

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

**PRODUÇÃO DE BIOHIDROGENIO (BioH<sub>2</sub>) A PARTIR DO PROCESSO  
FERMENTATIVO DO SORO DE LEITE UTILIZANDO DIFERENTES COMPLEXOS  
BACTERIANOS**

**ANDRÉ LUIZ VIANA SOUZA**

**TOLEDO - PR**

**SETEMBRO/2018**

**ANDRÉ LUIZ VIANA SOUZA**

**PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO (BioH<sub>2</sub>) A PARTIR DO PROCESSO  
FERMENTATIVO DO SORO DE LEITE UTILIZANDO DIFERENTES COMPLEXOS  
BACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós-Graduação Stricto Senso em  
Bioenergia, como requisito da  
obtenção do grau de Mestre em  
Bioenergia pela UNIOESTE/PR

**ORIENTADOR:**

Professor Dr. Carlos Eduardo Borba

**CO-ORIENTADOR:**

Professor Dr. Eduardo Bittencourt  
Sydney

TOLEDO - PR

SETEMBRO/2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

SOUZA, ANDRE LUIZ VIANA  
PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO (BioH<sub>2</sub>) A PARTIR DO PROCESSO  
FERMENTATIVO DO SORO DE LEITE UTILIZANDO DIFERENTES  
COMPLEXOS BACTERIANOS / ANDRE LUIZ VIANA SOUZA;  
orientador(a), CARLOS EDUARDO BORBA; coorientador(a),  
EDUARDO BITTENCOURT SYDNEY, 2018.  
62 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e  
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia,  
2018.

1. HIDROGÊNIO. 2. COMPLEXO BACTERIANO. 3. GÁS. 4. SORO  
DE LEITE. I. BORBA, CARLOS EDUARDO. II. SYDNEY, EDUARDO  
BITTENCOURT. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por ANDRÉ LUIZ  
VIANA SOUZA perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia  
em 28 de setembro de 2018

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba  
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney  
Coorientador

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Fernandes Rodrigues  
Membro

  
Prof. Dr. Fabiano Bisinella Scheufele  
Membro

Dedico a Deus e a minha família pelo apoio e os direcionamentos que me permitiu traçar os caminhos que me trouxeram até este momento, principalmente a minha mãe Gilvane que me mostrou o lindo caminho da Biologia, da mesma forma (*in memoriam*) a minha vó Judite e meu pai José Raimundo, pelos ensinamentos e exemplos sobre a importância de termos, como princípios para a vida a honestidade, a perseverança e o respeito, mesmo sabendo que não estão mais presentes fisicamente, acredito que sem eles não chegaria a este momento.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus,

A minha família pela dedicação e força que me dedicaram principalmente nos momentos difíceis, os meus irmão e seus cônjuges, as minhas sobrinhas Beatriz, Gabriela, Ana Clara e Bianca, pela torcida e pelo amor dedicado a mim e a Vandete e sua família (uma intrusa muito bem vinda a família) pela confiança e felicidade transmitida.

A Eládio e Marta, pelos ensinamentos e paciência durante toda a minha vida na UFS que começou aos 4 anos ao acompanhar minha mãe durante as férias ao laboratório de Botânica e a Alexis e sua família por ter me demonstrado que mesmo nas adversidades da vida com determinação consegue-se alcançar os objetivos.

Aos meus amigos e pessoas que passaram por minha vida sem eles não seria a pessoa de hoje, não poderia descrever nomes neste para não ser injusto.

Aos meus orientadores o professor Dr. Carlos Eduardo Borba e o professor Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, pelos ensinamentos, paciência, disposição e por sempre acreditarem que esta pesquisa traria excelentes resultados. A todos os componentes do curso de bioenergia e em especial a Dirce pelo empenho e em sempre esta disposta a ajudar a todos os alunos do curso.

