UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

VIVIAN MARIA CARMINATO

Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos, SP
2013

VIVIAN MARIA CARMINATO

Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos, SP
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

C287
i

Carminato, Vivian Maria
Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. / Vivian Maria Carminato; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Processos anaeróbios. 2. Reator de leito fixo. 3. Produção de hidrogênio. 4. Cálcio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **VIVIAN MARIA CARMINATO BLANCO**.

Título da dissertação: "Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios".

Data da defesa: 14/06/2013

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Prof. Associado **Marcelo Zaiat - (Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovada
Prof. Dr. **José Alberto Domingues Rodrigues** (Instituto Mauá de Tecnologia/IMT)	Aprovada
Profª. Drª. **Viviane Trevisan** (Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC)	Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marcelo Zaiat, pela credibilidade depositada, pela paciência, pela valiosa orientação e por todos os ensinamentos durante a pesquisa.

Aos professores Eugenio Foresti e Moacir Messias de Araujo Jr. pelas sugestões no exame de qualificação, pelas contribuições e ensinamentos.

A toda minha família que sempre depositou toda confiança e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Ricardo, pelas conversas, pelo apoio, pelo amor e por estar ao meu lado, me dando sempre muita força para prosseguir em frente.

Aos meus amigos, especialmente à Alice, pela amizade, pelas conversas e risadas que sempre demos! Pela ajuda que me deu nesta etapa final do trabalho.

A todo pessoal do LPB, em especial a Pilar, Adriana e Eduardo por toda a ajuda. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos técnicos do LPB, pelo auxílio em laboratório, pela disposição em sempre ajudar.

À Escola de Engenharia de São Carlos, ao Departamento de Hidráulica e Saneamento e à CAPES por permitir a execução deste projeto.

RESUMO

Carminato, V. M. **Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Esse trabalho investigou a influência de diferentes dosagens de cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária sintética a base de sacarose em reatores anaeróbios de leito fixo estruturado e fluxo ascendente. Cilindros de polietileno de baixa densidade foram usados como material suporte para aderência da biomassa. Os reatores foram operados com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 h e a 25ºC. Foram avaliadas diferentes concentrações de cálcio (Ca): 0,50; 1,06; 1,37; 1,87; 2,45 e 3,61 mg L^{-1} na alimentação. A remoção de sacarose apresentou valores médios acima de 54% para todas as concentrações. O biogás produzido foi composto de H_2 e CO_2, com porcentagens médias de H_2 superiores a 60% para todas as concentrações avaliadas. Os principais produtos intermediários produzidos foram o ácido acético, o butírico e etanol. Os resultados demonstraram que há influência da suplementação de cálcio na produção de hidrogênio e a concentração de cálcio de 1,37 mg L^{-1} foi a que apresentou melhores resultados em relação a produção de hidrogênio, com rendimento de 1,4 mol de H_2 mol^{-1} de sacarose, vazão molar de hidrogênio de 5,4 mmol h^{-1} e produção volumétrica de hidrogênio de 57 mL H_2 h^{-1} L^{-1}. Relacionaram-se as concentrações de cálcio com o rendimento médio de produção de hidrogênio e as curvas foram ajustadas a uma spline. Para a função ajustada chegou-se a um ponto de ótimo de rendimento de 1,5 mol H_2 mol^{-1} sacarose obtido com concentração de cálcio de 1,54 mg L^{-1}.

Palavras-chave: processos anaeróbios, reator de leito fixo estruturado, produção de hidrogênio, cálcio.

ABSTRACT

Carminato, V. M. **Influence of calcium on the hydrogen production from wastewater in anaerobic bioreactor.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

This paper investigated the influence of different dosages of calcium in the biological production of hydrogen from synthetic sucrose based wastewater in upflow anaerobic structured-bed reactor. Low density polyethylene cylinders were used as support material for biomass attachment. The reactors were operated with hydraulic retention time (HRT) of 2 h at 25° C. The wastewater was amended with different concentrations of calcium (Ca): 0.50; 1.06; 1.37; 1.87; 2.45 e 3.61 mg L^{-1}. The removal of sucrose showed values above 54% for all concentrations. The biogas produced was composed of H_2 and CO_2 with H_2 average percentages above 60% for all concentrations evaluated. The main intermediates produced were acetic acid, butyric acid and ethanol. The results showed that there is influence of calcium supplementation in the production of hydrogen and calcium concentration of 1.37 mg L^{-1} showed the best results regarding hydrogen production, with yield of 1.4 mol H_2 mol^{-1} sucrose, hydrogen molar flow of 5.4 mmol H_2 h^{-1} and volumetric production of hydrogen of 57 mL H_2 h^{-1} L^{-1}. Calcium concentrations were correlated with the average yield of hydrogen production and the curves were fitted to a spline. From this function, an optimum yield of 1.5 mol H_2 mol^{-1} sucrose was reached with calcium concentration of 1.54 mg L^{-1}.

Keywords: anaerobic processes, structured-bed reactor, hydrogen production, calcium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Esquema do reator de leito estruturado 26
Figura 4.2 – Foto do reator anaeróbio 27
Figura 4.3 – Cilindros de polietileno. 28
Figura 4.4 – Hastes de aço 29
Figura 4.5 – Distribuição das hastes de aço 29
Figura 4.6 – Hastes de aço preenchidas pelo material suporte. 30
Figura 4.7 – Fluxograma geral de realização dos experimentos 33
Figura 5.1 - Variação temporal de percentual de H_2 no biogás para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ( ); 1,37 mg Ca L^{-1} ( ); 1,87 mg Ca L^{-1} ( ); 2,45 mg Ca L^{-1} ( ) e 3,61 mg Ca L^{-1} ( ) e de CO_2 para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ( ); 1,37 mg Ca L^{-1} ( ); 1,87 mg Ca L^{-1} ( ); 2,45 mg Ca L^{-1} ( ) e 3,61 mg Ca L^{-1} ( ). 42
Figura 5.2 - Variação temporal de vazão molar de hidrogênio para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ( ); 1,37 mg Ca L^{-1} ( ); 1,87 mg Ca L^{-1} ( ); 2,45 mg Ca L^{-1} ( ) e 3,61 mg Ca L^{-1} ( ). 44
Figura 5.3 – Resumo do teste Tukey para vazão molar de H_2. Os valores ***ns*** significam que a diferença não é significativa, já ***p<0,01*** e ***p<0,05*** entende-se que a diferença é significativa. . 46
Figura 5.4 - Variação temporal da produção volumétrica de H_2 para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ( ); 1,37 mg Ca L^{-1} ( ); 1,87 mg Ca L^{-1} ( ); 2,45 mg Ca L^{-1} ( ) e 3,61 mg Ca L^{-1} ( ). 46
Figura 5.5 – Resumo teste Tukey para HPR. Os valores ***ns*** significam que a diferença não é significativa, já ***p<0,01*** e ***p<0,05*** entende-se que a diferença é significativa. 49
Figura 5.6 - Variação temporal da conversão de sacarose para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 49
Figura 5.7 - Variação temporal do rendimento para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ... 51
Figura 5.8 - Resumo teste Tukey para a o rendimento da produção de H2 53
Figura 5.9 - Variação temporal da concentração de SSV para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 54
Figura 5.10 – Concentração média de SSV no efluente do reator ( ) e concentração da biomassa aderida no material suporte no final da operação ( ). 55
Figura 5.11 - Concentração de SV no final da operação ( ) e Rendimento da produção de H_2 ( ). 57
Figura 5.12 – Variação temporal da COVe para 0,50 mg Ca L^{-1} ( ); 1,06 mg Ca L^{-1} ( ); 1,37 mg Ca L^{-1} ( ); 1,87 mg Ca L^{-1} ( ); 2,45 mg Ca L^{-1} ( ) e 3,61 mg Ca L^{-1} ( ). 58
Figura 5.13 - Carga orgânica volumétrica específica aplicada para as diferentes concentrações de cálcio. 59

Figura 5.14 - Relação entre Concentração de cálcio e rendimento 60
Figura 5.15 - Variação temporal do pH efluente para 0,50 mg Ca L^{-1} (); 1,06 mg Ca L^{-1} 62
Figura 5.16 - Geração de produtos intermediários ao longo do período de operação para diferentes concentrações de cálcio: Ácido Acético (); Ácido Cítrico (); Ácido Lático (); Ácido Fórmico (); Ácido Propiônico (); Ácido Butírico (); Etanol (); Metanol (); 63
Figura 5.17 - Distribuição porcentual média dos produtos intermediários para as diferentes concentrações de cálcio avaliadas. 65
Figura 5.18 - Variação temporal da remoção de DQO para 0,50 mg Ca L^{-1} (); 1,06 mg Ca L^{-1} (); 1,37 mg Ca L^{-1} (); 1,87 mg Ca L^{-1} (); 2,45 mg Ca L^{-1} () e 3,61 mg Ca L^{-1} (). 68
Figura 5.19 – Curvas E dos reatores para cada concentração de cálcio avaliada: 70
Figura 5.20 – Biomassa aderida no material suporte () e o Número de CSTR em série (). 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Dimensões do reator anaeróbio de leito estruturado.....27
Tabela 4.2 – Características físicas dos cilindros de polietileno. 28
Tabela 4.3 – Composição do meio sintético que alimentou os reatores. 31
Tabela 4.4 – Concentrações de cálcio 32
Tabela 4.5 - Concentração de cálcio avaliada em cada etapa. 33
Tabela 4.6 – Vazão média afluente, ao longo da operação. 35
Tabela 5.1 - Valores médios e desvio padrão da porcentagem de H_2 e CO_2 no biogás.....43
Tabela 5.2 - Valores médios, máximos e desvio padrão da vazão de biogás e vazão molar de hidrogênio para diferentes concentrações de cálcio 44
Tabela 5.3 – Resumo do teste ANOVA para vazão molar de H2. 45
Tabela 5.4 - Valores médios, máximos e desvio padrão da produção volumétrica de H_2 para diferentes concentrações de cálcio 47
Tabela 5.5 - Resumo ANOVA para HPR.....48
Tabela 5.6 - Valores médios, máximos e desvio padrão da conversão de sacarose para diferentes concentrações de cálcio 50
Tabela 5.7 - Valores médios, máximos e desvio padrão do rendimento para diferentes concentrações de cálcio 51
Tabela 5.8 – Resumo ANOVA para a o rendimento da produção de H2.....53
Tabela 5.9 – Valores médios, máximos e desvio padrão da concentração de SSV e SV no líquido drenado e no material suporte para diferentes concentrações de cálcio.....55
Tabela 5.10: Carga orgânica volumétrica específica aplicada para as diferentes concentrações de cálcio. 59
Tabela 5.11 – pH efluente médio para as diferentes concentrações de cálcio avaliadas. 62
Tabela 5.12 – Concentrações médias dos produtos intermediários formados ao longo da operação para diferentes concentrações de cálcio 64
Tabela 5.13 - Porcentagens médias dos produtos intermediários para as diferentes concentrações de cálcio. 65
Tabela 5.14 – Produção de ácido acético por homoacetogênese.....67
Tabela 5.15 – Balanço teórico de hidrogênio 67
Tabela 5.16 – Valores médios da remoção de DQO. 69
Tabela 5.17 – Reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator equivalente em DQO. 69

Tabela 5.18 – DQO efluente média empírica e a teórica e a sua concordância nas concentrações de cálcio estudadas. 70
Tabela 5.19 – Resultados obtidos dos ensaios hidrodinâmicos. 71
Tabela 5.20 – Comparação entre ensaios hidrodinâmicos realizados por diferentes estudos utilizando reatores de leito fixo para a produção de hidrogênio. 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	concentração do traçador
COVe	carga orgânica volumétrica específica
C_{So}	concentração de sacarose no meio afluente
C_{Sf}	concentração de sacarose no efluente
DQO	demanda química de oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
F_m	fator de calibração
HPR	Produção volumétrica de hidrogênio
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MM_S	massa molar da sacarose
N	número de reatores
NADH	nicotinamida adenina dinucleotído
pH	potencial hidrogeniônico
Q	vazão de alimentação do reator
Q_g	vazão de biogás
SSV	sólidos Suspensos Voláteis
SV	sólidos voláteis
TDH	tempo de detenção hidráulica médio real
V	volume útil do reator
V_m	volume de gás obtido no medidor
Y_{H_2}	rendimento de produção de hidrogênio
η	número de mols totais no biogás
n_{H_2}	número de mols de hidrogênio no biogás

n_{CO_2}	número de mols de gás carbônico no biogás
n_{CH_4}	número de mols de metano no biogás
θ_h	tempo de detenção hidráulica médio teórico
v_{H_2}	vazão molar de hidrogênio
v_s	velocidade global de conversão de sacarose
σ^2	variância
$\%H_2$	porcentagem de hidrogênio no biogás
$\%CO_2$	porcentagem de dióxido de carbono no biogás
$\%CH_4$	porcentagem de metano no biogás

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVOS 18

2.1. OBJETIVO GERAL 18

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

3.1. PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO 19

3.2. CÁLCIO 20

3.3. REATOR DE LEITO FIXO ESTRUTURADO 22

3.4. AVANÇOS DO GRUPO DE PESQUISA 23

3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 25

4. MATERIAL E MÉTODOS 26

4.1. REATOR DE LEITO ESTRUTURADO 26

4.2. MATERIAL SUPORTE 28

4.3. EFLUENTE SINTÉTICO 30

4.4. INOCULAÇÃO DOS REATORES 31

4.5. OPERAÇÃO DOS REATORES 32

4.6. MONITORAMENTOS DAS VARIÁVEIS OPERACIONAIS 34

4.7. ENSAIOS HIDRODINÂMICOS 35

4.8. PARÂMETROS CALCULADOS 37

4.9. CÁLCULO DA BIOMASSA NO REATOR 39

4.10. CÁLCULO DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA (COVE) 40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

5.1. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO 42

5.2. CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA ACUMULADA NOS REATORES 54

5.3. INSTABILIDADE NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE CÁLCIO 56

5.4. GERAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS 62

5.5. BALANÇO DE DQO 68

5.6. ENSAIOS HIDRODINÂMICOS 70

6. CONCLUSÕES 73

7. SUGESTÕES 74

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética devido ao elevado crescimento populacional e a consequente busca por alternativas que minimizem os efeitos poluidores da utilização de combustíveis fósseis tem incentivado pesquisas em torno de novos combustíveis de fontes renováveis.

Neste âmbito merece destaque o gás hidrogênio, o qual se apresenta como carreador vantajoso de energia do ponto de vista ambiental e energético, visto que seu uso em células combustíveis gera energia elétrica tendo como produtos finais calor e vapor de água. Além disso, o hidrogênio possui alta densidade energética, aproximadamente 2,75 vezes maior que a obtida com qualquer combustível baseado em hidrocarbonetos (ARGUN et al., 2008; CHEN et al., 2001).

No entanto, uma das principais barreiras a respeito do uso do hidrogênio como alternativa de energia limpa é a forma como ele é produzido. Dentre os processos de obtenção de hidrogênio a partir de fontes primárias de energia destacam-se a eletrólise, os processos termoquímicos e radiolíticos e os processos biológicos.

A atual produção de gás hidrogênio é feita a partir de combustíveis fósseis por meio de processos termoquímicos, como a reforma de hidrocarbonetos, a gaseificação do carvão e oxidação parcial de hidrocarbonetos, os quais são muito caros se comparados com métodos utilizados para a produção de combustíveis fósseis (SHOW et al., 2011). Nesse sentido, a produção de hidrogênio por via biológica tem atraído a atenção mundial devido ao seu potencial para se tornar fonte renovável de energia e de baixo custo.

O hidrogênio biológico (biohidrogênio) pode ser gerado por meio de processos fotossintéticos ou fermentativos, sendo este último mais vantajoso por ser um método simples de obtenção desse gás, além de poder utilizar uma variedade de substâncias orgânicas como substratos, ter menor gasto energético e menor custo de implementação (CHEN et al., 2006; HALLENBECK & GHOSH, 2009, LAY et al., 1999 e MATHEWS & WANG, 2009).

A produção de hidrogênio por meio de processos fermentativos se configura em alternativa energética ainda mais vantajosa quando o substrato utilizado provém de fontes renováveis e baratas, como águas residuárias com quantidades consideráveis de fração orgânica biodegradável (BABU, MOHAN e SARMA, 2009; LAY et al., 1999; WANG & WAN, 2009).

Embora perspectivas promissoras em relação à produção fermentativa de hidrogênio tenham sido relatadas na literatura, ainda não foi possível atingir o nível de produção previsto teoricamente, devido às limitações termodinâmicas do processo, aos baixos rendimentos e as baixas velocidades de produção. Melhorar a eficiência da produção de hidrogênio é, portanto, um grande desafio para a o processo fermentativo (HALLENBECK e GHOSH, 2009; SHOW et al., 2012).

Vários fatores reconhecidamente afetam a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios como temperatura, pH, tipo e condição operacional do reator, forma de inoculação, características das águas residuárias, entre outros. A configuração do reator é de extrema importância, pois pode influenciar o comportamento hidrodinâmico, a população microbiana, o contato do substrato com os microrganismos e a distribuição do pH dentro do reator, o que pode afetar o rendimento global do processo de produção biológica de hidrogênio (BABU, MOHAN e SARMA, 2009, SHOW et al., 2012).

Pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) (ANZOLA-ROJAS, 2010; FERNANDES, 2008; LIMA, 2011; PEIXOTO, 2008; PENTEADO, 2012), com reatores anaeróbios de leito fixo empacotado e fluxo ascendente para a produção de hidrogênio, apresentaram avanços consideráveis, partindo da viabilidade de produção e chegando a altas produtividades.

No entanto, nesses trabalhos sempre foi observada queda na geração do biogás após atingir o ápice de produção. Assim, o hidrogênio e o dióxido de carbono gerados apresentam decaimento ao longo do tempo, de forma simultânea ao crescimento e acúmulo de biomassa no leito. Esse comportamento foi atribuído ao desenvolvimento de microrganismos consumidores de H_2 e CO_2 devido à diminuição contínua da carga orgânica volumétrica específica aplicada (COVe) (g sacarose g SSV^{-1} h^{-1}), o que pode levar ao desvio de rotas bioquímicas no reator.

Dessa maneira o controle sobre a retenção de biomassa no reator pode controlar o desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio, permitindo a liberação contínua e estável desse gás em reatores de leito fixo.

A presente pesquisa avaliou duas hipóteses de estratégia para atingir este controle sobre a retenção de biomassa no reator. A primeira foi avaliar os efeitos da suplementanção de cálcio na retenção de biomassa, visto que tal mineral tem sido relatado na literatura como uma exigência estrutural para manter uma alta concentração de biomassa no reator (AHN et al., 2006; KIM & JANG, 2006; LEE et al., 2004; WU et al., 2012; YUAN et al., 2010).

Aliado a essa estratégia, utilizou-se o reator de leito fixo estruturado a fim de diminuir a acumulação de biomassa em interstícios, onde, provavelmente, são estabelecidos os organismos consumidores dos constituintes do biogás.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência da concentração de cálcio na produção biológica de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo estruturado, com fluxo ascendente, alimentado com efluente sintético a base de sacarose.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto foram:

- Avaliar a composição do biogás produzido, a vazão molar de hidrogênio, a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento da produção de hidrogênio para diferentes concentrações de cálcio e buscar a relação que maximize esses parâmetros;

- Determinar a distribuição dos produtos intermediários da produção biológica de hidrogênio e a eficiência de remoção de matéria orgânica para diferentes dosagens de cálcio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio da fotossíntese e da fermentação. A produção de hidrogênio pela fermentação apresenta algumas vantagens em relação à fotossíntese, tais como: maior velocidade de produção de hidrogênio pelas bactérias fermentativas, independência da intensidade luminosa, possibilidade de obtenção de hidrogênio a partir de carboidratos presentes em águas residuárias e possibilidade de utilização de grande variedade de microrganismos para a decomposição anaeróbia de carboidratos (HALLENBECK & GHOSH, 2009; LAY et al., 1999).

A produção de hidrogênio por via fermentativa acontece na etapa acidogênica da digestão anaeróbia. Nesta etapa, microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica em hidrogênio, gás carbônico, ácidos graxos voláteis e álcoois, sendo que a distribuição do produto pode ser diferente de acordo com o microrganismo envolvido, o estado de oxidação do substrato e as condições ambientais, como pH, pressão parcial de hidrogênio, entre outros (HALLENBECK & GHOSH, 2009).

Em condições anaeróbias, a matéria orgânica é oxidada e o excesso de elétrons é usado para produzir o gás hidrogênio, processo este facilitado pela enzima hidrogenase. Outro mecanismo para a produção de hidrogênio ocorre quando a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotído (NADH) é formada por meio da glicólise (conversão da glicose a piruvato). O NADH é, então, oxidado, conforme a Equação 3.1.

$$NADH + H^+ \rightarrow H_2 + NAD^+ \qquad \text{Equação 3.1}$$

Apesar destas vantagens da fermentação, sérios desafios devem ser superados para tornar a produção de hidrogênio por meio da fermentação uma realidade prática. A principal barreira pode ser encontrada nas limitações do processo metabólico, já que apenas um terço do substrato pode ser utilizado para a produção de hidrogênio, uma vez que os restantes dois terços (acetil-CoA) formam outros produtos da fermentação, como o acetato, butirato, butanol, acetona, entre outros (HALLENBECK & GHOSH, 2009).

