI; FUESS; MORAES, 2021). Além disso, a produção de um digestato de melhor qualidade também é citada como possível vantagem, porém é preciso atentar às quantidades dos substratos, já que proporções incompatíveis podem resultar em sobrecarga orgânica, acidificação e falha do sistema (KARKI et al., 2021).

A cofermentação utilizando efluentes derivados da cana-de-açúcar possibilita ganhos energéticos e ambientais. Consiste numa alternativa para agregar valor aos resíduos dessa biorrefinaria e aumentar a sustentabilidade do setor (GONZÁLEZ; REYES; ROMERO, 2017; ALBUQUERQUE et al., 2019; SANTANA JUNIOR; DUDA; OLIVEIRA, 2019). Volpi; Fuess; Moraes (2021) verificaram que a produção de bionergia a partir da codigestão de resíduos das cadeias de processamento da cana-de-açúcar de primeira e segunda geração aumentou em mais de 400% em relação a monodigestão.

No processo digestivo, a geração de hidrogênio é promovida pelo carbono orgânico presente no substrato, enquanto o nitrogênio é o principal nutriente requerido pelos microrganismos para a síntese de proteínas. Esses nutrientes devem estar presentes em concentrações adequadas sendo comumente expressos pela relação carbono/nitrogênio (C/N). Seus valores variam com o tipo e concentração do substrato, com a comunidade microbiana presente e com as condições operacionais (ELREEDY; FUJII; TAWFIK, 2019; CREMONEZ et al., 2021). A codigestão entre materiais com diferentes razões C/N favorece o balanceamento das necessidades nutricionais, evita o acúmulo de ácidos e contribui para a estabilização do pH e da fermentação (AHLBERG-ELIASSON et al., 2018; KARKI et al., 2021).

Substratos que apresentam relação C/N alta, ou seja, cuja disponibilidade de nitrogênio é baixa, terão o rápido consumo deste elemento por parte das bactérias fermentativas visando atender às suas demandas proteicas, o que limita a formação de novas células microbianas e resulta em baixa produção de H₂. Por outro lado, se a relação C/N é baixa (disponibilidade de N alta), o nitrogênio pode ser acumulado no meio sob a forma de amônia, que por sua conhecida toxicidade irá inibir o metabolismo dos microrganismos produtores de H₂ (LI; CHEN; WU, 2019; CREMONEZ et al., 2021).

Chen; Yin; Wang (2021) mencionam que a inibição por amônia é favorecida em relações C/N inferiores a 20, estando a faixa ótima de produção de H₂ entre 20 e 130. Argun; Onaran (2017) testaram o efeito da relação C/N (20 e 40) a partir de hidrolisado de resíduos de papel toalha, observando o rendimento máximo de 0,656 mol-H₂/mol-glicose em C/N = 20. Elreedy; Fujii; Tawfik (2019) avaliaram o impacto de três razões (28,5, 57 e 114) utilizando águas residuais petroquímicas e verificaram a maior produção de 87,6 mL-H₂/L em C/N = 28,5.

Outros pesquisadores mencionam o intervalo ótimo da razão C/N entre 47 e 200. Lin; Lay (2004) atingiram máximas produtividade (4,8 mol-H₂/mol-sacarose) e taxa de produção de hidrogênio (270 mmol-H₂/L-dia) a partir da sacarose em C/N = 47. O-Thong et al. (2008), através da fermentação de efluente de óleo de palma, otimizaram o rendimento de hidrogênio na relação C/N de 74. Argun et al. (2008) testaram valores entre 20 e 200 a partir de solução de pó de trigo, alcançando maior rendimento (281 mL-H₂/g-amido) em C/N = 200. Já Anzola-Rojas et al. (2015) utilizaram águas residuais sintéticas à base de sacarose nas razões C/N de 40 a 190, obtendo o rendimento ótimo de 3,5 mol-H₂/mol-sacarose em C/N = 137.

3.3.4 Codigestão com vinhaça e/ou melaço

Estudos recentes investigaram a produção fermentativa de hidrogênio a partir da vinhaça como substrato único (FUSS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019; NIZ et al., 2019; LERTSRIWONG; GLINWONG, 2020; BERNAL; MENEZES; SILVA, 2021; GOIS et al., 2021; PIFFER et al., 2021; RAMOS et al., 2021). Esta produção apresenta maior eficiência energética líquida (140 kJ/g-DQO) em comparação com outros efluentes industriais, como a glicerina (69 kJ/g-DQO) e esgoto doméstico (52 kJ/g-DQO) (SILVA et al., 2021).

Apesar de ser rica em carbono e nutrientes e, portanto, adequada ao processo de digestão anaeróbia, outros compostos também presentes, como potássio, sulfato, fenóis e melanoidinas podem causar toxicidade e dificultar a degradação microbiana da vinhaça, havendo a necessidade de co-substratos com características complementares que forneçam uma mistura resultante que supere as desvantagens individuais dos materiais (ALBANEZ et al., 2016; 2018; ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2020).

Parsaee; Kiani Deh Kiani; Karimi (2019) apontam valores para a relação C/N da vinhaça entre 11 e 15, valor abaixo do indicado para a produção de hidrogênio (C/N \geq 20) segundo alguns pesquisadores (ARGUN; ONARAN, 2017; ELREEDY; FUJII; TAWFIK, 2019; CHEN; YIN; WANG, 2021). Este fator é mais um indicativo para o uso da cofermentação.

Algumas combinações já avaliadas foram: vinhaça + torta de filtro (GONZÁLEZ et al., 2015; GONZÁLEZ; REYES; ROMERO, 2017) e vinhaça + soro de queijo (ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; LOVATO et al., 2019; SOUSA et al., 2019), entretanto tendo o metano como produto principal. Sousa et al. (2019) alcançaram alta produtividade e rendimento de metano ao realizarem a codigestão de vinhaça com soro de queijo em comparação com as digestões individuais. Quanto a produção de hidrogênio, pode ser citado o estudo de Lee; Wee; Cho (2014), onde houve a combinação de água residuária de melaço com

lodo de esgoto. Um rendimento de mais de 50 mL-H₂/g-SV_{removido} foi obtido a partir de uma mistura de 10% de lodo de esgoto e 90% de vinhaça.

O melão, sendo rico em carboidratos simples, principalmente sacarose, também é uma excelente fonte de matéria orgânica para a produção de biohidrogênio (HAN et al., 2016; VILELA et al., 2019; FREITAS; MENEZES; SILVA, 2020; MIYNAT; ARGUN, 2020; OLIVEIRA et al., 2020b; CHAVES et al., 2021; FUESS et al., 2021a; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2021). Porém, quando utilizado separadamente, seus altos teores de nitrogênio e sais podem causar a inibição por amônia, havendo a indicação da codigestão para garantir o equilíbrio de nutrientes e a estabilidade do sistema (VRIEZE et al., 2015; ALBANEZ et al., 2018).

Vrieze et al. (2015) analisaram a codigestão de melão com lodo ativado, resultando em uma comunidade microbiana diversa com produção estável de metano.

A cofermentação de vinhaça com melão é uma opção promissora devido ao fato de que esta adição pode contribuir para o equilíbrio da relação C/N, o aumento da biodegradabilidade da matéria orgânica e o fornecimento de nutrientes adicionais aos microrganismos possibilitando maior rendimento de hidrogênio (HAGOS et al., 2017; KARKI et al., 2021).

A mistura de subprodutos da mesma cadeia produtiva (açúcar e álcool) também é conveniente devido a fácil disponibilidade dos materiais, tornando o processo mais sustentável e viável economicamente (ALBANEZ et al., 2016; 2018; SOUSA et al., 2019). Além disso, durante o período da entressafra brasileira de cana-de-açúcar, em que há escassez de vinhaça, o melão, facilmente armazenado em temperatura ambiente, pode ser utilizado sozinho como substrato (SANTANA JUNIOR; DUDA; OLIVEIRA, 2019; CAVALCANTE et al., 2020).

A codigestão entre vinhaça e melão foi implementada em alguns estudos visando a obtenção de metano (ALBUQUERQUE et al., 2019; SANTANA JUNIOR; DUDA; OLIVEIRA, 2019). Santana Junior; Duda; Oliveira (2019) verificaram que o uso de melão como fonte de carbono produz mais energia a partir da digestão em reator anaeróbio (18,01 MJ/L-melão) do que a partir da fermentação alcoólica (8,3 MJ/L-melão).

Em se tratando da produção de hidrogênio, o número de pesquisas é também escasso, podendo-se citar as de Albanez et al. (2016; 2018), onde os autores, em reatores anaeróbios de bateladas sequenciais (AnSBBR), aplicaram algumas condições operacionais.

Albanez et al. (2016) com um tempo de ciclo fixo em 3h, realizaram os seguintes experimentos: i) 33% melão + 67% vinhaça alimentados a 3 g-DQO/L em modo batelada com e sem suplementação e com e sem tratamento prévio do inóculo; ii) 33% melão + 67% vinhaça a 6 g-DQO/L em modos batelada e batelada alimentada sem suplementação e com tratamento

prévio do inóculo; iii) 25% melação + 75% vinhaça a 6 g-DQO/L em modo batelada sem suplementação e com tratamento prévio do inóculo; iv) 33% melação + 67% vinhaça a 9 g-DQO/L em modo batelada alimentada sem suplementação e com tratamento prévio do inóculo.

Os autores verificaram que porcentagens de vinhaça acima de 67% eram desfavoráveis ao processo, obtendo a máxima produtividade de H₂ (13,5 mol-H₂/m³/d) ao utilizarem 67% de vinhaça e 33% de melação alimentados em modo batelada, na DQO afluyente de 6000 mg/L, sem suplementação de nutrientes e com lodo de um reator anaeróbio de tratamento de efluentes de um matadouro de aves pré-tratado com choque térmico (aquecimento a 90 ° C por 15 min seguido de resfriamento em banho de gelo a 25 ° C).

Albanez et al. (2018) utilizando o mesmo tipo de inóculo, temperatura (30 °C) e agitação (200 rpm) aplicados por Albanez *et al.* (2016), testaram em modo batelada as seguintes condições experimentais, com suplementação nutricional em todos os casos: i) 100% melação nas concentrações de 3 e 4 g-DQO/L; ii) 67% melação + 33% vinhaça na DQO de 3 g/L; iii) 25% melação + 75% vinhaça a 3 g-DQO/L. A melhor produtividade molar (3,8 mol-H₂/m³/d) foi obtida na concentração afluyente de 3000 mg-DQO/L com 3 horas de tempo de ciclo e 33 % de vinhaça (67% de melação), havendo instabilidade no sistema ao aumentar o teor de vinhaça para 75%.

Embora essas pesquisas tenham iniciado o estudo sobre a codigestão entre vinhaça e melação visando a produção de hidrogênio, há alguns pontos a serem destacados:

- a) Os dois trabalhos não utilizaram planejamento experimental específico de misturas para avaliar a composição de vinhaça e melação que resulte na melhor produção de H₂ nem os efeitos interativos sinérgicos ou antagônicos entre os substratos.
- b) Nos dois estudos foram empregados inóculo e reatores diferentes dos aplicados na presente pesquisa;
- c) A influência do pH inicial e da temperatura do meio na fermentação não foram avaliadas.
- d) Não foram avaliados os efeitos interativos entre os fatores estudados por Albanez et al. (2016; 2018).

Diante dos estudos específicos apresentados, observa-se que o efeito de vários fatores e de suas interações, positivas ou negativas, envolvidos na cofermentação escura de vinhaça e melação de cana-de-açúcar para a produção de hidrogênio ainda não foram verificados, havendo várias lacunas processuais a serem investigadas.

3.4 Planejamento experimental

O planejamento de experimentos é uma ferramenta bastante útil quando o objetivo é investigar o efeito de vários fatores sobre várias propriedades ao mesmo tempo, de modo a minimizar o número de experimentos e o custo associado, além de otimizar a propriedade em estudo. É possível modelar os dados obtidos a partir dos experimentos gerando modelos empíricos que descrevem o comportamento do processo analisado na região investigada (MONTGOMERY, 2020).

A qualidade do ajuste dos modelos gerados é avaliada numericamente por meio da análise de variância (ANOVA), a partir da qual é possível realizar testes estatísticos. Os testes-F relativos à regressão ($\text{Valor-F} = \text{média quadrática da regressão} / \text{média quadrática do resíduo}$) e à falta de ajuste ($\text{Valor-F} = \text{média quadrática da falta de ajuste} / \text{média quadrática do erro puro}$) são bastante utilizados para este fim. No primeiro caso, o valor-F calculado pelos dados do modelo deve ser maior do que o valor-F tabelado para o limite de confiança desejado e graus de liberdade estabelecidos, indicando que a equação da regressão é estatisticamente significativa. No segundo caso, o valor-F calculado deve ser menor do que o valor-F tabelado, indicando que não há falta de ajuste no modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Na linguagem do planejamento experimental a resposta é a propriedade que se deseja estudar, os fatores são as variáveis que influenciam esta resposta e a superfície de resposta consiste na função que descreve a influência dos fatores sobre a variável resposta. Quando os fatores se influenciam mutualmente significa que há interação entre eles, de forma que suas análises não podem ser feitas individualmente e sim em conjunto (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Dentre os inúmeros tipos de planejamento existentes podem ser citados os planejamentos de mistura simplex lattice e os fatoriais completo de dois níveis.

Experimentos de mistura simplex lattice consistem em uma classe especial de experimentos de superfície de resposta na qual a resposta avaliada é composta de diversos componentes. Se destacam por apresentarem os seus pontos experimentais organizados de maneira uniforme (ou lattice) em uma L-simplex. Para experimentos binários simples em que é estudado apenas o efeito dos dois componentes na mistura é possível modelar aspectos lineares da superfície de resposta por meio de modelos lineares e quadráticos (MONTGOMERY, 2020).

A partir do experimento simplex lattice, o tipo de interação (sinérgica ou antagônica) entre os componentes de uma mistura bifásica é avaliado a partir do termo de interação obtido no modelo quadrático, o qual deve ser positivo para que a interação seja sinérgica. Isto significa que o valor obtido pelo modelo quadrático para a variável resposta é superior ao valor obtido pelo modelo linear, o qual considera apenas as respostas dos componentes puros. No caso contrário, quando o termo de interação bifásica é negativo, as previsões do modelo quadrático são inferiores as previsões do modelo linear, indicando interações antagônicas já que a resposta obtida com os dois componentes misturados é sempre menor do que a soma de suas respostas individuais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Experimentos fatoriais de dois níveis são indicados para investigações preliminares, quando o objetivo é verificar se determinados fatores exercem influência sobre a resposta analisada, não sendo possível descrever detalhadamente essa influência. No planejamento fatorial completo são realizados experimentos em todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores. Quando o efeito de um fator depende do nível do outro fator, havendo interação entre eles, calcula-se o efeito de interação além dos efeitos principais de cada fator (MONTGOMERY, 2020).

Após o cálculo dos efeitos, é necessário verificar quais são significativos e passíveis de interpretação. Considerando limite de confiança de 95%, são significativos os efeitos que apresentarem valor- $P > 0,05$, intervalo de confiança (IC) incluindo o zero e valor em módulo do efeito padronizado (efeito/erro padrão) $< t$ -student para o grau de liberdade em questão. O gráfico de pareto facilita a visualização dessa análise (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

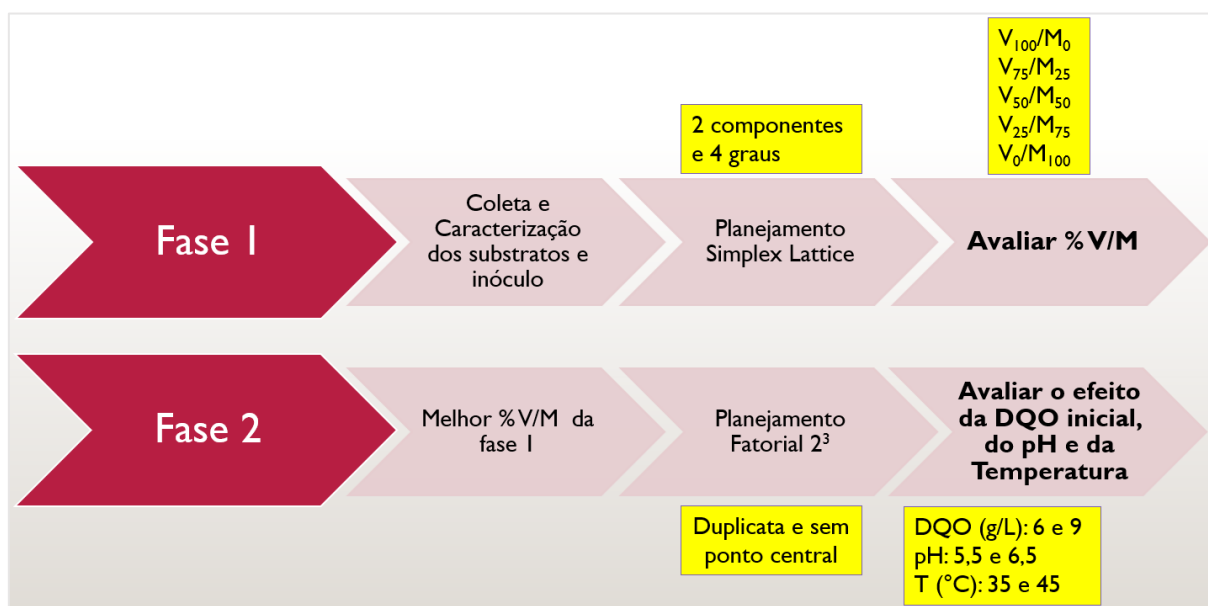
Para os casos em que os efeitos interativos não forem significativos, o efeito individual de cada fator pode ser visualizado a partir do gráfico de médias marginais. Já para os casos em que as interações são significativas, a interpretação conjunta dos fatores para interações de segunda ordem pode ser visualizada com o auxílio do gráfico quadrado de médias preditas que contém as respostas médias de todas as combinações de níveis das variáveis (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi dividida em 2 fases, conforme apresentado na Figura 4. Na primeira fase (F1) foi avaliado o efeito da composição do substrato na produção de H_2 , variando-se as proporções de vinhaça (V) e melação (M) em porcentagem de demanda química de oxigênio (DQO), com base no planejamento experimental de mistura Simplex Lattice.

A condição de F1 que resultou na maior e mais estável produção de H_2 e que utilizou o máximo possível de vinhaça (efluente mais prejudicial ao meio ambiente) foi testada em uma segunda fase (F2), com nova acidogênese da mistura, avaliando-se o efeito da concentração do substrato por meio da DQO, o pH e a temperatura a partir de um planejamento fatorial completo com dois níveis.

Figura 4: Fluxograma da metodologia desenvolvida no trabalho.



Legenda: V_i e M_i – porcentagens de vinhaça e melação, respectivamente, onde i varia de 0 a 100%; DQO – demanda química de oxigênio e T – temperatura.

Fonte: Autora (2023).

4.1 Inóculo e substratos utilizados

A vinhaça e o melação de cana-de-açúcar foram coletados na Usina Caeté S/A produtora de açúcar e álcool, unidade Matriz, localizada em São Miguel dos Campos, Alagoas. A vinhaça, foi armazenada a -4°C e o melação conservado em temperatura ambiente ($27 \pm 3^\circ\text{C}$). O inóculo,

proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB) que trata esgotos domésticos foi mantido resfriado em geladeira.

Na Tabela 3 são apresentadas as principais características físico-químicas dos substratos e do inóculo utilizados na pesquisa.

Tabela 3: Caracterização do inóculo e substratos utilizados.

Parâmetro	Vinhaça	Melaço	Inóculo
DQO total (g/L)	39,93 ± 0,89	1169,57 ± 6,08	*23,76 ± 1,07
Carboidratos totais (g/L)	10,23 ± 0,34	908,88 ± 13,07	-
Sólidos totais (g/L)	33,35 ± 0,5	923,2 ± 19,60	30 ± 0,00
Sólidos voláteis totais (g/L)	23,9 ± 1,60	806,4 ± 24,00	24 ± 0,00
Sólidos suspensos totais (g/L)	2,07 ± 0,13	8,35 ± 0,45	20,7 ± 1,10
Sólidos suspensos voláteis (g/L)	1,19 ± 0,19	4,15 ± 0,35	16,75 ± 0,75
NTK (g/L)	0,36	7,24	-
COT (g/L)	10,86	-	-
C/N	29,84	-	-
Ph	3,98 ± 0,02	5,12 ± 0,05	6,38 ± 0,08
SO ₄ ²⁻ (g/L)	2,59 ± 0,07	20,53 ± 0,61	-
DQO/SO ₄ ²⁻	15,44	56,96	-
HLa (g/L)	6,58 ± 0,84	11,12 ± 1,85	-

*Demanda química de oxigênio (DQO) estimada com base nos sólidos suspensos voláteis. NTK - nitrogênio amoniacal; COT - carbono orgânico total; C/N – relação carbono-nitrogênio; SO₄²⁻ - sulfato; HLa – ácido láctico; ± - desvio padrão.

Fonte: Autora (2023).

4.2 Fase 1: influência da composição do substrato na produção de H₂

4.2.1 Planejamento de mistura simplex lattice

A influência das porcentagens de vinhaça (x_V) e melaço (x_M) na produção de H₂, bem como os seus efeitos interativos (sinérgicos ou antagônicos) na mistura utilizada como substrato foram avaliados pelo planejamento Simplex Lattice de dois componentes e quatro graus, possibilitando a avaliação de cinco condições experimentais: condição 1 (R1 - V₁₀₀/M₀) com 100% de vinhaça, condição 2 (R2 - V₇₅/M₂₅) com 75% de vinhaça e 25% de melaço, condição 3 (R3 - V₅₀/M₅₀) com 50% de cada substrato, condição 4 (R4 - V₂₅/M₇₅) com 25% de vinhaça e 75% de melaço e condição 5 (R5 - V₀/M₁₀₀) com 100% de melaço.

As variáveis resposta do planejamento simplex foram o rendimento volumétrico de hidrogênio por carga aplicada ($VHY_{DQO_{apl}}$) em mL/g- DQO_{apl} e a taxa de produção volumétrica de H_2 por carga aplicada ($VHPR_{DQO_{apl}}$) em mL/(g- DQO_{apl} .d). Os dados experimentais da produção acumulada de H_2 foram ajustados ao modelo de Gompertz Modificado (Equação (10) aliado ao software OriginPro® 8 para determinação dos parâmetros cinéticos. Este é um dos modelos mais utilizados para descrever a produção de hidrogênio em testes em batelada (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019; GAVAZZA et al., 2021; SILLERO; SOLERA; PEREZ, 2022).

$$H(t) = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (10)$$

Onde, $H(t)$ é a produção acumulada de hidrogênio em mL, P é o potencial máximo de produção de hidrogênio em mL, R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio em mL/h, e e é a constante adimensional de Euler = $\text{Exp}(1) = 2,718$, λ (h) é o intervalo de tempo necessário para o início da produção exponencial de H_2 (fase lag) e t é o tempo (h).

Os resultados do experimento simplex lattice foram analisados em software estatístico, por meio do ajuste aos modelos de regressão linear e quadrático (Equações (11) e (12)) avaliados com um nível de significância de 5% (valores- $p \leq 0,05$) pela análise de variância (ANOVA) e com teste F de falta de ajuste para verificar a adequação dos modelos aos dados (valores- $p \geq 0,05$). O teste de Tukey no intervalo de confiança de 95% foi utilizado em conjunto com a ANOVA de um fator para comparação das médias.

$$y = b_V X_V + b_M X_M \quad (11)$$

$$y = b_V X_V + b_M X_M + b_{VM} X_V X_M \quad (12)$$

Onde, y é a variável resposta ($VHY_{DQO_{apl}}$ ou $VHPR_{DQO_{apl}}$), X_V e X_M são as porcentagens de vinhaça e melaço, respectivamente, e b_V , b_M e b_{VM} são os coeficientes lineares e de interação do modelo.

4.2.2 Fermentação acidogênica e monitoramento

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro Duran operados em modo batelada e em duplicata, vedados com rolha de borracha nitrílica e tampa de plástico, com

válvula de 3 vias acoplada a rolha para retirada de amostra gasosa. A concentração inicial do substrato foi fixada em 6 g-DQO/L (ALBANEZ et al., 2016) e o pH inicial foi ajustado em 5,5 com adição de NaOH 6M e/ou HCl 2M (LEE; WEE; CHO, 2014; AMORIM et al. 2018), conforme necessidade. Para garantir o ambiente anaeróbio dentro dos reatores, purgou-se gás nitrogênio puro por cerca de 2 minutos (SILVA et al. 2017). Em seguida foram incubados a 35 °C e sob rotação de 120 rpm (LEE; WEE; CHO, 2014; SILVA et al., 2017).

Foram utilizados 12 reatores de 1130 mL de volume total e aproximadamente 65% de volume reacional (AMORIM et al., 2018), onde 10 continham as diferentes proporções de vinhaça e melaço e 2 serviram como controle (sem substrato, apenas inóculo e água). Para manter as proporções escolhidas dos substratos, ambos foram preparados na mesma DQO de 6 g/L, variando-se apenas os volumes de cada material, considerando um volume total de substrato igual a 90% do volume útil. Os 10% restante corresponderam a contribuição do inóculo (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI; 2019; MIYNAT; ARGUN, 2020) pré-tratado por choque térmico, conforme Maintinguer et al. (2008).

O monitoramento da fermentação foi feito por meio das análises de gás, pH, DQO, carboidratos totais, sulfato e sólidos (totais e suspensos). Os reatores foram operados até estabilização da produção de H₂ (variação aproximada de 5% do volume de gás produzido) (CHAVES et al. 2021). O gás H₂ foi analisado 5 vezes por semana. As séries de sólidos bem como as análises de sulfato pH, DQO e carboidratos foram realizadas apenas no início e no final da batelada.

4.3 Fase 2: influência da concentração do substrato, do pH e da temperatura na produção de H₂.

4.3.1 Planejamento fatorial completo 2³

Nessa fase foram realizados ensaios em batelada a fim de avaliar o efeito da concentração do substrato em termos de DQO (x_1), do pH (x_2) e da temperatura (x_3) nas respostas $VHY_{DQO_{apl}}$ (rendimento volumétrico de hidrogênio por carga aplicada) e $VHPR_{DQO_{apl}}$ (taxa de produção volumétrica de H₂ por carga aplicada) obtidas a partir da codigestão de 50% de vinhaça com 50% de melaço (melhor condição de F1). Para o estudo foi desenhado um planejamento fatorial completo com dois níveis (-1, 1) em duplicata, conforme matriz apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 utilizado na fase 2 (F2).

x_1 (g-DQO/L)	x_2 (pH)	x_3 (°C)	Código da Condição
6 (-)	5,5 (-)	35 (-)	RM ⁶ _{5,5}
9 (+)	5,5 (-)	35 (-)	RM ⁹ _{5,5}
6 (-)	6,5 (+)	35 (-)	RM ⁶ _{6,5}
9 (+)	6,5 (+)	35 (-)	RM ⁹ _{6,5}
6 (-)	5,5 (-)	45 (+)	RT ⁶ _{5,5}
9 (+)	5,5 (-)	45 (+)	RT ⁹ _{5,5}
6 (-)	6,5 (+)	45 (+)	RT ⁶ _{6,5}
9 (+)	6,5 (+)	45 (+)	RT ⁹ _{6,5}

RM – Reator Mesofílico (35 °C); RT – Reator Termofílico (45°C).

Fonte: Autora (2022).

Os dados experimentais da produção acumulada de H_2 foram ajustados ao modelo de Gompertz Modificado (Equação (10) aliado ao software OriginPro® 8 para determinação dos parâmetros cinéticos. Com os resultados do planejamento fatorial, foi ajustado um modelo linear com interações de primeira e segunda ordem (Equação (13), com um nível de significância de 5% (valores-p $\leq 0,05$) para a análise estatística de variância (ANOVA) e com testes F de regressão e de falta de ajuste visando verificar a adequação dos modelos aos dados. O teste de Tukey no intervalo de confiança de 95% foi utilizado em conjunto com a ANOVA de um fator para comparação das médias.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (13)$$

Onde, y é a variável resposta (P , R_m , λ , $VHY_{DQO_{apl}}$ ou $VHPR_{DQO_{apl}}$), x_1 , x_2 e x_3 são os valores codificados das variáveis independentes DQO, pH e temperatura, respectivamente, e b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} e b_{23} são os parâmetros do modelo.

4.3.2 Fermentação acidogênica e monitoramento

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro Duran em duplicata, todos vedados com rolha de borracha nitrílica e lacre de alumínio, com uma válvula de 3 vias acoplada as rolhas para retirada de amostras gasosas. Reatores de 120 mL (Figura 5) foram preenchidos com 60 mL de meio reacional constituído por 90% da mistura de vinhaça e meloço na DQO

desejada (6 e 9 g/L) e 10% de inóculo pré-tratado por choque térmico, conforme fase 1. O pH foi ajustado com soluções aquosas de NaOH ou de HCl para 5,5 e 6,5. Gás N₂ foi fluxionado no meio líquido por 1 minuto para garantir ambiente anaeróbico e os reatores foram colocados em incubadoras com controle de temperatura a 35 e 45°C sob agitação constante de 120 rpm.