Ademais, outro aspecto desvantajoso da produção do gás via fermentação que pode ser citado é que o hidrogênio produzido encontra-se misturado com o gás carbônico e, eventualmente, com o metano, necessitando assim de uma etapa de separação para poder ser utilizado como combustível (PEIXOTO, 2008).

3.2. Cálcio

O cálcio é um importante nutriente para o crescimento microbiano, essencial às bactérias Gram-positivas para síntese das paredes celulares, e aos organismos formadores de esporos, para síntese de esporos (BLACK, 2002). Norris et al. (1991) resumiram alguns processos em diversas bactérias em que o cálcio está envolvido, tais como quimiotaxia, esporulação, fosforização, início da replicação do DNA, estrutura do nucleotídeo e a síntese de fosfolipídios. Norris et al. (1991) sugerem, também, que existem funções relacionadas ao cálcio que não foram descobertas.

Além dessas funções, tem sido demonstrado que cátions bivalentes, como cálcio, desempenham papel importante na agregação de bactérias (HUANG e PINDER, 1995; MAHONEY et al., 1987; KOSARIC e BLASZCZYK, 1990; SOBECK e HIGGINS, 2002; THIELE et al., 1990). A presença de cálcio melhora a adesão das células por meio de apêndices microbianos e/ou polímeros, os quais preferem se ligar a cátions bivalentes quando estão disponíveis, devido à formação de complexos mais estáveis (RUDD et al., 1984). Segundo Yu et al. (2001), a superfície da célula bacteriana e os polímeros extracelulares são normalmente carregados negativamente e, para formar os grânulos, muitas vezes requerem cátions bivalentes para se associarem. Forster e Lewin (1972) também sugeriram que o cálcio tem afinidade especialmente elevada com o polímero de estrutura extracelular, indicando que esse mineral está envolvido no processo de adesão das bactérias.

Dessa maneira, a adição de cálcio pode ter um impacto positivo sobre reatores em que a retenção de biomassa é desejada (THIELE et al., 1990;. HUANG e PINDER, 1995). Muitos estudos mostram que ocorreu incremento no acúmulo de biomassa com a presença de cálcio com concentrações na faixa de 100 a 200 mg L^{-1} (CAIL e BARFORD, 1985; HUANG e PINDER, 1995; HULSHOFF et al., 1983; MAHONEY et al., 1987; YU et al., 2001), enquanto que elevadas concentrações de cálcio (maiores que 300 mg L^{-1}) foram relatadas como prejudiciais (HULSHOFF POL et al., 1983; THIELE et al., 1990, YU et al., 2001)

Lee et al. (2004) e Yuan et al. (2010) propuseram que o cálcio pode afetar o desempenho da produção de H_2, pois é um elemento fundamental na formação de biopartículas granulares em biorreatores.

Wu et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação de cálcio em duas formas ($CaCl_2$ e $Ca(OH)_2$) na produção de hidrogênio em um reator de leito fluidizado (FBR), com sacarose como substrato, carga orgânica de 20 g DQO L^{-1}, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 a 8 h, temperatura de 40°C e vazão de recirculação de 5,5 L min^{-1}. O estudo mostrou que operações com mesmo tempo de detenção geraram melhores resultados quando adicionados íons cálcio. Os melhores resultados foram alcançados com TDH de 2 h e cálcio na concentração de 100 ppm, com valores máximos de 3,76 mol H_2 mol^{-1} sacarose e 1,22 L $h^{-1}L^{-1}$ para o rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio, respectivamente. Os autores concluíram que não houve diferença na produção de H_2 quando se utilizou Ca^{2+} sob a forma dos dois compostos avaliados.

Yuan et al. (2010) estudaram a influência da suplementação de cálcio de 100 mg L^{-1} na produção de hidrogênio em reator contínuo de mistura completa com meio sintético a base de sacarose, temperatura de 35°C e TDH de 2 e 4 horas. Para o reator sem adição de cálcio, quando o TDH foi baixado para 2 h, o reator tornou-se bastante instável e as variáveis produção volumétrica de hidrogênio (HPR), percentual de H_2 no biogás, e conversão de sacarose diminuíram. Quando o cálcio foi adicionado, a eficiência de conversão de sacarose aumentou para 73%, que foi quase o dobro do que sem suplementação de cálcio. As variáveis HPR e rendimento aumentaram, respectivamente, para 24,5 L $d^{-1}L^{-1}$ e 3,74 mol H_2 mol^{-1} sacarose, os quais foram os maiores valores alcançados no estudo. A concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) aumentou de 747 para 1682 mg L^{-1} após a suplementação de cálcio, o que indica que ocorreu um aumento considerável na retenção de biomassa.

Lee et al. (2004) avaliaram o efeito da suplementação de cálcio na faixa de 5,4 a 27,2 mg L^{-1} em um reator CIGSB (carrier-induced granular sludge bed) alimentado com meio sintético a base de sacarose, temperatura de 35°C e TDH de 0,5 h. Os resultados de tal trabalho mostraram que a adição de 5,4 mg L^{-1} resultou em aumento de quase 4 vezes no rendimento de produção de hidrogênio, acompanhado por aumento de duas vezes na HPR e de 64% na porcentagem de H_2. Os autores mostraram que os grânulos de lodo tiveram seus diâmetros aumentados de 1,8 para 3,5 mm, o que sugere que a agregação de células foi melhorada com a adição de cálcio. As dosagens de 13,6 e 27,2 mg L^{-1} de cálcio não conduziram a maior concentração de biomassa, não aumentaram o tamanho das grânulos nem

melhoraram a produção de H_2. Assim, a adição de 5,4 mg L^{-1} de cálcio foi suficiente para a obter melhorias na produção de hidrogênio.

3.3. Reator de leito fixo estruturado

Os reatores anaeróbios de leito fixo estruturado vêm sendo estudados por grupos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), nos quais os projetos têm enfoque no estudo da otimização do biorreator convencional e de novas propostas de configurações para que a aplicação do sistema em escala plena se torne viável.

O reator de leito fixo estruturado foi apresentado por Peixoto (2011) como alternativa ao leito empacotado, o qual apresenta grande acúmulo de biomassa nos interstícios do material suporte, comprometendo a hidrodinâmica do reator e, consequentemente, o desempenho do processo.

Em reatores de leito fixo estruturado, o suporte é estruturado em hastes ao longo do leito, sem que se criem interstícios no mesmo. Reatores com essa configuração, no geral, resultam em TDH médios mais próximos do esperado, menor dispersão e maior similaridade com o comportamento hidrodinâmico do tipo pistão (PEIXOTO, 2011).

Além desses aspectos positivos, quando comparados ao reator de leito fixo empacotado, os reatores de leito fixo estruturado apresentam porosidades maiores. Lee et al. (2003), utilizando reatores de leito fixo destinados à produção de H_2 a partir de sacarose, avaliaram a produção de hidrogênio mediante o efeito da porosidade e do tempo de detenção hidráulica (TDH) em reatores com leitos constituídos de carvão ativado com porosidades de 70, 80 e 90%. Os melhores resultados obtidos quanto à porcentagem de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de hidrogênio, remoção de substrato e rendimento de produção de hidrogênio foram, respectivamente: 37%, 7,4 L h^{-1} L^{-1}, 92% e 2,9 mol H_2 mol^{-1} sacarose para a porosidade de 90% e TDH de 0,5 h. Desta maneira, nota-se que a produção de hidrogênio é favorecida tanto pela eficiência de imobilização da biomassa em leitos fixos quanto pela manutenção de uma elevada porosidade nos mesmos.

3.4. Avanços do grupo de pesquisa

O Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP) é um dos pioneiros no Brasil a abordar o tema de produção biológica de hidrogênio. Ainda assim, esta temática é recente no laboratório, sendo que os primeiros trabalhos concluídos neste grupo de pesquisa, os quais tinham o objetivo de produzir hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária, foram Fernandes (2008) e Peixoto (2008).

Fernandes (2008) avaliou a influência do material suporte e do tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo. A autora não encontrou influência do material suporte (argila expandida, carvão vegetal e polietileno) na produção biológica de hidrogênio, visto que os rendimentos de hidrogênio médio foram semelhantes para todos os materiais testados (próximos a 4,4 mol H_2 mol^{-1}sacarose para 0,5 hora e 3,3 mol H_2 mol^{-1}sacarose para 2,0 horas). Com vistas a este resultado, nas pesquisas subsequentes desenvolvidas no laboratório foi adotado polietileno de baixa densidade como material suporte, uma vez estes são de menor custo e aplicáveis em larga escala.

Em relação ao TDH aplicado, Fernandes (2008) estudou TDH de 0,5 e 2 horas e concluiu que o uso de 0,5 hora por um lado aumentou o rendimento de produção de hidrogênio, mas por outro diminuiu a relação entre a produção volumétrica de hidrogênio obtida e a máxima teórica e a conversão de substrato. Desta maneira, o TDH de 2,0 horas foi escolhido e utilizado nas pesquisas subsequentes no laboratório.

Por outro lado, Peixoto (2008) avaliou a influência da adição de macro e micronutrientes na produção biológica de hidrogênio, utilizando reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente no tratamento de água residuária de indústria de refrigerante. O autor concluiu que a adição dos nutrientes apresentou efeito negativo sobre a produção biológica de hidrogênio, sendo que o rendimento de hidrogênio máximo (4,2 mol H_2 mol^{-1} carboidratos) foi obtido para o reator sem adição de micro e macro nutrientes, enquanto o reator com adição de nutrientes obteve rendimento de 2,5 mol H_2 mol^{-1} carboidratos.

Dando continuidade às pesquisas no laboratório, Fernandes et al. (2010) avaliaram a potencialidade do uso de efluentes reais na produção biológica de hidrogênio. Avaliaram a utilização de esgoto doméstico, vinhaça da indústria sucroalcooleira e glicerol, o qual é

efluente da produção de biodiesel. O melhor substrato para a produção biológica de hidrogênio encontrado nesta pesquisa foi a vinhaça.

No mesmo ano, Anzola-Rojas (2010) estudou a influência da relação carbono e nitrogênio (C:N) na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente utilizando efluente sintético a base de sacarose com 2000 mg L^{-1} de Demanda Química de Oxigênio (DQO) (1780 mg L^{-1} de sacarose). Com base no estudo de diversas relações C:N (40, 90,140 e 190), foram observados os rendimentos máximos de hidrogênio em cada situação. Após ajuste de função, foi obtida relação C:N ótima igual a 137 para a produção de hidrogênio. Este resultado mostra que valores altos da relação levam a maior controle do crescimento da biomassa e maior rendimento de hidrogênio. Por outro lado, quando aplicadas baixas relações de carbono e nitrogênio, foi observado crescimento microbiano de maneira mais rápida, o que diminui a produção de hidrogênio. Neste trabalho também foi verificada instabilidade da produção de hidrogênio, tendo sido observada sua queda após se atingir o ápice. Em algumas relações testadas a produção do biogás chegou a cessar completamente durante os 60 dias de operação. Esta instabilidade foi atribuída à presença de bactérias hidrogênio-oxidantes e à dificuldade da transferência de massa entre a fase líquida e o biofilme e a fase líquida e fase gasosa.

Em outro trabalho desenvolvido no laboratório, Lima (2011) também verificou instabilidade na produção biológica de hidrogênio e atribuiu esta oscilação às bactérias consumidoras de hidrogênio, similarmente a Anzola-Rojas (2010).

Em relação ao tipo de reator utilizado na produção biológica de hidrogênio, Peixoto (2011) apresentou alternativa ao leito empacotado normalmente utilizado nas pesquisas, o qual, como já citado anteriormente, apresenta grande acúmulo de biomassa nos interstícios do material suporte, comprometendo a hidrodinâmica do reator. O autor estudou reator de leito fixo estruturado, o qual, segundo o autor, resulta em TDH médios mais próximos do esperado, menor dispersão e maior similaridade com o comportamento hidrodinâmico do tipo pistão.

Penteado (2012) avaliou a influência de diferentes origens e pré-tratamentos do inóculo na produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo empacotado e fluxo ascendente, com aparas de polietileno de baixa densidade como material suporte, TDH de 2 h e a 25ºC, alimentados com efluente sintético a base de sacarose. Duas fontes de inóculo foram estudadas: lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de água residuária de abatedouro de aves e lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de água residuária de suinocultura, e a autofermentação, quando não há nenhum inóculo no reator. Além disso, dois tipos de pré-tratamento, térmico e ácido, foram avaliados. O inóculo obtido

pelo processo de autofermentação obteve a maior produtividade média de 2,1 mol de H_2 mol^{-1} de sacarose, mostrando-se uma maneira interessante para a produção biológica de hidrogênio, pois não foram aplicadas as técnicas de pré-tratamento para a seleção dos microrganismos.

3.5. Considerações finais

A produção biológica de hidrogênio por meio de processos anaeróbios a partir de águas residuárias tem se mostrado uma promissora alternativa por disponibilizar um combustível renovável ao mesmo tempo em que diminui o passivo ambiental causado pelos lançamentos de efluentes.Embora a tecnologia de reatores anaeróbios seja amplamente difundida para tratamento de efluentes, o seu estudo na geração de bioenergia utilizando reatores de leito fixo estruturado é ainda incipiente. Este tipo de configuração de reator pode apresentar efeitos positivos na retenção de biomassa, visto que a alta porosidade obtida permite menor acúmulo de biomassa nos interstícios, além de favorecer o arraste periódico da biomassa excedente.

A produção de hidrogênio é maximizada na fase exponencial de crescimento celular, a qual pode ser beneficiada pela presença de cálcio. Porém, em reatores de leito fixo convencionais, quando há acumulo excessivo de biomassa no reator a mesma apresenta efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio, o qual passa a ser consumido quando há baixas cargas orgânicas específicas (COVe). Dessa maneira, quando há maior controle do crescimento da biomassa obtém-se maior produtividade de hidrogênio. A vista disso busca-se nesse trabalho avaliar os efeitos do cálcio no acúmulo de biomassa no reator de leito estruturado, de forma a encontrar uma concentração ideal para que ocorra maior produtividade de hidrogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reator de leito estruturado

Foram operados seis reatores de leito fixo estruturado e fluxo ascendente, cada um com capacidade total de aproximadamente 3,8 L, considerando o reator vazio, e 3,35 L com o material suporte. A Figura 4.1 e a Figura 4.2 apresentam a configuração e a foto do reator anaeróbio de leito estruturado, respectivamente. Na Tabela 4.1 são apresentadas as dimensões de cada reator, as quais são semelhantes ao reportado no trabalho realizado por Peixoto (2011).

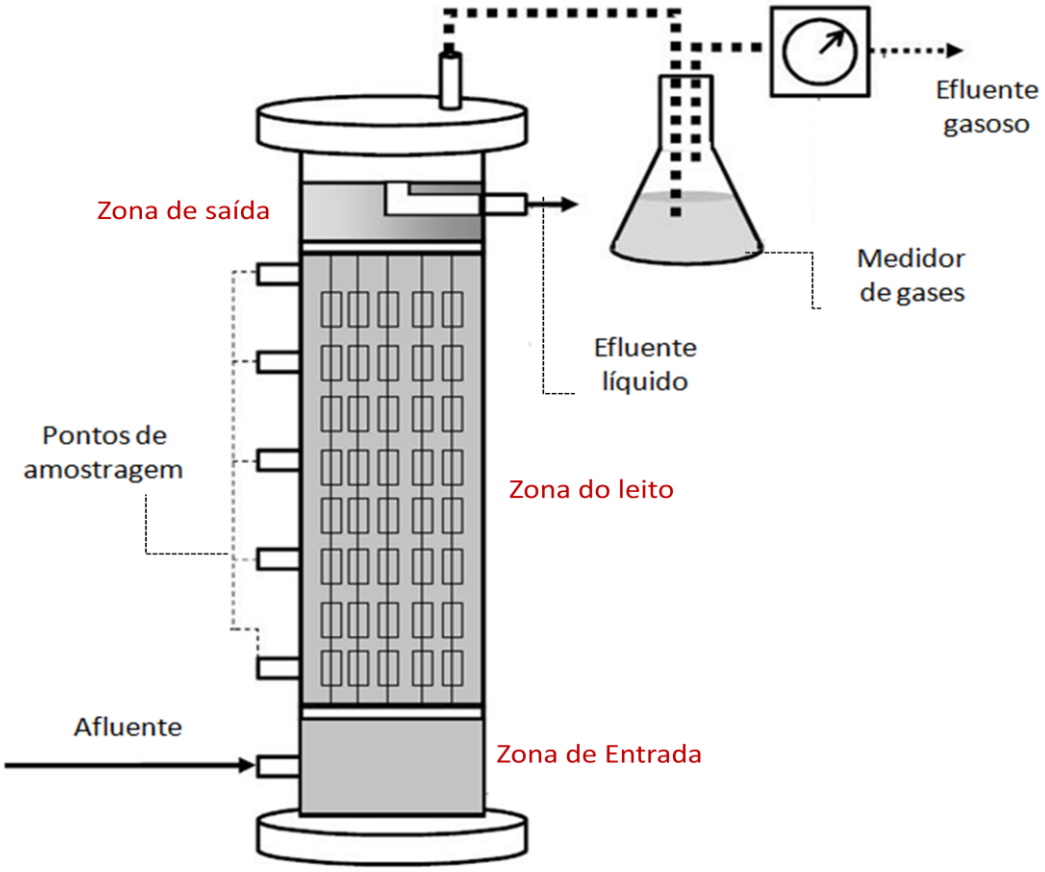

Figura 4.1 – Esquema do reator de leito estruturado

Figura 4.2 – Foto do reator anaeróbio

Tabela 4.1 – Dimensões do reator anaeróbio de leito estruturado

Característica	**Leito fixo estruturado**
Diâmetro interno	8 cm
Altura total	75 cm
Altura útil	71 cm
Volume da zona de entrada	2211 cm^3
Volume da zona do leito	10053 cm^3
Volume da zona de saída	2010 cm^3
Volume do headspace	804 cm^3
Porosidade do leito	85 %
Distância entre pontos de coleta	10 cm

4.2. Material suporte

Os reatores foram preenchidos com cilindros de polietileno de baixa densidade (Figura 4.3) com 23 e 25 mm de diâmetro e altura, respectivamente. Peixoto (2011) fez a caracterização dos cilindros de polietino e as respectivas características estão mostradas na Tabela 4.2.

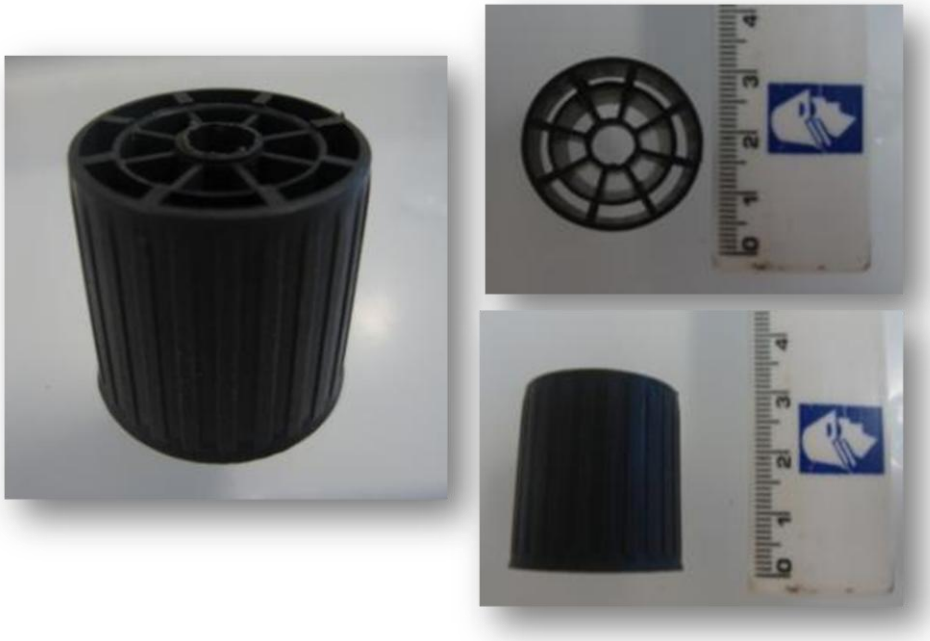

Figura 4.3 – Cilindros de polietileno.

Tabela 4.2 – Características físicas dos cilindros de polietileno.

Características	Cilindro de polietileno
Densidade (g mL^{-1})	0,96
Área superficial específica (m^2 g^{-1})	7,94

Os cilindros de polietileno possuíam um furo central para serem empilhados em hastes de aço. Tais hastes foram colocadas no reator, de maneira a formar uma coluna que compreendesse toda a extensão da zona do leito, como pode ser observado na Figura 4.6. Foram colocadas no interior do reator dez hastes distribuídas de maneira equidistante no formato de um pentágono, de modo que cinco hastes correspondessem aos vértices do

pentágono, enquanto as demais constituíssem pontos intermediários das arestas (Figura 4.5). A Figura 4.6 mostra as hastes de aço preenchidas pelo material suporte.

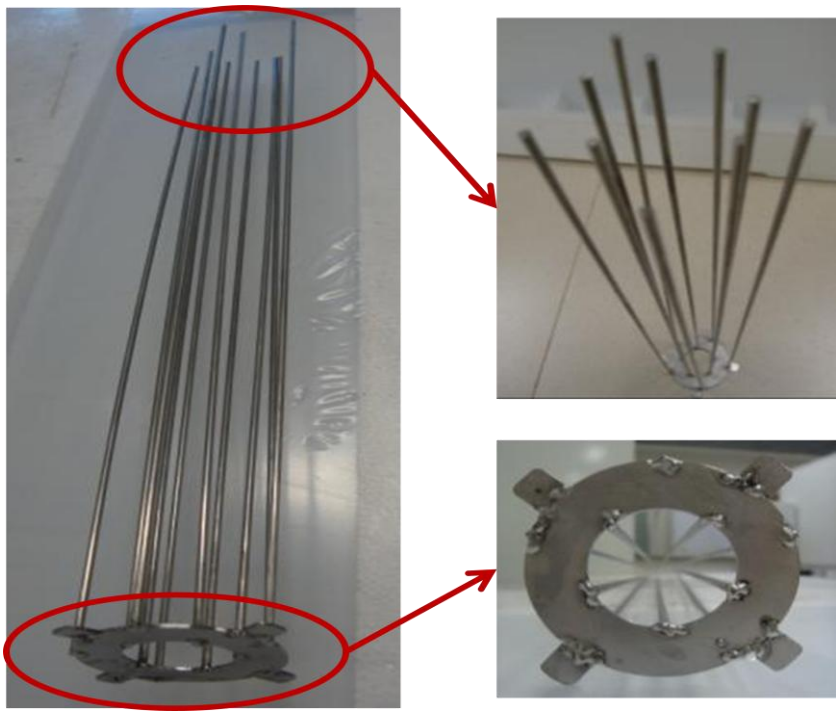

Figura 4.4 – Hastes de aço

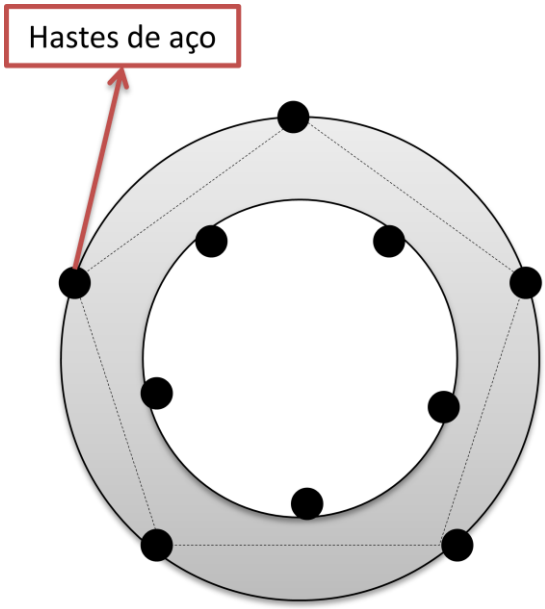

Figura 4.5 – Distribuição das hastes de aço.

Figura 4.6 – Hastes de aço preenchidas pelo material suporte.

4.3. Efluente sintético

A Tabela 4.3 apresenta a descrição da composição da água residuária sintética à base de sacarose utilizada para alimentar os reatores. Foi utilizada DQO de aproximadamente 2000 mg L^{-1} e relação carbono/nitrogênio (C/N) igual a 140, a qual corresponde a melhor relação C/N encontrada por Anzola-Rojas (2010) visando a produção de hidrogênio. O pH de entrada foi ajustado a 6,5 por meio da adição de 500 mg L^{-1} de bicarbonato de sódio e 0,25 mL L^{-1} de ácido clorídrico.

Tabela 4.3 – Composição do meio sintético que alimentou os reatores.

Composição	**Concentração (mg L^{-1})**
Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	1781,24
Uréia (CH_4N_2O)	11,51
Óxido de selênio (SeO_2)	0,036
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	5,36
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	1,3
Fosfato de sódio dibásico ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	2,76
Sulfato de níquel ($NiSO_4.6H_2O$)	0,5
Sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$)	2,5
Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$)	0,25
Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$)	Variável (conforme item 4.5)
Cloreto de Cobalto ($CoCl_2.2H_2O$)	0,04

Fonte: Del Nery (1987) adaptado.

4.4. Inoculação dos reatores

A inoculação do reator foi realizada por meio do processo de fermentação natural de acordo com metodologia desenvolvida por Leite et al. (2008). Essa metodologia consiste em preparar o meio com água de abastecimento e deixá-lo em repouso por três dias em recipiente aberto antes do início da operação dos reatores, a fim de favorecer a primeira fermentação natural. Após os três dias de repouso, essa solução é recirculada nos reatores por cinco dias com o intuito de obter aderência dos microrganismos ao meio suporte.

Penteado (2012) fez análise de microscopia ótica do inóculo em um reator de leito fixo com parâmetros operacionais iguais aos utilizados na presente pesquisa (TDH, temperatura, efluente sintético a base de sacarose e inoculação por fermentação natural). As análises microbianas foram feitas no início da operação (após a recirculação) e após os 60 dias de operação. No início da operação, as imagens de microscopia indicaram o predomínio de bacilos e endósporos, cujas morfologias são similares as dos gêneros *Enterobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* associados com a produção biológica de hidrogênio e de ácidos orgânicos (Leite *et al*, 2008). No final da operação (após os 60 dias), foi realizada novamente a microscopia da biomassa presente no interior do reator e não houve variação da morfologia da comunidade microbiana. A morfologia dos microrganismos encontradas por Penteado

(2012) foram similares ao relatados por Fernandes (2008), Peixoto (2008) e Lima (2011), os quais utilizaram a mesma metodologia de inoculação.

4.5. Operação dos reatores

Foi avaliada a produção de hidrogênio para seis diferentes concentrações de cálcio (Ca): 0,14; 0,55, 1,09 e 2,18 mg L^{-1}, além de reatores sem adição de cálcio (com água de abastecimento) e com água deionizada.

Foram realizadas análises de amostras de água de abastecimento e a concentração média de cálcio (Ca) encontrada na água foi de 1,06 ± 0,31 mg Ca L^{-1}. Ao longo das operações monitoraram-se as concentrações de cálcio na entrada do reator de forma a obter a concentração real de dosagem de cálcio aplicada. A Tabela 4.5 mostra as concentrações de cálcio teóricas e as respectivas concentrações de cálcio medidas por meio da cromatografia iônica. Cabe ressaltar que ao se utilizar água deionizada esperava-se encontrar concentração nula de cálcio, porém, ao longo da operação foram detectadas baixas concentrações de cálcio, como pode ser observado na Tabela 4.5. Tal fato aconteceu devido à saturação da coluna de troca de íons utilizada no processo de purificação da água. Ao longo da discussão dos resultados as concentrações de cálcio mencionadas serão as obtidas por meio da cromatografia iônica e não as teóricas.

Tabela 4.4 – Concentrações de cálcio

Concentrações usadas de $CaCl_2 2H_2O$ [mg L^{-1}]	**Concentração teórica Cálcio [mg L^{-1}]**	**Concentração real de cálcio [mg L^{-1}]**
água deionizada	0,0	0,50 ± 0,12
sem adição (água de abastecimento)	-	1,06 ± 0,31
0.5	0,14	1,37 ± 0,17
2	0,55	1,87 ± 0,33
4	1,09	2,45 ± 0,40
8	2,18	3,61 ± 0,52

O experimento foi dividido em três etapas, sendo que em cada uma delas foram operados dois reatores com diferentes concentrações de cálcio, uma para cada reator, com tempo de operação de 60 dias em cada etapa. Na Tabela 4.5 estão apresentadas as

concentrações de cálcio utilizadas em cada etapa. O TDH aplicado foi de 2 h, conforme trabalhos realizados no LPB-EESC-USP (ANZOLA-ROJAS, 2010; FERNANDES, 2008; LIMA, 2011; PEIXOTO, 2008 e PENTEADO, 2012). Em todas as etapas o sistema foi operado à temperatura contralada de 25°C.

Tabela 4.5 - Concentração de cálcio avaliada em cada etapa.

	Concentração real de cálcio (mg L^{-1})	
	Reator 1	**Reator 2**
Etapa 1	1,37 ± 0,17	1,87 ± 0,33
Etapa 2	1,06 ± 0,31	2,45 ± 0,40
Etapa 3	0,50 ± 0,12	3,61 ± 0,52

Na Figura 4.7 é apresentado o fluxograma geral do procedimento experimental realizado neste trabalho.

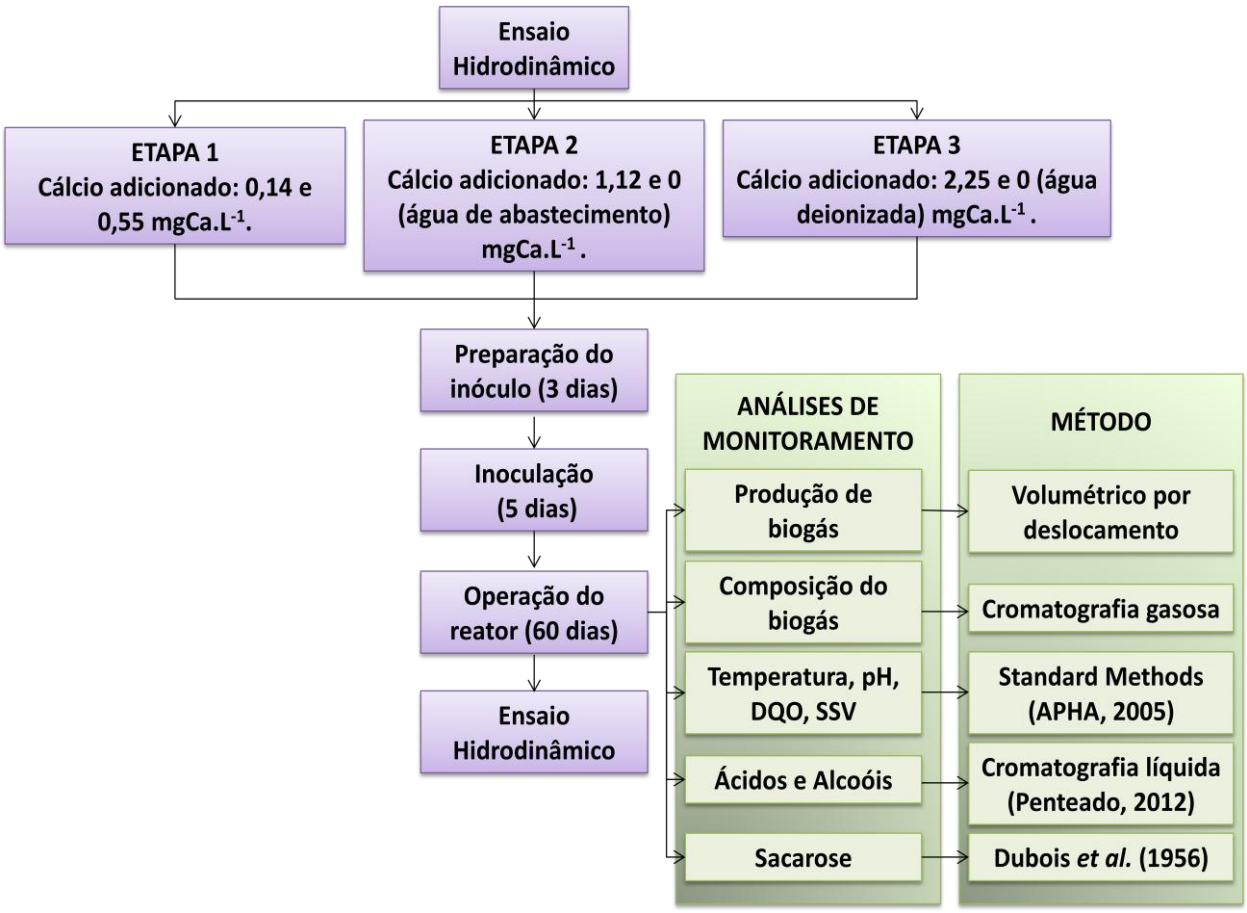

Figura 4.7 – Fluxograma geral de realização dos experimentos

4.6. Monitoramentos das variáveis operacionais

Para fins de monitoramento foram coletadas amostras do biogás, do afluente e efluente líquido do reator e realizadas as análises das variáveis operacionais descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Análise das variáveis operacionais.

Variável	**Metodologia**
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Standard Methods (APHA, 2005)
pH	Standard Methods (APHA, 2005)
Temperatura	Standard Methods (APHA, 2005)
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	Standard Methods (APHA, 2005)
Concentração de Sacarose	Dubois et al. (1956)
Vazão de Biogás	Método volumétrico por deslocamento (Medidor de gás MilliGas- counter da marca Ritter)
Composição do Biogás	Cromatografia Gasosa
Concentrações de Ácidos Voláteis e Álcoois	Cromatografia Líquida (Penteado, 2012)
Concentração de Cálcio	Cromatografia Iônica

A análise da composição do biogás gerado em cada reator foi feita em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna CARBOXEN 1010 plot 30 m x 0,53 mm, com argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente.

As análises de ácidos (cítrico, málico, succínio, láctico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), álcoois (metanol, etanol e n-butanol) e carboidratos (frutose e glicose) foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (comprimento de 0,3 m, diâmetro interno de 7,8 mm) no sistema Shimadzu. A fase móvel foi H_2SO_4 com fluxo de 0,5 mL min^{-1} e temperatura da coluna de 43°C.

O preparo da amostra consistiu em 2,0 mL da amostra a ser analisada e a adição de 80 μL de solução de ácido sulfúrico 1 N (2M). Em seguida, a solução a ser injetada foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm. Somente 100 μL desta solução foram injetadas.

A concentração de cálcio foi determinada por cromatografia iônica em cromatógrafo de íons (Dionex 5000), equipado com detector de condutividade e coluna IonPac CS12A, operando a temperatura ambiente (25°C). A fase móvel utilizada foi solução de ácido sulfúrico a 20 mM com fluxo de 1,0 mL min^{-1}. O preparo da amostra consistiu apenas na filtração da amostra em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm.

O monitoramento da vazão de alimentação na entrada de cada reator foi realizado por meio da medição do volume que escoava na saída do reator em dado intervalo de tempo, com auxílio de proveta e cronômetro. Este controle foi importante para manter a vazão de efluente constante ao longo da operação. A verificação era realizada diariamente. As vazões médias obtidas ao longo das operações estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Vazão média afluente, ao longo da operação.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Vazão [mL min^{-1}]**			
	Média	**Desvio**	**Máxima**	**Mínima**
0,50	29,6	0,7	31,0	28,0
1,06	29,7	0,8	31,0	28,0
1,37	29,8	0,9	31,5	27,0
1,87	29,8	0,8	31,5	27,5
2,45	29,8	0,8	31,0	28,0
3,61	30,1	0,6	31,0	29,0

4.7. Ensaios hidrodinâmicos

Foram realizados ensaios hidrodinâmicos antes do início das operações e no final de cada operação para a avaliação do padrão de escoamento bem como do tempo de detenção real aplicado. O TDH teórico utilizado foi de 2 horas que corresponde a uma vazão aplicada de 28 mL min^{-1}. Utilizou-se cloreto de sódio como traçador, o qual foi aplicado nos reatores na forma de degrau conforme metodologia apresentada por Levenspiel (2000).

Nos ensaios abióticos, o reator foi alimentado com água do sistema público de abastecimento com concentração de cloreto de sódio de 10 mg L^{-1} durante 6 horas, que corresponde a três vezes o TDH teórico (2 horas). Nos ensaios após a operação (60 dias), o reator foi alimentado com meio sintético com cloreto de sódio na concentração de 10 mg L^{-1} durante o período de 6 horas.

Para a aquisição dos dados da variação temporal da concentração do sal no efluente dos reatores, utilizou-se sensor de condutividade conectada à calculadora TI 89 Titanium da Texas Instruments, que por sua vez estava acoplada à interface de aquisição de dados CBL da Texas Instruments. Foram coletados 600 dados durante período igual a três vezes os TDH teóricos aplicados aos reatores.

A partir dos dados experimentais obtidos plotou-se a curva C (concentração e tempo) e foram calculadas as curvas normalizadas F (Equação 4.1) e E (Equação 4.2) para cada ensaio. O TDH médio foi determinado por meio da Equação 4.3.

$$F = \frac{C}{C_{máx}} \qquad \text{Equação 4.1}$$

$$E = \frac{dF}{dt} \qquad \text{Equação 4.2}$$

$$\theta h = \frac{\int_0^\infty t \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^\infty C(t) \cdot dt} \qquad \text{Equação 4.3}$$

Em que: θh é o TDH médio, C é a concentração do traçador e t o tempo.

A variância (σ^2) das curvas, a qual indica a dispersão da distribuição, foi calculada pela Equação 4.4., a partir da qual calculou-se a variância adimensional (Equação 4.5), o número de dispersão (*D/u.L)* para dispersões de pequena intensidade (Equação 4.6) e, por fim, considerando o modelo de tanques de mistura completa em série, calculou-se o número de reatores, N, por meio da Equação 4.7.

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^\infty (t - \theta h)^2 \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^\infty C(t) \cdot dt} \qquad \text{Equação 4.4}$$

$$\sigma_{\Theta}^{2} = \frac{\sigma^{2}}{\theta h^{2}} \qquad \text{Equação 4.5}$$

$$\sigma_{\Theta}^{2} = 2\left[\frac{D}{u \cdot L}\right] \qquad \text{Equação 4.6}$$

$$\sigma_{\Theta}^{2} = \frac{1}{N} \qquad \text{Equação 4.7}$$

4.8. Parâmetros calculados

A partir dos resultados das análises físico-químicas alguns cálculos foram realizados a fim de se avaliar a eficiência dos reatores. Tais cálculos estão descritos nas Equações 4.8 a 4.15.

- Velocidade global de conversão de sacarose v_s:

$$v_s\left[mmol.h^{-1}\right] = \frac{Q \cdot \left(C_{S_0} - C_{S_f}\right)}{MM_S} \qquad \text{Equação 4.8}$$

Em que: C_{So} é a concentração de sacarose no meio afluente, C_{Sf} a concentração de sacarose no efluente, MM_s é a massa molar da sacarose e Q a vazão de alimentação do reator.

- *Vazão de biogás (Q_g):*

$$Q_g\left[mL.h^{-1}\right] = \frac{V_m \cdot F_m}{t} \qquad \text{Equação 4.9}$$

Em que: V_m é o volume de gás marcado pelo medidor, o F_m é o fator de calibração do medidor obtido por calibração com bolhômetro padrão e t é o tempo da medida.

- *Composição do biogás*

Distribuição em porcentagem de hidrogênio (%H_2), dióxido de carbono (%CO_2) e metano (%CH_4) no biogás:

$$\%H_2 = \frac{n_{H_2}}{n} \cdot 100 \qquad \text{Equação 4.10}$$

$$\%CO_2 = \frac{n_{CO_2}}{n} \cdot 100 \qquad \text{Equação 4.11}$$

$$\%CH_4 = \frac{n_{CH_4}}{n} \cdot 100 \qquad \text{Equação 4.12}$$

Em que: n_{H2}, n_{CO2}, n_{CH4}, correspondem ao número de mols de cada um dos gases presentes no biogás: hidrogênio, dióxido de carbono e metano, respectivamente. O valor de n corresponde ao número de mols totais na amostra de gás injetado.

- *Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}):*

$$v_{H_2}\left[mmolH_2.h^{-1}\right] = \frac{Q_g \cdot n_{H_2}}{V_i} \qquad \text{Equação 4.13}$$

Em que V_i corresponde ao volume da amostra coletado e injetado no cromatógrafo gasoso. O V_i adotado foi de 500 µL, em todas as operações.

- *Rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}):*

$$Y_{H_2}\left[molH_2.mol_{sac}^{-1}\right] = \frac{v_{H_2}}{v_s} \qquad \text{Equação 4.14}$$

- *Produção volumétrica de hidrogênio (HPR):*

$$HPR\left[mL_{H_2}.h^{-1}.L^{-1}\right] = \frac{Q_g \cdot \%_{H_2}}{V} \qquad \text{Equação 4.15}$$

Em que V corresponde ao volume útil do reator.

4.9. Cálculo da biomassa no reator

- *Biomassa arrastada do reator ($B_{ARRASTE}$):*

$$B_{ARRASTE} = Q \cdot \begin{bmatrix} SSV_1 \cdot t_1 + SSV_2 \cdot (t_2 - t_1) + SSV_3 \cdot (t_3 - t_2) + \\ ... + SSV_n \cdot (t_n - t_{n-1}) \end{bmatrix}$$ Equação 4.16

Em que *SSV* corresponde concentração de sólidos suspensos voláteis (mg L^{-1}), *Q* a vazão de alimentação do reator e *t* é o tempo em horas.

- *Biomassa retida no reator (B_{RETIDA}):*

Para o cálculo da biomassa aderida no material suporte lavou-se uma amostra de material suporte no final da operação com 100 mL de água destilada. Depois separou-se o material suporte da solução de lavagem, o primeiro foi levado a estufa a 120°C e após a secagem foi feita a aferição da massa do material suporte. Na solução utilizada para a lavagem do material suporte foi feita análise da concentração de sólidos totais segundo metodologia de Standard Methods (APHA, 2005).

No final da operação foi calculada, também, a concentração de sólidos totais presentes no líquido drenado do reator.