Figura 5: Esquema de montagem dos reatores na Fase 2.



Fonte: Autora (2022).

O monitoramento foi feito por meio das análises de gás, pH, DQO, carboidratos totais, sólidos totais e sólidos suspensos. Os reatores foram operados até estabilização da produção acumulada de H₂ (variação próxima de 5%). O gás H₂ foi analisado 5 vezes por semana. Amostras líquidas foram coletadas apenas na partida e na desativação da batelada.

4.4 Métodos analíticos

Os dados de produção em batelada são apresentados a partir das médias das duplicatas e descontando-se o que foi produzido pelos reatores controle. O gás H₂ foi coletado com uso de seringa acoplada as válvulas de 3 vias enquanto as amostras líquidas para monitoramento do pH, DQO, carboidratos, sulfato, sólidos totais e sólidos suspensos foram retiradas utilizando seringa descartável.

As análises de DQO, pH e as séries de sólidos foram realizadas de acordo com os procedimentos detalhados no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association - APHA, 2005). Os carboidratos totais foram quantificados de acordo com o método de Dubois et al. (1956). Os gases foram determinados a

partir de um cromatógrafo gasoso de alta resolução marca Shimadzu, modelo GC 2010, munido de detector de condutividade térmica (TCD), coluna Carboxen 1010 PLOT com capilar de sílica fundida (30m x 0,53mm), temperaturas do injetor, do detector e da coluna em 30, 200 e 230 °C, respectivamente, e tendo argônio como gás de arraste.

4.5 Avaliação do desempenho dos reatores

Para avaliar o desempenho dos reatores foram utilizados os seguintes parâmetros:

- a) o rendimento volumétrico de hidrogênio por carga aplicada ($VHY_{DQO_{apl}}$ - Equação (14) e taxa de produção volumétrica de H_2 por carga aplicada ($VHPR_{DQO_{apl}}$ - Equação(15):

$$VHY_{DQO_{apl}} \left(\frac{mL-H_2}{g-DQO_{apl}} \right) = \frac{\text{Volume de } H_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de DQO aplicada na partida}} \quad (14)$$

$$VHPR_{DQO_{apl}} \left(\frac{mL-H_2/d}{g-DQO_{apl}} \right) = \frac{\text{Taxa máxima de produção de } H_2 (R_m)}{\text{grama de DQO aplicada na partida}} \quad (15)$$

- b) as eficiências de remoção de matéria orgânica em termos de DQO (E_{DQO} - Equação (16) e de carboidratos (E_C - Equação (17):

$$E_{DQO} (\%) = \left(\frac{DQO_{inicial} - DQO_{final}}{DQO_{inicial}} \right) * 100 \quad (16)$$

$$E_C (\%) = \left(\frac{C_{inicial} - C_{final}}{C_{inicial}} \right) * 100 \quad (17)$$

- c) o rendimento molar por substrato consumido (HY - Equação (18) e a eficiência de conversão teórica do substrato em hidrogênio (E_{H_2} - Equação (19), calculada a partir da produção máxima de 4 mol- H_2 /mol-glicose com base na rota metabólica do ácido acético, conforme descrito anteriormente na Equação 1.

$$HY \left(\frac{mol-H_2}{mol-glicose} \right) = \frac{\text{mols de } H_2 \text{ produzido}}{\text{mol de glicose consumida}} \quad (18)$$

$$E_{H_2}(\%) = \left(\frac{HY}{4 \frac{\text{mol-H}_2}{\text{mol-glicose}}} \right) * 100 \quad (19)$$

d) a taxa de produção volumétrica por volume reacional (HPR_{VR} – Equação (20):

$$HPR_{VR} \left(\frac{\text{mL-H}_2}{\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{d}} \right) = \frac{R_m \left(\frac{\text{mL}}{\text{d}} \right)}{\text{volume útil do reator (L)}} \quad (20)$$

e) a eficiência de remoção de biomassa (E_{SVT} - Equação (21):

$$E_{SVT}(\%) = \left(\frac{SVT_{\text{inicial}} - SVT_{\text{final}}}{SVT_{\text{inicial}}} \right) * 100 \quad (21)$$

f) o rendimento ($MHY_{DQO_{\text{apl}}}$ – Equação (22) e a taxa de produção ($MHPR_{DQO_{\text{apl}}}$ - Equação(23) molares por carga aplicada:

$$MHY_{DQO_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-DQO}_{\text{apl}}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de DQO aplicada na partida}} \quad (22)$$

$$MHPR_{DQO_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-DQO}_{\text{apl}} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \frac{\text{acumulado}}{\text{dia}} (R_m)}{\text{grama de DQO aplicada na partida}} \quad (23)$$

g) os rendimentos molares ($MHY_{DQO_{\text{rem}}}$ - Equação (24) e volumétricos ($VHY_{DQO_{\text{rem}}}$ - Equação(25) por carga removida:

$$MHY_{DQO_{\text{rem}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-DQO}_{\text{rem}}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de DQO removida}} \quad (24)$$

$$VHY_{DQO_{\text{rem}}} \left(\frac{\text{mL-H}_2}{\text{g-DQO}_{\text{rem}}} \right) = \frac{\text{mL de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de DQO removida}} \quad (25)$$

h) os rendimentos molares ($MHY_{SVT_{\text{apl}}}$ - Equação (26) e volumétricos ($VHY_{SVT_{\text{apl}}}$ - Equação(27) por biomassa aplicada:

$$\text{MHY}_{\text{SVT}_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{apl}}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de SVT aplicado na partida}} \quad (26)$$

$$\text{VHY}_{\text{SVT}_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mL-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{apl}}} \right) = \frac{\text{mL de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de SVT aplicado na partida}} \quad (27)$$

i) os rendimentos molares ($\text{MHY}_{\text{SVT}_{\text{rem}}}$ - Equação (28) e volumétricos ($\text{VHY}_{\text{SVT}_{\text{rem}}}$ - Equação(29) por biomassa removida:

$$\text{MHY}_{\text{SVT}_{\text{rem}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{rem}}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de SVT removido}} \quad (28)$$

$$\text{VHY}_{\text{SVT}_{\text{rem}}} \left(\frac{\text{mL-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{rem}}} \right) = \frac{\text{mL de H}_2 \text{ acumulado}}{\text{grama de SVT removido}} \quad (29)$$

j) as taxas de produção molar ($\text{MHPR}_{\text{SVT}_{\text{apl}}}$ - Equação (30) e volumétrica ($\text{VHPR}_{\text{SVT}_{\text{apl}}}$ - Equação (31) por biomassa aplicada e o pH dos reatores ao final da batelada.

$$\text{MHPR}_{\text{SVT}_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mmol-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{apl}} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{mmol de H}_2 \frac{\text{acumulado}}{\text{dia}} (\text{R}_m)}{\text{grama de SVT aplicado na partida}} \quad (30)$$

$$\text{VHPR}_{\text{SVT}_{\text{apl}}} \left(\frac{\text{mL-H}_2}{\text{g-SVT}_{\text{apl}} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{mL de H}_2 \frac{\text{acumulado}}{\text{dia}} (\text{R}_m)}{\text{grama de SVT aplicado na partida}} \quad (31)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase 1: influência da composição do substrato na produção de H₂

Esta seção foi dividida em quatro partes. No item 5.1.1 são apresentadas as análises referentes a caracterização de cada meio reacional para amostras retiradas antes da partida (caracterização inicial) e após a desativação (caracterização final) dos reatores, bem como as eficiências de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos voláteis totais (SVT) e sulfato. No item 5.1.2 são expostos os dados de produção acumulada de H₂ e os parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste ao modelo de Gompertz modificado. Em 5.1.3 são apresentados os resultados de rendimento e taxa de produção de H₂, calculados em várias unidades de medida. Por fim, a análise estatística de variância dos modelos gerados é exibida na subseção 5.1.4.

5.1.1 Caracterização das misturas avaliadas e eficiências de remoção

A Tabela 5 mostra a caracterização inicial e final das misturas de vinhaça e melaço investigadas, além das eficiências de remoção em termos de carboidratos, DQO, SVT e sulfato.

Como o melaço possui maior quantidade de açúcar, quanto maior sua proporção na mistura, mais elevada é a concentração de carboidratos no reator antes da digestão ($C_{inicial}$). Conforme observado na Tabela 5, enquanto na monodigestão da vinhaça (R1) havia 1,68 g/L de carboidratos, na monodigestão do melaço esse valor subiu para 4,50 g/L (R5). As concentrações finais (C_{final}) variaram entre 0,9 g/L (R1) e 1,24 g/L (R5).

A eficiência de remoção de carboidratos manteve-se entre 46,49 % (R1) e 74,75 % (R4). As condições com 75% (R4) e 100% (R5) de melaço exibiram as melhores conversões, provavelmente devido a maior disponibilidade de açúcar no melaço para ser consumida pelos microrganismos. Situação semelhante foi observada por Ramos; Silva (2018), que ao avaliarem a codigestão de vinhaça com soro de leite, registraram conversões superiores de carboidratos com o aumento da proporção de soro na mistura, uma vez que o soro tinha concentração de carboidratos maior do que a vinhaça.

Chaves et al. (2021) conseguiram remoções de carboidratos entre 50% e 70%, a partir da fermentação acidogênica do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leite fluidizado (RALF). Também com melaço, Oliveira et al. (2020b), em reator anaeróbio de leite estruturado acidogênico (AnSTBR-A), e Kumar et al. (2018), em reatores batelada, observaram

eficiências entre 40% a 42% e 46% a 73%, respectivamente. Albanez et al. (2016; 2018), utilizando codigestão de vinhaça e melaço em reatores anaeróbios de bateladas sequenciais (AnSBBR), relataram valores variando de 73 % a 95 % e 84 % a 95 %, respectivamente. Para a monodigestão de vinhaça, Fuess; Zaiat; Nascimento (2019) citam porcentagens de remoção entre 50,8 % e 76 % em AnSTBR.

Tabela 5: Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores avaliados na Fase 1.

Parâmetro	R1	R2	R3	R4	R5
C_{inicial} (g/L)	1,68 ± 0,03	2,01 ± 0,03	3,39 ± 0,07	4,03 ± 0,00	4,50 ± 0,02
C_{final} (g/L)	0,90 ± 0,00	0,95 ± 0,00	1,22 ± 0,02	1,02 ± 0,05	1,24 ± 0,03
E_C (%)	46,49 ± 0,72	52,91 ± 0,92	63,93 ± 0,06	74,75 ± 1,25	72,52 ± 0,51
DQO_{inicial} (g/L)	6,03 ± 0,07	6,35 ± 0,17	6,49 ± 0,01	6,54 ± 0,09	6,60 ± 0,00
DQO_{final} (g/L)	5,22 ± 0,04	4,80 ± 0,15	4,77 ± 0,04	4,86 ± 0,02	4,96 ± 0,04
E_{DQO} (%)	13,49 ± 0,36	24,34 ± 0,35	26,53 ± 0,49	25,64 ± 1,34	24,85 ± 0,58
SVT_{inicial} (g/L)	6,21 ± 0,20	6,48 ± 0,72	5,84 ± 0,26	6,88 ± 0,38	6,40 ± 0,58
SVT_{final} (g/L)	3,39 ± 0,20	3,18 ± 0,30	2,90 ± 0,10	3,96 ± 0,14	3,74 ± 0,28
E_{SVT} (%)	45,47 ± 1,41	50,93 ± 0,83	50,33 ± 0,49	42,52 ± 1,22	41,58 ± 0,94
SO_4^{2-} inicial (mg/L)	286,35 ± 50,50	216,92 ± 10,96	178,20 ± 9,20	134,19 ± 7,77	83,09 ± 6,31
SO_4^{2-} final (mg/L)	231,25 ± 46,31	185,56 ± 7,97	171,45 ± 9,81	123,45 ± 7,05	77,28 ± 5,99
$E_{SO_4^{2-}}$ (%)	19,59 ± 1,99	14,43 ± 0,65	3,81 ± 0,54	8,01 ± 0,07	7,01 ± 0,15
$(DQO/SO_4^{2-})_{\text{inicial}}$	21,06 ± 3,58	29,27 ± 0,71	36,44 ± 1,81	48,71 ± 3,53	79,39 ± 6,01
pH_{final}	5,27 ± 0,03	5,03 ± 0,06	4,70 ± 0,02	4,39 ± 0,00	4,16 ± 0,01

R1 = V_{100}/M_0 ; R2 = V_{75}/M_{25} ; R3 = V_{50}/M_{50} ; R4 = V_{25}/M_{75} ; R5 = V_0/M_{100} ; C_{inicial} , C_{final} e E_C - Concentração de carboidrato inicial e final e eficiência de remoção; DQO_{inicial} , DQO_{final} e E_{DQO} - Concentração de DQO inicial e final e eficiência de remoção; SVT_{inicial} , SVT_{final} e E_{SVT} - Concentração de sólidos voláteis totais inicial e final e eficiência de remoção; SO_4^{2-} inicial, SO_4^{2-} final e $E_{SO_4^{2-}}$ - concentração inicial e final e eficiência de remoção de sulfato; ± - desvio padrão.

Fonte: Autora (2023)

Os ensaios foram conduzidos em DQO inicial constante (≈ 6 g/L), havendo variação entre 6,03 g/L (R1) e 6,60 g/L (R5). Após a digestão, as concentrações oscilaram entre 4,77 g-DQO/L (R3) e 5,22 g-DQO/L (R1). A eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO apresentou valor mínimo de 13,49 % (R1) e máximo de 26,53 % (R3). Tais eficiências encontram-se dentro da faixa esperada para reatores acidogênicos, em torno de 20%; isto porque nestes biorreatores a remoção de matéria orgânica é promovida apenas pela conversão do substrato para H_2 e CO_2 e não pela transformação de ácidos orgânicos em metano, como é o

caso de reatores metanogênicos, que por sua vez apresentam altas remoções (LI et al., 2007; NUALSRI; KONGJAN; REUNGSANG, 2016; CHAVES et al., 2021; TAVARES et al., 2022).

Albanez et al. (2016; 2018), Chaves et al. (2021) e Fuess; Zaiat; Nascimento (2019) conseguiram até 24%, 27%, 23,3% e 13,7% de remoção de DQO, respectivamente, a partir da fermentação acidogênica de subprodutos da cana-de-açúcar.

Em relação ao teor de sólidos voláteis totais nas misturas, no início houve variação entre 5,84 g/L (R3) e 6,88 g/L (R4) e no final entre 2,90 g/L (R3) e 3,96 g/L (R4). A remoção de SVT, como é mostrado na Tabela 5, ficou entre 41,58 % (R5) e 50,93 % (R2). Sillero; Solera; Perez (2022) observaram eficiência máxima de 38,16% ao estudarem a produção de hidrogênio a partir da codigestão em batelada de vinhaça, lodo de esgoto e esterco de aves. Tena et al. (2020), por sua vez, alcançaram 37% com a mistura digestiva de vinhaça e lodo de esgoto.

A remoção de sólidos voláteis é um parâmetro muito importante na análise de desempenho de resíduos orgânicos na produção de hidrogênio por meio de processo fermentativo (TENA et al., 2020; SILLERO; SOLERA; PEREZ, 2022).

A concentração inicial de sulfato cresceu com o aumento da porcentagem de vinhaça nos reatores, apresentando valores máximos e mínimos de 286,35 mg-SO₄²⁻/L (V₁₀₀/M₀) e 83,09 mg-SO₄²⁻/L (V₀/M₁₀₀). Além disso, observou-se maiores remoções de sulfato em R1 (19,59%) e R2 (14,43%), indicando que nestes casos pode ter havido transformação significativa de sulfato em sulfeto de hidrogênio. Vários autores destacam os altos teores de sulfato na vinhaça como um dos fatores que podem causar a diminuição da produção de H₂ e favorecer a geração de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2020; SILVA et al., 2021).

As relações DQO/SO₄²⁻ mantiveram-se entre 21,06 (R1) e 79,10 (R5). Omil et al. (1998) e Silva et al. (2020) citam que as vias redutoras de sulfato podem ser dificultadas com o uso da relação DQO/SO₄²⁻ mantida acima de 0,67, situação em que a matéria orgânica não será totalmente oxidada pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Não foi detectada nenhuma produção de metano nas condições estudadas, o que comprova a eficiência do pré-tratamento térmico aplicado ao lodo fonte de inóculo, conforme já foi confirmado por Amorim et al. (2018), Chaves et al. (2021) e Gavazza et al. (2021).

Ao final das bateladas, o pH dos reatores (Tabela 5) diminuiu em relação ao pH inicial estabelecido (5,5) com valores entre 4,16 (R5) e 5,27 (R1). Esta faixa de pH favoreceu a inibição de arqueias metanogênicas, o que também pode ter contribuído para a ausência de metano nos reatores (ELBESHISHY et al., 2017; ROMÃO et al., 2018; SIDDIQUE; WAHID, 2018; LI; CHEN; WU, 2019; WU et al., 2021a; 2021b). Por se tratar de fermentação

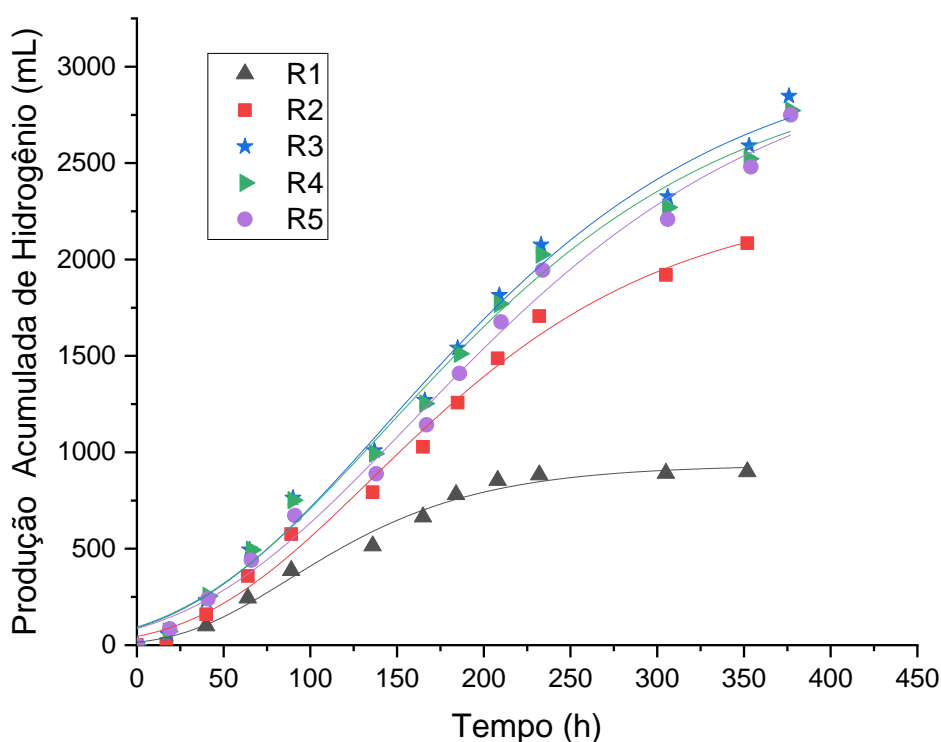
acidogênica este comportamento do pH já era esperado, visto que a produção de H_2 vem acompanhada pela formação de ácidos orgânicos que tendem a diminuir o pH do meio (SILVA et al., 2021). Além disso, o não uso de alcalinizante como agente tamponante também corrobora para o fato observado.

Apesar de a vinhaça ter sido caracterizada com menor pH do que o melaço (Tabela 3), quanto maior a porcentagem deste último na mistura digestiva, menor foi o pH final (Tabela 5). Isto pode estar associado a quantidade elevada de carboidratos presente no melaço, ocasionando uma produção mais elevada de ácidos voláteis na acidogênese com conseqüente decréscimo do pH (LI; CHEN; WU, 2019; ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020; SILVA et al., 2021).

5.1.2 Produção acumulada de H_2 e parâmetros cinéticos

A Figura 6 juntamente com as informações apresentadas no Apêndice A mostram os dados experimentais de produção acumulada em relação ao tempo para as cinco condições operacionais, bem como a curva de ajuste dos dados ao modelo de Gompertz Modificado.

Figura 6: Produção acumulada de H_2 e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado em função da % de vinhaça (V) e melaço (M) nas misturas (R1 = V_{100}/M_0 , R2 = V_{75}/M_{25} , R3 = V_{50}/M_{50} , R4 = V_{25}/M_{75} e R5 = V_0/M_{100}).



Fonte: Autora (2023).

A Tabela 6 apresenta os dados de produção volumétrica de H_2 por hora para as condições experimentais estudadas na fase 1. Observa-se que as situações com maiores proporções de vinhaça na mistura (V_{100}/M_0 e V_{75}/M_{25}) apresentaram problemas de instabilidade visto que não conseguiram manter produções altas de H_2 por muito tempo.

Os decréscimos observados em curto espaço de tempo nas condições R1 e R2, já que não houve detecção de metano no gás produzido, podem ser devido ao fato de que possíveis BRSs, por terem se beneficiado dos maiores teores de sulfato fornecidos pela vinhaça (Tabela 5) tenham se multiplicado e competido com as bactérias acidogênicas para transformar o sulfato e o H_2 em H_2S (LI; CHEN; WU, 2019; CHEN; YIN; WANG, 2021; SILVA et al., 2021). O uso do melão como co-substrato pode ter diluído o sulfato e inibido a ação das BRSs.

De acordo com a Figura 6, percebe-se que a adição de melão em qualquer proporção melhorou a produção acumulada de hidrogênio em comparação com a monodigestão de vinhaça. Em cerca de 15 dias (352 horas) de operação, as condições com maiores porcentagens de vinhaça resultaram em $899,31 \pm 29,61$ mL- H_2 (R1) e $2.084,92 \pm 1,53$ mL- H_2 (R2). Neste mesmo período, os demais reatores apresentaram resultados superiores e aproximados entre si sendo produzidos $2.590,75 \pm 20,11$ mL- H_2 em R3 (V_{50}/M_{50}), $2.522,34 \pm 74,97$ mL- H_2 em R4 (V_{25}/M_{75}) e $2.480,26 \pm 55,56$ mL- H_2 em R5 (V_0/M_{100}).

Tabela 6: Produções volumétricas diárias de H₂ para as condições operacionais da fase 1 (R1 = V₁₀₀/M₀, R2 = V₇₅/M₂₅, R3 = V₅₀/M₅₀, R4 = V₂₅/M₇₅ e R5 = V₀/M₁₀₀).

R1		R2		R3		R4		R5	
Tempo (h)	mL _{H2}	Tempo (h)	mL _{H2}	Tempo (h)	mL _{H2}	Tempo (h)	mL _{H2}	Tempo (h)	mL _{H2}
0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
17	3,37 ± 0,15	17	6,74 ± 3,72	18	55,81 ± 0,75	18	70,94 ± 0,04	19	84,30 ± 7,56
40	97,11 ± 5,85	40	153,59 ± 0,68	40	176,00 ± 7,25	41	184,11 ± 0,18	41	155,68 ± 1,01
64	144,27 ± 0,26	64	198,32 ± 4,81	65	262,80 ± 0,61	66	239,16 ± 4,45	66	200,75 ± 2,51
89	142,76 ± 7,61	89	217,60 ± 6,05	90	268,71 ± 0,06	90	257,61 ± 9,92	91	231,97 ± 2,73
136	127,48 ± 5,40	136	216,99 ± 5,90	137	245,67 ± 7,13	137	241,96 ± 17,68	138	215,53 ± 2,89
165	149,84 ± 5,29	165	234,86 ± 7,94	166	260,94 ± 9,60	166	259,11 ± 6,42	167	253,93 ± 2,62
184	116,12 ± 2,03	185	229,58 ± 0,35	185	271,96 ± 0,48	186	258,73 ± 7,01	186	266,84 ± 9,11
208	73,62 ± 3,36	208	229,52 ± 4,25	209	273,53 ± 0,17	209	257,85 ± 10,24	210	267,20 ± 10,72
232	28,60 ± 0,09	232	219,62 ± 2,86	233	261,09 ± 3,11	233	255,75 ± 10,34	234	268,79 ± 8,48
305	8,32 ± 0,06	305	212,61 ± 9,91	306	249,81 ± 3,26	306	245,30 ± 3,36	306	264,08 ± 6,43
352	7,82 ± 0,01	352	165,48 ± 6,68	353	264,44 ± 3,91	353	251,83 ± 5,78	354	271,21 ± 1,50
				376	256,95 ± 4,68	377	249,79 ± 0,86	377	269,57 ± 4,82

Fonte: Autora (2023).

Todos os casos apresentaram dados com bom ajuste ($R^2 > 0,98$) ao modelo de Gompertz Modificado. A Tabela 7 traz os parâmetros cinéticos obtidos com o modelo de regressão. Os três maiores valores de potencial máximo de produção (P) foram similares, observados nas condições R3 (3.113,27 mL-H₂), R4 (3.035,74 mL-H₂) e R5 (3.135,02 mL-H₂) e representaram mais do que o triplo do alcançado pela monodigestão da vinhaça (R1 - 934,44 mL-H₂).

Tabela 7: Parâmetros cinéticos do Modelo de Gompertz Modificado para as condições da Fase 1 (R1 = V₁₀₀/M₀, R2 = V₇₅/M₂₅, R3 = V₅₀/M₅₀, R4 = V₂₅/M₇₅ e R5 = V₀/M₁₀₀).

Parâmetro	R1	R2	R3	R4	R5
P (mL)	934,44 ± 33,46	2.332,83 ± 125,59	3.113,27 ± 172,17	3.035,74 ± 162,77	3.135,02 ± 198,66
R _m (mL/h)	5,56 ± 0,48	8,73 ± 0,54	10,07 ± 0,63	9,73 ± 0,59	9,33 ± 0,55
λ (h)	26,13 ± 6,94	36,65 ± 7,37	30,20 ± 8,05	28,19 ± 7,79	34,41 ± 7,85
R ²	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00

P - Potencial máximo de produção de H₂; R_m - Taxa máxima de produção de H₂; λ (h) - Duração da fase lag; R² - Coeficiente de regressão.

Fonte: Autora (2023).

As taxas máximas de produção (R_m) também foram maiores e bastantes aproximadas para as condições R3 a R5, com valor superior de 10,07 mL-H₂/h em R3 (V₅₀/M₅₀). Quanto a duração da fase lag, apesar de em R1 a produção exponencial de H₂ ter iniciado mais rapidamente, em 26,13 h, a estabilidade da produção diária (Tabela 6) não permaneceu por muito tempo, havendo decaimento em cerca de 8 dias de operação. O reator R2, por sua vez, com a maior duração da fase lag (36,65 h), também apresentou instabilidade na produção diária, com decréscimo iniciado em aproximadamente 10 dias. Os demais reatores, com fases lag de 30,20 h (R3), 28,19 h (R4) e 34,41 h (R5) conseguiram manter a produção estável.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros de Gompertz Modificado obtidos por diversos estudos de produção de H₂ operados em modo batelada.

Percebe-se que os valores dos parâmetros variam bastante conforme o tipo de substrato utilizado e as condições operacionais aplicadas. Enquanto Lee; Wee; Cho (2014), por exemplo, utilizando água residuária de melaço e lodo de esgoto, obtiveram potencial de produção máximo de apenas 14,3 mL-H₂ e fase lag com duração de 8,77 h, a sua taxa máxima de produção (5,88 mL-H₂/h) foi maior do que a obtida por Gavazza et al. (2021) (2,01 mL-H₂/h), que a partir de efluente de mandioca observaram valor superior de P (2.471 mL-H₂) e da fase lag (187 h).

Tabela 8: Parâmetros de Gompertz Modificado para diversos estudos de produção de H₂ em batelada.

Substrato	Condições operacionais	P (mL)	R _m (mL/h)	λ (h)	R ²	Referência
80% Efluente de melaço + 20% Lodo de esgoto	V _R = 0,5 L, 17,3 g _{DQO} /L, 35 °C, pH 5,7, 120 rpm Inóculo de produção de H ₂	14,3	5,88	8,77	-	Lee; Wee; Cho (2014)
Melaço	V _R = 1 L, 40 g _{DQO} /L, 30 °C, pH 6,8, 200 rpm <i>Enterobacter aerogenes</i>	1.710	142	9,18	0,99	Kumar et al. (2018)
Efluente de Mandioca	V _R = 1,7 L, 20 g _{DQO} /L, 30 °C, pH 5,5, Inóculo de rúmen bovino	1.183,91	1,15	225,83	0,99	Amorim et al. (2018)
Vinhaça	V _R = 0,3 L, 11,6 g _{DQO} /L, 36 °C, pH 5,5, Inóculo de ETE de laticínios.	203,29	7,47	2,15	0,99	Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi (2019)
50% Vinhaça + 50% Lodo de esgoto	V _R = 120 mL, 54,04 g _{DQO} /L, 55 °C, pH 5,5, inoculo de produção termofílica de H ₂	101,28	3,10	0	0,92	Tena et al. (2020)
Efluente de Mandioca	V _R = 1,725 L, 20 g _{DQO} /L, 40 °C, pH 5,5, inóculo: substrato autofermentado	2.471	2,01	187	0,99	Gavazza et al. (2021)
50% Vinhaça + 50% Lodo de esgoto + 10 g/L esterco de aves	V _R = 120 mL, 50,86 g _{DQO} /L, 55 °C, pH 5,5, Inóculo de Produção termofílica de H ₂	114,18	0,35	0	0,97	Sillero; Solera; Perez (2022)
100% Vinhaça		934,44	5,56	26,13		
50% Vinhaça + 50% Melaço	V _R = 735 mL, 6 g _{DQO} /L, 35 °C, pH 5,5, inóculo de ETE	3.113,27	10,07	30,20	0,99	Este estudo
100% Melaço		3.135,02	9,33	34,41		

P - Potencial máximo de produção de H₂; R_m - Taxa máxima de produção de H₂; λ (h) - Duração da fase lag; R² - Coeficiente de regressão; V_R = volume reacional; ETE – Estação de tratamento de efluente.