Sendo assim calculou-se a biomassa total no sistema conforme Equação 4.17.

$$B_{RETIDA} = B_{ADERIDA} \cdot M_{SUPORTE} + SV_{DREN} \cdot V_{DREN}$$ Equação 4.17

Em que $B_{ADERIDA}$ corresponde concentração de sólidos suspensos voláteis aderida por massa de material suporte (mg SV g^{-1} material suporte), $M_{SUPORTE}$ é a massa total de material suporte presente no reator (g material suporte), V_{DREN} e SV_{DREN} correspondem ao volume de líquido drenado do reator no final da operação (L) e à concentração de SSV no líquido drenado no final da operação, respectivamente.

- *Biomassa total gerada no sistema (B_{TOTAL}):*

$$B_{TOTAL} = B_{ARRASTE} + B_{RETIDA}$$ Equação 4.18

4.10. Cálculo da carga orgânica volumétrica específica (COVe)

- *Carga orgânica volumétrica (COV):*

$$COV = \frac{Q \cdot \begin{bmatrix} SAC_1 \cdot t_1 + SAC_2 \cdot (t_2 - t_1) + SAC_3 \cdot (t_3 - t_2) + \\ ... + SAC_n \cdot (t_n - t_{n-1}) \end{bmatrix}}{V} \qquad \text{Equação 4.19}$$

Em que SAC corresponde concentração de sacarose afluente ao reator (mg L^{-1}) em um intervalo de tempo, *Q* a vazão de alimentação do reator (L h^{-1}), *t* o tempo (h) e *V* o volume útil do reator (L).

- *Coeficiente de conversão de substrato (Y):*

$$Y = \frac{B_{TOTAL}}{SAC_{CONS.TOTAL}} \qquad \text{Equação 4.20}$$

Em que B_{TOTAL} corresponde a biomassa total gerada no sistema e $SAC_{CONS.TOTAL}$ ao valor total de sacarose consumida.

- Concentração de biomassa ao longo da operação (C_X):

$$C_X = \frac{Q \cdot Y \cdot Adesão}{V} \cdot \begin{bmatrix} SAC_{CONS.1} \cdot t_1 + SAC_{CONS.1} \cdot (t_2 - t_1) + \\ ... + SAC_{CONS.n} \cdot (t_n - t_{n-1} \end{bmatrix} \qquad \text{Equação 4.21}$$

Em que:

Q: vazão afluente ao reator;

Y: coeficiente de conversão de substrato;

V: volume útil do reator;

Adesão: corresponde a $B_{RETIDA}/B_{TOTAL;}$

SAC_{CONS}: corresponde a sacarose consumida em um intervalo de tempo;

t: tempo (horas).

- Carga orgânica volumétrica específica (COVe):

$$COVe = \frac{COV}{C_X}$$

Equação 4.22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de hidrogênio

O tempo de operação foi de 60 dias para todas as concentrações avaliadas, sendo que foi descontado o período de inoculação dos reatores no início de cada operação. A composição do biogás produzido ao longo do tempo de operação para as concentrações de cálcio avaliadas estão apresentadas na Figura 5.1. Os gases encontrados no biogás foram o H_2 e o CO_2, não tendo sido observada a presença de CH_4. Os valores médios e desvio padrão da porcentagem de H_2 e CO_2 presente no biogás estão apresentados na Tabela 5.1.

Pode ser observado que para todas as concentrações de cálcio as porcentagens de H_2 foram próximas a 60%. A concentração de 0,50 mg Ca L^{-1} foi a que apresentou a maior porcentagem média de hidrogênio, 65%, e a menor porcentagem média foi de 60% para as maiores dosagens de cálcio (2,45 e 3,61 mg Ca L^{-1}).

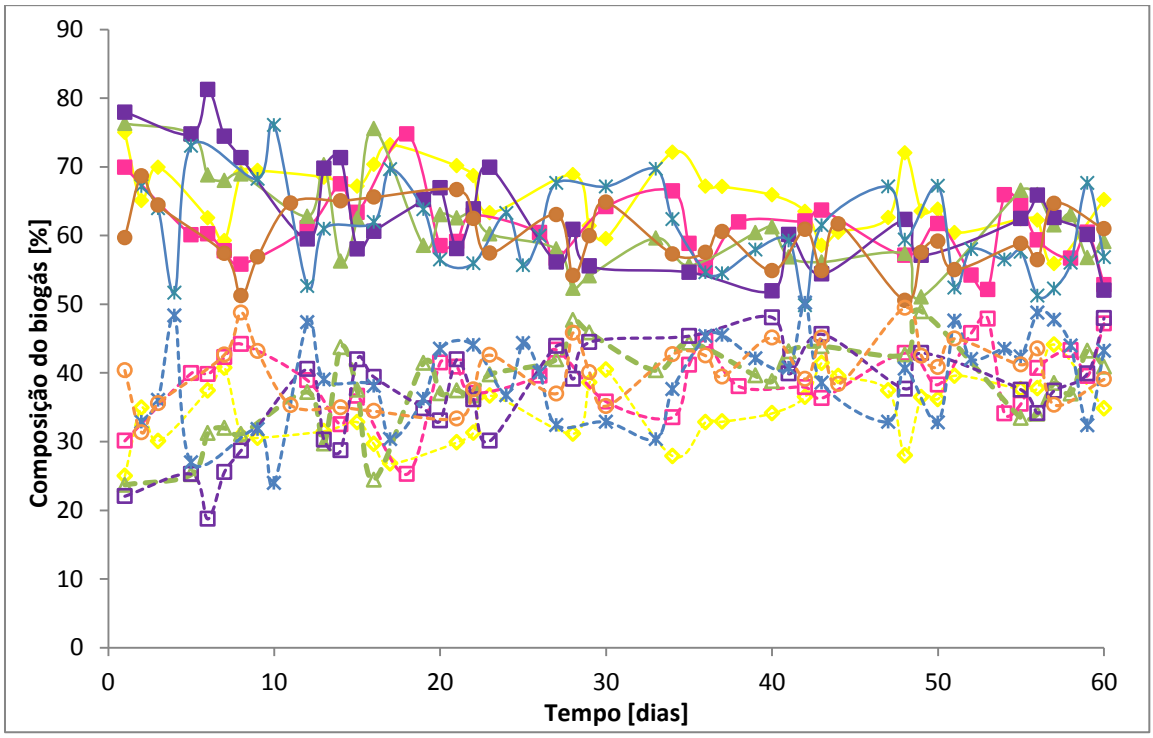

Figura 5.1 - Variação temporal de percentual de H_2 no biogás para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—) e de CO_2 para 0,50 mg Ca L^{-1} (---◇---); 1,06 mg Ca L^{-1} (---□---); 1,37 mg Ca L^{-1} (---△---); 1,87 mg Ca L^{-1} (---□---); 2,45 mg Ca L^{-1} (---✳---) e 3,61 mg Ca L^{-1} (---○---).

Tabela 5.1 - Valores médios e desvio padrão da porcentagem de H_2 e CO_2 no biogás.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Porcentagem de H_2 no Biogás [%]**		**Porcentagem de CO_2 no Biogás [%]**	
	Média	**Desvio**	**Média**	**Desvio**
0,50[a]	65	5	35	5
1,06[b]	61	5	39	5
1,37[c]	62	6	38	6
1,87[d]	63	8	37	8
2,45[e]	60	6	40	6
3,61[f]	60	5	40	5

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

As porcentagens de hidrogênio e gás carbônico são similares às observadas pelos trabalhos de Penteado (2012), Lima (2011) e Anzola-Rojas (2010) que utilizaram semelhante configuração de reator, substrato a base de sacarose e obtiveram médias em torno de 60% de H_2. Wu et al. (2012) utilizaram reator de leito fluidizado com sacarose como substrato a 20 g DQO L^{-1} e observaram que a porcentagem de H_2 no biogás na presença de 100 ppm de $CaCl_2$ ou $Ca(OH)_2$ estava na faixa de 39,7 a 42,7%, enquanto que na ausência de íons cálcio a porcentagem encontrava-se entre 38,8 e 41,6%. Yuan et al. (2010) utilizaram reator de mistura com 2 h de TDH e substrato a base de sacarose, e verificaram aumento na porcentagem de hidrogênio de 39 para 47% após a suplementação de cálcio de 100 mg L^{-1}. Lee et al. (2004) observaram aumento de 64% no teor de H_2 quando foi adicionado 5,4 mg L^{-1} de cálcio em um reator CIGSB (*carrier-induced granular sludge bed bioreactor*) alimentado com sacarose.

Foram realizados testes estatísticos ANOVA (ANalysis Of VAriance) e Teste Tukey utilizando o programa BioEstat® para a porcentagem de hidrogênio com o intuito de se verificar se as condições são estatisticamente diferentes. O ANOVA destina-se a comparar todo o grupo de dados e indica se existem diferenças estatísticas quando o F calculado é maior que o F estatístico crítico. Já o Teste Tukey compara se existem diferenças estatísticas entre cada condição de grupo. Caso a comparação seja menor que 5% (0,05), então existe diferença estatística entre os dois grupos comparados. O valor de F obtido para a porcentagem de H_2 foi de 1,7 ($p<0,1353$) e, para o nível de significância de 0,05, o valor crítico de $F_{crítico}$ foi 2,3. Portanto, o teste mostrou que não há diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações utilizadas em relação à porcentagem de H_2.

A variação temporal da vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}), determinada a partir dos valores de produção volumétrica de biogás e da porcentagem de hidrogênio no biogás, e os

valores médios, máximos e desvio padrão estão apresentados na Figura 5.2 e na Tabela 5.2, respectivamente.

O comportamento da vazão molar de hidrogênio foi instável, assim como foi observado em outros trabalhos realizados com reator de leito fixo aplicado à produção de hidrogênio (FERNANDES, 2008; LIMA, 2011; PENTEADO, 2012; ROJAS, 2010). O maior valor médio obtido foi de 5,4 mmol H_2 h^{-1} para concentração de cálcio de 1,37 mg L^{-1} e o menor valor médio foi de 1,0 mmol H_2 h^{-1} para a concentração de 2,45 mg L^{-1}.

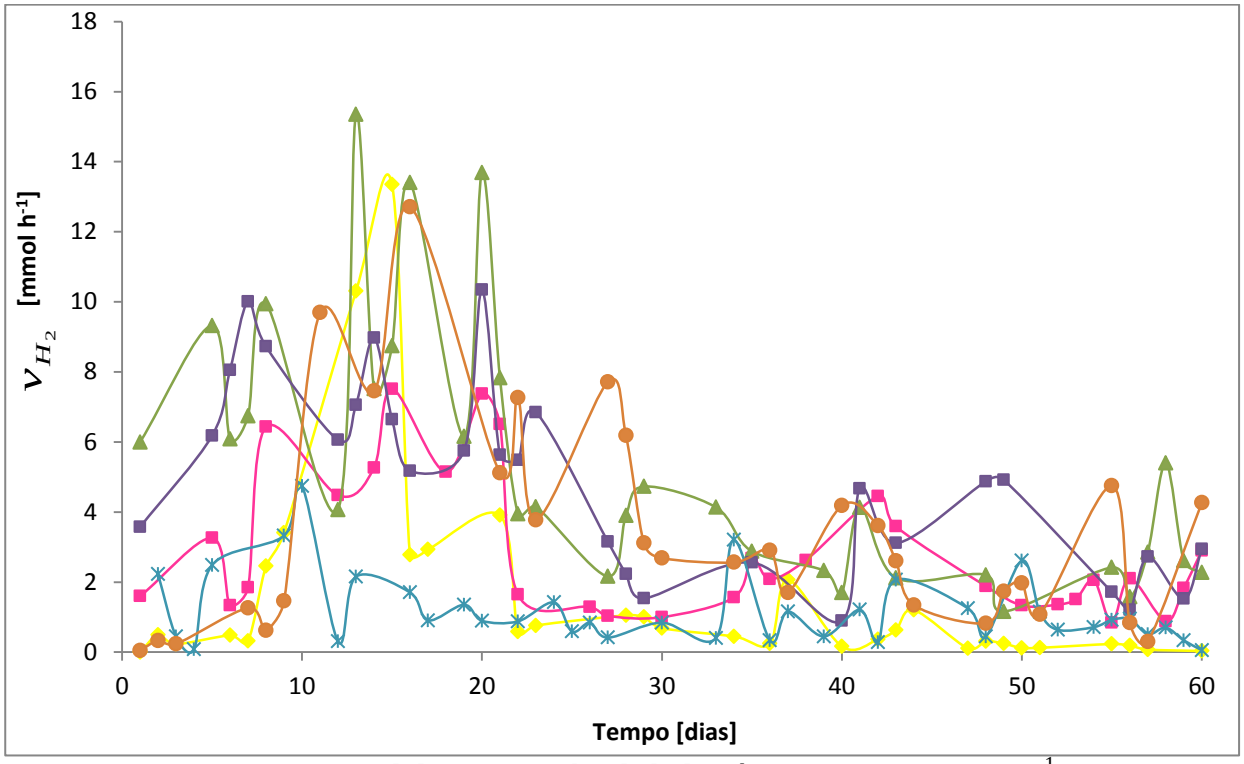

Figura 5.2 - Variação temporal de vazão molar de hidrogênio para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.2 - Valores médios, máximos e desvio padrão da vazão de biogás e vazão molar de hidrogênio para diferentes concentrações de cálcio

	Qg [mL h-1]			v_{H_2} [mmol h-1]		
Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**	**Desvio**	**Máx**	**Média**	**Desvio**	**Máx**
0,50[a]	130	127	539	1,6	2,9	13,3
1,06[b]	303	109	610	2,9	2,0	7,5
1,37[c]	328	147	707	5,4	3,7	15,4
1,87[d]	318	89	480	4,9	2,7	10,3
2,45[e]	192	91	392	1,0	0,7	3,2
3,61[f]	305	136	491	3,4	3,1	12,7

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

É possível observar na Tabela 5.2 que a vazão molar de hidrogênio apresentou diferença para as concentrações de cálcio avaliadas. Para confirmar se os dados são estatisticamente diferentes realizou-se o testes estatísticos ANOVA e Teste Tukey por meio do programa BioEstat®. Os resultados obtidos para o teste ANOVA e Tukey estão apresentados na Tabela 5.3 e Figura 5.3, respectivamente.

Os valores obtidos pelo teste ANOVA ($F=13,5 > F_{crítico}=2,3$) indicam que os dados são estatisticamente diferentes e que a melhor condição para a produção volumétrica de hidrogênio apresentou-se entre 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1}. Analisando os resultados do teste Tukey pode-se observar que as diferenças entre a média das concentrações de 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1} não são significativas, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Todavia a diferença entre a média da concentração de 1,37 mg Ca L^{-1} com os demais foi a mais significativa. Portanto, considerou-se que a mesma foi a que levou ao maior valor médio de vazão molar de H_2.

Tabela 5.3 – Resumo do teste ANOVA para vazão molar de H2.

Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**
0,50	1,6
1,06	2,9
1,37	5,4
1,87	4,9
2,45	1,2
3,61	3,4

Fonte de variação	**SQ**	**gl**	**MQ**	**F**	**valor-P**	**F crítico**
Entre grupos	480,9	5,0	96,2	13,5	< 0,0001	2,3
Dentro dos grupos	1340,0	188,0	7,1			
Total	1820,9	193,0				

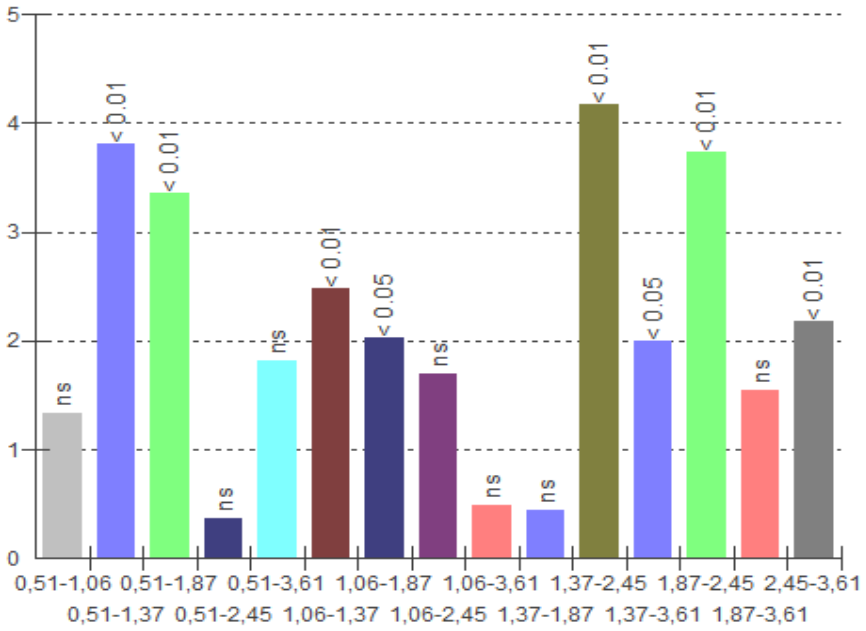

Figura 5.3 – Resumo do teste Tukey para vazão molar de H_2. Os valores ***ns*** significam que a diferença não é significativa, já ***p<0,01*** e ***p<0,05*** entende-se que a diferença é significativa.

A variação temporal da produção volumétrica de hidrogênio (HPR), obtida pela razão entre a vazão molar de hidrogênio e o volume útil do reator, está apresentada na Figura 5.4 e os respectivos valores médios, máximo e desvio padrão estão dispostos na Tabela 5.4.

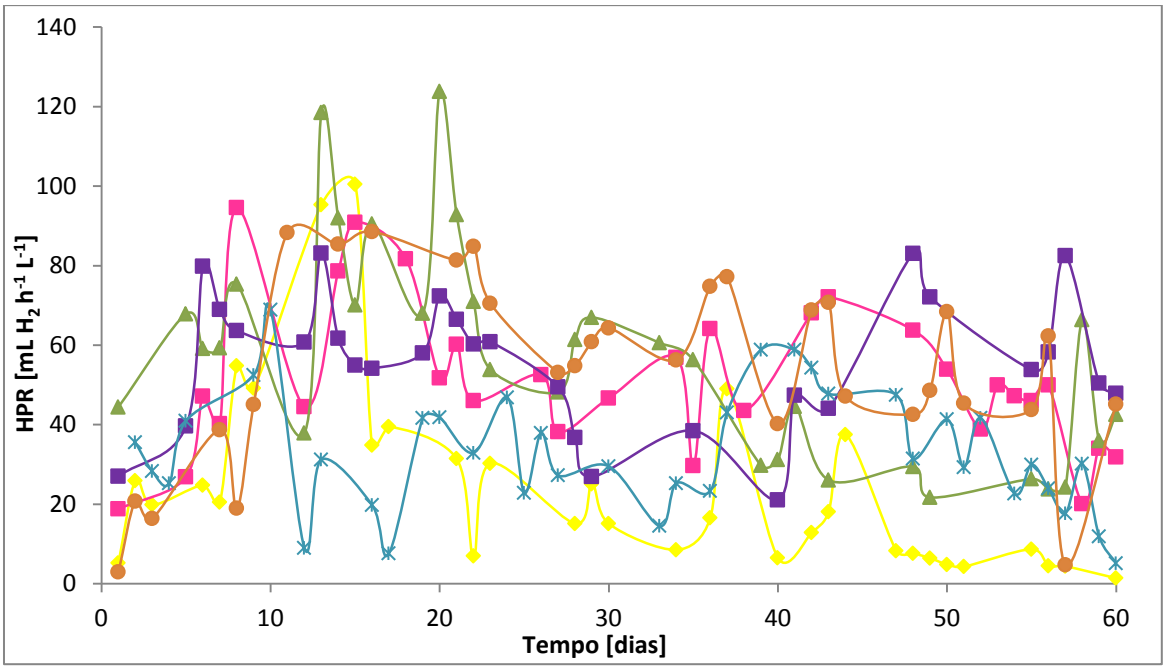

Figura 5.4 - Variação temporal da produção volumétrica de H_2 para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.4 - Valores médios, máximos e desvio padrão da produção volumétrica de H_2 para diferentes concentrações de cálcio

HPR [mL H_2 h^{-1} L^{-1}]			
Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**	**Desvio**	**Máx**
0,50[a]	24	24	101
1,06[b]	51	18	95
1,37[c]	57	26	124
1,87[d]	56	16	83
2,45[e]	33	15	69
3,61[f]	54	23	89

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

O maior valor médio obtido foi de 57 mL H_2 h^{-1} L^{-1} para concentração de cálcio de 1,37 mg L^{-1} e o menor valor médio foi de 24 mL H_2 h^{-1} L^{-1} para a concentração de 0,50 mg L^{-1}. Os valores obtidos foram inferiores àqueles reportados por Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011). Tal diferença pode ser atribuída à configuração do reator de leito estruturado. Como será discutido no item 5.6, esse tipo de configuração resultou em TDH médios reais mais próximos do esperado, com maior similaridade com o comportamento hidrodinâmico pistonado, ao contrário do que foi observado em reatores de leito empacotado, nos quais ocorreu colmatação do leito. O TDH real encontrado na presente pesquisa foi em média 4 vezes maior que os obtidos em reatores de leito fixo empacotado utilizados por Anzola-Rojas (2010), Peixoto (2008), Penteado (2012) e Perna (2011). Os menores TDH observados nos outros trabalhos levaram os sistemas ao maior desbalanceamento entre produção e consumo de hidrogênio, com resultados mais positivos em relação aos valores de HPR.

Lee et al. (2003), utilizando reatores de leito empacotado compostos por material suporte de carvão ativado destinados à produção de H_2 a partir de sacarose, avaliaram a influência da porosidade do leito e do TDH na produção de hidrogênio. A maior porosidade estudada (90%) e o menor TDH (0,5 h), resultaram em melhores resultados, com HPR de 7,4 L $h^{-1}L^{-1}$. Embora o reator de leito fixo estruturado apresente porosidades maiores, com médias de 85% no presente estudo, se comparadas ao de leito empacotado com média de 45-60%, tal fator não foi o suficiente para alcançar maiores HPR. Dessa maneira, novos estudos em relação ao TDH ideal para o reator de leito estruturado visando à produção de hidrogênio poderia permitir melhores resultados.

Lee et al. (2004), Wu et al. (2012) e Yuan et al. (2010) obtiveram maiores HPR que operações com mesmo TDH quando adicionaram íons cálcio. Os melhores resultados em relação à HPR obtidos, respectivamente, foram: 4057 mL h^{-1} L^{-1} com TDH de 0,5 h e adição

de cálcio de 5,4 mg Ca L^{-1}, 1220 mL h^{-1} L^{-1} com TDH de 2 h e adição de cálcio de 100 mg $CaCl_2$ L^{-1} e 1020,8 mL h^{-1} L^{-1} com TDH de 2 h e adição de cálcio de 100 mg Ca L^{-1}. Tais valores também foram muito acima dos encontrados na presente pesquisa.

Foram feitos testes estatísticos ANOVA (Tabela 5.5) e Teste Tukey (Figura 5.5) para os 30 primeiros dias de operação e os resultados obtidos ($F=14,1 > F_{crítico}=2,3$) comprovaram que os dados são estatisticamente diferentes e que, assim como para a vazão molar, as melhores condições para a produção volumétrica de hidrogênio apresentaram-se entre 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1}, embora diferença entre as médias de tais concentrações não sejam significativas.

Tabela 5.5 - Resumo ANOVA para HPR

Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**
0,50	24,1
1,06	51,3
1,37	56,9
1,87	56,0
2,45	33,1
3,61	52,9

Fonte de variação	**SQ**	**gl**	**MQ**	**F**	**valor-P**	**F crítico**
Entre grupos	31500	5	6310	14,1	< 0,0001	2,3
Dentro dos grupos	84400	188	448,9			
Total	115900	193				

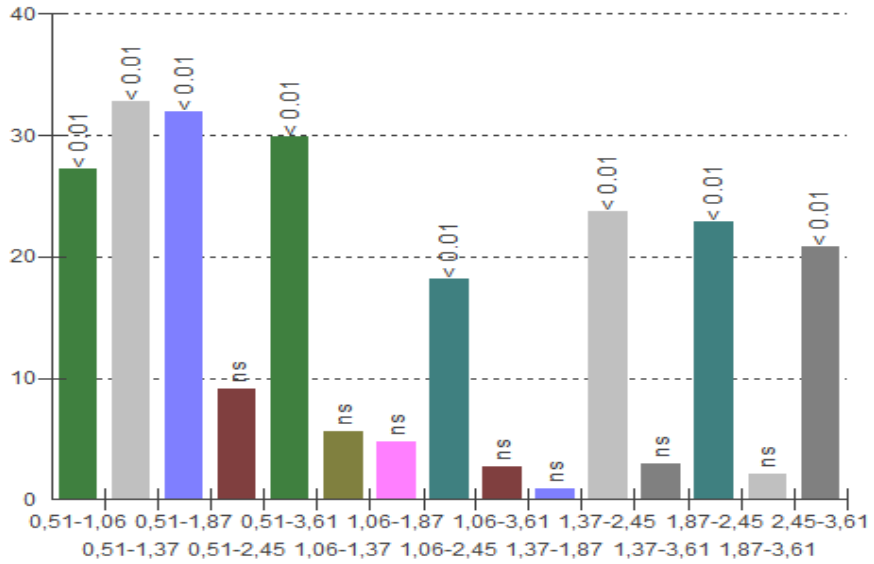

Figura 5.5 – Resumo teste Tukey para HPR. Os valores ***ns*** significam que a diferença não é significativa, já ***p<0,01*** e ***p<0,05*** entende-se que a diferença é significativa.

A eficiência de conversão de sacarose ao longo do tempo de operação para as concentrações de cálcio avaliadas estão apresentadas na Figura 5.6. Os valores médios, máximos e desvio padrão da conversão de sacarose estão apresentados na Tabela 5.6.

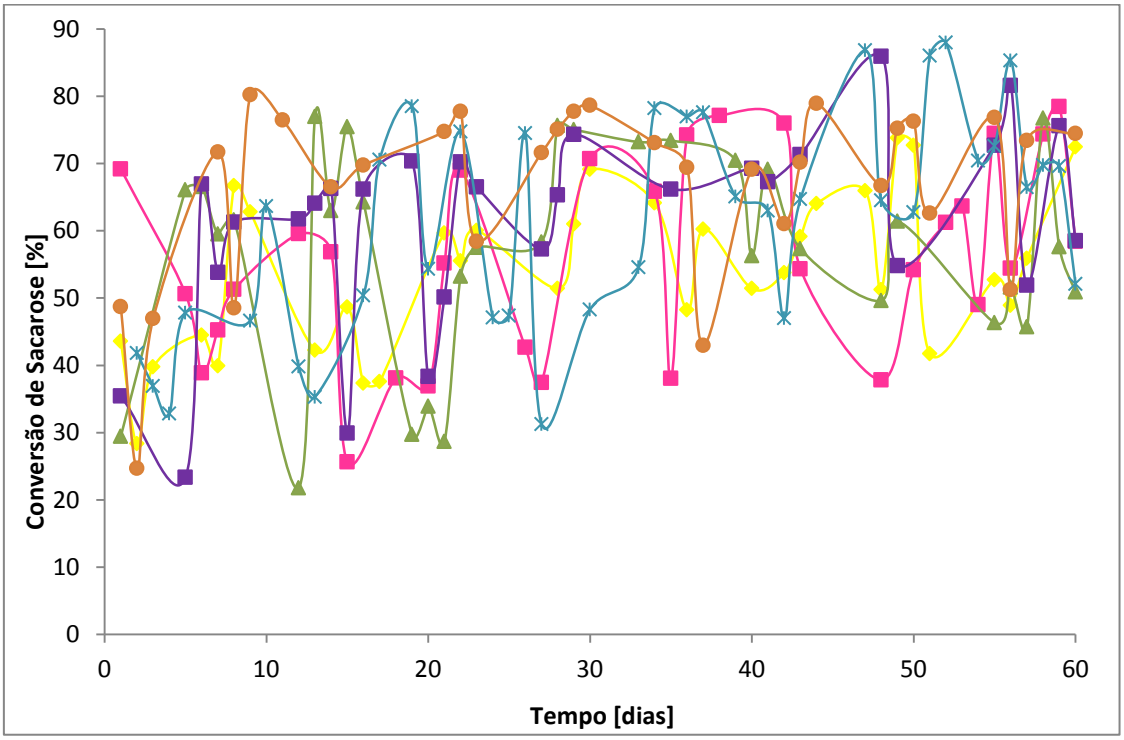

Figura 5.6 - Variação temporal da conversão de sacarose para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.6 - Valores médios, máximos e desvio padrão da conversão de sacarose para diferentes concentrações de cálcio

Conversão de sacarose [%]			
Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**	**Desvio**	**Máx**
0,50[a]	54	11	74
1,06[b]	56	14	78
1,37[c]	57	15	77
1,87[d]	61	14	86
2,45[e]	64	15	88
3,61[f]	67	13	80

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

Pode ser observado na Figura 5.6 que a conversão de sacarose apresentou alta instabilidade por todo período de operação e para todas as concentrações de cálcio avaliadas. Fernandes (2008) observou instabilidades na conversão de sacarose e creditou estes resultados oscilatórios ao fato de a produção fermentativa de hidrogênio ser um processo intermediário da degradação anaeróbia que se caracteriza por possuir alta velocidade de crescimento microbiano, o que provoca alterações nas inter-relações microbianas e na competição por diferentes substratos.

O maior valor médio de conversão de sacarose foi de 67% para a concentração de cálcio de 3,61 mg L^{-1}. Anzola-Rojas (2010), Fernandes (2008) e Lima (2011) utilizaram configurações parecidas e apresentaram eficiências de conversão superiores às obtidas neste trabalho, com médias de conversão de sacarose entre 70% e 90%. Outro fato a ser observado é a eficiência de conversão que aumentou conforme maiores concentrações de cálcio foram dosadas, assim como foi observado por Yuan et al. (2010) e Lee et al. (2004) que aumentaram a conversão de sacarose cerca de 50% quando dosaram cálcio nas concentrações de 100 e 5,4 mg L^{-1}, respectivamente. Esse aumento de conversão de sacarose pode estar relacionado ao cálcio que devido a sua ação estrutural melhora a retenção de biomassa no reator e consequentemente aumenta o consumo de substrato.

Calculou-se o rendimento em produção de hidrogênio por meio da relação do consumo de substrato e a vazão molar de hidrogênio. A variação temporal do rendimento está apresentada na Figura 5.7 para todas as concentrações de cálcio avaliadas e na Tabela 5.7 encontram-se os dados relacionados ao rendimento médio, máximo e desvio padrão.

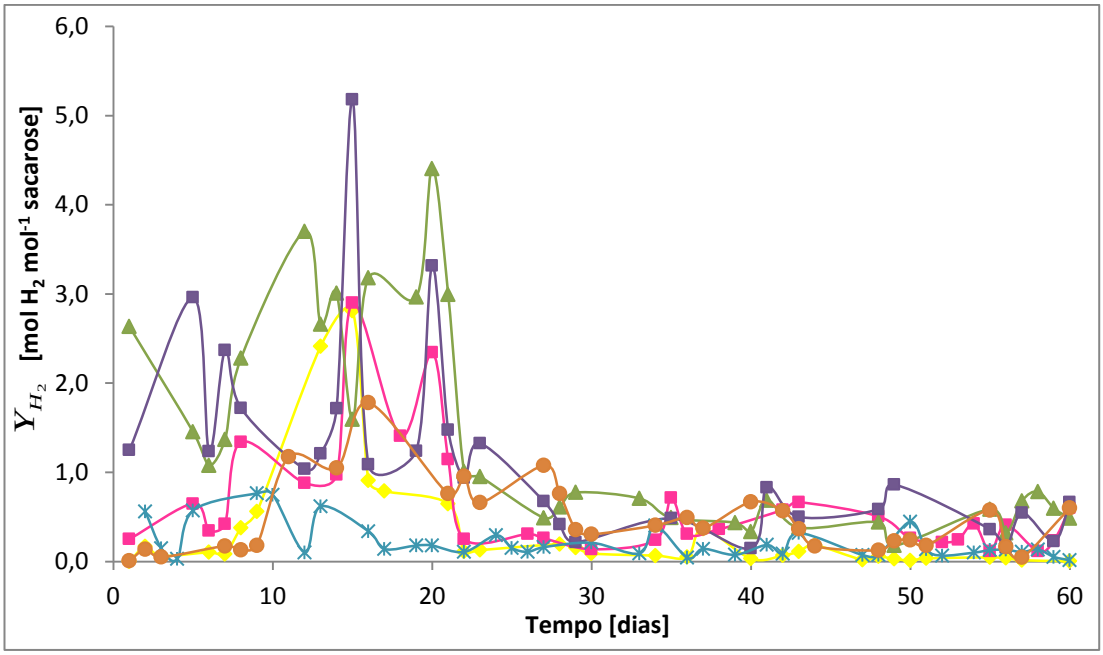

Figura 5.7 - Variação temporal do rendimento para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.7 - Valores médios, máximos e desvio padrão do rendimento para diferentes concentrações de cálcio

Y_{H_2} [mol H2 mol-1 sacarose]			
Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**Média**	**Desvio**	**Máx**
0,50[a]	0,3	0,6	2,8
1,06[b]	0,6	0,6	2,9
1,37[c]	1,4	1,2	4,4
1,87[d]	1,2	1,1	5,2
2,45[e]	0,2	0,2	0,8
3,61[f]	0,5	0,4	1,8

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

O maior valor médio foi de 1,4 mol H_2 mol^{-1} sacarose para a concentração de cálcio de 1,37 mg L^{-1} e a menor média de rendimento foi de 0,3 mol H_2 mol^{-1} sacarose para a menor concentração de cálcio, 0,50 mg L^{-1}. O maior valor médio do rendimento de hidrogênio foi apenas 17% do valor teórico máximo estabelecido pela estequiometria da melhor reação para produção de hidrogênio, a qual ocorreria se toda sacarose fosse convertida em ácido acético (8 mol H_2 mol^{-1} de sacarose). Dessa maneira, o rendimento baixo está relacionado também à ocorrência de fermentação mista no reator, ou seja, à produção de outros metabólitos, como por exemplo, o ácido butírico, além do ácido acético, bem como o consumo de hidrogênio por outras vias, como por exemplo, a homoacetogênese.

Segundo Show et al. (2011) não é possível manter altos rendimentos de hidrogênio em um reator de leito fixo, pois o gradiente de distribuição de pH ao longo do reator causa distribuição heterogênea na atividade microbiana. Perfis espaciais realizados em reator de leito fixo empacotado mostram que logo na entrada do reator, no primeiro ponto de amostragem, o valor do pH é inferior a 6, para um pH afluente de 6,5, e decai ao longo do leito (ANZOLA-ROJAS, 2010; FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; PENTEADO, 2012). Uma maneira de melhorar o sistema é implementar a recirculação da fase líquida. Lima (2011) aplicou recirculação da fase líquida com razão de recirculação igual a 0,5 e concentração de cálcio de 0,6 mg Ca L^{-1}, obtendo perfil espacial do pH praticamente constante ao longo do reator. O autor obteve rendimento médio de 1,43 mol H_2 mol^{-1} sacarose, maior que os valores obtidos neste trabalho para concentrações próximas a 0,6 mg Ca L^{-1}, cerca de 4 e 2 vezes maior para as concentrações de 0,50 e 1,06 mg Ca L^{-1}, respectivamente.

Wu et al. (2012) obtiveram melhores rendimentos quando adicionaram 100 ppm de $Ca(OH)_2$ em um reator de leito fluidizado, tendo obtido rendimento de 3,76 mol H_2 mol^{-1} sacarose. Da mesma maneira Yuan et al. (2010) e Lee et al. (2004) também observaram aumento no rendimento dos reatores após a suplementação de cálcio de 100 e 5,4 mg Ca L^{-1}, respectivamente. Os autores em questão observaram rendimentos médios de 3,74 e 2,11 mol H_2 mol^{-1} sacarose, respectivamente.

Foram feitos testes estatísticos ANOVA (Tabela 5.8) e Teste Tukey (Figura 5.8) para os 30 primeiros dias de operação e os resultados obtidos para o nível de significância de 0,05 ($F=13,0 > F_{crítico}=2,3$) comprovaram que os dados são estatisticamente diferentes e que, assim como para a vazão molar de H_2 e HPR, as melhores condições para a produção volumétrica de hidrogênio apresentou-se entre 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1}, embora diferença entre as médias de tais concentrações não sejam significativas. Todavia a diferença entre a média da concentração de 1,37 mg Ca L^{-1} com os demais foi a que apresentou valores mais significativos. Portanto, considerou-se que a mesma foi a que levou a maior valor médio de rendimento de produção de H_2.

Tabela 5.8 – Resumo ANOVA para a o rendimento da produção de H2.

Cálcio [mg L^{-1}]	Média
0,50	0,33
1,06	0,63
1,37	1,38
1,87	1,20
2,45	0,22
3,61	0,48

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	37,3	5,0	7,5	13,0	< 0,0001	2,3
Dentro dos grupos	107,8	188,0	0,6			
Total	145,1	193,0				

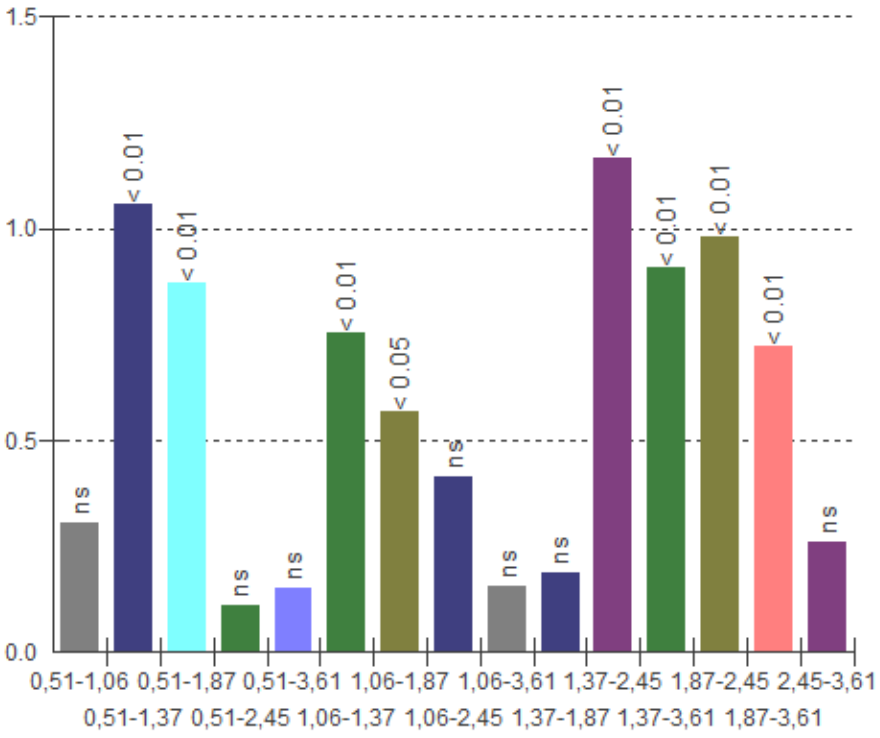

Figura 5.8 - Resumo teste Tukey para a o rendimento da produção de H2.

5.2. Concentração de biomassa acumulada nos reatores

Outra variável monitorada foi a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente do reator, com o objetivo de monitorar o arraste de sólidos do reator ao longo da operação (Figura 5.9), e também foi analisada a concentração de sólidos totais no final da operação de cada etapa, ou seja, foi medida a concentração de sólidos no líquido drenado do reator (biomassa acumulada nos interstícios do material suporte e na zona de entrada) bem como da concentração de biomassa aderida ao material suporte (Figura 5.10). Tais resultados estão dispostos na Tabela 5.9.

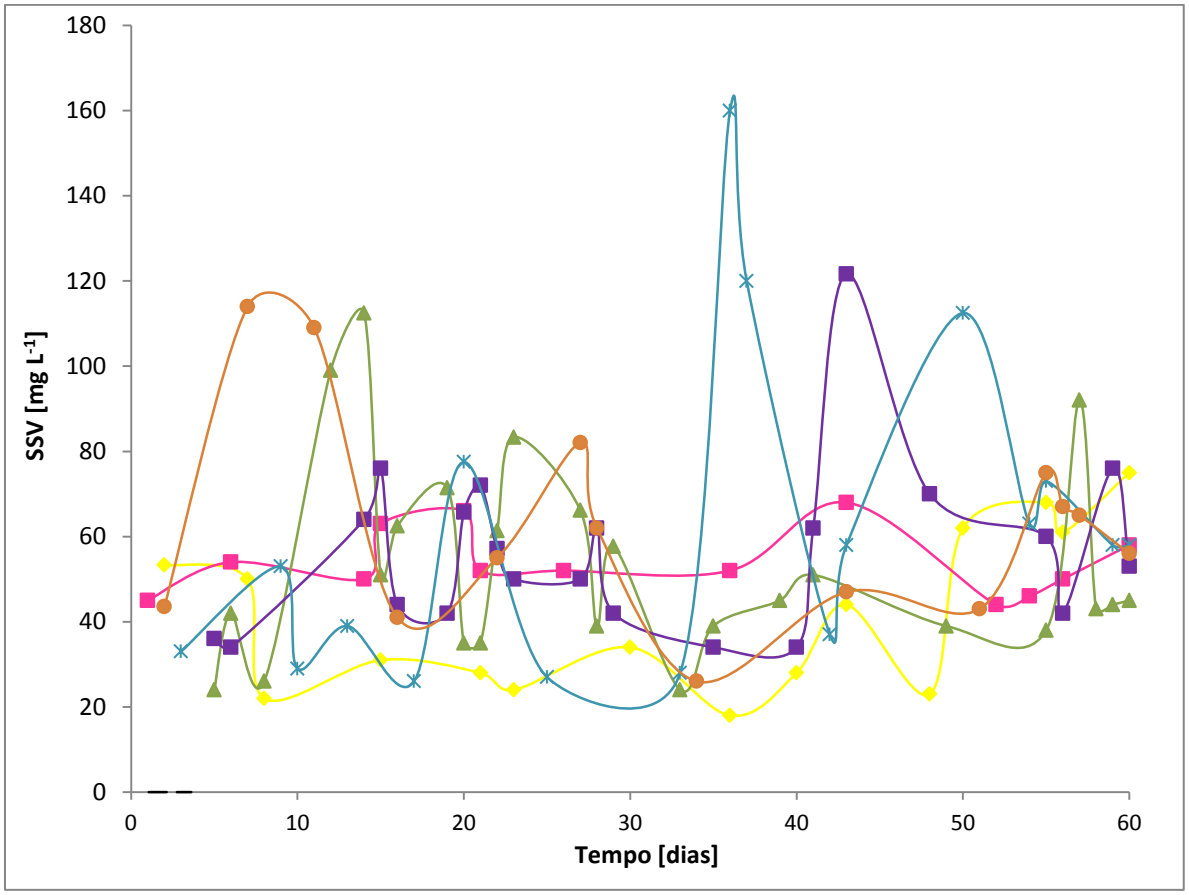

Figura 5.9 - Variação temporal da concentração de SSV para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

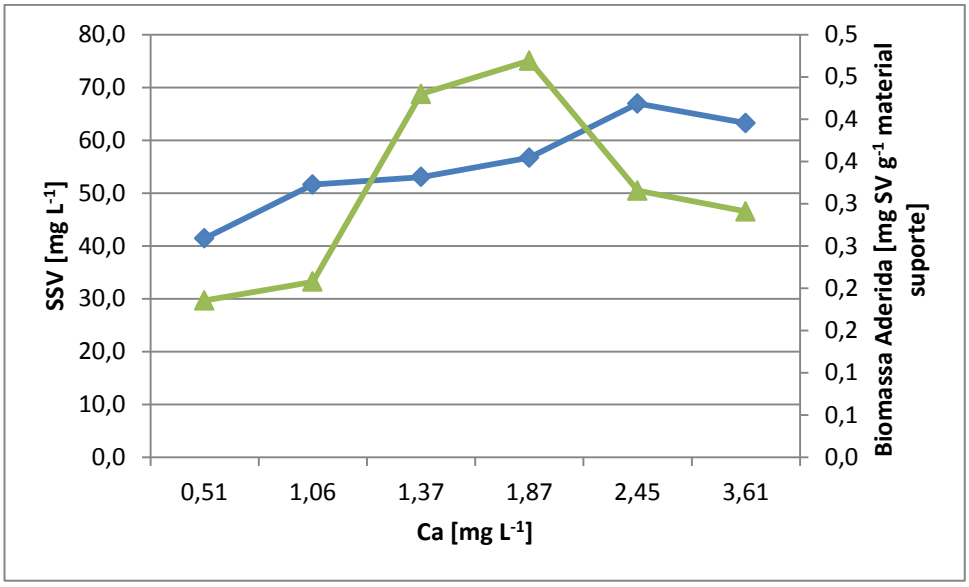

Figura 5.10 – Concentração média de SSV no efluente do reator (—◆—) e concentração da biomassa aderida no material suporte no final da operação (—▲—).