Fonte: Autora (2023).

Outra comparação interessante pode ser feita entre os trabalhos de Kumar et al. (2018) e Sillero; Solera; Perez (2022). Os autores realizaram a digestão com pelo menos um subproduto da cana-de-açúcar. Kumar et al. (2018) com a monodigestão de melaço, relatam valores de P, R_m e λ iguais a 1.710 mL-H₂, 142 mL-H₂/h e 9,18 h, respectivamente, enquanto Sillero; Solera; Perez (2022), com a codigestão de vinhaça, lodo de esgoto e esterco de aves, citam valores bastantes inferiores (114,18 mL-H₂, 0,35 mL-H₂/h e 0 h). São destacáveis os altos valores de P e R_m alcançados neste trabalho com as condições R3 (50% Vinhaça/50% Melaço), R4 (25% Vinhaça/75% Melaço) e R5 (100% Melaço).

5.1.3 Rendimento e taxa de produção de H₂

Na Tabela 9 são apresentados os resultados de rendimento e taxa de produção de H₂, molares e volumétricas, em relação a carga aplicada e aos sólidos voláteis totais. Os resultados de rendimento de produção molar de H₂ por substrato consumido (HY) revelaram maiores valores para as condições R2 (1,38 mol-H₂/mol-glicose) e R3 (1,05 mol-H₂/mol-glicose), representando aproximadamente 1000% e 50% a mais do que o alcançado pelas monodigestões dos substratos nos casos R1 (0,09 mol-H₂/mol-glicose) e R5 (0,73 mol-H₂/mol-glicose). Além disso, não houve diferença significativa entre R4 e R5.

Em comparação com o HY máximo de 4 mol-H₂/mol-glicose, as eficiências de conversão teórica dos substratos em H₂ (E_{H2}) aumentaram de 2,23 % (R1) a 34,57 % (R2). Argun; Onaran (2017), em sistema batelada explorando hidrolisado de resíduos de papel toalha, obtiveram máximo de 0,656 mol-H₂/mol-glicose. Amorim et al. (2018), a partir de água residuária de mandioca observaram um valor superior, 1,66 mol-H₂/mol-glicose consumida.

A codigestão de vinhaça com 25% (R2), 50% (R3) e 75% (R4) de melaço aumentou o rendimento de H₂ por carga aplicada (Tabela 9) em 120% (466,69 mL/g-DQO_{apl}), 194% (596,63 mL/g-DQO_{apl}) e 184% (577,00 mL/g-DQO_{apl}), respectivamente, em relação a monodigestão da vinhaça que resultou em apenas 202,90 mL/g-DQO_{apl}. Logo, a presença do melaço foi benéfica para o sistema.

Em comparação com a monodigestão do melaço (R5 - 567,12 mL/g-DQO_{apl}), a adição de 25% (R4) e 50% (R3) de vinhaça não provocou alterações significativas nesses rendimentos, conforme teste de Tukey, havendo acréscimos de apenas 2% e 5%, respectivamente. Por outro lado, com a adição de 75% de vinhaça (R2), o rendimento diminuiu em 21%. Isto mostra que a presença de vinhaça em 75% ou mais na mistura não beneficiou o rendimento por carga aplicada.

A taxa de produção de H₂ por carga aplicada (Tabela 9), com comportamento similar ao apresentado pelo rendimento, embora de forma mais inibida, também melhorou com a adição de melaço ao meio reacional, aumentando cerca de 50% entre R1 (30,11 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d) e R2 (44,89 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d) e permanecendo sem alteração significativa em relação aos casos R3 (50,63 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d), R4 (48,61 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d) e R5 (46,18 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d). Quanto ao rendimento por carga removida, acréscimo de 50% foi observado entre a monodigestão da vinhaça (R1 - 1.503,92 mL-H₂/g-DQO_{rem}) e a condição V₅₀/M₅₀ (R3 - 2.249,01 mL-H₂/g-DQO_{rem}), permanecendo estatisticamente semelhante aos casos R4 (2.250,02 mL-H₂/g-DQO_{rem}) e R5 (2.282,13 mL-H₂/g-DQO_{rem}).

Tabela 9: Parâmetros indicadores de desempenho para as condições avaliadas na Fase 1 (R1 = V₁₀₀/M₀, R2 = V₇₅/M₂₅, R3 = V₅₀/M₅₀, R4 = V₂₅/M₇₅ e R5 = V₀/M₁₀₀).

Parâmetro	Unidade	R1	R2	R3	R4	R5
HY	mol-H ₂ /mol-glicose	0,09 ± 0,00 d	1,38 ± 0,10 a	1,05 ± 0,04 b	0,74 ± 0,01 c	0,73 ± 0,01 c
E_{H2}	%	2,23 ± 0,07 d	34,57 ± 2,56 a	26,37 ± 1,02 b	18,44 ± 0,35 c	18,35 ± 0,27 c
HPR_{VR}	mL-H ₂ /(L.d)	181,55 ± 6,69 c	285,06 ± 5,39 b	328,82 ± 4,08 a	317,71 ± 12,08 ab	304,65 ± 6,53 ab
MHY_{DQOapl}	mmol-H ₂ /g-DQO _{apl}	7,37 ± 0,33 c	16,22 ± 0,44 b	21,66 ± 0,16 a	20,95 ± 0,86 a	20,59 ± 0,47 a
VHY_{DQOapl}	mL-H ₂ /g-DQO _{apl}	202,90 ± 9,07 c	466,69 ± 12,13 b	596,63 ± 4,45 a	577,00 ± 23,65 a	567,12 ± 12,84 a
MHPR_{DQOapl}	mmol-H ₂ /(g-DQO _{apl} .d)	1,09 ± 0,05 b	1,63 ± 0,07 a	1,84 ± 0,03 a	1,76 ± 0,09 a	1,68 ± 0,04 a
VHPR_{DQOapl}	mL-H ₂ /(g-DQO _{apl} .d)	30,11 ± 1,46 b	44,89 ± 2,04 a	50,63 ± 0,63 a	48,61 ± 2,54 a	46,18 ± 1,01 a
MHY_{DQOrem}	mmol-H ₂ /g-DQO _{rem}	54,60 ± 3,91 b	66,62 ± 0,85 ab	81,66 ± 0,89 a	81,69 ± 7,66 a	82,86 ± 0,04 a
VHY_{DQOrem}	mL-H ₂ /g-DQO _{rem}	1.503,92 ± 107,58 b	1.834,96 ± 23,48 ab	2.249,01 ± 24,40 a	2.250,02 ± 211,09 a	2.282,13 ± 1,23 a
MHY_{SVTapl}	mmol-H ₂ /g-SVT _{apl}	7,16 ± 0,46 b	15,89 ± 1,78 a	24,09 ± 1,21 a	19,90 ± 0,57 a	21,23 ± 2,40 a
VHY_{SVTapl}	mL-H ₂ /g-SVT _{apl}	197,11 ± 12,77 b	437,75 ± 48,92 a	663,43 ± 33,20 a	548,20 ± 15,67 a	584,80 ± 66,17 a
MHPR_{SVTapl}	mmol-H ₂ /(g-SVT _{apl} .d)	1,06 ± 0,07 b	1,60 ± 0,15 ab	2,04 ± 0,12 a	1,68 ± 0,03 ab	1,73 ± 0,19 ab
VHPR_{SVTapl}	mL-H ₂ /(g-SVT _{apl} .d)	29,25 ± 2,01 b	43,99 ± 4,11 ab	56,30 ± 3,21 a	46,18 ± 0,80 ab	47,62 ± 5,36 ab
MHY_{SVTrem}	mmol-H ₂ /g-SVT _{rem}	15,74 ± 0,53 b	31,21 ± 4,01 ab	47,86 ± 2,86 a	46,82 ± 2,69 a	51,07 ± 6,97 a
VHY_{SVTrem}	mL-H ₂ /g-SVT _{rem}	433,50 ± 14,66 b	859,58 ± 110,55 ab	1.318,06 ± 78,89 a	1.289,44 ± 74,05 a	1.406,49 ± 191,95 a

A análise comparativa entre as médias para cada parâmetro deve ser feita na horizontal por meio das letras que as seguem, onde os valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); HY - rendimento molar por substrato consumido; E_{H2} - eficiência de conversão do substrato em H₂; HPR_{VR} – taxa de produção volumétrica por volume reacional; MHY_{DQOapl}, VHY_{DQOapl}, MHPR_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} - Rendimentos e taxas de produção, molares e volumétricos, por carga aplicada; MHY_{DQOrem} e VHY_{DQOrem} - Rendimentos molar e volumétrico por carga removida; MHY_{SVTapl}, VHY_{SVTapl}, MHPR_{SVTapl} e VHPR_{SVTapl} - Rendimentos e taxas de produção, molares e volumétricos, por biomassa aplicada; MHY_{SVTrem} e VHY_{SVTrem} - rendimento molar e volumétrico por biomassa removida.

Fonte: Autora (2023).

O rendimento em relação a biomassa aplicada, mostrou-se aproximadamente três vezes maior para a condição V_{50}/M_{50} (R3 - 663,43 mL- H_2 /g-SVT_{apl}) em comparação com a monodigestão da vinhaça (R1 - 197,11 mL- H_2 /g-SVT_{apl}) e estatisticamente similar a digestão de apenas melaço (R5 - 584,80 mL- H_2 /g-SVT_{apl}). Quanto a taxa de produção de H_2 por biomassa aplicada, o resultado mínimo de 29,25 mL/g-SVT_{apl}/d foi obtido em R1 e o máximo de 56,30 mL/g-SVT_{apl}/d em R3. Já o rendimento por biomassa removida, resultou no extremo inferior de 433,50 mL- H_2 /g-SVT_{rem} em V_{100}/M_0 e extremo superior de 1.406,49 mL- H_2 /g-SVT_{rem} em V_0/M_{100} .

Os resultados expostos sugerem uma maior dificuldade em produzir H_2 a partir da digestão da vinhaça e a necessidade de um co-substrato mais biodegradável como o melaço para melhorar a fermentação. A influência negativa do aumento da proporção de vinhaça em sistemas de codigestão também foi relatada nos trabalhos de Albanez et al. (2016; 2018) e Lovato et al. (2019), onde os autores realizaram as codigestões vinhaça/melaço e vinhaça/soro de leite, ambos em AnSBBR, para produção de hidrogênio e metano, respectivamente.

O efeito inibitório da vinhaça pode ser devido a sua baixa biodegradabilidade conferida por compostos tóxicos como melanoidinas e polifenóis que lhe conferem cor escura e pela presença de metais pesados como cobre, níquel e zinco, além das expressivas quantidades de sólidos e de sulfato que podem inibir a ação dos microrganismos (GODOI et al., 2019; PARSAAE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2020; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, 2021; RATNA; RASTOGI; KUMAR, 2021; SILVA et al., 2021).

Albanez et al. (2016) testaram as proporções 33% melaço + 67% vinhaça e 25% melaço + 75% vinhaça em diferentes concentrações afluente, verificando os melhores resultados, 2,2 mmol- H_2 /g-DQO_{aplicada}, 2,9 mmol- H_2 /g-DQO_{removida} e 2,9 mol- H_2 /g-SVT_{aplicado}/d, em modo batelada com 67% de vinhaça e DQO afluente de 6 g/L. Albanez et al. (2018), por sua vez, na condição com maior porcentagem de vinhaça (75%) relataram instabilidade na produção com decréscimo até não haver mais detecção de H_2 no reator. Ao utilizar 67% de melaço e 33% de vinhaça, os resultados foram 0,5 mmol- H_2 /g-DQO_{alimentada}, 2,5 mmol- H_2 /g-DQO_{removida} e 1,4 mol- H_2 /g-SVT_{alimentado}/d.

Fuess; Zaiat; Nascimento (2019), relataram rendimento máximo de 3,1 mmol- H_2 /g-DQO_{apl} utilizando apenas vinhaça em AnSTBR. Para García-Depraect et al. (2020), em CSTR alimentado também com vinhaça, as produções máximas foram 3,5 mmol- H_2 /g-DQO_{adicionada}, 21,3 mmol- H_2 /g-DQO_{removida} e 128,1 mL/g-SVT_{adicionado}. Já Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi

(2019), trabalhando com vinhaça em reatores batelada, citam rendimentos de 58,41 mL/g-DQO_{inicial} e 649,07 mL/g-DQO_{removida}.

Pesquisas tem mostrado melhor eficiência na produção de H₂ a partir da codigestão de substratos reais. A Tabela 10 resume os resultados de alguns estudos que utilizaram vinhaça e/ou melação para produção de biohidrogênio. Os máximos rendimentos obtidos pelos autores citados na Tabela foram inferiores a todas as condições analisadas neste estudo de codigestão.

Lee; Wee; Cho (2014) melhoraram a performance de desempenho de lodo de esgoto na fermentação acidogênica com a adição de águas residuais de melação ao processo digestivo. Com o substrato diluído 10 vezes, o rendimento de H₂ saiu de zero (100% lodo) para 0,9 mL/g-SV_{removido} (80% lodo), 16,3 mL/g-SV_{removido} (60% lodo), 23,3 mL/g-SV_{removido} (40% lodo) e 35,8 mL/g-SV_{removido} (20% lodo).

Ramos; Silva (2018), observaram aumento no rendimento de hidrogênio em 82% (0,82 mmol-H₂/g-DQO) e na taxa de produção em 117% (1,41 L-H₂/d/L) ao adicionar 2 g-DQO/L de soro de queijo a fermentação da vinhaça. Tena et al. (2020), utilizando 25% de vinhaça e 75% de lodo de esgoto, alcançaram 43,25 mL/g-SVT_{adicionado}, aumentando em 14 vezes o rendimento obtido a partir da digestão de 100% de lodo de esgoto. Sillero; Solera; Perez (2022), por sua vez, com a codigestão de vinhaça (50%) e lodo de esgoto (50%) relataram 9,66 mL-H₂/g-DQO_{adicionada} (18,97 mL/g-SVT_{adicionado}) e conseguiram aumentar o rendimento para 22,34 mL-H₂/g-DQO_{adicionada} (27,10 mL-H₂/g-SVT_{adicionado}) ao adicionar 10 g/L de esterco de aves na mistura original de vinhaça e lodo.

Tabela 10: Comparação entre resultados de estudos de produção de H₂ a partir da digestão anaeróbia de vinhaça e/ou melação.

Substrato	Condições	Rendimento	Taxa de Produção	Referência
80% Efluente de melação + 20% Lodo de esgoto	Batelada, 17,3 g _{DQO} /L, 35 °C, pH 5,5	35,8 mL-H ₂ /g-SVT _{rem}	^b 1,41 L-H ₂ /(L.d)	Lee; Wee; Cho (2014)
67% Vinhaça + 33% Melação	AnSBBR, 6 g _{DQO} /L, 30 °C	^a 59,61 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} ^a 78,57 mL-H ₂ /g-DQO _{rem}	2,9 mol-H ₂ /(g-SVT _{apl.d})	Albanez et al. (2016)
33% Vinhaça + 67% Melação	AnSBBR, 3 g _{DQO} /L, 30 °C	^a 13,55 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} , ^a 67,74 mL-H ₂ /g-DQO _{rem}	1,4 mol-H ₂ /(g-SVT _{apl.d}) ^a 0,1 L-H ₂ /(L.d)	Albanez et al. (2018)
Vinhaça (10 g _{DQO} /L) + Soro de queijo (2 g _{DQO} /L)	AFBR, 55 °C, TDH 8 h	^a 24,05 mL-H ₂ /g-DQO _{apl}	1,41 L-H ₂ /(L.d)	Ramos; Silva (2018)
Vinhaça	AnSTBR, 55 °C, 40 g _{DQO} /L	^a 90,92 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} ^a 114,39 mL-H ₂ /g-DQO _{rem}	0,76 L-H ₂ /(L.d)	Fuess; Zaiat; Nascimento (2019)
Vinhaça	Batelada, 11,6 g _{DQO} /L, 36 °C, pH 5,5	58,41 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} 649,07 mL-H ₂ /g-DQO _{rem}	0,67 L-H ₂ /(L.d)	Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi (2019)
Vinhaça de tequila	CSTR, 42 g _{DQO} /L, 35 °C, pH 5,8	^a 96,40 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} ^a 586,64 mL-H ₂ /g-DQO _{rem} 128,1 mL-H ₂ /g-SVT _{apl}	9,1 L-H ₂ /(L.d)	García-Depraect et al. (2020)
75% Vinhaça + 25% Lodo de esgoto	Batelada, 54,04 g _{DQO} /L, 55 °C, pH 5,5	43,25 mL-H ₂ /g-SVT _{apl}	^b 0,620 L-H ₂ /(L.d)	Tena et al. (2020)
50% Vinhaça + 50% Lodo de esgoto + esterco de aves (10 g/L)	Batelada, 50,86 g _{DQO} /L, 55 °C, pH 5,5	22,34 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} 27,10 mL-H ₂ /g-SVT _{apl}	^b 0,070 L-H ₂ /(L.d)	Sillero; Solera; Perez (2022)
50% Vinhaça + 50% Melação	Batelada, 6,49 g _{DQO} /L, 35 °C, pH 5,5	596,63 mL-H ₂ /g-DQO _{apl} 2.249,01 mL-H ₂ /g-DQO _{rem} 663,43 mL-H ₂ /g-SVT _{apl} 1.318,06 mL-H ₂ /g-SVT _{rem}	0,051 L-H ₂ /(g-DQO _{apl.d}) 0,056 L-H ₂ /(g-SVT _{apl.d}) 0,33 L-H ₂ /(L.d)	Este estudo

^aConvertido de mmol para mL a partir de dados disponíveis no artigo e da equação dos gases perfeitos (PV=nRT); ^bCalculado com dados do artigo; AnSBBR - Reator anaeróbio de bateladas sequenciais; AnSTBR - Reator anaeróbio de leito estruturado; AFBR - Reator anaeróbio de leito fluidizado; CSTR - Reator contínuo de tanque agitado.

Fonte: Autora (2023).

5.1.4 Análise estatística

Na Tabela 11 são mostrados os resultados da análise de variância (ANOVA) dos modelos lineares e quadráticos gerados para as variáveis respostas (rendimentos e taxas de produção volumétricos por carga aplicada).

Tabela 11: ANOVA para os modelos lineares e quadráticos da Fase 1.

Modelo	Resposta	R ² (%)	Fonte	GL	SQ	MQ	Valor-F	Valor-P
Linear	VHY _{DQOapl}	67,36	Regressão	1	147428	147428	16,51	0,004
			Resíduo	8	71451	8931		
			Falta de ajuste	3	69504	23168	59,51	0,000
			Erro puro	5	1947	389		
	VHPR _{DQOapl}	46,02	Regressão	1	256,94	256,94	6,82	0,031
			Resíduo	8	301,41	37,677		
			Falta de ajuste	3	272,76	90,921	15,87	0,005
			Erro puro	5	28,65	5,730		
Quadrático	VHY _{DQOapl}	97,30	Regressão	2	212968	106484	126,12	0,000
			Resíduo	7	5910	844		
			Falta de ajuste	2	3964	1982	5,09	0,062
			Erro puro	5	1947	389		
	VHPR _{DQOapl}	91,96	Regressão	2	513,47	256,736	40,04	0,000
			Resíduo	7	44,88	6,412		
			Falta de ajuste	2	16,24	8,118	1,42	0,325
			Erro puro	5	28,65	5,730		

VHY_{DQOapl} - rendimento volumétrico de H₂ por carga aplicada; VHPR_{DQOapl} - taxa de produção volumétrica de H₂ por carga aplicada; GL - grau de liberdade; SQ - soma quadrática; MQ - média quadrática.

Fonte: Autora (2023).

Os valores calculados de F para as regressões ($MQ_{\text{regressão}}/MQ_{\text{resíduo}}$) referentes aos modelos quadráticos do rendimento e da taxa de produção de H₂ (F-calc_{2,7}) foram 126,12 e 40,04, respectivamente, contra apenas 16,51 e 6,82 dos modelos lineares (F-calc_{1,8}). Já os valores tabelados de F, no nível de 95% de confiança, são 4,74 (F-tab_{2,7}) para os modelos quadráticos e 5,32 (F-tab_{1,8}) para os modelos lineares. Logo, comparando os F calculados com os F tabelados, é possível confirmar a maior significância dos modelos quadráticos a partir do teste F de regressão.

Em análise semelhante, o teste F de falta de ajuste nos dá F calculados ($MQ_{\text{falta de ajuste}}/MQ_{\text{erro puro}}$) iguais a 59,51 e 15,87 para os modelos lineares (F-calc_{3,5}) contra 5,09 e 1,42 para os modelos quadráticos (F-calc_{2,5}), enquanto os valores tabelados são 5,41 (F-tab_{3,5}) e 5,79

(F-tab_{2,5}), respectivamente; assim, o teste mostra falta de ajuste para os modelos lineares e confirma a alta significância dos modelos quadráticos.

Os modelos lineares, mesmo sendo estatisticamente significativos ($p < 0,05$), apresentam baixos R^2 (0,67 e 0,46) e destacável falta de ajuste. Isto indica má previsão de dados a partir dessas regressões. Os fatores de interação de dois componentes adicionados aos modelos quadráticos provocam melhora nos ajustes. Nestes casos, os R^2 (0,98 e 0,92) mostram que cerca de 67% e 46% da variabilidade das respostas, rendimento e taxa e produção, respectivamente, são explicadas pelos componentes puros, enquanto 31% e 46% representam a variabilidade da interação bifásica e os 2% e 8% restantes são inexplicáveis.

Os altos R^2 e os valores de $P \geq 0,05$ (0,062 e 0,325) no teste F de falta de ajuste mostram a superioridade dos modelos quadráticos.

Na Tabela 12 são apresentados os coeficientes de regressão, os erros padrão e os significados estatísticos obtidos pelos modelos quadráticos para as variáveis respostas. Os componentes puros apresentam influência positiva (b_V e $b_M > 0$) para o rendimento e a taxa de produção de hidrogênio, havendo maiores contribuições a partir do melaço (553,20 e 45,22) do que da vinhaça (209,70 e 30,89).

Tabela 12: Coeficientes de regressão, erro padrão e significados estatísticos do modelo quadrático na fase 1.

Resposta	Coefficiente	Estimativa	Erro padrão	Valor-P
VHY _{DQOapl}	b_V	209,70	19,3	
	b_M	553,20	19,3	
	b_{VM}	774,10	84,7	0,000
VHPR _{DQOapl}	b_V	30,89	1,69	
	b_M	45,22	1,69	
	b_{VM}	48,43	7,66	0,000

VHY_{DQOapl} – rendimento volumétrico de H₂ por carga aplicada; VHPR_{DQOapl} – taxa de produção volumétrica de H₂ por carga aplicada.

Fonte: Autora (2023).

Os termos de interação bifásica entre os componentes, altamente significativos (valores- $p < 0,05$), revelam que as misturas apresentam efeitos sinérgicos ($b_{VM} > 0$), com coeficientes 774,1 para o rendimento e 48,43 para a taxa de produção. Assim, os dois componentes, vinhaça e melaço, interagem sinérgicamente entre si, contribuindo para a melhora do rendimento e da taxa de produção de hidrogênio.

Os modelos quadráticos resultam nas Equações (32) e (33), a partir das quais é possível prever as respostas de rendimento e de taxa de produção de hidrogênio, respectivamente, para quaisquer proporções de vinhaça e melaço.

$$VHY_{DQO_{apl}} = 209,7x_V + 552,2x_M + 774,1x_Vx_M \quad R^2 = 97,3\% \quad (32)$$

$$VHPR_{DQO_{apl}} = 30,89x_V + 45,22x_M + 48,43x_Vx_M \quad R^2 = 91,96\% \quad (33)$$

Na Tabela 13 são resumidos os rendimentos e taxas de produção obtidos experimentalmente, bem como os previstos pelos modelos quadráticos.

Como as respostas para os dois componentes misturados obtidas a partir dos modelos quadráticos completos (contendo termos lineares e interativos) são maiores do que a soma das suas respostas individuais previstas a partir da parte linear dos modelos quadráticos (desconsiderando termos interativos) isso confirma que a vinhaça e o melaço interagem sinergicamente nas misturas, ou seja, as previsões dos modelos quadráticos completos são maiores do que as previsões das partes lineares dos mesmos modelos.

Tabela 13: Rendimentos e taxas de produção de H₂ experimentais e previstos para as condições da fase 1.

Misturas	Rendimento (mL-H ₂ /g-DQO _{apl})			Taxa de Produção (mL-H ₂ /(g-DQO _{apl} .d))		
	Experimental	Previsto ¹	Previsto ⁴	Experimental	Previsto ^a	Previsto ^b
V ₁₀₀ /M ₀	202,90 ± 9,07 c	209,70	209,70	30,11 ± 1,46 e	30,89	30,89
V ₇₅ /M ₂₅	466,69 ± 12,13 b	295,45	440,59	44,89 ± 2,04 d	34,47	43,55
V ₅₀ /M ₅₀	596,63 ± 4,45 a	381,20	574,73	50,63 ± 0,63 d	38,06	50,17
V ₂₅ /M ₇₅	577,00 ± 23,65 a	466,95	612,09	48,61 ± 2,54 d	41,64	50,72
V ₀ /M ₁₀₀	567,12 ± 12,84 a	552,70	552,70	46,18 ± 1,01 d	45,22	45,22

Médias que compartilham uma mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste de Tukey. ¹Valores obtidos pela parte linear do modelo quadrático (sem interações sinérgicas ou antagônicas). ⁴Valores obtidos pelo modelo quadrático considerando interações sinérgicas ou antagônicas.

Fonte: Autora (2023).

O efeito sinérgico identificado na mistura é devido a maior capacidade de tamponamento do sistema e ao equilíbrio de nutrientes como enxofre, potássio e nitrogênio. Além disso, conforme enfatizado por González; Reyes; Romero (2017), a mistura de substratos e o melhor equilíbrio nutricional podem contribuir para a maior versatilidade da comunidade microbiana, ampliando a tolerância dos microrganismos a condições operacionais diversas.

5.2 Fase 2: influência da concentração do substrato, do pH e da temperatura na produção de H₂

Esta seção foi dividida em sete partes. Em 5.2.1 é apresentada a caracterização das condições avaliadas na fase 2 e as eficiências de remoção de matéria orgânica (carboidratos, DQO, SVT e sulfato). No item 5.2.2 são expostos os dados de produção acumulada de H₂, os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado e os resultados de rendimento e taxa de produção de H₂. Em 5.2.3 é apresentada a análise de significância dos efeitos nas variáveis resposta. As interações entre DQO e pH, DQO e T bem como pH e T em relação ao rendimento e a taxa de produção de H₂ são discutidas nos itens 5.2.4, 5.2.5 e 5.2.6, respectivamente. Em 5.2.7 é exposta a análise estatística de variância dos modelos de regressão.

5.2.1 Caracterização das misturas avaliadas e eficiências de remoção

Na Tabela 14 é apresentada a caracterização inicial e final das condições investigadas, além das eficiências de remoção em termos de carboidratos, DQO e SVT. Apesar de o substrato utilizado neste trabalho ser uma mistura de efluentes reais, foi possível estabelecer a DQO inicial dos reatores próximo aos valores desejados de 6 g/L (variação de 5,00 a 5,72 g/L) e 9 g/L (variação de 9,04 a 9,60 g/L), enquanto os valores finais variaram de 3,93 a 4,44 g/L e de 7,92 a 8,55 g/L, respectivamente.

Os reatores operados a 6 g-DQO/L apresentaram maiores eficiências de remoção (19,20 a 25,70%) do que os operados a 9 g-DQO/L (8,92 a 14,45%), independente da temperatura e do pH. Provavelmente, a maior a concentração de substrato (9 g-DQO/L) forneceu matéria orgânica em excesso para os microrganismos, facilitando a produção excessiva de ácidos orgânicos. Isto provoca mudanças nas vias metabólicas, diminui o pH, a capacidade de tamponamento e a atividade enzimática, resultando em menores taxas de remoção de DQO, sólidos voláteis e carboidratos (PU et al., 2019).

As condições testadas resultaram em conversões de DQO próximas do esperado para reatores acidogênicos. Essa remoção reflete a conversão do substrato em H₂, CO₂ e ácidos graxos dentro da digestão anaeróbia incompleta. Conforme citado por Li et al. (2007) e Chaves et al. (2021), para casos como esses, em que não transformação de ácidos orgânicos em metano, as remoções ficam em torno de 20%. Silva et al. (2017) relatam que remoções inferiores também são comuns, já que em seus reatores acidogênicos que codigeriam resíduos de alimentos e glicerol todas as amostras resultaram em conversões abaixo de 20%.