Tabela 5.9 – Valores médios, máximos e desvio padrão da concentração de SSV e SV no líquido drenado e no material suporte para diferentes concentrações de cálcio

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**SSV [mg L^{-1}]**			**Final da operação [mg SV L^{-1}]**	**Biomassa aderida [mg SV g^{-1} material suporte]**
	Média	**Desvio**	**Máx**		
0,50[a]	41	19	75	2008	0,16
1,06[b]	52	34	156	3036	0,16
1,37[c]	53	23	112	3600	0,26
1,87[d]	57	20	122	2314	0,28
2,45[e]	63	39	160	5207	0,32
3,61[f]	63	25	114	4432	0,29

Número de amostras: [a]16, [b]16, [c]20, [d]20, [e]16 e [f]18.

É possível observar pela Figura 5.10 que a biomassa aderida no meio suporte apresentou diferença para as concentrações de cálcio analisadas. Foi observado aumento na concentração de biomassa no material suporte conforme maiores dosagens de cálcio foram dosadas. Tal fato mostra que a adição de cálcio pode ser usada como estratégia para melhorar a retenção de biomassa.

Cabe ressaltar que para a concentração de 0,50 mg Ca L^{-1} foram observadas as menores concentrações de SSV no efluente bem como de biomassa aderida no material suporte. Tal fato pode ter ocorrido por se tratar de água deionizada, em que não só íons cálcio foram retirados, mas também todos os íons presentes na água de abastecimento, o que pode interferir

nas concentrações totais de nutrientes disponíveis para os microrganismos.

Os resultados obtidos por Anzola-Rojas (2010), Lima (2011) e Penteado (2012) em relação à biomassa aderida em reator de leito fixo empacotado foram em média 540, 500 e 50 vezes maiores que os resultados obtidos no presente estudo, respectivamente. A principal diferença dos reatores desses autores para o utilizado no presente estudo é a porosidade do leito que para o empacotado está na faixa de 45-60% e para o leito estruturado é em média 85%. Fernandes (2008) e Lee et al. (2003) estudaram o efeito da porosidade de reatores de leito fixo e concluíram que baixas porosidades facilitam a formação de biomassa, uma vez que possuem maior área de superfície para formação de biofilme. Por outro lado porosidades maiores proporcionam mais espaço vazio para o crescimento dos microrganismos na fase líquida. Os resultados obtidos por tais autores foram melhores quando aplicadas porosidades de 90%, pois favoreceram menor retenção de biomassa nos interstícios e o arraste periódico da biomassa excedente. Chang et al. (2002) demonstraram que as células mantidas em suspensão no espaço vazio de reatores de leito fixo desempenhou papel importante na geração de H_2. Dessa maneira, altas porosidades que proporcionam espaços vazios suficientes para o crescimento das células em suspensão pode ser crucial para a produção de H_2 em reatores de leito fixo, porém não foi observado melhores resultados que os de leito empacotado no presente estudo. Tal fato pode estar relacionado ao tempo de detenção real que foram, em média, maiores que os reportados por Anzola-Rojas (2010), Lima (2011) e Penteado (2012).

5.3. Instabilidade na produção de hidrogênio e estimativa da concentração ótima de cálcio

Em trabalhos realizados com reatores de leito fixo a instabilidade observada na produção de hidrogênio foi creditada ao crescimento excessivo de organismos no leito do reator, levando a cargas específicas decrescentes e consequente queda na produtividade (ANZOLA-ROJAS, 2010, FERNANDES, 2008). Como pode ser observado na Figura 5.11, embora os reatores com concentrações de 0,50 e 1,06 mg Ca L^{-1} tenham apresentado as menores concentrações de SV (considerando a biomassa aderida no material suporte + biomassa contida no líquido drenado do reator) no final da operação de cada etapa, eles não foram melhores em relação a produção de hidrogênio. Tal fato pode ocorrer como consequência de tais concentrações estarem abaixo do requerimento nutricional mínimo dos microrganismos para que a produção de hidrogênio acontecesse de forma satisfatória. Os

reatores com concentrações de 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1} que alcançaram os maiores rendimentos médios de produção de H_2 apresentaram baixas concentrações de SV dentro do reator se comparadas as concentrações de 2,45 e 3,61 mg Ca L^{-1} , corroborando, dessa maneira, com a hipótese de haver uma carga específica ótima para a produção de hidrogênio, tal como observado por Anzola-Rojas (2010) e Dinamarca & Bakke (2009).

Os reatores com maiores concentrações de cálcio (2,45 e 3,61 mg Ca L^{-1}) foram os que obtiveram maior acúmulo de biomassa. Tal fato, foi observado nos trabalhos realizados por Lee et al. (2004), Yuan et al. (2010) e Wu et al. (2012), os quais comprovaram que a suplementação de cálcio com baixos TDH evita que a biomassa seja lavada do reator.

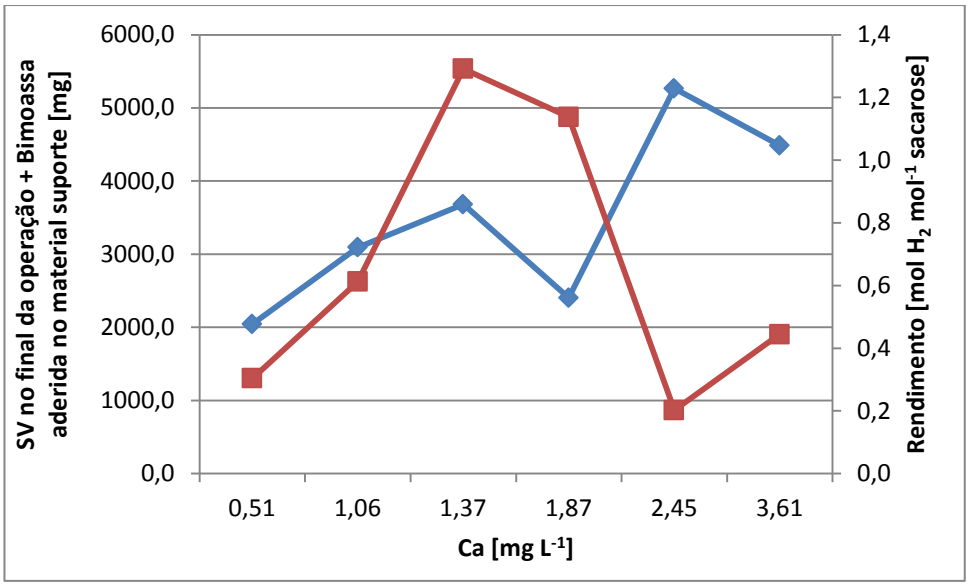

Figura 5.11 - Concentração de SV no final da operação (—◆—) e Rendimento da produção de H_2 (—■—).

Assim como observado por Anzola-Rojas (2010), Fernandes (2008), Lima (2011), Peixoto (2008) e Penteado (2012), a produção de hidrogênio e dióxido de carbono decaíram ao longo do tempo de operação ao mesmo tempo em que o crescimento e acúmulo de biomassa aumentaram no leito. Tais autores relacionaram esse comportamento ao desenvolvimento de microrganismos consumidores de H_2 e CO_2 devido à diminuição continua da carga orgânica volumétrica específica aplicada (COVe), o que pode levar ao desvio de rotas bioquímicas no reator, levando ao estabelecimento, por exemplo, da homoacetogênese, a qual consome o hidrogênio produzido no reator.

Foram estimados os valores de COVe ao longo do tempo e, como pode ser observado na Figura 5.12, a COVe decresceu continuamente, devido ao crescimento da biomassa no reator, com estabilização a partir do 30° dia, após o qual o valor da COVe obtive pequenas

variações. Os valores médios da COVe para o período entre o 30° e 60° dia estão dispostos na Tabela 5.10 e Figura 5.13.

A fase de "estabilização" da COVe coincide com a diminuição do valor médio do rendimento para todas as operações, como pode ser observado na Figura 5.7. O período de maior variação da COVe, nos primeiros 30 dias, coincide com os maiores valores de rendimento obtidos ao longo das operações. Deste modo, o controle sobre a COVe pode ser fator chave para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo.

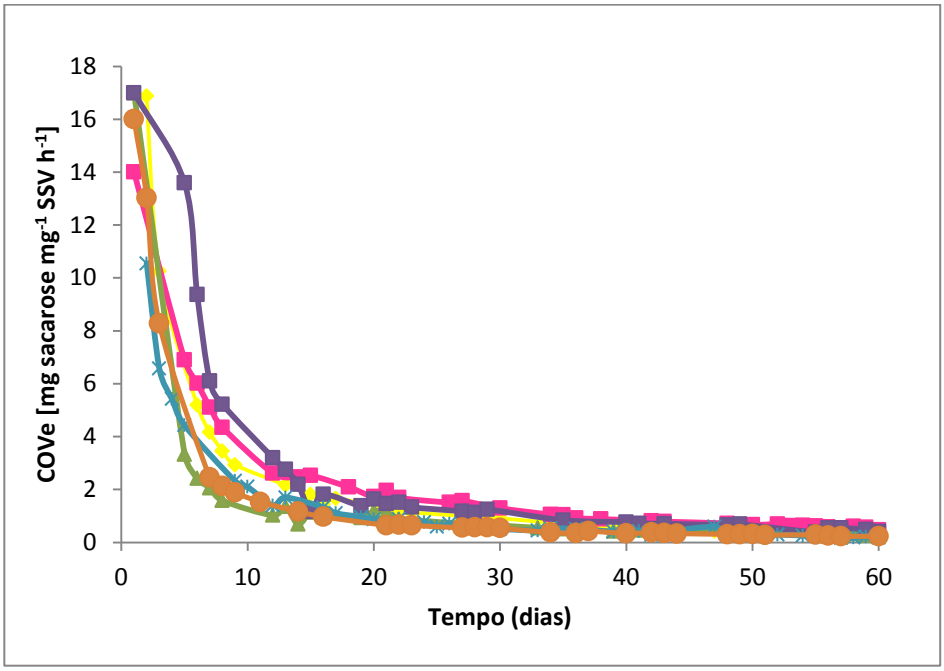

Figura 5.12 – Variação temporal da COVe para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Como pode ser observado na Figura 5.13 e Tabela 5.10, há uma tendência de queda de COVe, com posterior estabilização, conforme maiores dosagens de cálcio são adicionadas ao meio. O controle da concentração de cálcio na alimentação dos reatores pode, portanto, ser um fator controlador da COVe já que maior ou menor acúmulo de biomassa no sistema se mostraram dependentes dessa concentração afluente. Assim como foi observado para a concentração de SSV no reator, embora os reatores com concentrações de 0,50 e 1,06 mg Ca L^{-1} tenham apresentado as maiores COVe (0,72 e 0,70 g sacarose.g SSV $^{-1}$ h^{-1}) eles não foram melhores em relação a produção de hidrogênio.

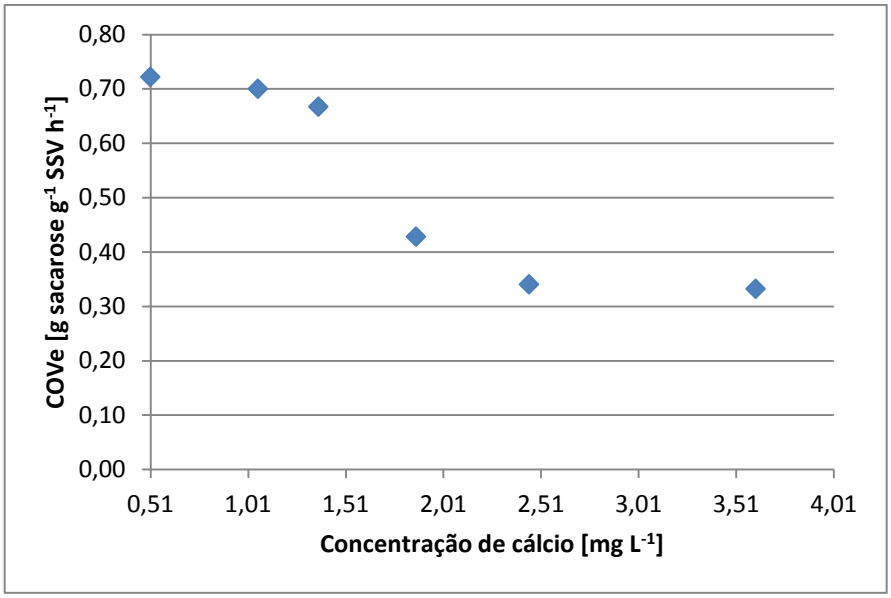

Figura 5.13 - Carga orgânica volumétrica específica aplicada para as diferentes concentrações de cálcio.

Tabela 5.10: Carga orgânica volumétrica específica aplicada para as diferentes concentrações de cálcio.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**COVe após 30° dia de operação [g sacarose.g SSV $^{-1}$.h^{-1}]**	
	Média	**Desvio**
0,50	0,72	0,11
1,06	0,70	0,13
1,37	0,43	0,11
1,87	0,61	0,13
2,45	0,34	0,12
3,61	0,33	0,08

Para os principais parâmetros analisados, o mesmo comportamento foi observado e ficou evidente que há influência da concentração de cálcio adicionada sobre a vazão molar de hidrogênio, a produtividade volumétrica de hidrogênio e o rendimento de produção de hidrogênio.

A suplementação de cálcio em reatores de leito fixo estruturado pode ter efeitos positivos e negativos no desempenho do reator e consequentemente na produção de hidrogênio, principalmente nos aspectos relacionados ao acúmulo de biomassa. Tendo em vista isto, era esperada a existência de um ponto de ótimo, uma concentração de cálcio que fosse o suficiente para nutrição dos microrganismos sem que ocorresse elevada retenção de biomassa no reator. Para a maioria dos parâmetros avaliados a concentração de cálcio de 1,37

mg L^{-1} gerou melhores resultados. No entanto, é possível buscar um ponto de ótimo operacional. Para isso, foi utilizado o rendimento médio de cada operação, como parâmetro para avaliação do ponto ótimo para a configuração de reator de leito estruturado. Inicialmente, foi relacionada as concentrações de cálcio com o rendimento médio e as curvas foram ajustadas a uma spline com o auxilio da programa Origin 8.6. As splines são polinômios de baixa ordem que guardam continuidade em vários níveis nos pontos de conexão. Seu uso é frequente em problemas de interpolação, em que polinômios interpoladores não produzem bons resultados, que foi o que ocorreu ao se fazer o ajuste polinomial dos dados analisados (ALENCAR NETO, 2008).

Para a função ajustada chegou-se, por meio da derivação da curva spline, a um ponto de ótimo de rendimento de 1,5 mol H_2 mol^{-1} sacarose obtido com concentração de cálcio de 1,54 mg L^{-1}.

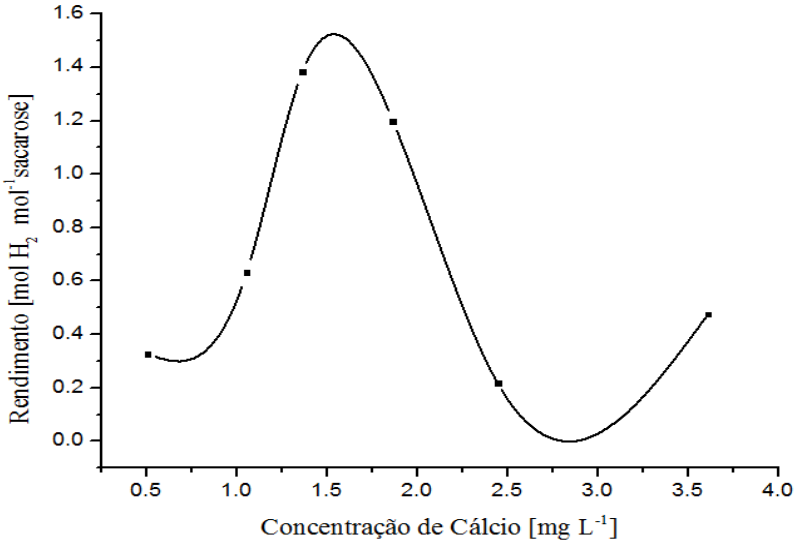

Figura 5.14 - Relação entre Concentração de cálcio e rendimento

A dosagem ótima de cálcio encontrada no presente estudo foi significativamente menor que as concentrações relatadas por Yuan et al. (2010) e Wu et al. (2012), iguais a 100 ppm de $CaCl_2$ ou $Ca(OH)_2$ e 100 mg Ca L^{-1}, respectivamente. Tal aspecto pode ser considerado como positivo, uma vez que em termos econômicos a necessidade de suplementação de cálcio em reatores de leito fixo é diminuída. Porém, cabe ressaltar, que tais autores utilizaram a suplementação de cálcio como uma estratégia para aumentar a concentração de biomassa no reator, pois a mesma era lavada com baixos TDH quando não havia adição de cálcio. No

presente estudo buscou-se, com a adição de cálcio, obter maior controle da biomassa aderida no leito do reator, de maneira a encontrar uma concentração que seja suficiente para o requerimento nutricional dos microrganismos envolvidos, sem que ocorra colmatação do leito, conforme foi observado por Anzola-Rojas (2010), Fernandes (2008), Peixoto (2008,2011), Penteado (2012) e Perna (2011) utilizando reatores de leito fixo empacotados.

Os menores valores de rendimento de produção de hidrogênio observados na presente pesquisa, se comparados com trabalhos realizados com reatores de leito empacotado (ANZOLA-ROJAS, 2010; FERNANDES, 2008; LIMA, 2011, PENTEADO, 2012) podem ser atribuídos ao tempo de detenção hidráulica reais maiores encontrados nesse trabalho. Dinamarca e Bakke (2009) observaram que a queda da produção de hidrogênio foi mais lenta quando menores TDH foram aplicados, os autores inferiram que existe uma ligação entre a idade e/ou densidade de biomassa no reator com o consumo de hidrogênio, principalmente quando TDH maiores são aplicados.

Os efeitos relativos ao crescimento da biomassa nos processos de produção de hidrogênio ainda são desconhecidos. Identificar e compreender os fatores e reações envolvidas na produção de hidrogênio deve ser foco de pesquisa, de forma que seja possível melhorar o controle de formação de produtos, de biomassa e otimizar a produção de hidrogênio.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a suplementação de cálcio é capaz de aumentar a retenção de biomassa em reatores de leito fixo estruturado e que é possível adicionar uma concentração de cálcio “ótima” (1,54 mg L^{-1}) que proporcione melhores condições para a produção de hidrogênio e que diminua o crescimento de biomassa no reator de leito estruturado. Considerando a água de abastecimento utilizada nesse trabalho, a concentração necessária de cálcio seria diminuída para cerca de 0,5 mg L^{-1} já que a água continha, em média, 1,06 mg L^{-1} de cálcio.

Cabe ressaltar que outro parâmetro avaliado ao longo das operações foi o pH efluente, o qual se manteve próximo de 4,5 em todas as concentrações avaliadas (Figura 5.15 e Tabela 5.11). Segundo Hawkes et al. (2007) Show et al. (2012), reatores anaeróbios com pH próximo a 4,5 produzem menos hidrogênio que reatores em que o pH é mantido entre 5,0 e 6,0. Portanto, este pode ser mais um dos fatores a causar a instabilidade na produção.

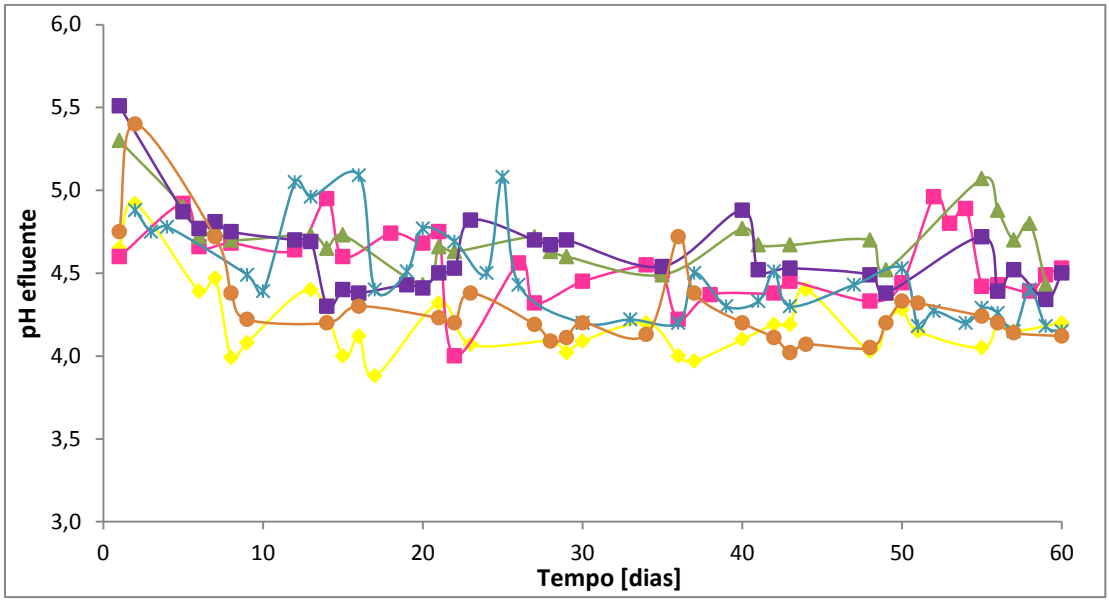

Figura 5.15 - Variação temporal do pH efluente para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.11 – pH efluente médio para as diferentes concentrações de cálcio avaliadas.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**pH**	
	Média	**Desvio**
0,50[a]	4,18	0,20
1,06[b]	4,56	0,22
1,37[c]	4,71	0,19
1,87[d]	4,61	0,24
2,45[e]	4,45	0,29
3,61[f]	4,30	0,28

Número de amostras: [a]34, [b]32, [c]33, [d]30, [e]39 e [f]32.

5.4. Geração de produtos intermediários

Os gráficos dos principais produtos intermediários obtidos na produção biológica de hidrogênio a partir da sacarose para cada uma das concentrações de cálcio avaliadas estão apresentados na Figura 5.16.

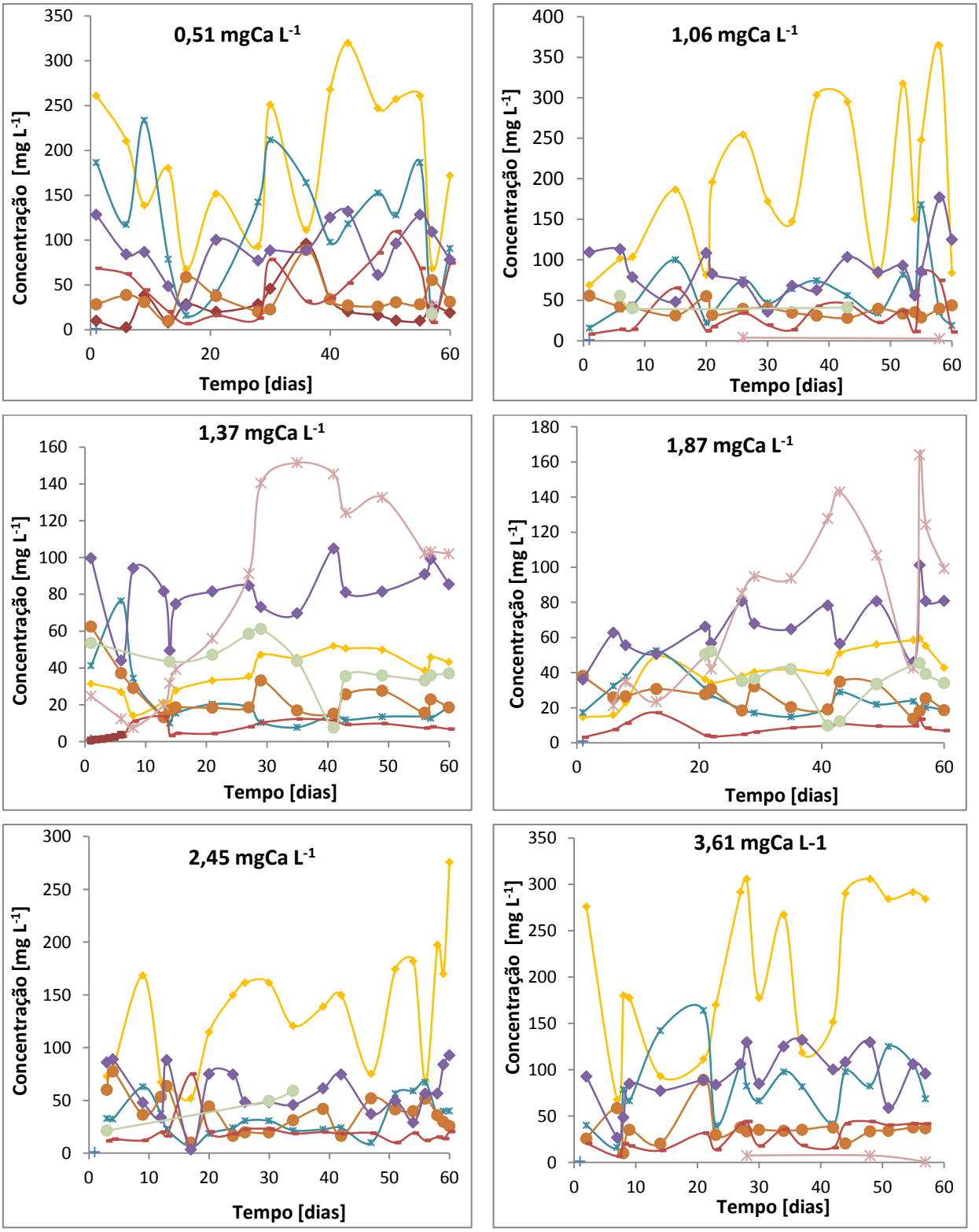

Figura 5.16 - Geração de produtos intermediários ao longo do período de operação para diferentes concentrações de cálcio: Ácido Acético (—◆—); Ácido Cítrico (—■—); Ácido Lático (—✕—); Ácido Fórmico (—●—); Ácido Propiônico (——); Ácido Butírico (—◆—); Etanol (—✕—); Metanol (—●—);

Os principais produtos intermediários foram ácido butirico e ácido acético, sendo que para as concentrações de 1,37 e 1,87 mg L^{-1} foram detectadas concentrações de etanol em torno de 80 mg L^{-1}. Além desses, outros produtos intermediarios foram gerados, como metanol, ácido propiônico, ácido lático, ácido citrico, ácido málico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido iso-butírico, ácido iso-valérico, ácido valérico e ácido capróico, porém em concentrações menores. Na Tabela 5.12 são apresentados os valores médios e na Figura 5.17 e Tabela 5.13 as porcentagem média de todos os produtos intermediários.

Tabela 5.12 – Concentrações médias dos produtos intermediários formados ao longo da operação para diferentes concentrações de cálcio

	Concentração média [mg L^{-1}]					
Produtos	**0,50[a]**	**1,06[b]**	**1,37[c]**	**1,87[d]**	**2,45[e]**	**3,61[f]**
Ácido cítrico	26 ± 22	22 ± 10	18 ± 18	21 ± 21	20 ± 3	24 ± 20
Ácido málico	40 ± 16	37 ± 16	41 ± 20	33 ± 19	26 ± 11	25 ± 12
Ácido Succínico	9 ± 3	8 ± 2	42 ± 45	30 ± 33	6 ± 1	8 ± 3
Ácido lático	124 ± 66	57 ± 37	21 ± 17	25 ± 10	32 ± 17	83 ± 38
Ácido fórmico	36 ± 19	38 ± 8	24 ± 12	26 ± 7	35 ± 16	36 ± 17
Ácido acético	191 ± 79	185 ± 96	36 ± 12	41 ± 14	137 ± 59	214 ± 83
Ácido propiônico	48 ± 31	31 ± 24	8 ± 4	8 ± 4	21 ± 14	28 ± 13
Ácido isobutírico	7 ± 4	5 ± 4	15 ± 9	14 ± 6	8 ± 6	9 ± 6
Ácido butírico	91 ± 30	88 ± 33	81 ± 17	67 ± 17	56 ± 24	93 ± 29
Ácido isovalérico	5 ± 2	4 ± 1	20 ± 9	19 ± 6	15 ± 19	3 ± 0
Ácido valérico	12 ± 8	11 ± 4	12 ± 2	8 ± 6	5 ± 0	10 ± 4
ácido capróico	19 ± 6	20 ± 3	-	-	41 ± 29	24 ± 7
Metanol	-	45 ± 9	41 ± 14	36 ± 14	54 ± 7	-
Etanol	26	3 ± 1	80 ± 52	83 ± 46	-	5 ± 4

Número de amostras: [a]17, [b]18, [c]17, [d]17, [e]20 e [f]19.

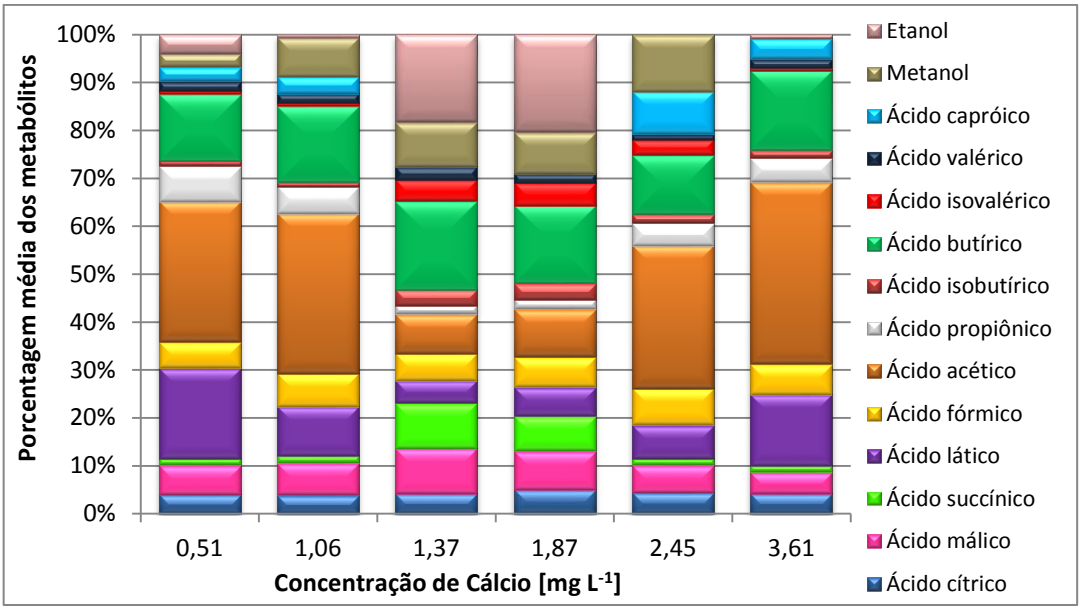

Figura 5.17 - Distribuição porcentual média dos produtos intermediários para as diferentes concentrações de cálcio avaliadas.

Tabela 5.13 - Porcentagens médias dos produtos intermediários para as diferentes concentrações de cálcio.

	Porcentagem Média [%]					
Produtos	**0,50**	**1,06**	**1,37**	**1,87**	**2,45**	**3,61**
Ácido cítrico	4,0%	3,9%	4,2%	5,0%	4,4%	4,2%
Ácido málico	6,1%	6,7%	9,4%	8,0%	5,8%	4,5%
Ácido succínico	1,3%	1,5%	9,5%	7,3%	1,4%	1,4%
Ácido lático	19,0%	10,2%	4,7%	6,0%	7,0%	14,8%
Ácido fórmico	5,4%	6,9%	5,5%	6,3%	7,6%	6,3%
Ácido acético	29,3%	33,5%	8,3%	10,0%	29,9%	38,0%
Ácido propiônico	7,4%	5,5%	1,8%	2,0%	4,6%	5,0%
Ácido isobutírico	1,0%	1,0%	3,4%	3,4%	1,8%	1,6%
Ácido butírico	14,0%	15,9%	18,4%	16,2%	12,3%	16,6%
Ácido isovalérico	0,7%	0,7%	4,5%	4,7%	3,3%	0,6%
Ácido valérico	1,9%	1,9%	2,6%	1,9%	1,1%	1,8%
Ácido capróico	3,0%	3,5%	0,0%	0,0%	8,9%	4,2%
Metanol	2,7%	8,2%	9,3%	8,7%	11,9%	0,0%
Etanol	4,0%	0,6%	18,3%	20,3%	0,0%	0,9%

O ácido acético e o butírico, dois dos principais produtos gerados em todas as fases, são geralmente associados com rendimentos elevados de H_2, uma vez que, pela estequiometria, o valor teórico da produção de hidrogênio a partir de sacarose é de 8 mol H_2

mol^{-1} sacarose quando há formação de ácido acético e de 4 mol H_2 mol^{-1} sacarose na geração de ácido butírico. Enquanto que, baixos rendimentos de H_2 estão associados com formação de ácido propiônico, ácido lático e álcoois (LEVIN et al., 2004; VIGNAIS et al., 2006).

Embora tenha ocorrido a produção dos ácidos acético e butírico o rendimento de produção de hidrogênio alcançado não foi elevado. Tal fato pode estar relacionado à produção de etanol e a formação de ácido acético pela homoacetogênese, uma vez que, em tais reações ocorre consumo do H_2 produzido.

Arooj *et al.* (2008) propuseram um modelo para estimar a produção de ácido acético pela homoacetogênese concomitante com a produção de hidrogênio, cujas considerações foram as seguintes:

- Produção de ácido acético acompanhada pela produção de hidrogênio, há formação de 4 mols de ácido acético (HAc_{H_2}) e 8 mols de hidrogênio:

$$C_{12}H_{22}O_{11}+5H_2O \rightarrow 4CH_3COOH+4CO_2+8H_2$$

- Produção de ácido acético via homoacetogênese ($HAc_{Hom.}$) há consumo de 4 mols de hidrogênio para cada mol de ácido acético formado:

$$4H_2+2CO_2 \rightarrow CH_3COOH+2H_2O$$

- Produção de ácido propiônico consome um mol de hidrogênio;
- Conversão de um mol de sacarose para ácido bútirico gera 4 mols de hidrogênio.

A partir de tais considerações pode-se então calcular a parcela de ácido acético formado devido à homoacetogênese por meio das Equações 5.1 e 5.2.

$$[HAc]_{Total} = [HAc]_{Hom.} + [HAc]_{H2} \qquad \text{Equação 5.1}$$

$$[H_2] = 8*[HAc]_{H2} + 4*[Butírico]-[Propiônico] - 4*[HAc]_{Hom.} \qquad \text{Equação 5.2}$$

A porcentagem de ácido acético gerada pela homoacetogênese sobre o ácido acético total está apresentada na Tabela 5.14. Para todas as concentrações avaliadas a produção de ácido acético pela via homoacetogênica foi constante e superior a 68%, o que sugere que tal rota ocorre concomitantemente com a de produção de hidrogênio.

Contudo, descontando o valor de hidrogênio consumido pela homoacetogênese, a quantidade liberada ainda é muito menor que a teórica (Tabela 5.15). Desta forma, pode-se

inferir que parte do hidrogênio produzido foi utilizada para geração de outros produtos intermediários ou para síntese de biomassa.

As concentrações de 1,37 e 1,87 mgCa L^{-1}, foram as que obtiveram menores porcentagens de ácido acético formado pela homoacetogênese (68%) e menores porcentagens de hidrogênio consumido, 43% e 49%, respectivamente. Tal fato está de acordo com os resultados obtidos em relação ao rendimento de produção de H_2, HPR e vazão molar de H_2, pois os melhores resultados foram obtidos para tais concentrações de cálcio. Isto indica que a adição de quantidade ótima de cálcio em reator de leito fixo pode melhorar a produção de H_2.

É possível notar também que os ácidos lático e propiônico, que geralmente são relacionados a baixo rendimento de H_2, foram gerados em proporções menores pelos reatores com 1,37 e 1,87 mg Ca L^{-1} se comparado com as demais concentrações. Isto está de acordo com os maiores rendimentos de produção de hidrogênio obtidos por tais reatores.

Tabela 5.14 – Produção de ácido acético por homoacetogênese

Concentração de cálcio [mg L^{-1}]	**Ácido acético total [mmol/h]**	**Ácido acético por homoacetogênese [mmol/h]**	**% Ácido Acético via Homoacetogênese**
0,50	6,8 ± 2,2	5,1 ± 1,8	78 ± 14
1,06	5,6 ± 2,9	4,0 ± 2,0	74 ± 10
1,37	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,5	68 ± 30
1,87	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,5	68 ± 26
2,45	4,1 ± 1,8	3,0 ± 1,3	73 ± 7
3,61	6,4 ± 2,5	4,6 ± 1,8	72 ± 5

Tabela 5.15 – Balanço teórico de hidrogênio

Concentração de cálcio [mg L^{-1}]	**H_2 teórico total [mmol/h]**	**H_2 medido (v_{H_2}) [mmol/h]**	**H_2 consumido [%]**
0,50	66 ± 22	1,6 ± 2,9	91 ± 12
1,06	51 ± 23	2,9 ± 2,0	83 ± 14
1,37	15 ± 4	5,4 ± 3,7	43 ± 28
1,87	15 ± 4	4,9 ± 2,7	49 ± 25
2,45	37 ± 15	1,0 ± 0,7	91 ± 7
3,61	58 ± 21	3,4 ± 3,0	85 ± 13

Os produtos intermediários gerados no presente trabalho coincidiram com diversas pesquisas de produção de H_2, porém, não foram similares em relação às quantidades e distribuição, provavelmente devido às diferentes configurações de reatores e parâmetros

operacionais utilizados em cada trabalho (FERNANDES, 2008; LEE et al., 2004; LIMA, 2011; PEIXOTO, 2008; PENTEADO, 2012, YUAN et al., 2010 e WU et al., 2012)

5.5. Balanço de DQO

A remoção de DQO está apresentada na Figura 5.18 e Tabela 5.16. Os valores médios ficaram entre 11 e 17%, como esperado para o processo de produção de hidrogênio por degradação anaeróbia.

O balanço da DQO foi realizado para todas as operações somando as concentrações dos produtos intermediários e da sacarose com base em DQO. As reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator que relaciona a massa deste composto com a DQO estão apresentados na Tabela 5.17.

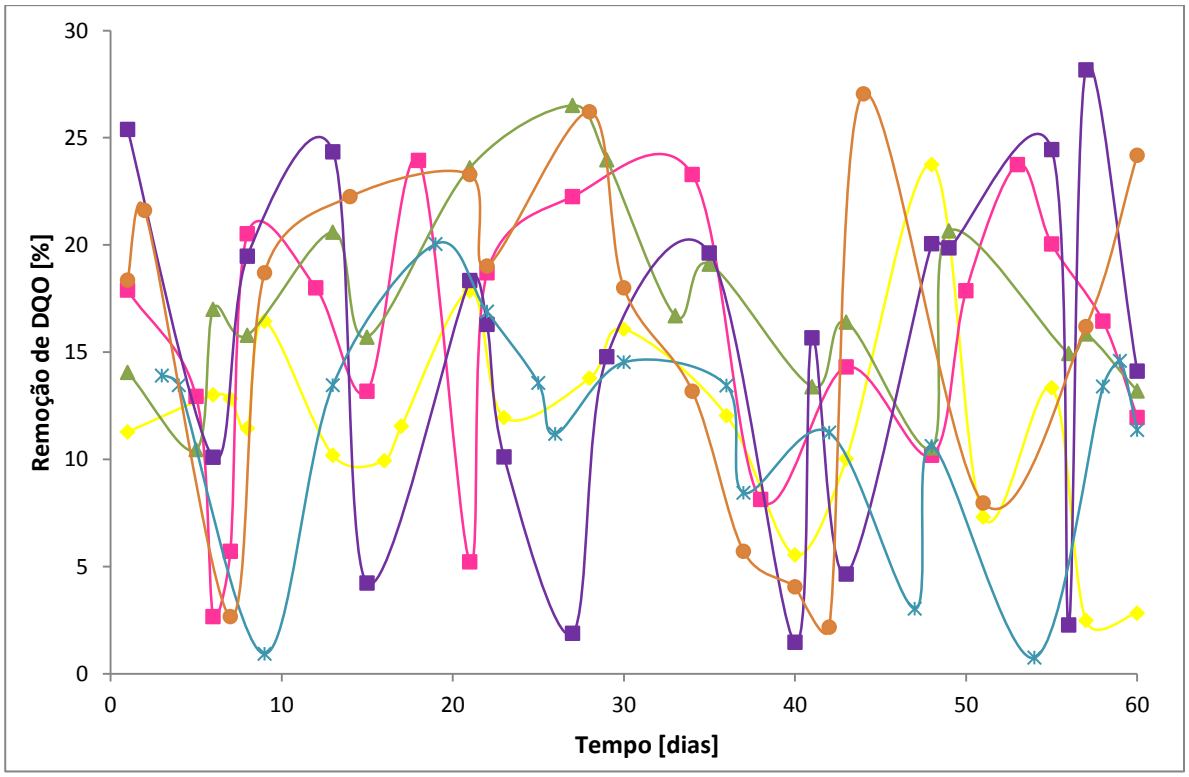

Figura 5.18 - Variação temporal da remoção de DQO para 0,50 mg Ca L^{-1} (—◆—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—■—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—▲—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—■—); 2,45 mg Ca L^{-1} (—✳—) e 3,61 mg Ca L^{-1} (—●—).