Tabela 14: Características iniciais e finais e eficiências de remoção nos reatores avaliados na Fase 2.

Parâmetro	RM⁶_{5,5}	RM⁹_{5,5}	RM⁶_{6,5}	RM⁹_{6,5}	RT⁶_{5,5}	RT⁹_{5,5}	RT⁶_{6,5}	RT⁹_{6,5}
C_{inicial} (g/L)	3,32 ± 0,03	6,63 ± 0,00	3,31 ± 0,19	6,19 ± 0,35	3,29 ± 0,00	6,51 ± 0,14	3,34 ± 0,09	6,87 ± 0,04
C_{final} (g/L)	0,91 ± 0,02	2,34 ± 0,02	0,76 ± 0,04	1,60 ± 0,01	1,96 ± 0,24	4,45 ± 0,03	1,70 ± 0,04	4,04 ± 0,06
E_C (%)	72,59 ± 0,75	64,71 ± 0,30	76,98 ± 2,40	74,01 ± 1,71	40,39 ± 7,07	31,50 ± 1,85	49,04 ± 0,08	41,20 ± 0,56
DQO_{inicial} (g/L)	5,72 ± 0,15	9,38 ± 0,02	5,20 ± 0,19	9,04 ± 0,07	5,29 ± 0,06	9,33 ± 0,12	5,00 ± 0,15	9,60 ± 0,24
DQO_{final} (g/L)	4,44 ± 0,02	8,55 ± 0,14	4,14 ± 0,06	7,92 ± 0,05	3,93 ± 0,34	8,00 ± 0,22	4,04 ± 0,00	8,21 ± 0,29
E_{DQO} (%)	21,75 ± 1,65	8,92 ± 1,69	20,37 ± 1,73	12,38 ± 0,12	25,70 ± 5,69	14,33 ± 1,19	19,20 ± 2,66	14,45 ± 0,85
SVT_{inicial} (g/L)	5,79 ± 0,03	8,94 ± 0,34	5,27 ± 0,26	8,26 ± 0,22	6,17 ± 0,14	9,96 ± 0,19	6,01 ± 0,21	8,60 ± 1,08
SVT_{final} (g/L)	5,09 ± 0,13	7,98 ± 0,27	4,17 ± 0,25	6,62 ± 0,29	5,19 ± 0,02	9,01 ± 0,35	5,20 ± 0,19	7,53 ± 0,95
E_{SVT} (%)	12,01 ± 1,71	10,73 ± 0,41	20,76 ± 0,87	19,94 ± 1,33	15,87 ± 2,09	9,57 ± 1,80	13,51 ± 0,19	12,45 ± 0,05
pH_{final}	4,38 ± 0,04	4,48 ± 0,11	4,73 ± 0,01	4,57 ± 0,03	4,88 ± 0,11	4,98 ± 0,01	5,01 ± 0,00	5,00 ± 0,00

RM⁶_{5,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁹_{5,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁶_{6,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RM⁹_{6,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁶_{5,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁹_{5,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁶_{6,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁹_{6,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5.

C_{inicial}, C_{final} e E_C - Concentração de carboidrato inicial e final e eficiência de remoção; DQO_{inicial}, DQO_{final} e E_{DQO} - Concentração de DQO inicial e final e eficiência de remoção; SVT_{inicial}, SVT_{final} e E_{SVT} - Concentração de sólidos voláteis totais inicial e final e eficiência de remoção; ± - desvio padrão.

Fonte: Autora (2023).

As concentrações iniciais de sólidos voláteis totais (Tabela 14) aproximaram-se dos valores em termo de DQO, alcançando de 5,27 a 6,17 g-SVT/L ($DQO_{inicial} = 6$ g/L) e de 8,26 a 9,96 g-SVT/L ($DQO_{inicial} = 9$ g/L). Os teores finais resultaram em 4,17 a 5,20 g-SVT/L ($DQO_{inicial} = 6$ g/L) e 6,62 a 9,01 g-SVT/L ($DQO_{inicial} = 9$ g/L). As variações na eficiência de remoção (E_{SVT}) foram semelhantes às da DQO, oscilando entre 12,01% e 20,76% nas concentrações de 6 g-DQO/L e entre 9,57% e 19,54% nas concentrações de 9 g-DQO/L. É possível que o rápido acúmulo de ácidos favorecido na maior concentração de substrato tenha inibido a taxa de hidrólise, resultando em menores remoções de sólidos voláteis (GHIMIRE et al., 2018; PU et al., 2019).

A concentração de carboidratos no início das bateladas (Tabela 14) oscilou de 3,29 a 3,34 g/L para os reatores operados a 6 g-DQO/L e de 6,19 a 6,87 g/L para os iniciados a 9 g-DQO/L, com concentrações finais fluando de 0,76 a 1,96 g-carboidratos/L e de 1,60 a 4,45 g-carboidratos/L, respectivamente. Além das condições com maior concentração de substrato (9 g-DQO/L), independente do pH e temperatura, terem resultado em menores conversões de carboidratos do que as observadas com a concentração inferior de 6 g-DQO/L, é ainda mais destacável a análise sob o ponto de vista da variação da temperatura.

Maiores eficiências de remoção de carboidratos (E_C) foram verificadas a 35°C (64,71 a 76,98%) do que a 45°C (31,50 a 49,04%), independente da concentração e do pH. O fato de o inóculo utilizado ter sido proveniente de um reator mantido a temperatura ambiente, e, portanto, contendo microrganismos mais facilmente adaptáveis a 35 °C pode ter contribuído para a maior conversão de carboidratos nesta temperatura do que a 45°C. Fato análogo foi observado por Azbar et al. (2009) e Magdalena et al. (2023), onde inóculos mesofílicos apresentaram melhor desempenho na fermentação acidogênica mesofílica do que termofílica.

Tavares et al. (2022) ao avaliarem a produção de hidrogênio a partir de água residuária de mandioca também verificaram baixas remoções de carboidratos em faixas termofílicas (22 a 27 %). Albanez et al. (2016) ao promoverem a codigestão de vinhaça e melaço em AnSBBR a 30°C, relataram remoções de DQO em torno de 18% e de carboidratos próximas a 85%.

Pu et al. (2019) avaliaram as remoções de DQO, sólidos voláteis e carboidratos durante a fermentação de resíduos de alimentos sob as concentrações iniciais de 0, 7,5, 15, 22,5, 30 e 37,5 g-SV/L. Foram testadas condições utilizando inóculo com e sem pré-tratamento térmico. Para o substrato tratado termicamente, o acréscimo na concentração de 0 a 15 g-SV/L aumentou de 4,8% para 36,3% a eficiência de remoção de DQO, havendo decréscimo nas demais concentrações. O comportamento da variação na eficiência de remoção de sólidos voláteis foi análogo ao da DQO, com valor máximo de 40,5% a 15 g-SV/L. Quanto a degradação de

carboidratos, a eficiência máxima de 88,1% foi alcançada a 7,5 g-VS/L e decresceu com o aumento da concentração do substrato. Os autores concluíram que concentrações exageradas de substrato dificultam a transferência de massa e restringem o processo digestivo, diminuindo as taxas de conversões em termos de DQO, sólidos voláteis e carboidratos.

Ainda na Tabela 14, observa-se que houve decréscimo no pH final de todos os reatores em relação aos valores iniciais estabelecidos em 5,5 e 6,5. Isto porque, além de não ter sido utilizado alcalinizante para tamponar os sistemas, os ácidos orgânicos produzidos junto ao H₂ durante a fermentação acidogênica acabam diminuindo o pH do meio (SILVA et al., 2021).

O pH final dos reatores operados a 35 °C oscilou entre 4,38 e 4,73 enquanto nos reatores mantidos a 45 °C a variação foi de 4,88 a 5,01. Os ambientes ácidos aliados ao pré-tratamento térmico do inóculo colaboraram para a inibição da metanogênese, visto que ao longo das bateladas não foi detectada nenhuma produção de metano. Isto comprova a eficiência de inibição das arqueias metanogênicas, conforme experiência já verificada em outros estudos (AMORIM et al., 2018; CHAVES et al., 2021; GAVAZZA et al., 2021).

Os maiores pHs finais observados nos reatores termofílicos já eram esperados, pois em tais ambientes, há diminuição da solubilidade do CO₂, resultando em baixa concentração de ácido carbônico no meio e menor acidez do sistema (SIDDIQUE; WAHID, 2018; ELREEDY; FUJII; TAWFIK, 2019).

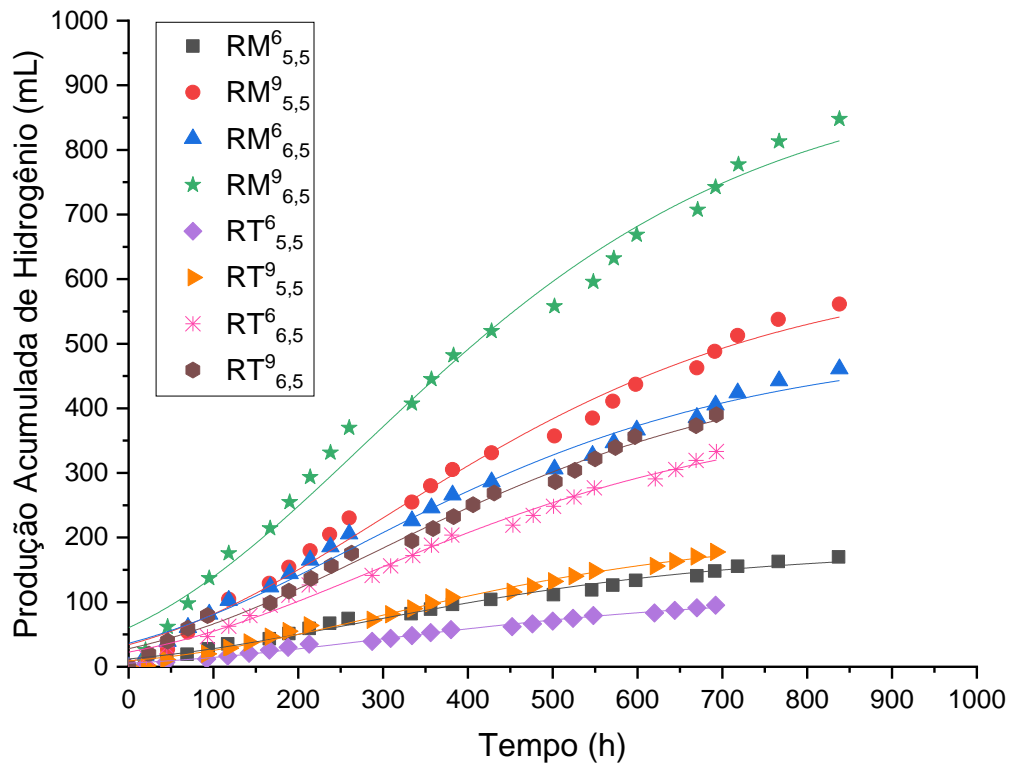
5.2.2 Produção de H₂ e parâmetros cinéticos

A Figura 7 e o Apêndice B (Tabela B1 e Figuras B1 a B8) trazem os dados de produção acumulada de hidrogênio em relação ao tempo e as curvas de ajuste ao modelo de regressão.

Os reatores mesofílicos, RM⁹_{6,5} (847,87 ± 13,78 mL-H₂), RM⁹_{5,5} (561,33 ± 26,14 mL-H₂) e RM⁶_{6,5} (461,16 ± 2,64 mL-H₂), com exceção de RM⁶_{5,5}, apresentaram as maiores produções acumuladas. A condição de maior DQO (9 g/L) e pH (6,5) aliada a menor temperatura (35°C) culminou no melhor resultado, que foi cerca de 9 vezes maior do que o valor alcançado pelo reator que apresentou a menor produção (RT⁶_{5,5}).

Por sua vez, as produções mínimas acumuladas, 169,92 ± 8,26 mL-H₂ (RM⁶_{5,5}) e 95,27 ± 11,36 mL-H₂ (RT⁶_{5,5}) foram obtidas com a combinação de menor DQO (6 g/L) e pH (5,5). Os demais reatores, todos termofílicos, resultaram nos valores intermediários de 177,77 ± 3,49 mL-H₂ (RT⁹_{5,5}), 333,23 ± 2,72 mL-H₂ (RT⁶_{6,5}) e 389,96 ± 1,42 mL-H₂ (RT⁹_{6,5}).

Figura 7: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para as condições da fase 2.



Legenda: $RM^{6}_{5,5}$ - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; $RM^{9}_{5,5}$ - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; $RM^{6}_{6,5}$ - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; $RM^{9}_{6,5}$ - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5; $RT^{6}_{5,5}$ - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; $RT^{9}_{5,5}$ - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; $RT^{6}_{6,5}$ - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; $RT^{9}_{6,5}$ - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5.

Fonte: Autora (2023).

As oito condições operacionais testadas resultaram em dados com bom ajuste ao modelo de Gompertz Modificado ($R^2 > 0,98$), conforme apresentado na Tabela 15. Verifica-se que o potencial máximo de produção (P) variou entre 114,43 mL-H₂ ($RT^{6}_{5,5}$) e 925,05 mL-H₂ ($RM^{9}_{6,5}$), a taxa máxima (R_m) oscilou entre 0,16 mL-H₂/h ($RT^{6}_{5,5}$) e 1,24 mL-H₂/h ($RM^{9}_{6,5}$) e a fase lag (λ) durou de 0,00 ($RM^{6}_{6,5}$) a 36,30 horas ($RT^{9}_{5,5}$).

Na Tabela 15 também são exibidos os resultados de rendimento e taxa de produção de H₂. O rendimento volumétrico manteve-se entre 0,30 L-H₂/g-DQO_{apl} ($RT^{6}_{5,5}$) e 1,56 L-H₂/g-DQO_{apl} ($RM^{9}_{6,5}$) e a taxa de produção volumétrica apresentou valor mínimo de 12,01 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d ($RT^{6}_{5,5}$) e máximo de 54,98 mL-H₂/g-DQO_{apl}/d ($RM^{9}_{6,5}$). A Tabela B2 do Apêndice B traz os resultados de desempenho em outras unidades usuais da literatura.

Para verificar se os resultados das respostas diferem estatisticamente entre si, foi realizado o teste de Tukey aliado a ANOVA de um fator com nível de significância de 5%. Em se tratando do rendimento em L-H₂/g-DQO_{apl}, os pares 1,48 ($RM^{6}_{6,5}$) e 1,56 ($RM^{9}_{6,5}$), 1,00 ($RM^{9}_{5,5}$) e 1,11 ($RT^{6}_{6,5}$) bem como 0,30 ($RT^{6}_{5,5}$) e 0,32 ($RT^{9}_{5,5}$) não diferem entre si. Quanto a

taxa de produção em mL-H₂/g-DQO_{apl}/d, as equidades são entre a dupla 51,65 (RM⁶_{6,5}) e 54,98 (RM⁹_{6,5}) e entre o trio 17,47 (RM⁶_{5,5}), 12,01 (RT⁶_{5,5}) e 13,00 (RT⁹_{5,5}).

Tabela 15: Parâmetros cinéticos do Modelo de Gompertz Modificado, rendimento e taxa de produção para as condições da Fase 2.

	P	R_m	λ (h)	R²	VHY_{DQOapl}	VHPR_{DQOapl}
RM⁶_{5,5}	183,77 ± 7,98 d	0,25 ± 0,01 e	0,68 ± 0,08 c	0,9864	0,50 ± 0,01 cd	17,47 ± 0,56 e
RM⁹_{5,5}	629,88 ± 51,99 b	0,82 ± 0,01 b	20,01 ± 4,87 b	0,9875	1,00 ± 0,04 b	35,12 ± 0,50 c
RM⁶_{6,5}	501,87 ± 4,35 c	0,67 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c	0,9874	1,48 ± 0,06 a	51,65 ± 2,04 a
RM⁹_{6,5}	925,05 ± 20,55 a	1,24 ± 0,01 a	1,89 ± 1,89 c	0,9879	1,56 ± 0,01 a	54,98 ± 0,05 a
RT⁶_{5,5}	114,43 ± 13,33 d	0,16 ± 0,02 f	27,91 ± 6,58 ab	0,9913	0,30 ± 0,04 e	12,01 ± 1,46 e
RT⁹_{5,5}	211,00 ± 3,64 d	0,30 ± 0,01 e	36,30 ± 0,93 a	0,9913	0,32 ± 0,00 de	13,00 ± 0,07 e
RT⁶_{6,5}	399,73 ± 2,85 c	0,54 ± 0,01 d	14,58 ± 0,01 bc	0,9908	1,11 ± 0,02 b	43,39 ± 0,90 b
RT⁹_{6,5}	481,64 ± 2,98 c	0,64 ± 0,00 c	12,57 ± 2,40 bc	0,9916	0,68 ± 0,01 c	26,66 ± 0,53 d

RM⁶_{5,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁹_{5,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁶_{6,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RM⁹_{6,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁶_{5,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁹_{5,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁶_{6,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁹_{6,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5.

P (mL) - Potencial máximo de produção de H₂; R_m (mL/h) - Taxa máxima de produção de H₂; λ (h) - Duração da fase lag; R² - Coeficiente de regressão; VHY_{DQOapl} (L-H₂/g-DQO_{apl}) - rendimento volumétrico por carga aplicada e VHPR_{DQOapl} (mL-H₂/g-DQO_{apl}/d) - taxa de produção volumétrica por carga aplicada.

A análise comparativa entre as médias para cada parâmetro deve ser feita na vertical por meio das letras que as seguem, onde os valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: Autora (2023).

Ao comparar os reatores sob mesmas condições combinadas de DQO e pH, em todos os casos, os ambientes mantidos a 35 °C resultaram em valores de P, R_m, VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} superiores aos obtidos a 45°C (RM⁶_{5,5} > RT⁶_{5,5}, RM⁹_{5,5} > RT⁹_{5,5}, RM⁶_{6,5} > RT⁶_{6,5} e RM⁹_{6,5} > RT⁹_{6,5}). Assim, o aumento da temperatura não foi benéfico para o sistema. A hipótese para explicar este fato é que a aplicação de temperatura mais alta pode ter causado desativação e perda de enzimas, taxa rápida de morte celular microbiana e conversão incompleta do substrato (CHEN et al.; 2022).

Quanto a fase de adaptação dos microrganismos (fase lag), houve maior duração com o incremento da temperatura (RM⁶_{5,5} < RT⁶_{5,5}, RM⁹_{5,5} < RT⁹_{5,5}, RM⁶_{6,5} < RT⁶_{6,5} e RM⁹_{6,5} < RT⁹_{6,5}). O inóculo fonte de microrganismos utilizado nos reatores foi coletado de um sistema que tratava efluente a temperatura ambiente. Certamente isso permitiu que os microrganismos presentes na cultura mista se adaptaram mais rapidamente na condição mesofílica do que termofílica, conforme verificado por Kargi; Eren; Ozmihci (2012).

No estudo de Kargi; Eren; Ozmihci (2012), em que solução de soro de queijo em pó foi usada como matéria-prima para a produção de gás hidrogênio por fermentação acidogênica a 35 °C e 55 °C, foi verificada maior fase lag na temperatura termofílica, uma vez que a cultura original era mesofílica parcialmente adaptada a 55 °C. Como essa cultura foi obtida a partir de fermentação escura mesófila, a produção a 35 °C ocorreu sem fase lag considerável.

Em relação ao pH inicial, mantendo constantes temperatura e DQO, a mudança de pH 5,5 para 6,5 provocou aumento nos valores de P, R_m , VHY_{DQOapl} e $VHPR_{DQOapl}$ ($RM^{6,5} > RM^{5,5}$, $RM^{9,5} > RM^{5,5}$, $RT^{6,5} > RT^{5,5}$ e $RT^{9,5} > RT^{5,5}$) e decréscimo na duração da fase lag ($RM^{6,5} < RM^{5,5}$, $RM^{9,5} < RM^{5,5}$, $RT^{6,5} < RT^{5,5}$ e $RT^{9,5} < RT^{5,5}$). As menores fases lag e maiores produções são devido a facilidade de adaptação dos microrganismos ao ambiente com pH 6,5 por ser mais próximo do pH 6,38 em que o inóculo foi coletado (HAQUE et al., 2022; MAGDALENA et al., 2023).

Do ponto de vista da concentração inicial do substrato, fixando temperatura e pH, percebe-se que o incremento na DQO de 6 g/L para 9 g/L reforçou os valores de P, R_m , VHY_{DQOapl} , $VHPR_{DQOapl}$ e λ em quase todos os casos ($RM^{9,5} > RM^{6,5}$, $RM^{9,5} > RM^{5,5}$, $RT^{9,5} > RT^{6,5}$, $RT^{9,5} > RT^{5,5}$), exceto nas condições de temperatura e pH superiores ($RT^{9,5} > RT^{6,5}$). Majoritariamente, a menor concentração de substrato forneceu inferior quantidade de matéria orgânica a ser degradada pelos microrganismos, resultando em produções menores de hidrogênio (KUMAR et al., 2018; PU et al., 2019).

5.2.3 Análise de significância dos efeitos

Na Tabela 16 são expostos os efeitos principais e interativos de segunda e terceira ordem gerados pelo planejamento fatorial 2^3 com intervalo de confiança de 95% (t-student = 2,31) para as variáveis resposta rendimento e taxa de produção.

Tanto para o rendimento volumétrico de hidrogênio por carga aplicada “ VHY_{DQOapl} ” ($R^2 = 0,99512$, ajuste = 0,99084 e EPMQ = 0,0021313) quanto para a taxa de produção volumétrica por carga aplicada “ $VHPR_{DQOapl}$ ” ($R^2 = 0,99613$, ajuste = 0,99275 e EPMQ = 1,99295), o efeito principal da DQO e o efeito interativo de terceira ordem (DQO*pH*T) não foram significativos, já que apresentam valor-P > 0,05, intervalo de confiança (IC) incluindo o zero e $|t(8)| < t\text{-student}(2,31)$. Neste caso, descartam interpretação. Além disso, como as interações de segunda ordem (DQO*pH, DQO*T e pH*T) foram todas significativas, os efeitos principais do pH e da temperatura não podem ser interpretados isoladamente e sim em conjunto.

Tabela 16: Efeitos principais e interativos do planejamento fatorial 2³.

Resposta	Fator	Efeito	DP (EP)	t(8)	Valor-P	IC de 95%
VHY _{DQOapl} (L-H ₂ /g-DQO _{apl})	Média Global	0,868125	0,011541	75,2186	0,000000	(0,8415; 0,8947)
	DQO	0,041250	0,023083	1,7871	0,111742	(-0,0120; 0,0945)
	pH	0,681250	0,023083	29,5134	0,000000	(0,6280; 0,7345)
	T	-0,531250	0,023083	-23,0150	0,000000	(-0,5845; -0,4780)
	DQO*pH	-0,218750	0,023083	-9,4768	0,000013	(-0,2720; -0,1655)
	DQO*T	-0,251250	0,023083	-10,8848	0,000004	(-0,3045; -0,1980)
	pH*T	-0,096250	0,023083	-4,1698	0,003123	(-0,1495; -0,0430)
	DQO*pH*T	-0,011	0,02308	-0,4874	0,639065	(-0,0645; 0,0420)
VHPR _{DQOapl} (mL-H ₂ /g-DQO _{apl} /d)	Média Global	31,7838	0,352930	90,0569	0,000000	(30,9699; 32,5976)
	DQO	1,3100	0,705859	1,8559	0,100563	(-0,3177; 2,9377)
	pH	24,7675	0,705859	35,0884	0,000000	(23,1398; 26,3952)
	T	-16,0400	0,705859	-22,7241	0,000000	(-17,6677; -14,4123)
	DQO*pH	-8,0100	0,705859	-11,3479	0,000003	(-9,6377; -6,3823)
	DQO*T	-9,1825	0,705859	-13,0090	0,000001	(-10,8102; -7,5548)
	pH*T	-2,2450	0,705859	-3,1805	0,012987	(-3,8727; -0,6173)
	DQO*pH*T	-0,8475	0,705859	-1,2007	0,264223	(-2,4752; 0,7802)

VHY_{DQOapl} - rendimento volumétrico de H₂ por carga aplicada; VHPR_{DQOapl} - taxa de produção volumétrica por carga aplicada; DQO - demanda química de oxigênio; T - temperatura; DP (EP) – desvio padrão (erro puro); t(8) – efeito/EP; IC – intervalo de confiança.

Fonte: Autora (2023)

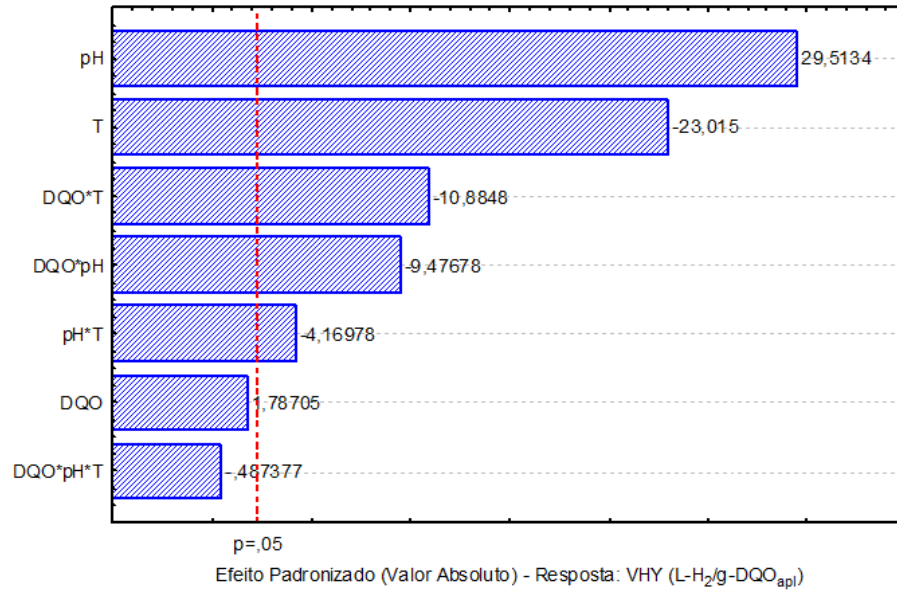
Os gráficos de pareto (Figuras 8 e 9) facilitam a análise de significância dos efeitos. Considerando probabilidade de erro de 5% e nível de confiança de 95%, aqueles com efeito padronizado antepostos a linha tracejada ($|t(8)| < t\text{-student}$) não são significativos. Isso permite estabelecer a ordem de influência dos fatores DQO, pH e Temperatura sobre as respostas.

Tanto para VHY_{DQOapl} (Figura 8) quanto para VHPR_{DQOapl} (Figura 9), o fator mais significativo foi o pH com efeito positivo, seguido pela temperatura com efeito negativo. A significância desses fatores já era esperada. A DQO, por sua vez, apesar de ter seu efeito individual sem significância, apresentou interações significativas e de efeito negativo com os demais fatores principais (pH e T).

Conforme destacado por Silva et al. (2021), a temperatura reacional afeta o crescimento e a diversidade dos microrganismos, influenciando diretamente na etapa de hidrólise dos substratos. Os autores destacam a melhora da produção de hidrogênio com o aumento da temperatura, já que esta condição fornece taxa de hidrólise mais rápida. Por outro lado, Chen et al. (2022) e Haque et al. (2022) enfatizam que a aplicação de temperaturas altas pode causar desativação e perda de enzimas, taxa rápida de morte celular microbiana e conversão

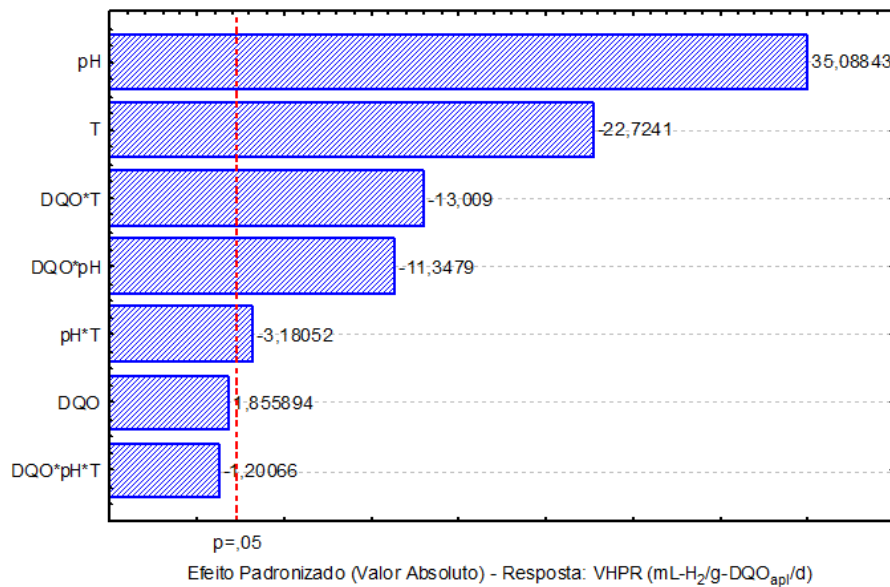
incompleta do substrato, vindo a apresentar efeito negativo sobre a produção de hidrogênio, conforme foi verificado neste trabalho.

Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para $VHY_{DQO_{apl}}$ com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Autora (2023).

Figura 9: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para $VHPR_{DQO_{apl}}$ com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Autora (2023).

Silva et al. (2021) também enfatizam a importância do pH na produção ou consumo de hidrogênio, já que influencia na solubilização da matéria orgânica, na comunidade microbiana e nos produtos formados. Segundo o trabalho de Ziara et al (2019), a faixa ideal de pH depende

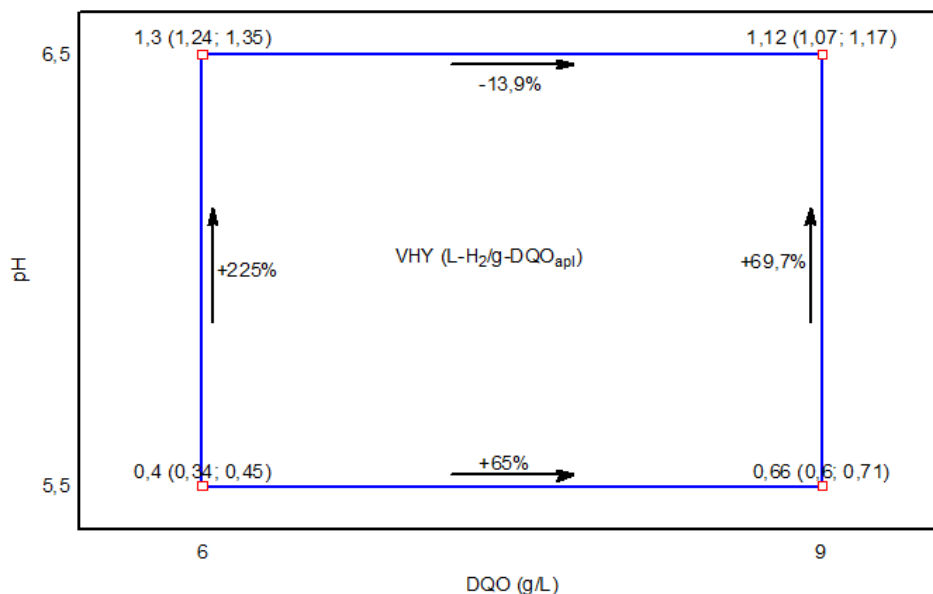
bastante do tipo de substrato. Os autores citam o pH ótimo entre 5 e 6 para resíduos de alimentos, valores de pH mais próximo da neutralidade para águas residuais de processamento animal e pH entre 6.5 e 8.5 para águas residuais de lactato.

A interpretação conjunta dos fatores considerando as interações significativas de segunda ordem é facilitada a partir da análise dos gráficos quadrados de médias previstas que contém as respostas médias de todas as combinações de níveis das variáveis. Neste caso tem-se os efeitos das interações DQO*pH (Figuras 10 e 11), DQO*T (Figuras 12 e 13) e pH*T (Figuras 14 e 15) em relação VHY_{DQOapl} e $VHPR_{DQOapl}$.

5.2.4 Efeito da interação DQO*pH sobre VHY_{DQOapl} e $VHPR_{DQOapl}$

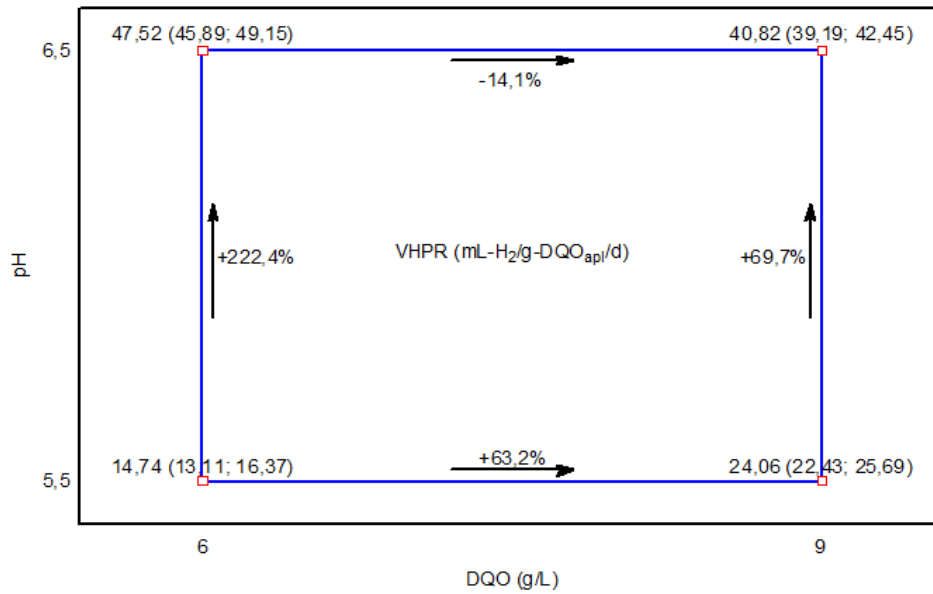
Quanto ao efeito da interação DQO*pH sobre VHY_{DQOapl} (Figura 10) e $VHPR_{DQOapl}$ (Figura 11), observa-se que no menor pH, ao elevar a DQO de 6 g/L para 9 g/L, o rendimento e a taxa de produção de H_2 foram incrementados em +65% e +63,2%, enquanto em pH 6,5 houve reduções de -13,9% e -14,1%, respectivamente. Sob outra perspectiva, em ambas as concentrações iniciais de substrato, o aumento do pH de 5,5 para 6,5 beneficiou tanto o rendimento (acréscimos de +225% a 6 g-DQO/L e +69,7% a 9 g-DQO/L) quanto a taxa de produção (acréscimos de +222,4% a 6 g-DQO/L e +69,7% a 9 g-DQO/L).

Figura 10: Gráfico de médias previstas DQO*pH para VHY_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Figura 11: Gráfico de médias previstas DQO*pH para VHPR_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Os aumentos observados em VHY_{DQOapl} (Figura 10) e VHPR_{DQOapl} (Figura 11) sob pH 5,5 com a elevação da DQO são explicados pelo fato de que a maior concentração de substrato (9 g-DQO/L) forneceu quantidade superior de matéria orgânica a ser degradada pelos microrganismos, resultando em produções maiores de hidrogênio (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019). Situações semelhantes foram relatadas por outros autores ao investigarem o efeito da concentração do substrato na produção de hidrogênio a partir de resíduos agrícolas, conforme exemplos descritos adiante.

No trabalho de Kumar et al. (2018), o acréscimo da concentração de melão entre 10 e 40 g/L favoreceu a fermentação do substrato, atingindo taxa máxima de 142 mL-H₂/h. Entretanto, a partir de 50 g/L houve inibição do crescimento bacteriano e decréscimo da produção.

Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi (2019) ao implementarem a digestão de vinhaça entre 1,7 e 11,6 g-DQO/L verificaram o beneficiamento do rendimento de hidrogênio, enquanto efeito negativo foi observado em DQO acima de 11,6 g/L. O valor máximo de 58,41 mL-H₂/g-DQO_{inicial} foi alcançado a 11,6 g-DQO/L e reduziu até 1,28 mL-H₂/g-DQO_{inicial} na concentração máxima testada de 49,8 g-DQO/L. O decréscimo foi atribuído à toxicidade da vinhaça, a superacidificação do sistema e ao aumento da pressão parcial no headspace.

Resíduos de alimentos pré-tratados termicamente, em concentrações superiores (22,5, 30 e 37,5 g-SV/L) e inferiores (0 e 7,5 g-SV/L) a 15 g-SV/L, apresentaram decréscimo no rendimento de hidrogênio. O ápice da produção foi 75,3 mL-H₂/g-SV (PU et al., 2019). Os

pesquisadores concluíram que nas concentrações mais baixas houve insuficiência de matéria orgânica, enquanto as concentrações mais altas favoreceram o crescimento de bactérias do ácido láctico, provocando queda do pH e diminuição da atividade enzimática.

Aumento na produção de hidrogênio ao elevar a concentração afluyente na mistura de 67% de vinhaça com 33% de melação foi observado no estudo de Albanez et al. (2016). Enquanto a 3 g-DQO/L foram produzidos 0,7 mmol-H₂/g-DQO_{aplicada} (0,8 mmol-H₂/g-DQO_{removida}) e 0,6 mol-H₂/g-SVT/d, na concentração de 6 g-DQO/L os resultados expandiram para 2,2 mmol-H₂/g-DQO_{aplicada} (2,9 mmol-H₂/g-DQO_{removida}) e 2,9 mol-H₂/g-SVT/d.

A partir dos estudos citados é possível observar que concentrações baixas de substrato podem ser insuficientes para o desenvolvimento das bactérias. Em contrapartida, concentrações relativamente altas também podem retardar o metabolismo bacteriano ao provocar acúmulo de ácidos orgânicos, decaimento do pH e aumento da pressão parcial de hidrogênio (P_{H2}) no headspace, a qual provoca acréscimo na quantidade de H₂ dissolvida no meio de fermentação e reduz significativamente o rendimento do processo.

O comportamento inverso das respostas observado em pH 6,5 com o aumento da DQO pode ser devido ao fato de que a aplicação simultânea dos valores superiores de dois fatores (pH 6,5 e DQO 9 g/L) tenha provocado um acúmulo exagerado de gás no início da batelada e aumentado a P_{H2}, o que inibe a atividade das hidrogenases e a continuidade da produção do gás. Isto porque houve colaboração mútua dos fatores para o aumento da pressão parcial no meio, onde o maior pH facilitou a adaptação dos microrganismos ao ambiente menos ácido (MAGDALENA et al., 2023) e a maior concentração de substrato disponibilizou mais carboidrato para a digestão (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019).

Sob o ponto de vista dos acréscimos verificados no rendimento (Figura 10) e na taxa de produção (Figura 11) em ambas as concentrações iniciais de substrato com o aumento do pH, tais fatos podem ser justificados com base na pesquisa de Magdalena et al. (2023). A possível explicação para o melhor desempenho em pH 6,5 seria a maior facilidade de adaptação dos microrganismos ao ambiente com pH mais próximo do habitat natural deles (pH 6,38 do inóculo - Tabela 3). Em adição, um menor acúmulo de ácidos orgânicos neste pH pode ter contribuído para a diminuição da fase lag e a maior produção de H₂, segundo citado por Haque et al. (2022).

No estudo de Magdalena et al. (2023), foram testados os pHs iniciais 5, 6, 7 e 8 na fermentação de resíduos alimentares, resultando na produção máxima de 136 mL-H₂/g-SV_{inicial} em pH 6. O pH original do inóculo que era próximo a 6 foi responsável pelo maior rendimento em pH 6 quando comparado com os demais casos. Foram obtidos 64,2 mL-H₂/g-SV_{inicial} em pH 5, 55 mL-H₂/g-SV_{inicial} em pH 7 e 38,3 mL-H₂/g-SV_{inicial} em pH 8.

Infantes et al. (2011) ao verificarem a influência do pH (4 e 6) e da temperatura (26 e 40 °C) na fermentação acidogênica de solução de glicose, justificaram a maior produção de H₂ obtida em pH 5 e 26 °C, devido ao cultivo utilizado no teste ter sido previamente adaptado para condição de pH 5 em temperatura ambiente por seis meses.

Haque et al. (2022) destacam que ambientes com elevada acidez podem bloquear a atividade enzimática das hidrogenases responsáveis pela produção de hidrogênio, aumentando a duração da fase lag e inibindo o processo de fermentação escura.

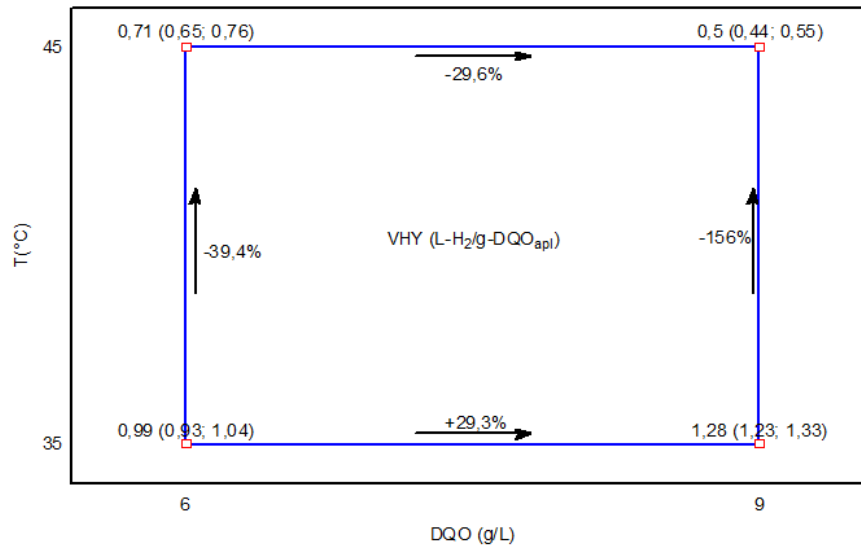
Sunyoto et al. (2017), avaliando o efeito do pH inicial (4, 6 e 8) na produção de hidrogênio de resíduos alimentares verificaram pior desempenho em um pH inicial menor (pH 4), onde as culturas necessitaram de um período de tempo maior para se adaptarem às condições ambientais e produzirem hidrogênio. A taxa de produção e o rendimento atingiram os picos de 651 mL-H₂/L/dia e 1.044 mL-H₂/L, respectivamente, em pH inicial 6, por ser o ambiente que promoveu maior ativação da enzima hidrogenase, inibição das arqueias metanogênicas e formação de solventes. Em pH 8 houve rápido acúmulo de ácidos e decréscimo do pH, enquanto em pH 4 houve diminuição da atividade da hidrogenase.

No trabalho de Tang et al. (2022), foi avaliado o efeito do pH (4 a 11) na produção de hidrogênio a partir de efluente sintético preparado com açúcar mascavo. O pH 5 resultou no maior rendimento de 70,94 mL-H₂/g-SSV que foi 3 vezes maior do que o obtido no pH 4, o qual, por sua vez, causou efeito inibitório no crescimento de bactérias hidrolíticas e acidificou o processo, aumentando a duração da fase lag. O rendimento no pH 5 foi aproximadamente 10%, 31%, 35%, 49%, 17% e 81% superior ao observado nos pHs 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

5.2.5 Efeito da interação DQO*T sobre VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl}

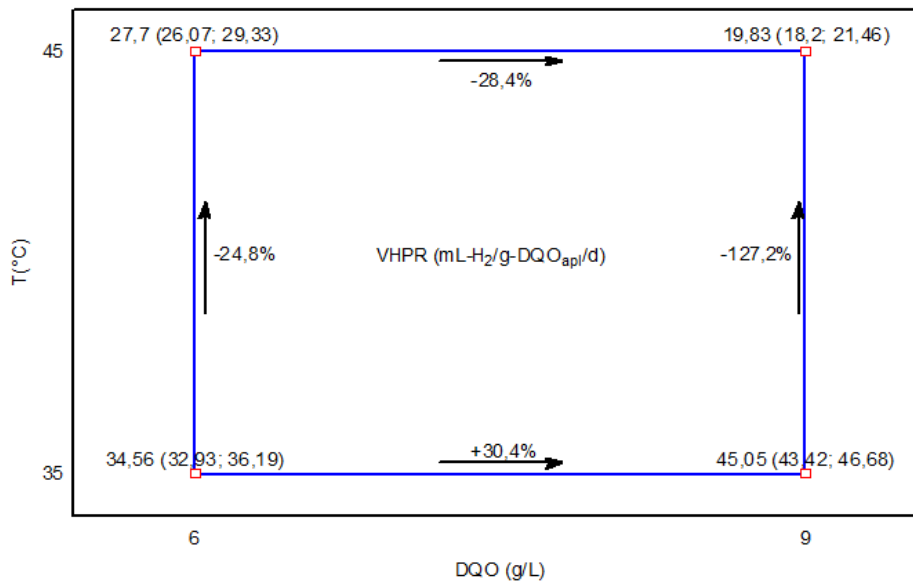
Os efeitos da interação DQO*T sobre VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} são observados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. A 35°C, quando a DQO foi elevada de 6 g/L para 9 g/L, os valores de VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} apresentaram aumentos de +29,3% e +30,4%, enquanto a 45°C as respostas foram reduzidas em -29,6% e -28,4%, na devida ordem. Por outra perspectiva, com as duas concentrações testadas, ao elevar a temperatura de 35 °C para 45 °C houve diminuição em VHY_{DQOapl} (-39,4% a 6 g-DQO/L e -156% a 9 g-DQO/L) e em VHPR_{DQOapl} (-24,8% a 6 g-DQO/L e -127,2% a 9 g-DQO/L).

Figura 12: Gráfico de médias previstas DQO*T para VHY_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Figura 13: Gráfico de médias previstas DQO*T para VHPR_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

A elevação da DQO na temperatura de 35 °C provocou aumento nas respostas. A maior concentração de substrato (9 g-DQO/L) nesta temperatura de 35 °C forneceu quantidade superior de matéria orgânica a ser degradada pelos microrganismos, por isso resultou em maiores produções de hidrogênio (KUMAR et al., 2018; PU et al., 2019).

Em contrapartida, a elevação da DQO na temperatura de 45 °C provocou decréscimos em VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl}. Isto pode ser devido ao aumento da P_{H2} no meio. Ao aplicar temperatura e DQO maiores, provavelmente houve um acúmulo inicial exagerado de gás,

inibindo a continuidade da produção. Neste caso, o aumento da pressão parcial foi possibilitado pela temperatura termofílica que forneceu maior taxa de hidrólise e de formação de H_2 (HAQUE et al., 2022) e pela maior concentração de substrato que disponibilizou mais carboidrato para a digestão (POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019).

As maiores taxas de hidrólise e de formação de produtos possibilitadas na digestão anaeróbia termofílica fazem com que haja maior acúmulo de hidrogênio no meio reacional. Quando o gás vai sendo produzido sem haver retirada simultânea, ocorre o aumento da pressão parcial do hidrogênio e transferência da fase gasosa para a fase líquida, prejudicando o metabolismo bacteriano (HAQUE et al., 2022).

Quanto ao comportamento das respostas com o aumento da temperatura nas duas concentrações testadas, os ambientes mesofílicos resultaram em valores de $VHY_{DQO_{apl}}$ e $VHPR_{DQO_{apl}}$ superiores aos obtidos na condição termofílica. O aumento da temperatura foi prejudicial para o processo digestivo. A aplicação de temperatura mais alta provavelmente causou desativação e perda de enzimas, taxa rápida de morte celular microbiana e conversão incompleta do substrato (CHEN et al., 2022). Além disso, o inóculo mesofílico pode ter contribuído para o baixo desempenho a 45 °C (MAGDALENA et al., 2023).

De acordo com Haque et al. (2022), a maioria dos estudos apresentam maiores produções de hidrogênio com o aumento da temperatura, entretanto, para casos em que o substrato possui concentração elevada de carboidratos, a exemplo da mistura entre vinhaça e melaço, o efeito pode ser inverso. Sattar et al. (2016), por exemplo, verificaram esse fato ao quantificarem o efeito da temperatura na produção de H_2 a partir de diversos resíduos da cultura do arroz. Enquanto palha, casca e farelo de arroz, que contém baixo teor de carboidratos, tiveram a produção favorecida em condições termofílicas (55°C), restos de arroz (alimento) ricos em carboidratos apresentaram melhor produção em temperatura mesofílica (37 °C).

Um possível melhor desempenho na temperatura de 45 °C seria obtido com a utilização de um inóculo proveniente de tratamento termofílico ou até mesmo inóculo mesofílico aclimatado para a temperatura desejada, em concordância com o relatado por Haque et al. (2022) e Infantes et al. (2011), respectivamente.

O estudo de Azbar et al. (2009) avaliou a fermentação acidogênica de efluente de soro de queijo nas temperaturas de 36 e 55 °C, observando maiores rendimento e taxa de produção específica de H_2 a 36 °C (9,2 mmol- H_2 /g-DQO e 5,1 mL- H_2 /g-SSV/h) do que a 55 °C (8,1 mmol- H_2 /g-DQO e 1,1 mL- H_2 /g-SSV/h). O baixo desempenho em ambiente termofílico foi atribuído a utilização de um lodo anaeróbio mesofílico como inóculo e a maior produção de ácido propiônico. Situação semelhante foi relatada por Magdalena et al. (2023), onde a digestão

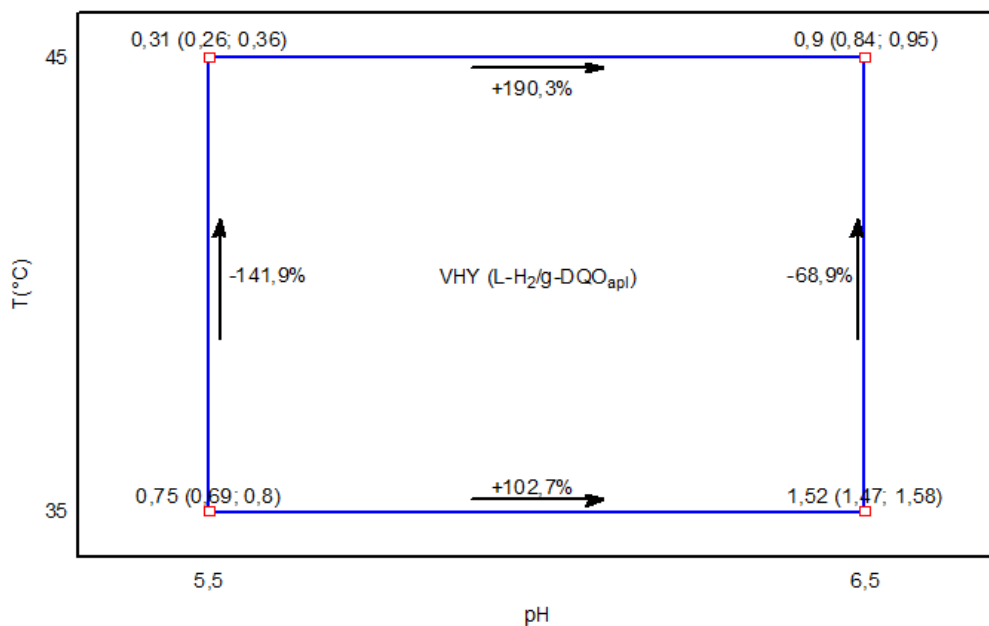
de resíduos alimentares em pH inicial de 5,5 resultou na maior produção de hidrogênio a 37 °C (93 mL-H₂/g-SV_{inicial}) do que nas temperaturas de 25 °C e 50 °C. Neste caso, o inóculo também foi coletado de uma fonte mesófila.

Lovato et al. (2018), a partir da codigestão de soro de queijo com glicerina verificaram maior produtividade de H₂ a 30°C do que a 35°C, trazendo como justificativa que o exagerado crescimento da biomassa a 35°C teria provocado rápido decréscimo na produção.

5.2.6 Efeito da interação pH*T sobre R_m, VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl}

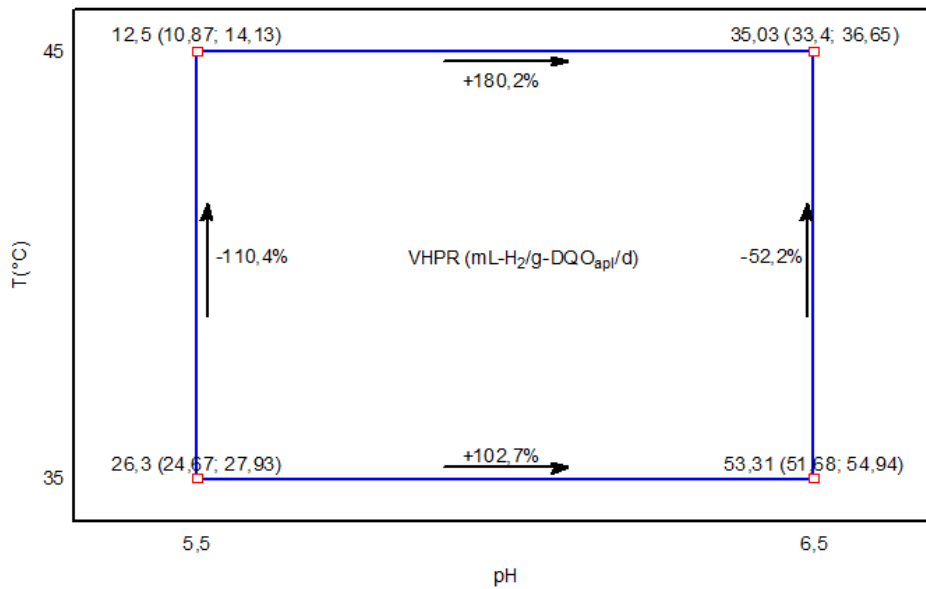
Os efeitos da interação pH*T sobre VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} são visualizados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Nas duas temperaturas avaliadas, quando o pH variou de 5,5 para 6,5, observou-se aumentos em VHY_{DQOapl} (+102,7% a 35 °C e +190,3% a 45 °C) e VHPR_{DQOapl} (+102,7% a 35 °C e +180,2% a 45 °C). Sob o ponto de vista do pH, nos dois valores testados, o aumento da temperatura provocou decréscimo em VHY_{DQOapl} (-141,9% em pH 5,5 e -68,9% em pH 6,5) e VHPR_{DQOapl} (-110,4% em pH 5,5 e -52,2% em pH 6,5).

Figura 14: Gráfico de médias previstas pH*T para VHY_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Figura 15: Gráfico de médias previstas pH*T para VHPR_{DQOapl} (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Foram observados melhores desempenhos das respostas nos ambientes menos ácidos, tanto a 35 °C quanto a 45 °C. Novamente, a justificativa é dada pela maior facilidade de adaptação dos microrganismos ao ambiente com pH mais próximo do pH do inóculo (6,38 – Tabela 3), resultando no aumento das produções de hidrogênio, em concordância com a observação de Magdalena et al. (2023).

Já o efeito negativo dessa interação causado em VHY_{DQOapl} e VHPR_{DQOapl} pela elevação da temperatura nos dois pHs testados foi semelhante ao observado para a interação DQO*T. O aumento da temperatura não foi benéfico para os sistemas. A temperatura mais alta pode ter causado desativação e perda de enzimas, taxa rápida de morte celular microbiana e conversão incompleta do substrato (CHEN et al., 2022).

5.2.7 Análise de variância (ANOVA) dos modelos lineares

A análise de variância utilizada para verificar a qualidade dos ajustes dos dados aos modelos lineares gerados para as variáveis resposta em função dos efeitos é exposta na Tabela 17. Como os efeitos de terceira ordem (DQO*pH*T) foram todos insignificantes e ainda a exclusão dos mesmos não alteram significativamente o valor do R² dos modelos, tais efeitos foram desconsiderados no cálculo da ANOVA para possibilitar a avaliação da falta de ajuste por meio dos testes F.

Os modelos apresentaram bons justes, com $R^2 > 99\%$. Isto indica que, para as respostas, mais de 99% das variações totais em torno das médias são explicadas pelas regressões, restando menos de 1% para os resíduos; além disso, os modelos tiveram valor máximo explicável superiores a 99%.

Ao realizar o teste F da razão $MQ_{\text{regressão}}/MQ_{\text{resíduo}}$ (Tabela 17) tem-se: F calculados (F-calc_{6,9}) iguais 296,69 e 327,13 para $VHY_{DQO_{\text{apl}}}$ e $VHPR_{DQO_{\text{apl}}}$, respectivamente. Como esses valores são superiores ao F tabelado (F-tab_{6,9} = 3,37) no nível de 95% de confiança, é possível verificar que os modelos estatísticos encontrados são significativos.

Por outro lado, para o teste F da razão $MQ_{\text{falta de ajuste}}/MQ_{\text{erro puro}}$, tem-se: F calculados (F-calc_{1,8}) iguais a 0,24 e 1,44 para $VHY_{DQO_{\text{apl}}}$ e $VHPR_{DQO_{\text{apl}}}$, respectivamente, que são menores do que o valor tabelado (F-tab_{1,8} = 5,32). Isto mostra que não há falta de ajuste dos dados e confirma a significância dos modelos lineares, indicando que os mesmos podem ser utilizados para fazer previsões sobre o comportamento das respectivas respostas com a variação da DQO, do pH e da temperatura. A boa predição dos modelos também é confirmada pelos os valores-p equivalentes às faltas de ajustes, visto que são todos não significativos ($\geq 0,05$).

Tabela 17: ANOVA para os modelos lineares das variáveis resposta da Fase 2.