Tabela 5.16 – Valores médios da remoção de DQO.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	Remoção de DQO [%]	
	Média	**Desvio**
0,50[a]	11,68	4,94
1,06[b]	15,35	6,47
1,37[c]	17,14	4,49
1,87[d]	14,76	8,43
2,45[e]	11,77	4,88
3,61[f]	15,92	8,41

Número de amostras: [a]20, [b]17, [c]18, [d]20, [e]18 e [f]17.

Tabela 5.17 – Reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator equivalente em DQO.

Produtos Intermediários	Reação	Fator (mg DQO mg^{-1} composto)
Ác. Cítrico	$C_6H_8O_7$+ 4,5 O_2 ⇆ 6 CO_2+ 4 H_2O	0,75
Ác. Málico	$C_4H_6O_5$+ 3 O_2 ⇆ 4 CO_2+ 3H_2O	0,72
Ác. Succínico	$C_4H_6O_4$+ 3,5 O_2 ⇆ 4 CO_2+ 3 H_2O	0,95
Ác. Lático	$C_3H_6O_3$+ 3 O_2 ⇆ 3 CO_2+ 3H_2O	1,07
Ác. Fórmico	CH_2O_2+ 0,5 O_2 ⇆ CO_2+ H_2O	0,35
Ác. Acético	$C_2H_4O_2$+ 2 O_2 ⇆ 2 CO_2+ 2 H_2O	1,07
Ác. Propiônico	$C_3H_6O_2$+ 3,5 O_2 ⇆ 3 CO_2+ 3 H_2O	1,51
Ác. Isobutírico	$C_4H_8O_2$+ 5 O_2 ⇆ 4 CO_2+ 4 H_2O	1,82
Ác. Butírico	$C_4H_8O_2$+ 5 O_2 ⇆ 4 CO_2+ 4 H_2O	1,82
Ác. Isovalérico	$C_5H_{10}O_2$+ 6,5 O_2 ⇆ 5 CO_2+ 5 H_2O	2,04
Ác. Valérico	$C_5H_{10}O_2$+ 6,5 O_2 ⇆ 5 CO_2+ 5 H_2O	2,04
Ác. Capróico	$C_6H_{12}O_2$+ 8 O_2 ⇆ 6 CO_2+ 6 H_2O	2,20
Etanol	C_2H_6O+ 3,5 O_2 ⇆ 2 CO_2+ 3 H_2O	2,43
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$+ 12 O_2 ⇆ 12 CO_2+ 11 H_2O	1,12

Somou-se a DQO equivalente de todos os componentes solúveis e comparou-se com a DQO empírica (APHA, 2005) e as porcentagens de concordância obtidas estão dispostas na Tabela 5.18. Os valores obtidos em cada fase não foram de 100%, indicando que outros produtos intermediários não foram contabilizados.

Tabela 5.18 – DQO efluente média empírica e a teórica e a sua concordância nas concentrações de cálcio estudadas.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	Porcentagem de concordância [%]
0,50	85
1,06	84
1,37	80
1,87	78
2,45	67
3,61	71

5.6. Ensaios hidrodinâmicos

Os ensaios hidrodinâmicos foram feitos com os reatores sem biomassa (antes do início das operações) e com biomassa (no final de cada uma das operações). Conforme metodologia descrita no item 4.7 e com o auxílio do programa Origin, a partir da curva-resposta do ensaio em degrau, após a normalização, ajuste para a sigmóide de *Boltzmann* e transformação para curva E, obtiveram-se as curvas da Figura 5.19.

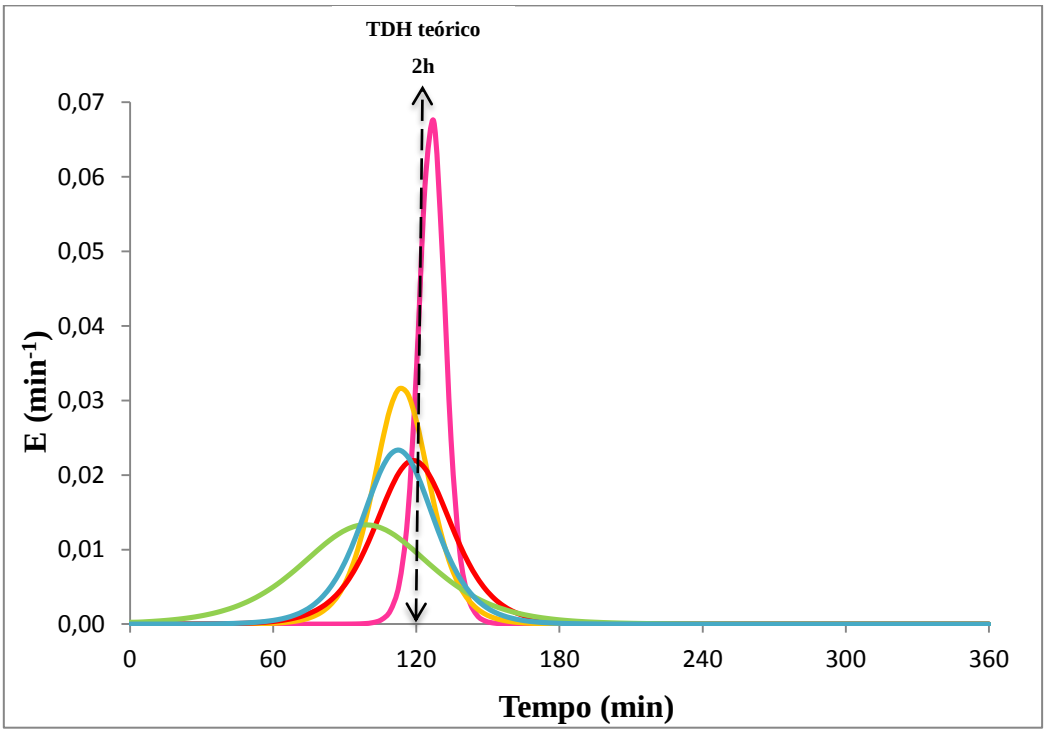

Figura 5.19 – Curvas E dos reatores para cada concentração de cálcio avaliada: Reator sem biomassa (—); 1,06 mg Ca L^{-1} (—); 1,37 mg Ca L^{-1} (—); 1,87 mg Ca L^{-1} (—) e 2,45 mg Ca L^{-1} (—).

Os valores encontrados de N e $D.u^{-1}L^{-1}$ para os reatores são apresentados na Tabela 5.19. Os valores de $\overline{\theta_h}$ em todos os ensaios foram próximos aos valores teóricos. Analisando a Tabela 5.19 verifica-se que o reator de leito estruturado, se comparados aos ensaios hidrodinâmicos realizados com leito empacotado (Tabela 5.20) apresentou TDH médios mais próximos ao teórico, menor dispersão e maior número de reatores CSTR em série (N), o que significa maior semelhança com o comportamento hidrodinâmico pistonado.

Tabela 5.19 – Resultados obtidos dos ensaios hidrodinâmicos.

Concentração de Cálcio [mg L^{-1}]	**TDH [h]**	**D $(uL)^{-1}$**	**Variância [σ^2]**	**N**	**Biomassa intersticial (mg STV g^{-1} suporte)**
0,00	2,1	0,001	40	398	-
1,06	2,3	0,005	194	101	0,16
1,37	1,9	0,027	311	41	0,26
1,87	2,0	0,051	376	38	0,28
2,45	1,7	0,051	1014	20	0,32

Tabela 5.20 – Comparação entre ensaios hidrodinâmicos realizados por diferentes estudos utilizando reatores de leito fixo para a produção de hidrogênio.

Referência	**Tipo de reator**	**TDH teórico (min)**	**TDH real (min)**	**N**	**Biomassa intersticial (mg STV.g^{-1} suporte)**
Anzola-Rojas (2010)	Leito fixo empacotado	120	72	5	130,5
Lima (2011)	Leito fixo empacotado com recirculação (R=0,5)	120	50	2	122,5
Penteado (2012)	Leito fixo empacotado	120	32	3	12,1
Peixoto (2008)	Leito fixo empacotado	60	24	3	-

A biomassa intersticial do material suporte provavelmente fez com que o comportamento do escoamento se alterasse em relação aos reatores sem biomassa como pode ser observado na Figura 5.20. Para todos os ensaios realizados com biomassa, o pico das curvas ocorreu antes do TDH teórico esperado (2 horas). Este comportamento sugere que em todas as condições ocorreram anomalias no escoamento, como, zonas mortas ou caminhos

preferenciais provocados pela biomassa presente entre os interstícios da matriz do material suporte (LEVENSPIEL, 2000).

É possível observar na Figura 5.20. que os valores N diminuíram a medida que maiores concentrações de cálcio foram adicionadas no sistema. Assim como comportamento hidrodinâmico ficou mais distante do pistonado à medida que o cálcio foi adicionado, tal fato se deve ao cálcio ter melhorado a retenção de biomassa nos interstícios.

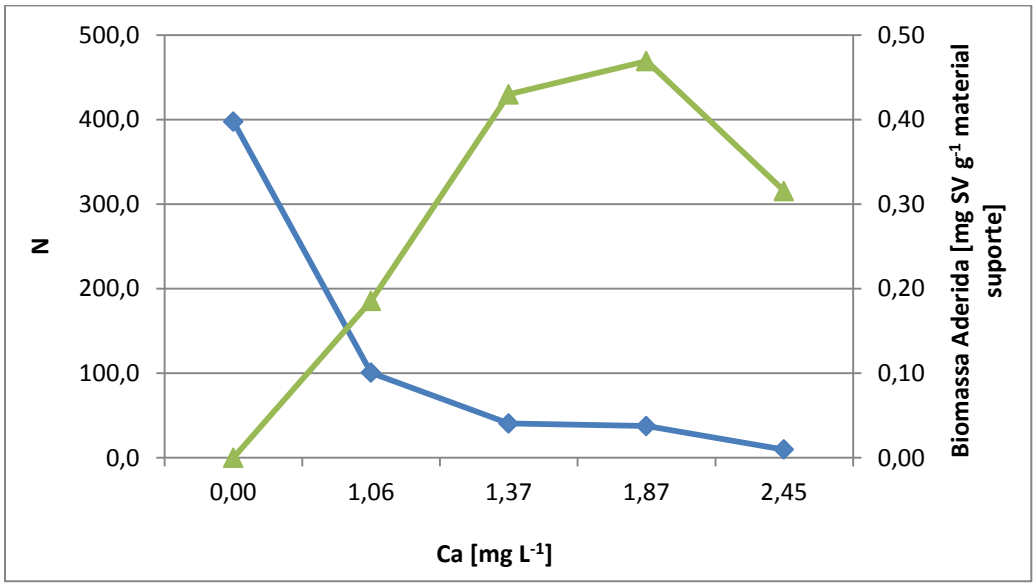

Figura 5.20 – Biomassa aderida no material suporte ( ) e o Número de CSTR em série ( ).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e da discussão apresentadas para os experimentos realizados em reatores anaeróbios de leito fixo estruturado com diferentes concentrações de cálcio (0,50; 1,06; 1,37; 1,87; 2,45 e 3,61 mg L^{-1}) , pode-se concluir que:

- As dosagens de cálcio influenciaram a vazão molar de hidrogênio, a produtividade volumétrica de hidrogênio, o rendimento de produção de hidrogênio e a eficiência de conversão de sacarose;
- A concentração de cálcio de 1,37 mg L^{-1} foi a que apresentou melhores resultados em relação a produção de hidrogênio, exceto para a conversão de sacarose. Essa concentração levou ao maior rendimento médio (1,4 mol de H_2 mol^{-1} de sacarose), à maior vazão molar média (5,4 mmol h^{-1}) e à maior produção volumétrica de hidrogênio (57 mL H_2 h^{-1} L^{-1}). Para a conversão de sacarose a concentração de cálcio de 3,61 mg L^{-1} foi a que apresentou a maior porcentagem (66%);
- Por meio de ajustes utilizando splines chegou-se a uma concentração ótima de cálcio 1,54 mg L^{-1} com valor máximo de rendimento de produção de hidrogênio de 1,5 mol de H_2 mol^{-1} de sacarose;
- O biogás produzido foi composto por CO_2 e H_2. As porcentagens médias deste último foram em torno de 60% para todas as concentrações avaliadas;
- Os principais produtos intermediários para as concentrações de cálcio de 1,37 e 1,87 mg L^{-1} foram ácido butirico, ácido acético e etanol, com distribuição percentual superior a 16%, 8% e 18%, respectivamente. Para as demais concentrações os produtos intermediários predominantes foram ácido butirico e ácido acético, com distribuição percentual superior a 12% e 29%, respectivamente;
- As dosagens de cálcio aumentaram a concentração de sólidos dentro dos reatores e, consequentemente, diminuíram a carga orgânica volumétrica específica, o que mostra que o controle da concentração de cálcio pode ser um fator de controle da carga orgânica volumétrica específica;
- O reator anaeróbio de leito fixo estruturado e fluxo ascendente apresentou TDH médios próximos ao esperado, menor dispersão e maior similaridade com o comportamento hidrodinâmico pistonado quando comparados à reatores de leito empacotado;

7. SUGESTÕES

Considerando os resultados obtidos e as experiências vivenciadas no presente trabalho, são apresentadas sugestões de temas para futuros trabalhos de produção biológica de hidrogênio:

- Avaliar novos TDH para reatores de leito estruturado usando as mesmas condições operacionais e substrato, com objetivo de estudar na produção biológica de hidrogênio;
- Avaliar a influência da temperatura em reatores de leito fixo estruturado;
- Analisar a pressão parcial de hidrogênio no meio líquido visando melhorar a produção de hidrogênio;
- Realizar estudo microbiológico com o intuito de identificar os principais grupos de microrganismos presentes e de genes responsáveis pela produção e consumo do hidrogênio, bem como o efeito do cálcio em tais organismos, com o objetivo de solucionar a instabilidade da produção de hidrogênio;
- Avaliar a possibilidade de aproveitamento dos ácidos e álcoois por meio de técnicas de separação, tendo em vista as concentrações obtidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J., DOA, T. H., KIMB, S. D., HWANGA, S. (2006). The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. v. 30, p. 33-38, 2006.

ALENCAR NETO, M. F. (2008). Interpolação por splines para a modelação de inomogeneidades no método de elementos analíticos – implementação por programação orientada a objetos. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ANZOLA-ROJAS, M. P. (2010). Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

APHA. (2005). Standard methods for the examination of waste and wastewater. American Public Health association, Washington, D.C. 21st Ed.

ARGUN, H., KARGI, F., KAPDAN, I., OZTEKIN, R. (2008). 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*, *33*(7), 1813–1819. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.01.038

AROOJ, M.F., HAN, S.K., KIM, S.H., KIM, D.H.; SHIN, H.S. (2008). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 33, n.13, p. 3289-3294.

BABU, V. L., MOHAN, S. V., SARMA, P. N. (2009). Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(8), 3305–3312. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.011

BLACK, J. G. (2002). Microbiologia, fundamentos e perspectivas. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4º edição, 2002.

CAIL, R. G., BARFORD, J. P. (1985). The development of granulation in na upflow floc digester and an upflow anaerobic sludge blanket digest treating cane juice stillage. *Biotechnol. Lett.* 7, p. 493–498.

CHANG, J., LEE, K., LIN, P. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy* [S.I.], v. 27, n. 11-12, p. 1167-1174.

CHEN, C. C., LIN, C. Y., CHANG, J. S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*(1-2), 56–64. doi:10.1007/s002530100747

CHEN, W., CHEN, S., KUMARKHANAL, S., SUNG, S. (2006). Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(15), 2170–2178. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.020

DEL NERY, V. (1987). Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DINAMARCA, C., BAKKE, R. (2009). Apparent hydrogen consumption in acid reactors : observations and implications, 1441–1448. doi:10.2166/wst.2009.135

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356.

FERNANDES, B. S. (2008). Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Tese (Doutorado) Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

FERNANDES, B. S., PEIXOTO, G., ALBRECHT, F. R., SAAVEDRA DEL AGUILA, N. K., ZAIAT, M. (2010). Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, *14*(2), 143–148. doi:10.1016/j.esd.2010.03.004

FORSTER C. F., LEWIN D. C. (1972). Polymer interaction at activated sludge surfaces. *Effluent and Water Treatment.Journal*. 12, 520–525.

HALLENBECK, P. C., GHOSH, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in biotechnology*, *27*(5), 287–97. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.004

HAWKES, F., HUSSY, I., KYAZZE, G., DINSDALE, R., HAWKES, D. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, *32*(2), 172–184. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014

HUANG, J., PINDER, K.L., (1995). Effects of calcium on development of anaerobic acidogenic biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* . *45*, 212–218.

HULSHOFF POL, L.W., ZEEUW, W. J., VELZEBOER, C. T. M., LETTINGA, G. (1983). Granulation in UASB reactors. *Water Science & Technology.* v. 15, p. 291–304.

KIM, I. S., JANG, N. (2006). The effect of calcium on the membrane biofouling in the membrane bioreactor (MBR). *Water Research,* v. 40, p. 2756-64, 2006.

KOSARIC N., BLASZCZYK R. (1990) Microbial aggregates in anaerobic wastewater treatment. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 42, 27–62.L

LAY, J. J., LEE, Y. J., NOIKE, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research* [S.I.], v. 33, n. 11, p. 2579-2586.

LEE, K. S., LO, Y. S., LO, Y. C., LIN, P. J., CHANG, J. S. (2003). H_2 production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology letters*, *25*(2), p. 133–8.

LEE, K. S., LO, Y. S., LO, Y. C., LIN, P. J., CHANG, J. S. (2004). Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, *35* (6-7), 605–612. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.08.013

LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 2, p. 579-586.

LEVENSPIEL, O. (2000). Engenharia das reações químicas. 3 ed. São Paulo: Edgard Blucher.

LEVIN, D. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, *29*(2), 173–185. doi:10.1016/S0360-3199(03)00094-6

LIMA, D. M. F. (2011). Influência da razão de recirculação na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos.

MAHONEY, E. M., VARANGU, L. K., CAIRNS, W. L., KOSARIC, N., MURRAY, R. G. E. (1987). The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up. *Water Sci. Technol*. v.19, p. 249–260.

MATHEWS, J., WANG, G. Y. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* [S.I.], v. 34, n. 17, p. 7404-7416.

NORRIS, V., CHEN, M. GOLDBERG, M., VOSKUIL, J., McGURK, G., HOLLAND, I. B. (1991). Calcium in bacteria: a solution to which problem? *Molecular microbiology*, v. 5, n. 4, p. 775-778.

PEIXOTO, G. (2008) Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.

PEIXOTO, G. (2011) Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

PENTEADO, E. D. (2012). Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos.

PERNA, V. (2011). Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando un reactor UASB y un reactor de lecho fijo. Dissertação (Mestrado). Universidad de la República Facultad de Ciencias, Montevideo.

RUDD, A. T., STERRITT, R. M., LESTER, J. N., RUDD, T., LESTER, J. N. (2013). All use subject to JSTOR Terms and Conditions Complexation extracellular sludge of heavy polymers metals in the by activated process, *56*(12), 1260–1268.

SHOW, K. Y., LEE, D. J., CHANG, J. S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource technology*, *102*(18), 8524–33. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.055

SHOW, K. Y., LEE, D. J., TAY, J. H., LIN, C. Y., CHANG, J. S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(20), 15616–15631. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.109

SOBECK, D.C., HIGGINS, M.J., (2002). Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research.* 36, 527–538.

THIELE, J. H., WU, W. M., JAIN, M. K., ZEIKUS, J. G. (1990). Ecoengineering high rate anaerobic digestion systems: analysis of improved syntrophic biomethanation catalysts. *Biotechnology and Bioengineering.* 35, 990–999.

VIGNAIS, P., MAGNIN, J., WILLISON, J. (2006). Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(11), 1478–1483. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.013

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

WU, S. Y., CHU, C. Y., SHEN, Y. C. (2012). Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(20), 15496–15502. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.119

YU, H. Q., TAY, M, J. H., FANG, H. P. (2001). The roles of calcium in sludge granulation during uasb reactor start-up. *Water Research*. v. 35, nº 4, p. 1052-1060.

YUAN, Z., YANG, H., ZHI, X., SHEN, J. (2010). Increased performance of continuous stirred tank reactor with calcium supplementation. *International Journal of Hydrogen Energy,* v. 35, p. 2622-2626.