Resposta	R ² (%)	Fonte	GL	SQ	MQ	Valor-F	Valor-P
$VHY_{DQO_{\text{apl}}}$ (L-H ₂ /g-DQO _{apl})	99,497	Regressão	6	3,473086	0,578848	296,69	
		Resíduo	9	0,017556	0,001951		
		Falta de ajuste	1	0,000506	0,000506	0,24	0,639065
		Erro puro	8	0,017050	0,002131		
		Total	15	3,490642			
% máxima de variação explicável: 99,512							
$VHPR_{DQO_{\text{apl}}}$ (mL-H ₂ /g-DQO _{apl} /d)	99,553	Regressão	6	4.103,779	683,96316	327,13	
		Resíduo	9	18,817	2,090778		
		Falta de ajuste	1	2,873	2,873	1,44	0,264223
		Erro puro	8	15,944	1,993		
		Total	15	4.122,596			
% máxima de variação explicável: 99,613							
VHY _{DQO_{apl}} – rendimento volumétrico por carga aplicada; VHPR _{DQO_{apl}} - taxa de produção volumétrica por carga aplicada; GL – grau de liberdade; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática.							

Fonte: Autora (2023).

Na Tabela 18 são apresentados os coeficientes de regressão com seus respectivos erros padrão e significado estatísticos para cada parâmetro dos modelos lineares gerados.

Tabela 18: Coeficientes de regressão, erro padrão e significados estatísticos dos modelos lineares em F2.

Resposta	Fator	Coefficiente	DP (EP)	IC de 95%	Valor-P
VHY _{DQOapl} (L-H ₂ /g-DQO _{apl})	Constante	0,868125	0,011541	(0,8415; 0,8947)	0,000000
	DQO	0,020625	0,011541	(-0,0060; 0,0472)	0,111742
	pH	0,340625	0,011541	(0,3140; 0,3672)	0,000000
	T	-0,265625	0,011541	(-0,2922; -0,2390)	0,000000
	DQO*pH	-0,109375	0,011541	(-0,1360; -0,0828)	0,000013
	DQO*T	-0,125625	0,011541	(-0,1522; -0,0990)	0,000004
	pH*T	-0,048125	0,011541	(-0,0747; -0,0215)	0,003123
VHPR _{DQOapl} (mL-H ₂ /g-DQO _{apl} /d)	Constante	31,78375	0,352930	(30,9699; 32,5976)	0,000000
	DQO	0,65500	0,352930	(-0,1589; 1,4689)	0,100563
	pH	12,38375	0,352930	(11,5699; 13,1976)	0,000000
	T	-8,02000	0,352930	(-8,8339; -7,2061)	0,000000
	DQO*pH	-4,00500	0,352930	(-4,8187; -3,1911)	0,000003
	DQO*T	-4,59125	0,352930	(-5,4051; -3,7774)	0,000001
	pH*T	-1,12250	0,352930	(-1,9364; -0,3086)	0,012987

VHY_{DQOapl} - rendimento volumétrico por carga aplicada; VHPR_{DQOapl} - taxa de produção volumétrica por carga aplicada; DQO - demanda química de oxigênio; T - temperatura; DP (EP) - desvio padrão (erro puro); IC - intervalo de confiança.

Fonte: Autora (2023).

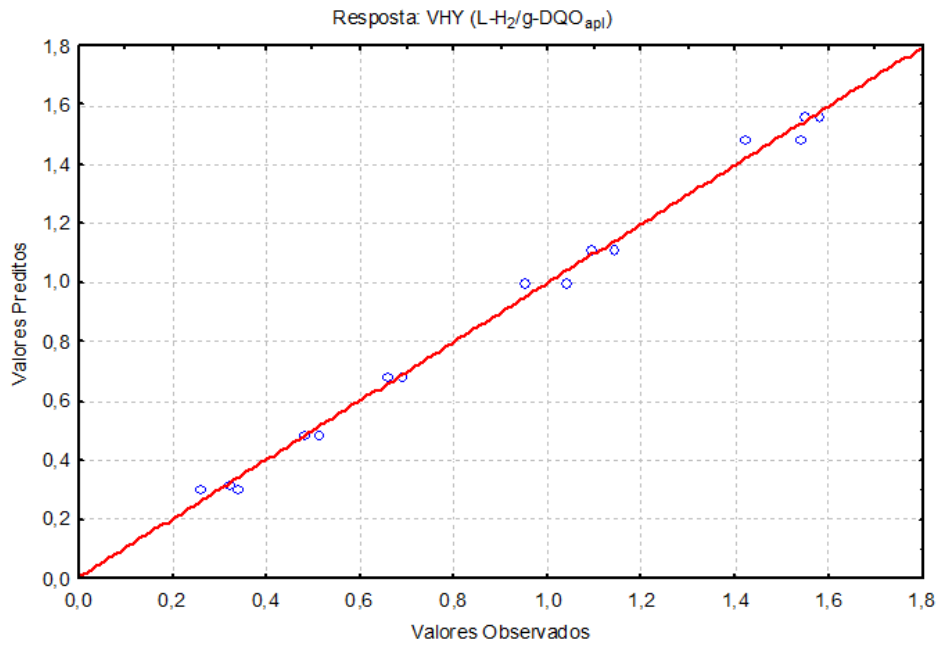
Resgatando os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 18 é possível escrever os modelos lineares para as respostas do planejamento, conforme apresentado nas Equações (34) e (35):

$$\text{VHY}_{\text{DQOapl}} = 0,868 + 0,021x_1 + 0,341x_2 - 0,266x_3 - 0,109x_1x_2 - 0,126x_1x_3 - 0,048x_2x_3 \quad (34)$$

$$\text{VHPR}_{\text{DQOapl}} = 31,784 + 0,655x_1 + 12,384x_2 - 8,020x_3 - 4,005x_1x_2 - 4,591x_1x_3 - 1,123x_2x_3 \quad (35)$$

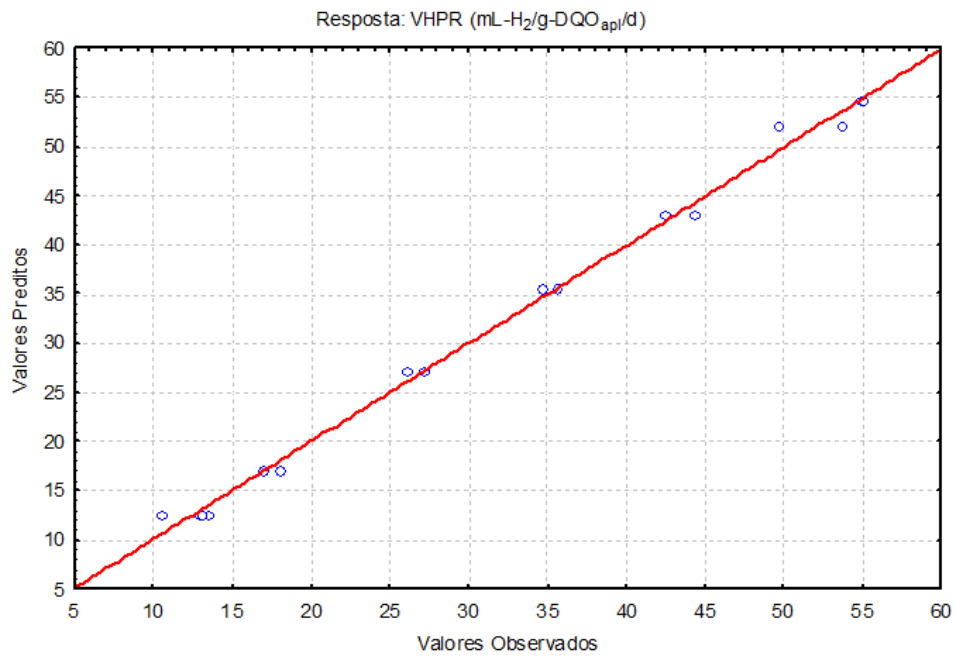
Nas Figuras 16 e 17 é possível ratificar o bom ajuste dos modelos a partir da observação de proximidade entre os valores preditos e os valores observados experimentalmente para as respostas em análise.

Figura 16: Gráfico de valores observados versus valores preditos para $VHY_{DQO_{apl}}$ (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

Figura 17: Gráfico de valores observados versus valores preditos para $VHPR_{DQO_{apl}}$ (IC = 95%).



Fonte: Autora (2023).

6. CONCLUSÃO

A codigestão anaeróbia promovida com a utilização da vinhaça e do melaço de cana-de-açúcar como substratos resultou em altas produções de hidrogênio. Este processo fermentativo pode ser considerado uma boa opção para a geração do gás e o consequente tratamento da vinhaça antes de sua aplicação na fertirrigação visto que ao final do processo houve ainda remoção de matéria orgânica em torno de 20% (remoção de DQO).

Ao testar o efeito interativo de diferentes composições de vinhaça e melaço na produção de hidrogênio (Fase 1), verificou-se que os substratos apresentaram efeitos sinérgicos na codigestão, ou seja, a mistura de substratos beneficiou tanto o rendimento quanto a taxa de produção do gás.

A monodigestão da vinhaça, apesar de apresentar produção elevada de biohidrogênio, foi bastante instável, com rápido decaimento da produtividade diária. Os altos teores de sulfato presentes na vinhaça prejudicaram a fermentação. Verificou-se que a adição de melaço melhorou o processo digestivo em relação a monodigestão de vinhaça. Além disso, foi possível obter modelos quadráticos significativos para as respostas do planejamento de mistura Simplex Lattice (rendimento e taxa de produção).

As condições com monodigestão de vinhaça e 50% de cada substrato resultaram nos piores e melhores rendimentos e taxas de produção por aplicação de DQO e de biomassa. A utilização de 75% e 100% de melaço apresentou resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com a codigestão de 50% melaço + 50% vinhaça. Já a condição com 25% de vinhaça e 75% de melaço, por sua vez, apesar de resultar no maior rendimento por substrato consumido, apresentou instabilidade na produção, com rápido decaimento, não sendo indicada para aplicação em larga escala.

A combinação de 50% de vinhaça com 50% de melaço foi escolhida como a melhor a ser reavaliada na segunda fase do trabalho quanto ao efeito de outros parâmetros no meio reacional. Esta foi a condição utilizando o máximo possível de vinhaça como cosubstrato que resultou na maior e mais estável produção de hidrogênio. A nível industrial, em caso de escassez da vinhaça, como no período de entressafra brasileiro da cana de açúcar, essa condição pode ser substituída pela combinação de 25% de vinhaça com 75% de melaço ou ainda pela monodigestão de melaço, sem haver grandes prejuízos a produção de hidrogênio, já que estas situações apresentaram resultados de rendimento e taxa de produção sem diferenças significativas do ponto de vista estatístico.

Quanto ao efeito das variáveis DQO, pH e temperatura na produção de hidrogênio (fase 2), foi constatado o pH como o fator mais influente e de efeito positivo sobre o rendimento e a taxa de produção volumétrica, enquanto a temperatura revelou efeito com significância negativa e a DQO apresentou influência desprezível.

A combinação da menor temperatura (35°C) com a maior DQO (9 g/L) e o maior pH (6,5) foi responsável pelos maiores valores do rendimento e da taxa de produção, entretanto não houve diferença significativa entre estes resultados e os apresentados pela combinação da menor temperatura com a DQO de 6 g/L e o maior pH. Isto indica que quaisquer destas condições poderia ser implementada sem prejuízo a produção de hidrogênio.

Os modelos lineares relacionando os fatores DQO, pH e T com as variáveis respostas, apesar de apresentarem bom ajuste dos dados, apenas descrevem o comportamento do processo analisado na região investigada, havendo necessidade de estudos complementares e de experimentos extras baseados em planejamentos de superfície de resposta que possam otimizar os resultados.

Por fim, destaca-se que o tratamento térmico aplicado ao lodo fonte de inóculo é realmente eficiente já que não houve produção de metano em nenhuma das fases estudadas.

7. SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Analisar os ácidos orgânicos voláteis produzidos a partir da codigestão de vinhaça e melação;
- ✓ Estudar o possível alongamento de cadeia dos ácidos carboxílicos produzidos junto com o hidrogênio a partir da codigestão de vinhaça e melação visando a obtenção de ácidos de cadeia média;
- ✓ Estudar a produção de ácido capróico a partir da codigestão entre vinhaça e melação;
- ✓ Estudar a produção de ácido láctico a partir da codigestão entre vinhaça e melação;
- ✓ Validar os modelos de regressão obtidos;
- ✓ Realizar um planejamento composto central com os fatores significativos identificados na fase 2 para identificar os valores ótimos dos fatores que maximizam as variáveis resposta;
- ✓ Estudar a codigestão entre vinhaça e melação de cana-de-açúcar para produção de hidrogênio em reatores contínuos;

REFERÊNCIAS

- ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; GABRIEL FILHO, J. B.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Use of anaerobic co-digestion as an alternative to add value to sugarcane biorefinery wastes. **Bioresource Technology**, v. 287, 121443, may. 2019. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121443>.
- 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**, v. 05, n. 07, p. 406-414, 2014. DOI: [10.4236/ajac.2014.57049](https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049).
- AHLBERG-ELIASSON, K.; LIU, T.; NADEAU, E.; SCHNURER, A. Forage types and origin of manure in codigestion affect methane yield and microbial community structure. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 3, p. 740-757, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/gfs.12358>.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; RATUSZNEI, S. M. ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D. Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27-41, jan. 2018. ISSN 0104-6632. DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180351s20150807>.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 20473-20484, dec. 2016. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.145>
- ALBUQUERQUE, J. N. de; ORELLANA, M. R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: start-up strategy and performance optimization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 717-731, apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20170611>.
- ALBUQUERQUE, J. N.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: effects of composition, organic load, feed strategy and temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 251, 109606, dec. 2019. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109606>.
- ALI, R.; SARAIVA, F.; HILLE-REICHEL, A.; HARRER, D.; GESCHER, J.; HORN, H. Enhanced production of propionic acid through acidic hydrolysis by choice of inoculum. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 207-216, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6529>.
- AMORIM, N. C. S.; AMORIM, E. L. C; KATO, M. T.; FLORENCIO, L.; GAVAZZA, S. The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. **Biodegradation**, v. 29, n. 1, p. 41-58, feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-017-9812-y>.

ANZOLA-ROJAS, M. P.; FONSECA, S. G.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M.; ZAIAT, M. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46-54, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2005.

ARCHANA, K.; VISCKRAM, A.S.; SENTHIL KUMAR, P.; MANIKANDAN, S.; SARAVANAN, A.; NATRAYAN, L. A review on recent technological breakthroughs in anaerobic digestion of organic biowaste for biogas generation: challenges towards sustainable development goals. **Fuel**, v. 358, Part B, feb. 2024, 130298. ISSN 0016-2361, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.130298>.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, L. K.; OZTEKIN, R. 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, 2008. DOI: [doi:10.1016/j.ijhydene.2008.01.038](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.038).

ARGUN, H.; ONARAN, G. Effects of N/C, P/C and Fe/C ratios on dark fermentative hydrogen gas production from waste paper towel hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 22, p. 14990-15001, jun. 2017. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.289>.

ARIMI, M. M.; ZHANG, Y.; GOTZ, G.; KIRIAMITI, K.; GEIBEN, S-U. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 34-43, feb. 2014. ISSN 0964-8305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.11.002>.

AZBAR, N.; DOKGÖZ, F. T.; KESKIN, T.; ELTEM, R.; KORKMAZ, K. S.; GEZGIN, Y.; AKBAL, Z.; ÖNCEL, S.; DALAY, M. C.; GÖNEN, Ç. TUTUK, F. Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. **International Journal of Green Energy**, v. 6, n. 2, p. 192-200, apr. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15435070902785027>.

BANU, R. J.; GINNI, G.; KAVITHA, S.; KANNAH, Y. R.; KUMAR, A. S.; BHATIA, S. K.; KUMAR, G. Integrated biorefinery routes of biohydrogen: possible utilization of acidogenic fermentative effluent. **Bioresource Technology**, v. 319, jan. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124241>.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; S.; BRUNS, R.; E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP, Editora Unicamp, ed. 2, 2001.

BERNAL, A. P.; MENEZES, C. A. de; SILVA, E. L. A new side-looking at the dark fermentation of sugarcane vinasse: Improving the carboxylates production in mesophilic EGSB by selection of the hydraulic retention time and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 24, p. 12758-12770, apr. 2021. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.161>.

BERNAL, A. P.; SANTOS, I. F. S. dos; MONI SILVA, A. P.; BARROS, R. M.; RIBEIRO, E. M. Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO₂ emissions. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 260-271, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.064>.

CASTELLÓ, E.; FERRAZ-JUNIOR, N. A. D.; ANDREANI, C.; ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; BORZACCONI, L.; BUITRÓN, G.; CARRILLO-REYES, J.; GOMES, S. D.; MAINTINGUER, S. I.; MORENO-ANDRADE, I. PALOMO-BRIONES, R.; RAZO-FLORES, E.; SCHIAPPACASSE-DASATI, M.; TAPIA-VENEGAS, E.; VALDEZ-VÁZQUEZ, I.; VESGA-BARON, A.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, 109602, mar. 2020. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.

CAVALCANTE, W. A.; GEHRING, T. A.; SANTAELLA, S. T.; FREITAS, I. B. F.; ANGENENT, L. T.; VAN HAANDEL, A. C.; LEITÃO, R. C. Upgrading sugarcane biorefineries: acetate addition allows for conversion of fermented sugarcane molasses into high-value medium chain carboxylic acids. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, 103649, apr. 2020. ISSN 2213-3437. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103649>.

CAVALCANTE, W. de A.; LEITÃO, R. C.; GEHRING, T. A.; ANGENENT, L.T.; SANTAELLA, S. T. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: a review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106-119, mar. 2017. ISSN 1359-5113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>.

CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. **Frontiers of Environmental Science and Engineering in China**, v. 5, n. 1, p. 140-148, mar. 2011. DOI: 10.1007/s11783-010-0258-2.

CHAVES, T. C.; GOIS, G. N. S. B.; PEITER, F. S.; VICH, D. V.; AMORIM, E. L. C. de. Biohydrogen production in an AFBR using sugarcane molasses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 307-316, feb. 2021. ISSN 1615-7591. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02443-0>.

CHEN, H.; WU, J.; HUANG, R.; ZHANG, W.; HE, W.; DENG, Z.; HAN, Y.; XIAO, B.; LUO, H.; QU, W. Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: performance and microbial community characteristics. **Chemosphere**, v. 286, Part 1, 131655, jan. 2022. ISSN 0045-6535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131655>.

CHEN, Y.; YIN, Y.; WANG, J. Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 7, p. 5053-5073, jan. 2021. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.096>.

CHIDTHAISONG, A.; CONRAD, R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 977-988, jul. 2000. ISSN 0038-0717. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00006-7).

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, dec. 2013. ISSN 0956-053X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar** – quadrimestral, v. 11 - safra 2023/24, n. 2 - segundo levantamento, p. 1-59, Brasília, DF, ago. 2023. ISSN 2318-7921. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 30/09/2023.

CONTRERAS-CONTRERAS, J. A.; BERNAL-GONZÁLEZ, M.; SOLÍS-FUENTES, J. A.; DURÁN-DOMÍNGUEZ-DE-BAZÚA, M. del C. Polyphenols from sugarcane vinasses, quantification, and removal using activated carbon after biochemical treatment in laboratory-scale thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors. **Water Air and Soil Pollution**, v. 231, 401, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04733-5>.

CREMONEZ, P. A.; TELEKEN, J. G.; MEIER, W. T. R.; ALVES, H. J. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, 111854, mar. 2021. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111854>.

DAHIYA, S.; CHATTERJEE, S.; SARKAR, O.; MOHAN, S. V. Renewable hydrogen production by dark-fermentation: current status, challenges and perspectives. **Bioresour Technol**, v. 321, 124354, feb. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>.

DEL NERY, V.; ALVES, I.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; PIRES, E. C. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, dec. 2018. ISSN 0961-9534. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REDERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. DOI: 10.1038/168167a0.

ELBESHISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H. S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656-668, nov. 2017. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.

ELREEDY, A.; FUJII, M.; TAWFIK, A. Psychrophilic hydrogen production from petrochemical wastewater via anaerobic sequencing batch reactor: techno-economic assessment and kinetic modelling. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 11, p. 5189-5202, 2019. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.091>.
ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HÉRNANDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 82, p. 1-9, nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HÉRNANDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, 2011. ISSN 1235-1250. DOI: <https://doi.org/10.1177/0734242X10387313>.

FORMANN, S.; HAHN, A.; JANKE, L.; STINNER, W.; STRAUBER, H.; LOGROÑO, W.; NIKOLAUSZ, M. Beyond sugar and ethanol production: value generation opportunities through sugarcane residues. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, 579577, nov. 2020. DOI: [10.3389/fenrg.2020.579577](https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.579577).

FREITAS, I. B. F.; MENEZES, C. A. de; SILVA, E. L. An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. **Fuel**, v. 260, 116419, jan. 2020. ISSN 0016-2361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116419>.

FUESS, L. T.; CRUZ, R. B. C. M.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. Diversifying the portfolio of sugarcane biorefineries: anaerobic digestion as the core process for enhanced resource recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 147, 111246, sept. 2021b. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111246>.

FUESS, L. T.; FUENTES, L.; BOVIO-WINKLER, P.; ENG, F.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, A. O. C do. Full details on continuous biohydrogen production from sugarcane molasses are unraveled: performance optimization, self-regulation, metabolic correlations and quanti-qualitative biomass characterization. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, 128934, jun. 2021a. ISSN 1385-8947. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128934>.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29-40, 2018. ISSN 0048-9697. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Economics of anaerobic digestion for processing sugarcane vinasse: Applying sensitivity analysis to increase process profitability in diversified biogas applications. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 115, p. 27-37, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.007>.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. do. Molasses vs. juice: maximizing biohydrogen production in sugarcane biorefineries to diversify renewable energy generation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, 101534, oct. 2020. ISSN 2214-7144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101534>.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. do. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, 121379, aug. 2019. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. do. Thermophilic biodigestion of fermented sugarcane molasses in high-rate structured-bed reactors: alkalization strategies

define the operating limits. **Energy Conversion and Management**, v. 239, 114203, jul. 2021. ISSN 0196-8904. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114203>.

GARCÍA-DEPRAECT, O.; MUÑOZ, R.; VAN LIER, J. B.; RENE, E. R.; DIAZ-CRUCES, V. F.; LEÓN-BECERRIL, E. Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. **Bioresource Technology**, v. 307, 123160, jul. 2020. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123160>.

GAVAZZA, S.; AMORIM, N. C. S.; KATO, M. T.; FLORENCIO, L.; AMORIM, E. L. C. de. Caproic acid formation by carbon chain elongation during fermentative hydrogen production of cassava wastewater. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2365-2373, may. 2021. ISSN 1877-2641. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01174-3>.

GEBREEYESSUS, G. D.; SREEKRISHNAN, T. R.; MEKONNEN, A.; CHEBUDE, Y.; ALEMAYEHU, E. Efficient anaerobic digestion of a mild wet air pretreated molasses ethanol distillery stillage: a comparative approach. **Heliyon**, v. 6, n. 11, e05539, nov. 2020. ISSN 2405-8440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05539>.

GHIMIRE, A.; TRABLY, E.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G.; CAZIER, E. A.; ESCUDIÉ, R. Effect of total solids content on biohydrogen production and lactic acid accumulation during dark fermentation of organic waste biomass. **Bioresource Technology**, v. 248, Part A, p. 180-186, jan. 2018. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.062>.

GODOI, L. A. G. de; CAMILOTI, P. R.; BERNARDES, A. N.; SANCHEZ, B. L. S.; TORRES, A. P. R.; GOMES, A. da C.; BOTTA, L. S. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 28, p. 29267-29282, oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>.

GOIS, G. N. S. B.; MACÊDO, W. V.; PEITER, F. S.; CHAVES, T. C.; SALES, V. C. R.; BARBOSA, P. A. M. A.; ABUD, A. K. S.; AMORIM, E. L. C. Evaluation of biohydrogen production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor without ph control. **Latin American Applied Research**, v. 51, n. 1, p. 63-69, jan. 2021. DOI: [10.52292/j.laar.2021.504](https://doi.org/10.52292/j.laar.2021.504).

GONZÁLEZ, L. L. M.; REYES, I. P.; ROMERO ROMERO, O. Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. **Waste Management**, v. 68, p. 139-145, 2017. ISSN 0956-053X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.016>.

GONZÁLEZ, L. L. M.; REYES, L. P.; ROMERO ROMERO, O.; BUDDE, J.; HEIERMANN, M.; VERVAEREN, H. Antagonistic effects on the methane yield of liquid hot-water pretreated press mud fractions co-digested with vinasse. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 11, p. 7284-7289, oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b01369>.

GUO, W.; REN, N.-Q.; WANG, X.-J.; XIANG, W.-S.; MENG, Z.-H.; DING, J.; QU, Y.-Y.; ZHANG, L.-S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4981-4988, sept. 2008. ISSN 0360-319. DOI: [0.1016/j.ijhydene.2008.05.033](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.033).

HAGOS, K.; ZONG, J.; LI, D.; LIU, C.; LU, X. Anaerobic co-digestion process for biogas production: progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1485-1496, 2017. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.184>.

HAN, W.; CHEN, H.; JIAO, A.; WANG, Z.; LI, Y.; REN, N. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 843-847, 2012a. ISSN 0360-3199. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2011.04.048](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.048).

HAN, W.; LIU, Z.; FANG, J.; HUANG, J.; ZHAO, H.; LI, Y. Techno-economic analysis of dark fermentative hydrogen production from molasses in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 567-572, jul. 2016. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.055>.

HAN, W.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, D.-X.; WANG, Y.; YUE, L.-R.; LI, Y.-F.; REN, N.-Q. Fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 219-223, jan. 2012b. ISSN 0960-8524. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.01.057](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.057).

HAQUE, S.; SINGH, R.; PAL, D. B.; FAIDAH, H.; ASHGAR, S. S.; AREESHI, M. Y.; ALMALKI, A. H.; VERMA, B.; SRIVASTAVA, N.; GUPTA, V. K. Thermophilic biohydrogen production strategy using agro industrial wastes: current update, challenges, and sustainable solutions. **Chemosphere**, v. 307, Part 4, 136120, nov. 2022. ISSN 0045-6535. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136120>.

HUANG, J.; KHAN, M. T.; PERECIN, D.; COELHO, S. T.; ZHANG, M. Sugarcane for bioethanol production: potential of bagasse in chinese perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, 110296, nov. 2020. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110296>

INFANTES, D.; DEL CAMPO, A. G.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F. J. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 24, p. 15595-15601, dec. 2011. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.061>

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUD, V. V. A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 81-90, sept. 2019. ISSN 1359-5113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.023>.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 10, p. 8338-8342, may. 2012. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.162>.

KARKI, R.; CHUENHART, W.; SURENDRA, K. C.; SHRESTHA, S.; RASKIN, L.; SUNG, S.; HASHIMOTO, A.; KHANAL, K. S. Anaerobic co-digestion: current status and

perspectives. **Bioresource Technology**, v. 330, 125001, jun. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125001>.

KHANAL, S. K.; LU, F.; WONG, J. W. C.; WU, D.; OECHSNER, H. Anaerobic digestion beyond biogas. **Bioresource Technology**, v. 337, 125378, oct. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125378>.

KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T.; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K. Decolorization and biodegradation of melanoidin contained in beet molasses by an anamorphic strain of *Bjerkandera adusta* CCBAS930 and its mutants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02944-w>

KUMAR, A. N.; MOHAN, S. V. Acidogenic valorization of vegetable waste for short chain carboxylic acids and biohydrogen production: influence of pretreatment and pH. **Journal of Cleaner Production**, v. 203, p. 1055-1066, dec. 2018. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.198>.

KUMAR, V.; KOTHARI, R.; PATHAK, V. V.; TYAGI, S. K. Optimization of substrate concentration for sustainable biohydrogen production and kinetics from sugarcane molasses: experimental and economical assessment. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 2, p. 273-281, feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9760-5>.

LAZARO, C. Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: the effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407-6418, apr. 2014. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.058>.

LEE, J.-Y.; WEE, D.; CHO, K.-S. Effects of volatile solid concentration and mixing ratio on hydrogen production by co-digesting molasses wastewater and sewage sludge. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 11, p. 1542-1550, jul. 2014. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02025>.

LEME, R. M.; SEABRA, J. E. A. Technical-economic assessment of different biogas upgrading routes from vinasse anaerobic digestion in the Brazilian bioethanol industry. **Energy**, v. 119, p. 754-766, jan. 2017. ISSN 0360-5442. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.11.029>.

LERTSRIWONG, S.; GLINWONG, C. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on molasses and agricultural wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 51, p. 26812-26821, oct. 2020. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.032>.

LI, J.; AI, B.; REN, N. Effect of initial sludge loading rate on the formation of ethanol type fermentation for hydrogen production in a continuous stirred-tank reactor. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 32, n. 4, p. 1271-1279, dec. 2013. DOI: 10.1002/ep.

LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L.; HE, J. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR).

International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, p. 3274-3283, jun. 2007. ISSN 0360-3199. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.04.023

LI, Y.; CHEN, Y.; WU, J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: a review. **Applied Energy**, v. 240, p. 120-137, apr. 2019. ISSN 0306-2619. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>.

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. DOI: doi:10.1016/S0360-3199(03)00083-1.

LIU, H.; WANG, J.; WANG, A.; CHEN, J. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1333-1340, mar. 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-3066-5.

LÓPEZ, R. A.; TENA, M.; SOLERA, R.; PÉREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and wine vinasse mixtures in single-stage and sequential temperature processes. **Fuel**, v. 348, 128531, 2023. ISSN 0016-2361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128531>.

LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; STRACIERI, L.; RUGGERO, L. S.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: temperature effect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 81-90, oct. 2018. ISSN 1369-703X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.007>.

LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; TRIVELONI, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Methane production by co-digesting vinasse and whey in an AnSBBR: effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 28-46, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2802-7>.

LÜ, F.; WANG, Z.; ZHANG, H.; SHAO, L.; HE, P. Anaerobic digestion of organic waste: recovery of value-added and inhibitory compounds from liquid fraction of digestate. **Bioresource Technology**, v. 333, 125196, aug. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125196>.

MAGDALENA, J. A.; PÉREZ-BERNAL, M. F.; BERNET, N.; TRABLY, E. Sequential dark fermentation and microbial electrolysis cells for hydrogen production: volatile fatty acids influence and energy considerations. **Bioresource Technology**, v. 374, 128803, apr. 2023. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128803>.

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**, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, 2008. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.053>.

MENG, X.; YUAN, X.; REN, J.; WANG, X.; ZHU, W.; CUI, Z. Methane production and characteristics of the microbial community in a two-stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1050-1059, oct. 2017. ISSN 0960-8524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.181>.

MIYNAT, M. E.; ARGUN, H. Prevention of substrate and product inhibitions by using a dilution strategy during dark fermentative hydrogen production from molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 60, p. 34695-34706, dec. 2020. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.03.118>.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3d edition. Wiley: Arizona, 2020

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, jan. 2015. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>

NAIR, L. G.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. **Energy Nexus**, v. 6, 100086, 2022. ISSN 2772-4271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100086>.

NIZ, M. Y. K.; ETCHELET, I.; FUENTES, L.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876-22887, aug. 2019. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 40, p. 17884-17895, oct. 2016. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.135>.

OLIVEIRA, B. G.; MENDES, L. W.; SMYTH, E. M.; TSAI, S. M.; FEIGL, B. J.; MACKIE, R. I. Assessment of microbial diversity associated with CH₄ emission from sugarcane vinasse storage and transportation systems. **Journal of Environmental Management**, v. 269, 110748, may. 2020a. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110748>.

OLIVEIRA, C. A.; FUESS, L. T.; SOARES, L. A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: metabolic and microbial aspects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 4182-4192, jan. 2020b. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.013>.

OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, A.; POL, L. W. H.; LETTINGA, G. Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. **Biotechnol Bioeng**, v. 57, n. 6, p. 676-685, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980320\)57:6%3C676::AID-BIT5%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980320)57:6%3C676::AID-BIT5%3E3.0.CO;2-I).

ORDAZ-DIAZ, L. A.; BAILON-SALAS, A. M. Molecular identification of microbial communities in the methane production from vinasse: a review. **BioResources**, v.15, n.2, p. 4528-4552, may. 2020. DOI: 10.15376/biores.15.2.Diaz.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; INTRASUNGKHA, N.; DHAMWICHUKORN, S.; BIRKELAND, N. K. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich

sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 4, p. 1221-1231, fev. 2008. DOI: [doi:10.1016/j.ijhydene.2007.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.017).

PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C. J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L. Short communication: characterization of molasses chemical composition. **J. Dairy Sci**, v. 103, p. 6244-6249, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17644>.

PARK, M. J.; JO, J. H.; PARK, D.; LEE, D. S.; PARK, J. M. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. **Renewable Energy**, v. 35, n. 12, p. 6194-6202, jun. 2010. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.135>.

PARSAEE, M.; KIANI DEH KIANI, M.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 117-125, mar. 2019. ISSN 0961-9534. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.

PIFFER, M. A.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. do; FUESS, L. T. Dynamics of sulfate reduction in the thermophilic dark fermentation of sugarcane vinasse: a biohydrogen-independent approach targeting enhanced bioenergy production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, 105956, oct. 2021. ISSN 2213-3437. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105956>.

POURESMAEIL, S.; NOSRATI, M.; EBRAHIMI, S. Operating control for enrichment of hydrogen-producing bacteria from anaerobic sludge and kinetic analysis for vinasse inhibition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 103090, jun. 2019. ISSN 2213-3437. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103090>.

PU, Y.; TANG, J.; WANG, X. C.; HU, Y.; HUANG, J.; ZENG, Y.; NGO, H. H.; LI, Y. Hydrogen production from acidogenic food waste fermentation using untreated inoculum: effect of substrate concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 50, p. 27272-27284, oct. 2019. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.230>.

RAMOS, L. R.; LOVATO, G.; RODRIGUES, J. A. D.; SILVA, E. L. Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, 128066, sept. 2021. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128066>.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 29, p. 13081-13089, jul. 2018. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>.

RATNA, S.; RASTOGI, S.; KUMAR, R. Current trends for distillery wastewater management and its emerging applications for sustainable environment. **Journal of Environmental Management**, v. 290, 112544, jul. 2021. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112544>.

REIS, C. M. DOS.; CAROSIA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498-8509, jul. 2015. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.136>.

REN, N.; LI, J.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2147-2157, 2006. ISSN 0360-3199. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2006.02.011](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.011).

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Markets & Statistics Annual Ethanol Production**. U. S. & World ethanol production. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>. Acesso em: 10 de jul. de 2021.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. T. M.; COSTA, H. C. de B.; MOREIRA, F. S.; FERREIRA, J. de S.; BATISTA, F. R. X.; CARDOSO, V. L. Influence of heat pre-treated inoculum and pH control on the hydrogen production by microbial consortium. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 505-512, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ep.12672>.

SÁNCHEZ, F. E.; FUESS, L. T.; CAVALCANTE, G. S.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: an application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, Parte 1, 119378, fev. 2021. ISSN 0016-2361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119378>.

SANTANA JUNIOR, A. E.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. de. Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, 117577, nov. 2019. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.07.052>.

SANTOS, P. S.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O do. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? a dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, 118005, dec. 2019. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118005>.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 17, p. 9000-9011, jun. 2014b. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.241>.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9599-9610, jun. 2014a. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.104>.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource**

Technology, v. 159, p. 55-63, may. 2014c. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.051>.

SAN-VALERO, P.; ABUBACKAR, H. N.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production. **Bioresource Technology**, v. 300, 122659, mar. 2020. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122659>.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P. S.; ARON, N. S. M.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; YAASHIKAA, P. R.; CHEW, K. W.; SHOW, P. L. A review on bioconversion processes for hydrogen production from agro-industrial residues. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 88, p. 37302-37320, oct. 2022. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.055>.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P. S.; KHOO, K. S.; SHOW, P.-L.; CAROLIN, C. F.; JACKULIN, C. F.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment-friendly energy source: production pathways, feedstock types, and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 342, 126021, dec. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126021>.

SATTAR, A.; ARSLAN, C.; JI, C.; SATTAR, S.; UMAIR, M.; SATTAR, S.; BAKHT, M. Z. Quantification of temperature effect on batch production of bio-hydrogen from rice crop wastes in an anaerobic bio reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 26, p. 11050-11061, jul. 2016. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.087>.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Ã. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 86, p. 481-497, 2008. ISSN 0301-4797. DOI: [10.1016/j.jenvman.2006.12.024](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.12.024).

SIDDIQUE, M. N. I.; WAHID, Z. A. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 194, n. 1, p. 359-371, sept. 2018. ISSN 0959-6526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155>

SILLERO, L.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge, wine vinasse and poultry manure for bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 6, p. 3667-3678, jan. 2022. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.11.032>.

SILVA, A. de S. e; MORAIS, N. W. S.; PEREIRA, E. L.; SANTOS, A. B. dos. Fatores que influenciam a produção de ácidos carboxílicos a partir de resíduos agroindustriais. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 5, p. 655- 666, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020190174>.

SILVA, A. F. R.; BRASIL, Y. L.; KOCH, K.; AMARAL, M. C. S. Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion - a review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, 113137, oct. 2021. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113137>.

SILVA, F. M. S.; OLIVEIRA, L. B.; MAHLER, C. F.; BASSIN, J. P. Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 42, n. 36,

p. 22720-22729, sept. 2017. ISSN 0360-3199. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.159>.

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor.

Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, v. 48, n. 13, p. 1707-1716, nov. 2013. ISSN 1707-1716. DOI:

<https://doi.org/10.1080/10934529.2013.815535>.

SOUSA, S. P.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Improvement of sugarcane stillage (vinasse) anaerobic digestion with cheese whey as its co-substrate: achieving high methane productivity and yield.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 189, n. 3, p. 987-1006, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03056-4>.

SUNYOTO, N. M.S.; ZHU, M.; ZHANG, Z.; ZHANG, D. Effect of biochar addition and initial pH on hydrogen production from the first phase of two-phase anaerobic digestion of carbohydrates food waste.

Energy Procedia, v. 105, p. 379-384, may. 2017. ISSN 1876-6102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.329>.

SUNYOTO, N. M.S.; ZHU, M.; ZHANG, Z.; ZHANG, D. Effect of biochar addition and initial pH on hydrogen production from the first phase of two-phase anaerobic digestion of carbohydrates food waste.

Energy Procedia, v. 105, p. 379-384, may. 2017. ISSN 1876-6102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.329>.

TANG, T.; CHEN, Y.; LIU, M.; DU, Y.; TAN, Y. Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification.

Environmental Research, v. 208, 112663, may. 2022. ISSN 0013-9351. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112663>.

TAVARES, T. de G. A.; PEITER, F. S.; CHAVES, T. C.; GOIS, G. N. S. B.; AMORIM, E. L. C de. Effect of thermophilic temperatures on hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactor from cassava wastewater.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 40, p. 115-127, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00222-w>.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49-58, 1996. DOI:

<https://doi.org/10.1007/BF02787869>

TENA, M.; LUQUE, B.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 45, n. 32, p. 5977-5984, jun. 2020. ISSN 0360-3199. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.075>.

TORRES, R. de N. S.; BERTOCO, J. P. A.; ARRUDA, M. C. G. de; COELHO, L. de M.; PASCHOALOTO, J. R.; ALMEIDA JÚNIOR, G. A. de; EZEQUIEL, J. M. B.; ALMEIDA, M. T. C. Meta-analysis to evaluate the effect of including molasses in the diet for dairy cows on performance, milk fat synthesis and milk fatty acid.

Livestock Science, v. 250, 104551, aug. 2021. ISSN 1871-1413. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104551>.

VIANA, M. B.; DAMS, R. I.; PINHEIRO, B. M.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T.; SANTOS, A. B. dos. The source of inoculum and the method of methanogenesis inhibition can affect biological hydrogen production from crude glycerol. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 3, p. 733-742, sept. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09994-5>.

VILELA, R.; SAIA, F. T.; GREGORACCI, G. B.; DUARTE, R.; ANDRADE, P.; VAN DER ZAAN, B.; LANGENHOFF, A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Hydrogen production in reactors: the influence of organic loading rate, inoculum and support material. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 50, p. 27259-27271, oct. 2019. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.180>.

VILELA, R. S.; FUESS, L. T.; SAIA, F. T.; SILVEIRA, C. R. M.; OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, P. A.; LANGENHOFF, A.; VAN DER ZAAN, B.; COP, F.; GREGORACCI, G. B. Biofuel production from sugarcane molasses in thermophilic anaerobic structured-bed reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, 110974, mar. 2021. ISSN 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110974>.

VOLPI, M. P. C.; FUESS, L. T.; MORAES, B. S. Anaerobic co-digestion of residues in 1G2G sugarcane biorefineries for enhanced electricity and biomethane production. **Bioresource Technology**, v. 330, 124999, mar. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124999>.

VRIEZE, J. D.; PLOVIE, K.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Co-digestion of molasses or kitchen waste with high-rate activated sludge results in a diverse microbial community with stable methane production. **Journal of Environmental Management**, v. 152, p. 75-82, apr. 2015. ISSN 0301-4797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.029>.

WAINAINA, S.; LUKITAWESA; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437-458, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>.

WANG, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 11, p. 4361-4367, apr. 2013. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.120>.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63-102, 2000. ISSN 0961-953. PII: S0961-9534(00)00017-9

WU, D.; PENG, X.; LI, L.; YANG, P.; PENG, Y.; LIU, H.; WANG, X. Commercial biogas plants: review on operational parameters and guide for performance optimization. **Fuel**, v. 303, 121282, nov. 2021a. ISSN 0016-2361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121282>.

WU, H.; DALKE, R.; MAI, J.; HOLTZAPPLE, M.; URGUN-DEMIRTAS, M. Arrested methanogenesis digestion of high-strength cheese whey and brewery wastewater with carboxylic acid production. **Bioresource Technology**, v. 332, 125044, jul. 2021b. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125044>.

YANG, G.; WANG, J. Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue: effect of various substrate concentrations. **Fuel**, v. 237, p. 1203-1208, 2019. ISSN 0016-2361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.026>.

ZHANG, S.; WANG, J.; JIANG, H. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. **Food Chemistry**, v. 346, 128860, jun. 2021. ISSN 0308-8146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128860>.

ZHANG, H.; FU, Z.; GUAN, D.; ZHAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; XIE, J.; SUN, Y.; GUO, L.; WANG, D. A comprehensive review on food waste anaerobic co-digestion: current situation and research prospect. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 179, p. 546-558, 2023. ISSN 0957-5820. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.09.030>.

ZHENG, X.; HU, R.; CHEN, D.; CHEN, J.; HE, W.; HUANG, L.; LIN, C.; CHEN, H.; CHEN, Y.; ZHU, J. Lipid and carotenoid production by the *Rhodospiridium toruloides* mutant in cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 326, 124816, apr. 2021. ISSN 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124816>.

ZHU, G.; LIU, C.; LI, J.; REN, N.; LIU, L.; HUANG, X. Fermentative hydrogen production from beet sugar factory wastewater treatment in a continuous stirred tank reactor using anaerobic mixed consortia. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 7, n. 1, p. 143-150, feb. 2013. DOI: 10.1007/s11783-012-0456-1.

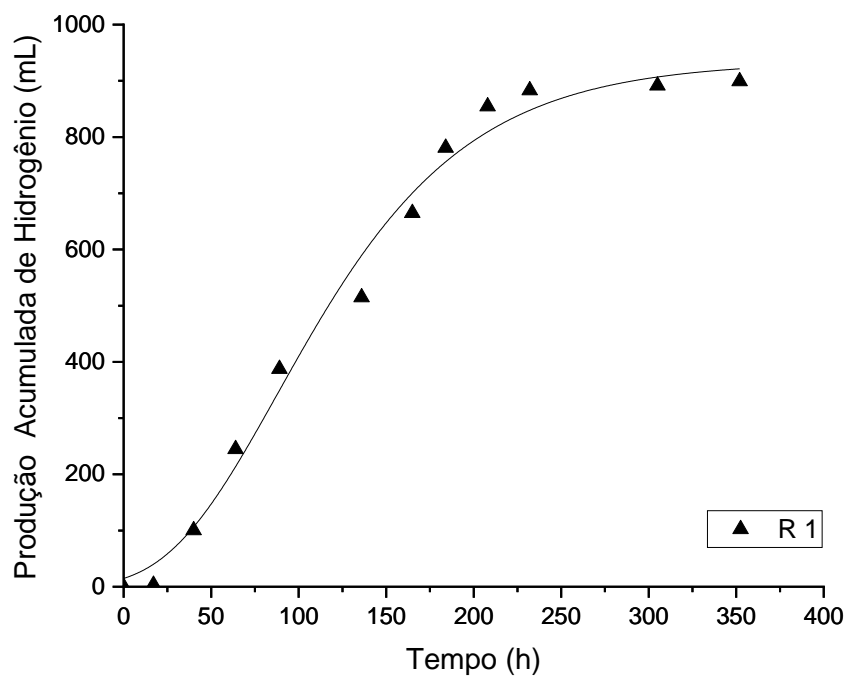
ZIARA, R. M. M.; MILLER, D. N.; SUBBIAH, J.; DVORAK, B. I. Lactate wastewater dark fermentation: the effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 2, p. 661-673, jan. 2019. ISSN 0360-3199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.045>.

APÊNDICE A – DADOS DE PRODUÇÃO VOLUMÉTRICA ACUMULADA DE H₂ AO LONGO DO TEMPO NA FASE 1 E GRÁFICOS INDIVIDUAIS AJUSTADOS AO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO

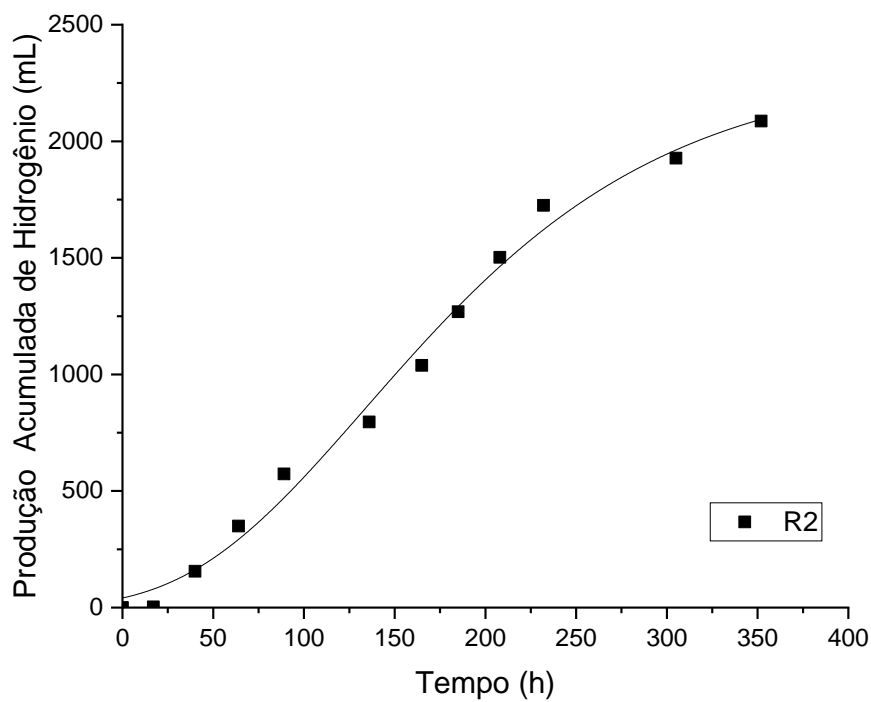
Tabela A1: Dados de produção de acumulada de H₂ em mL ao decorrer do tempo em horas (h) para as condições da fase 1.

R1 (V₁₀₀/M₀)		R2 (V₇₅/M₂₅)		R3 (V₅₀/M₅₀)		R4 (V₂₅/M₇₅)		R5 (V₀/M₁₀₀)	
Tempo	H₂ acumulado	Tempo	H₂ acumulado	Tempo	H₂ acumulado	Tempo	H₂ acumulado	Tempo	H₂ acumulado
0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
17	3,37 ± 0,15	17	6,74 ± 3,72	18	55,81 ± 0,75	18	70,94 ± 0,04	19	84,29 ± 7,56
40	100,47 ± 5,70	40	160,33 ± 4,41	40	231,81 ± 8,00	41	255,05 ± 0,23	41	239,97 ± 8,57
64	244,74 ± 5,96	64	358,65 ± 9,22	65	494,61 ± 7,39	66	494,21 ± 4,23	66	440,72 ± 11,08
89	387,51 ± 13,57	89	576,25 ± 3,17	90	763,31 ± 7,45	90	751,82 ± 14,15	91	672,69 ± 13,81
136	514,99 ± 18,97	136	793,25 ± 2,73	137	1.008,98 ± 14,58	137	993,78 ± 31,83	138	888,22 ± 16,70
165	664,83 ± 24,26	165	1.028,11 ± 10,68	166	1.269,92 ± 24,18	166	1.252,88 ± 38,25	167	1.142,15 ± 19,32
184	780,95 ± 26,29	185	1.257,69 ± 11,03	185	1.541,88 ± 23,70	186	1.511,62 ± 45,25	186	1.408,98 ± 28,42
208	854,57 ± 29,65	208	1.487,20 ± 15,28	209	1.815,41 ± 23,87	209	1.769,47 ± 55,50	210	1.676,18 ± 39,14
232	883,18 ± 29,55	232	1.706,83 ± 18,14	233	2.076,50 ± 20,76	233	2.025,22 ± 65,84	234	1.944,97 ± 47,63
305	891,49 ± 29,62	305	1.919,44 ± 8,23	306	2.326,31 ± 24,02	306	2.270,51 ± 69,19	306	2.209,05 ± 54,06
352	899,31 ± 29,61	352	2.084,92 ± 1,55	353	2.590,75 ± 20,11	353	2.522,34 ± 74,97	354	2.480,25 ± 55,56
				376	2.847,71 ± 15,43	377	2.772,13 ± 74,11	377	2.749,83 ± 60,37

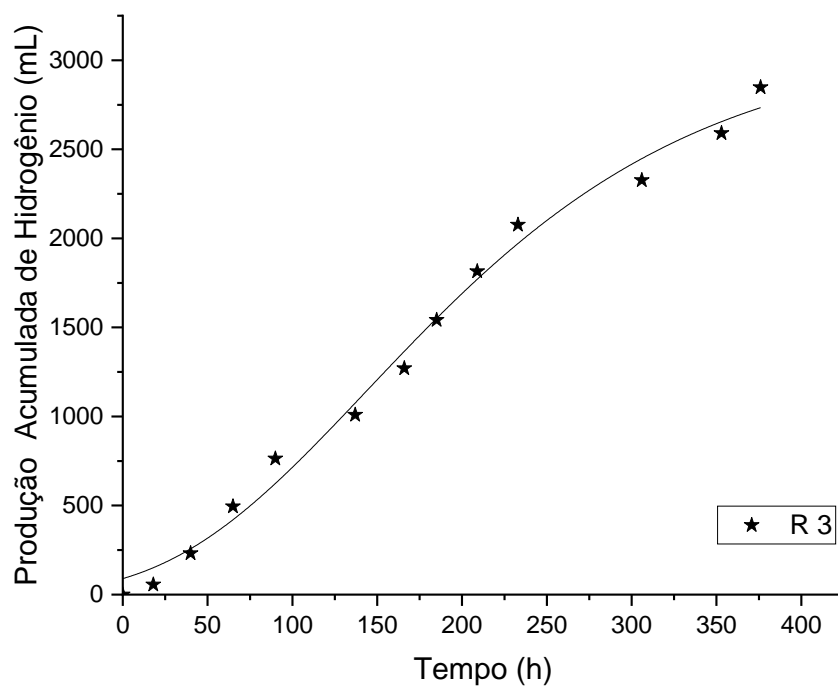
Fonte: Autora (2023).

Figura A1: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para R1 (V₁₀₀/M₀).

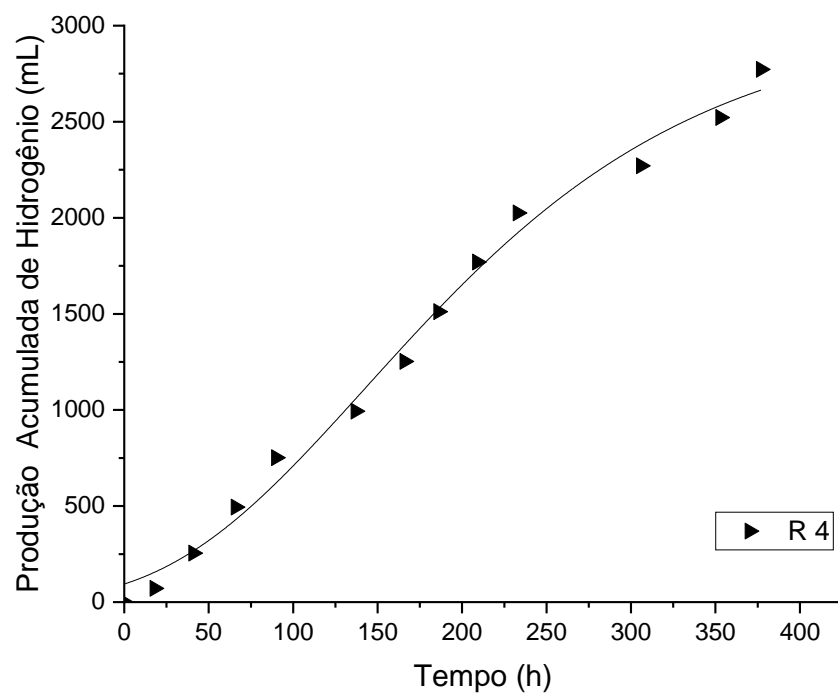
Fonte: Autora (2023).

Figura A2: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para R2 (V₇₅/M₂₅).

Fonte: Autora (2023).

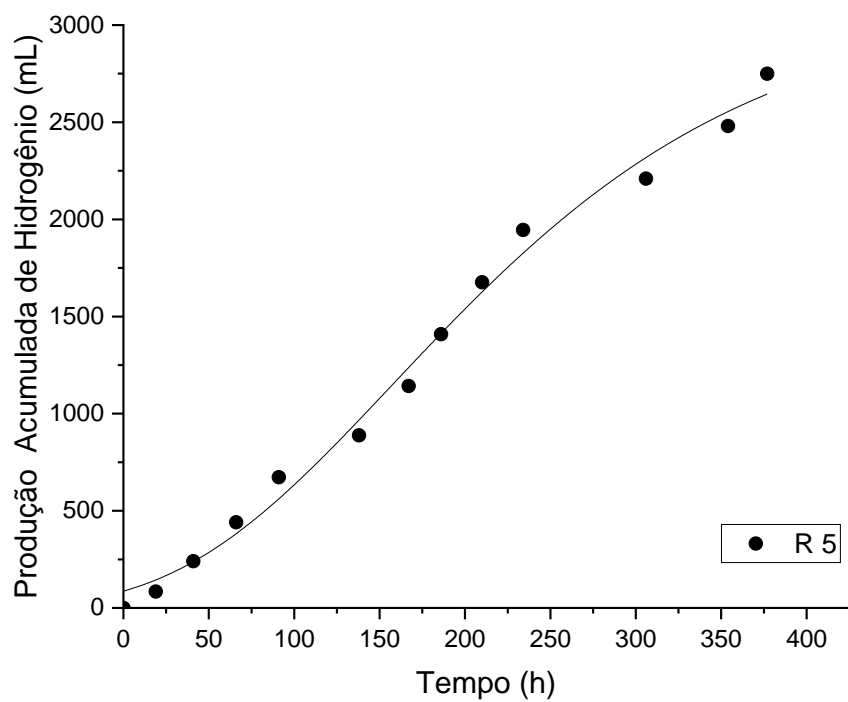
Figura A3: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para R3 (V₅₀/M₅₀).

Fonte: Autora (2023).

Figura A4: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para R4 (V₂₅/M₇₅).

Fonte: Autora (2023).

Figura A5: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para R5 (V_{100}/M_0).



Fonte: Autora (2023).

**APÊNDICE B – DADOS DE PRODUÇÃO VOLUMÉTRICA ACUMULADA DE H₂
AO LONGO DO TEMPO NA FASE 2 E GRÁFICOS INDIVIDUAIS AJUSTADOS AO
MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO**

Tabela B1: Dados de produção de acumulada de H₂ em mL ao decorrer do tempo em horas (h) para as condições da fase 2 (continua).

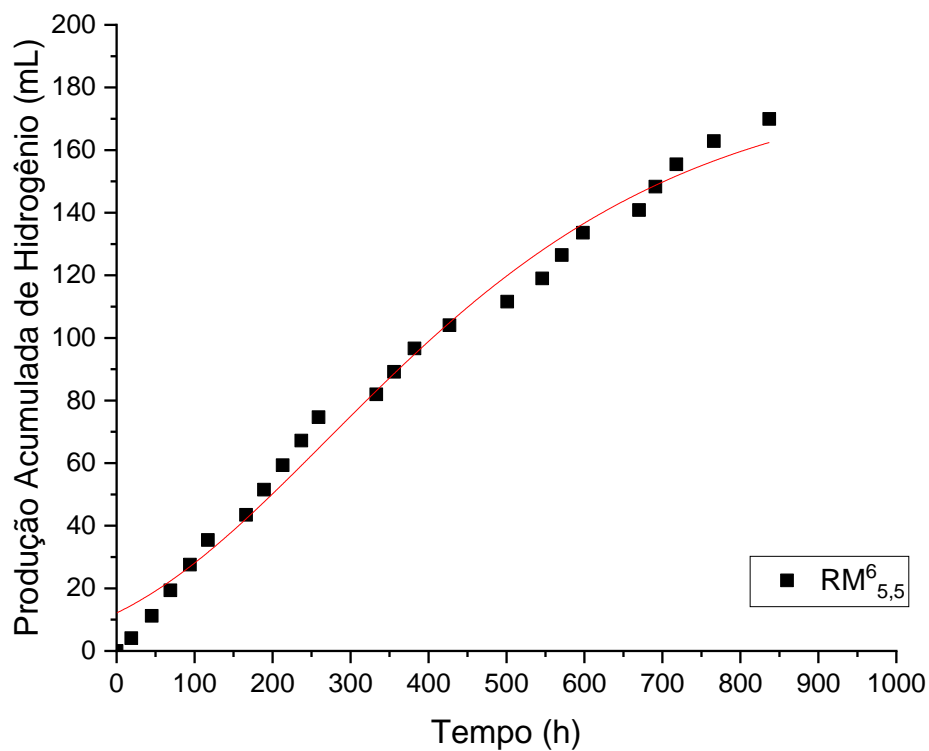
RM ⁶ _{5,5}		RM ⁹ _{5,5}		RM ⁶ _{6,5}		RM ⁹ _{6,5}	
H	mL-H ₂	h	mL-H ₂	h	mL-H ₂	h	mL-H ₂
0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
19	4,08 ± 0,07	19	1,19 ± 0,04	20	17,72 ± 0,10	20	25,84 ± 1,74
45	11,19 ± 0,39	46	26,71 ± 0,99	46	39,37 ± 0,12	46	61,66 ± 3,36
69	19,38 ± 0,81	70	53,35 ± 0,38	70	60,79 ± 0,05	70	98,02 ± 3,14
94	27,58 ± 1,33	94	78,96 ± 0,31	95	81,57 ± 0,25	95	137,03 ± 5,46
117	35,44 ± 1,70	118	104,40 ± 0,33	118	102,57 ± 0,41	118	175,45 ± 7,12
166	43,48 ± 2,54	166	129,08 ± 0,06	167	123,51 ± 0,49	167	214,18 ± 5,80
189	51,49 ± 2,90	189	154,04 ± 0,25	190	144,31 ± 0,24	190	254,72 ± 5,99
213	59,31 ± 3,21	214	179,44 ± 0,44	214	165,22 ± 0,39	214	293,70 ± 5,96
237	67,21 ± 3,57	237	204,81 ± 0,79	238	185,59 ± 0,58	238	331,49 ± 6,40
259	74,67 ± 3,95	260	230,11 ± 0,36	260	205,65 ± 0,44	260	369,75 ± 6,64
333	81,96 ± 4,53	334	254,81 ± 1,53	334	225,88 ± 0,55	334	407,27 ± 6,54
356	89,17 ± 4,89	356	280,15 ± 2,48	357	245,99 ± 0,39	357	445,21 ± 6,77
382	96,65 ± 5,32	382	305,23 ± 3,69	382	265,78 ± 0,61	383	482,06 ± 6,86
427	104,07 ± 5,59	428	331,07 ± 4,37	428	286,25 ± 1,20	428	519,56 ± 5,92
501	111,57 ± 6,03	502	357,08 ± 6,10	502	306,20 ± 0,99	502	558,03 ± 7,74
546	118,97 ± 6,36	547	384,96 ± 8,70	547	327,15 ± 1,19	548	595,80 ± 8,75
571	126,48 ± 6,68	571	411,07 ± 11,65	572	346,73 ± 1,30	572	632,08 ± 9,26
598	133,62 ± 6,93	598	437,21 ± 14,18	599	366,44 ± 1,58	599	668,54 ± 9,41
670	140,85 ± 7,35	670	462,56 ± 16,26	670	385,77 ± 1,87	671	707,25 ± 12,55
691	148,29 ± 7,81	691	488,12 ± 18,53	692	405,12 ± 2,28	692	742,54 ± 12,50
718	155,45 ± 7,87	718	512,84 ± 21,14	718	424,04 ± 2,25	719	777,30 ± 12,84
766	162,87 ± 8,09	766	537,52 ± 23,58	767	442,59 ± 2,44	767	813,11 ± 13,58
837	169,92 ± 8,26	838	561,33 ± 26,14	838	461,16 ± 2,64	838	847,87 ± 13,78

Tabela B1: Dados de produção de acumulada de H₂ em mL ao decorrer do tempo em horas (h) para as condições da fase 2.

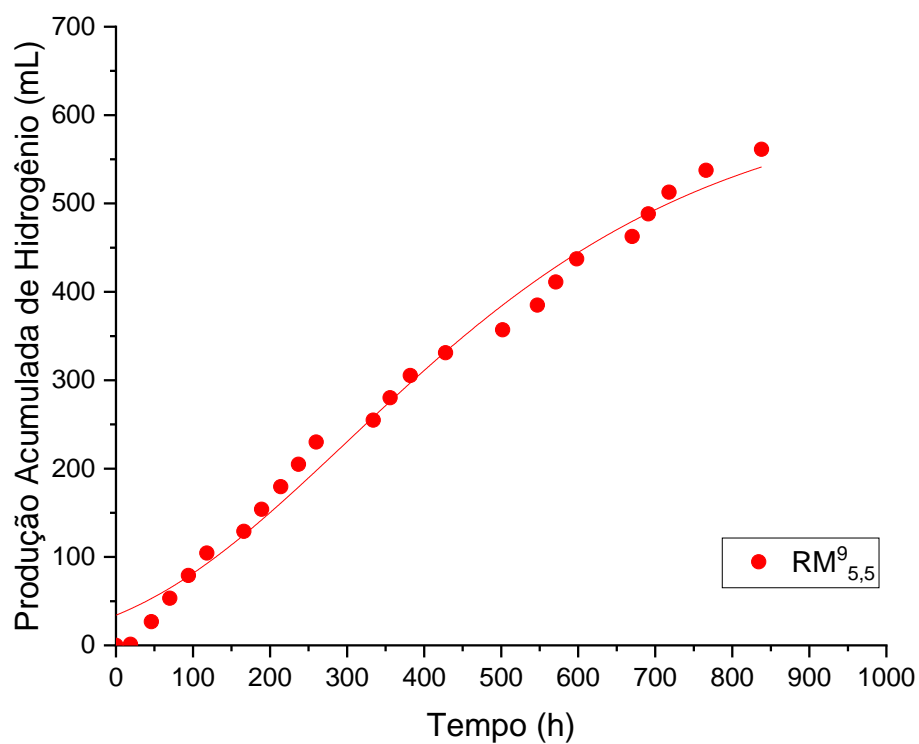
RT ⁶ _{5,5}		RT ⁹ _{5,5}		RT ⁶ _{6,5}		RT ⁹ _{6,5}	
H	mL-H ₂	h	mL-H ₂	h	mL-H ₂	h	mL-H ₂
0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
20	2,47 ± 1,19	21	1,94 ± 0,79	21	14,59 ± 0,22	24	19,66 ± 0,33
44	7,06 ± 1,64	44	11,13 ± 0,37	45	30,74 ± 0,49	46	39,57 ± 0,85
92	11,88 ± 2,14	92	19,84 ± 0,05	93	46,61 ± 0,32	70	59,54 ± 0,98
117	16,53 ± 2,68	118	28,77 ± 0,40	118	62,56 ± 0,55	93	79,34 ± 0,75
142	21,03 ± 3,28	142	37,62 ± 0,65	143	79,17 ± 0,50	167	98,57 ± 1,18
166	25,73 ± 3,84	167	46,46 ± 1,00	167	95,29 ± 0,65	189	117,14 ± 1,16
188	30,22 ± 4,25	188	55,11 ± 1,05	189	110,71 ± 1,07	215	136,76 ± 1,11
213	34,95 ± 4,85	213	64,08 ± 1,03	213	126,67 ± 1,02	239	156,38 ± 0,76
287	39,46 ± 5,48	287	72,62 ± 0,95	287	141,36 ± 1,13	263	175,80 ± 0,65
309	43,86 ± 5,95	309	81,20 ± 1,01	309	156,20 ± 1,90	334	194,78 ± 0,24
334	48,26 ± 6,16	335	89,95 ± 1,23	335	172,20 ± 2,20	359	213,89 ± 0,07
356	52,95 ± 6,77	356	98,52 ± 1,61	357	188,27 ± 2,13	383	232,30 ± 0,11
380	57,49 ± 7,33	380	107,31 ± 1,85	381	203,77 ± 2,05	406	250,85 ± 0,03
452	62,01 ± 7,83	452	115,79 ± 1,99	453	219,09 ± 1,71	431	268,96 ± 0,15
476	66,35 ± 8,25	476	124,12 ± 1,99	477	234,24 ± 1,79	503	286,42 ± 0,36
500	70,73 ± 8,63	501	132,24 ± 2,11	501	248,34 ± 2,16	526	304,04 ± 0,54
524	75,08 ± 9,24	525	140,23 ± 2,30	525	262,87 ± 2,50	550	321,83 ± 0,48
548	79,31 ± 9,65	549	148,23 ± 2,37	549	276,94 ± 2,40	574	339,48 ± 0,55
620	83,36 ± 9,98	621	155,98 ± 2,33	621	290,94 ± 2,94	597	356,16 ± 0,95
644	87,36 ± 10,42	644	163,37 ± 2,65	645	305,21 ± 2,80	669	373,23 ± 1,06
670	91,36 ± 10,88	669	170,68 ± 3,00	669	319,41 ± 2,84	693	389,96 ± 1,42
692	95,27 ± 11,36	692	177,77 ± 3,49	693	333,23 ± 2,72		

RM⁶_{5,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁹_{5,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁶_{6,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RM⁹_{6,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁶_{5,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁹_{5,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁶_{6,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁹_{6,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L.

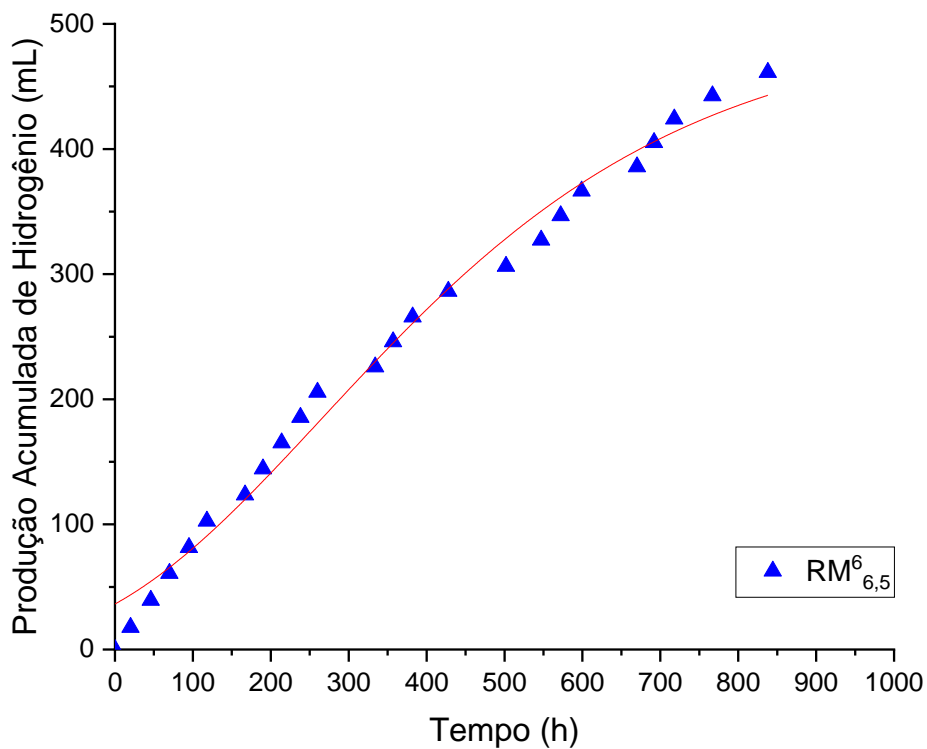
Fonte: Autora (2023)

Figura B1: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RM⁶_{5,5}.

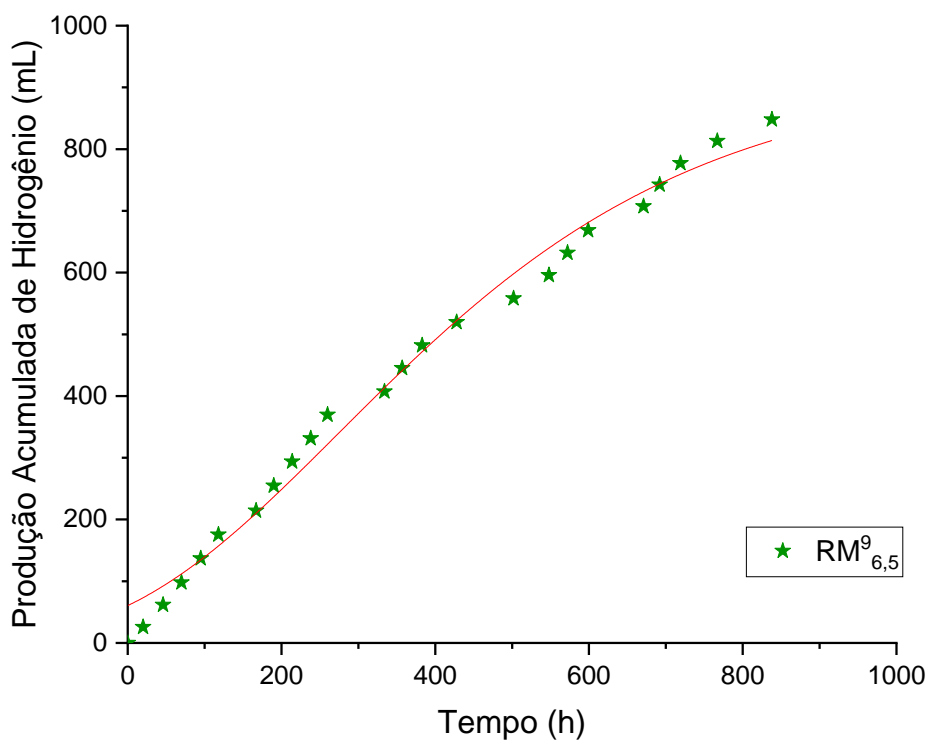
Fonte: Autora (2023).

Figura B2: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RM⁹_{5,5}.

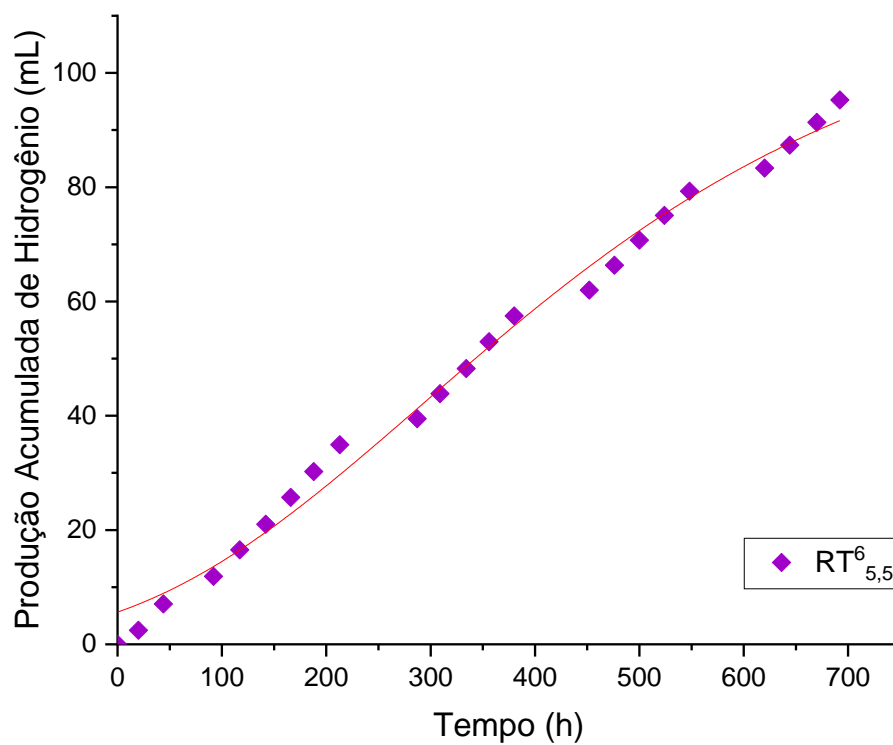
Fonte: Autora (2023).

Figura B3: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RM⁶_{6,5}.

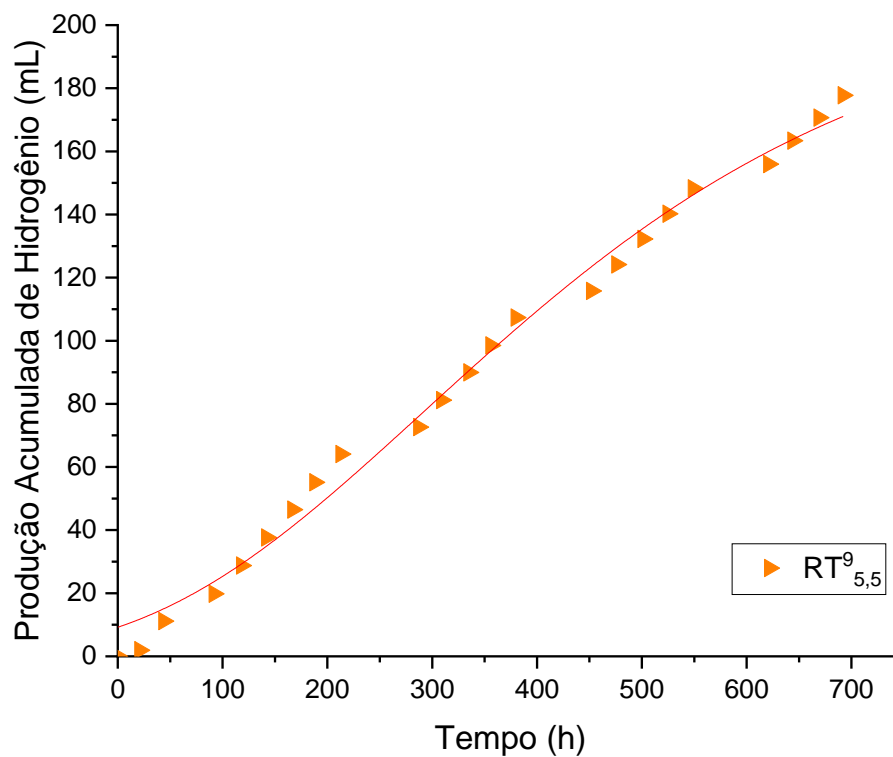
Fonte: Autora (2023).

Figura B4: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RM⁹_{6,5}.

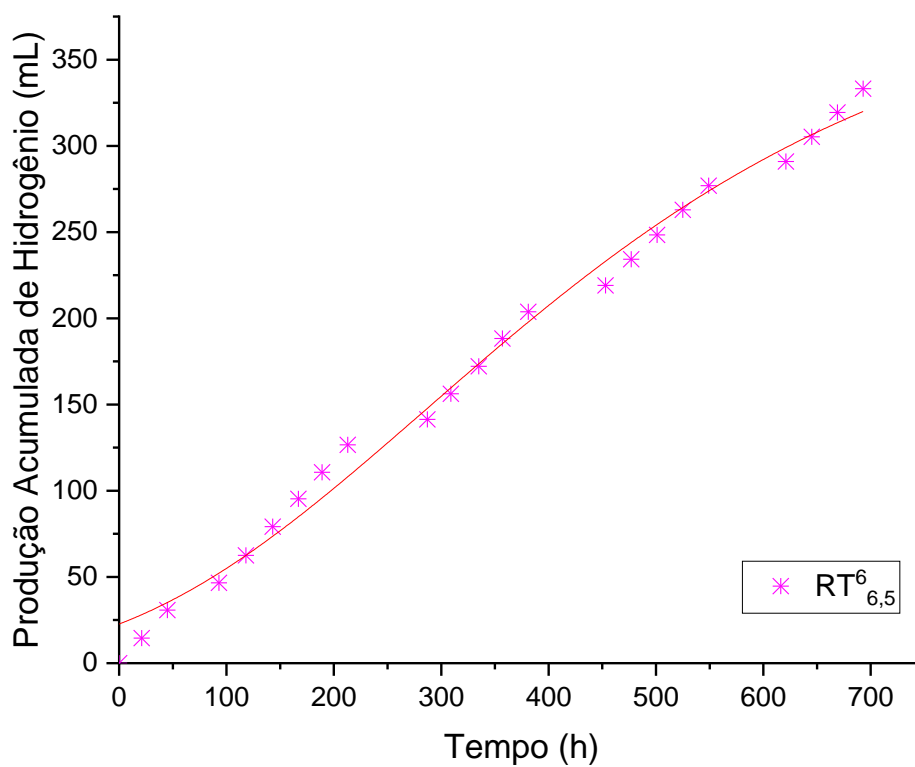
Fonte: Autora (2023).

Figura B5: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RT⁶_{5,5}.

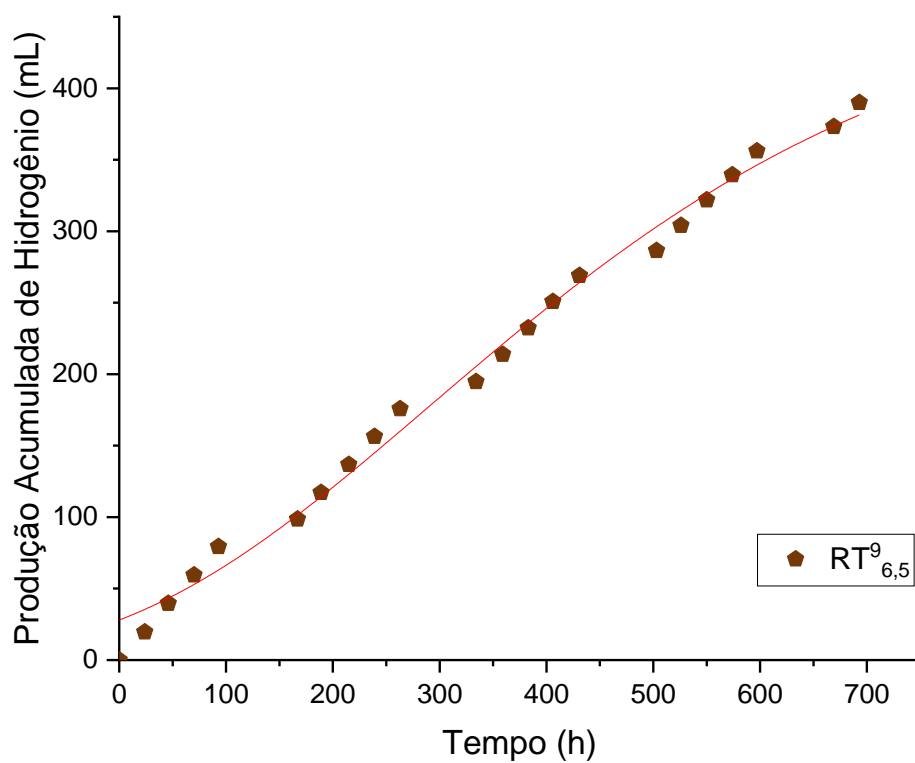
Fonte: Autora (2023).

Figura B6: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RT⁹_{5,5}.

Fonte: Autora (2023).

Figura B7: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RT⁶_{6,5}.

Fonte: Autora (2023).

Figura B8: Produção acumulada de H₂ e ajuste ao modelo de Gompertz Modificado para RT⁹_{6,5}.

Fonte: Autora (2023).

Tabela B2: Parâmetros indicadores de desempenho para as condições avaliadas na Fase 2.

Parâmetro	RM ⁶ _{5,5}	RM ⁹ _{5,5}	RM ⁶ _{6,5}	RM ⁹ _{6,5}	RT ⁶ _{5,5}	RT ⁹ _{5,5}	RT ⁶ _{6,5}	RT ⁹ _{6,5}
HY	0,32 ± 0,01 d	0,60 ± 0,06 bc	0,80 ± 0,06 ab	0,83 ± 0,07 ab	0,32 ± 0,02 d	0,38 ± 0,00 cd	0,92 ± 0,02 a	0,64 ± 0,01 b
E _{H2}	7,97 ± 0,34 d	15,11 ± 1,56 bc	19,95 ± 1,54 ab	20,77 ± 1,77 ab	8,11 ± 0,42 d	9,42 ± 0,11 cd	22,95 ± 0,44 a	16,09 ± 0,21 b
HPR _{VR}	0,10 ± 0,01 e	0,33 ± 0,01 b	0,27 ± 0,00 c	0,50 ± 0,00 a	0,06 ± 0,01 f	0,12 ± 0,00 e	0,22 ± 0,00 d	0,26 ± 0,00 c
MHY _{DQOapl}	17,98 ± 0,40 cd	36,21 ± 1,62 b	53,71 ± 2,29 a	56,73 ± 0,48 a	10,91 ± 1,42 e	11,53 ± 0,08 de	40,33 ± 0,90 b	24,61 ± 0,52 c
VHY _{DQOapl}	0,50 ± 0,01 cd	1,00 ± 0,04 b	1,48 ± 0,06 a	1,56 ± 0,01 a	0,30 ± 0,04 e	0,32 ± 0,00 de	1,11 ± 0,02 b	0,68 ± 0,01 c
MHPR _{DQOapl}	0,63 ± 0,02 e	1,28 ± 0,02 c	1,88 ± 0,07 a	2,00 ± 0,00 a	0,41 ± 0,05 e	0,44 ± 0,00 e	1,48 ± 0,03 b	0,91 ± 0,02 d
VHPR _{DQOapl}	17,47 ± 0,56 e	35,12 ± 0,50 c	51,65 ± 2,04 a	54,98 ± 0,05 a	12,01 ± 1,46 e	13,00 ± 0,07 e	43,39 ± 0,90 b	26,66 ± 0,53 d
MHY _{DQOrem}	0,08 ± 0,00 de	0,42 ± 0,06 ab	0,27 ± 0,03 bc	0,46 ± 0,00 a	0,04 ± 0,00 e	0,08 ± 0,01 de	0,21 ± 0,03 cd	0,17 ± 0,01 cde
VHY _{DQOrem}	2,22 ± 0,11 de	11,51 ± 1,68 ab	7,31 ± 0,92 bc	12,61 ± 0,00 a	1,19 ± 0,11 e	2,23 ± 0,2 de	5,92 ± 0,95 cd	4,70 ± 0,18 cde
MHY _{SVTapl}	17,77 ± 0,79 d	37,98 ± 0,32 b	53,14 ± 2,88 a	62,13 ± 0,65 a	8,81 ± 1,24 d	10,15 ± 0,39 d	31,56 ± 0,82 bc	26,19 ± 3,38 c
VHY _{SVTapl}	0,49 ± 0,02 d	1,05 ± 0,00 b	1,46 ± 0,08 a	1,71 ± 0,02 a	0,26 ± 0,04 d	0,30 ± 0,01 d	0,93 ± 0,02 bc	0,77 ± 0,10 c
MHPR _{SVTapl}	0,63 ± 0,03 c	1,34 ± 0,03 b	1,86 ± 0,09 a	2,19 ± 0,04 a	0,35 ± 0,05 c	0,42 ± 0,02 c	1,23 ± 0,03 b	1,03 ± 0,13 b
VHPR _{SVTapl}	17,27 ± 0,93 c	36,89 ± 0,81 b	51,11 ± 2,61 a	60,22 ± 1,19 a	10,32 ± 1,37 c	12,19 ± 0,46 c	36,16 ± 0,88 b	30,23 ± 3,95 b
MHY _{SVTrem}	0,15 ± 0,03 cd	0,35 ± 0,01 a	0,25 ± 0,00 ab	0,31 ± 0,02 ab	0,06 ± 0,02 d	0,11 ± 0,02 d	0,24 ± 0,00 bc	0,21 ± 0,03 bc
VHY _{SVTrem}	4,16 ± 0,79 cd	9,72 ± 0,30 a	7,02 ± 0,07 ab	8,61 ± 0,48 ab	1,69 ± 0,45 d	3,20 ± 0,48 d	6,90 ± 0,07 bc	6,17 ± 0,77 bc

RM⁶_{5,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁹_{5,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RM⁶_{6,5} - 35 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RM⁹_{6,5} - 35 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁶_{5,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁹_{5,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 5,5; RT⁶_{6,5} - 45 °C, 6 g-DQO/L e pH 6,5; RT⁹_{6,5} - 45 °C, 9 g-DQO/L e pH 6,5.

HY (mol-H₂/mol-glicose) - rendimento molar por substrato consumido; E_{H2} (%) - eficiência de conversão do substrato em H₂; HPR_{VR} (L-H₂/d/L-reator) - taxa de produção volumétrica por volume reacional; MHY_{DQOapl} (mmol-H₂/g-DQO_{apl}), VHY_{DQOapl} (L-H₂/g-DQO_{apl}), MHPR_{DQOapl} (mmol-H₂/g-DQO_{apl}/d) e VHPR_{DQOapl} (mL-H₂/g-DQO_{apl}/d) - rendimentos e taxas de produção, molares e volumétricos, por carga aplicada; MHY_{DQOrem} (mol-H₂/g-DQO_{rem}) e VHY_{DQOrem} (L-H₂/g-DQO_{rem}) - rendimentos molar e volumétrico por carga removida; MHY_{SVTapl} (mmol-H₂/g-SVT_{apl}), VHY_{SVTapl} (L-H₂/g-SVT_{apl}), MHPR_{SVTapl} (mmol-H₂/g-SVT_{apl}/d) e VHPR_{SVTapl} (mL-H₂/g-SVT_{apl}/d) - rendimentos e taxas de produção, molares e volumétricos, por biomassa aplicada; MHY_{SVTrem} (mol-H₂/g-SVT_{rem}) e VHY_{SVTrem} (L-H₂/g-SVT_{rem}) - rendimento molar e volumétrico por biomassa removida.

A análise comparativa entre as médias para cada parâmetro deve ser feita na horizontal por meio das letras que as seguem, onde os valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).