## **LISTA DE FIGURAS**

3.1 CONCENTRAÇÃO DOS GASES POLUENTES EMITIDOS LONGO DOS ANOS	09
3.2 DEMANDA ENERGÉTICA MUNDIAL POR FONTE	11
3.3 EVOLUÇÃO E PREVISÃO DA MATRIZ ENERGÉTICA	11
3.4 FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS	17
3.5 FLUXOGRAMA DEGRADAÇÃO DA GLICOSE PARA PRODUÇÃO DE BioH <sub>2</sub>	21
4.1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS PARA A PRODUÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	25
4.2 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE INOCULAÇÃO E FERMENTAÇÃO	27
5.1 GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS OBTIDO NO COMPLEXO CBPU	40
5.2 GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS OBTIDO NO COMPLEXO CBPO	41
5.3 GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS OBTIDO NO COMPLEXO CBTE	42
5.4 GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS OBTIDO NO COMPLEXO CBBO	43

## **LISTA DE TABELAS**

3.1 PRINCIPAIS VIAS PRODUTIVAS DE H <sub>2</sub>	19
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE	23
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA CARGA ORGÂNICA DO SORO DE LEITE	34
5.2 RESULTADOS PRODUTIVOS ENCONTRADOS DE GÁS DURANTE OS TESTES PARA DEFINIÇÃO DA TEMPERATURA IDEAL.	35
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA FASE GÁS E DA FASE LÍQUIDA APÓS O PROCESSO FERMENTATIVO DO SORO DO LEITE CONDUZIDO SOB AÇÃO DE DIFERENTES COMPLEXOS BACTERIANOS	36
5.4 ACOMPANHAMENTO DO PERÍODO PRODUTIVO DOS COMPLEXOS BACTERIANOS EM UMA GERAÇÃO	38
5.5 ACOMPANHAMENTO PRODUTIVO DE GÁS PELOS COMPLEXOS BACTERIANOS	39
5.6 ACOMPANHAMENTO PRODUTIVO DE BioH <sub>2</sub> PELOS COMPLEXOS BACTERIANOS	45
5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES OBTIDOS COMO RESULTADO APÓS O PROCESSO FERMENTATIVO DO SORO DO LEITE CONDUZIDO SOB AÇÃO DE DIFERENTES COMPLEXOS BACTERIANOS	48
5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS APÓS O PROCESSO FERMENTATIVO DO SORO DO LEITE CONDUZIDO SOB AÇÃO DE DIFERENTES COMPLEXOS BACTERIANOS	50

## LISTA DE ABREVEATURAS

ABREVIATURA	DENOMINAÇÃO
H <sub>2</sub>	GÁS DE HIDROGÊNIO
CO	MONÓXIDO DE CARBONO
CO <sub>2</sub>	DIÓXIDO DE CARBONO
BioH <sub>2</sub>	BIOHIDROGENIO
CH <sub>4</sub>	METANO
H <sub>2</sub> S	ACIDO SULFÍDRICO
NO <sub>x</sub>	OXIDO NITROSO
N <sub>2</sub>	NITROGÊNIO
NH <sub>3</sub>	AMÔNIA
H <sub>2</sub> O	AGUA
O <sub>2</sub>	GÁS OXIGÊNIO
Ppm	PARTÍCULAS POR MILHÃO
pH	POTENCIAL HIDROGENIONICO
CBPU	COMPLEXO BACTERIANO CEPA PURA
CBPO	COMPLEXO BACTERIANO PORCO
CBTE	COMPLEXO BACTERIANO TERRA
CBBO	COMPLEXO BACTERIANO BOI
DQO	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO
DBO	DEMANDA BIOLÓGICA DE OXIGÊNIO
CLAE	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
TOC	TOTAL ORGANIC CARBON
CG	CROMATOGRAFIA GASOSA
COD	CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	04
2. OBJETIVOS	07
2.1. OBJETIVO GERAL	07
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
3.1. BIOENERGIA E ENERGIAS RENOVÁVEIS	08
3.1.1. ENERGIA SOLAR	11
3.1.2. ENERGIA EÓLICA	12
3.1.3. ENERGIA DAS ÁGUAS	12
3.1.3.1. HIDROELÉTRICAS	12
3.1.4. BIOCOMBUSTÍVEIS LÍQUIDOS	13
3.1.4.1. ETANOL	13
3.1.4.2. BIODIESEL	14
3.1.5. BIOCOMBUSTÍVEIS GASOSOS	14
3.1.5.1. BIOGÁS (BIOMETANO)	14
3.1.5.2. BIOGÁS (BioH <sub>2</sub> )	17
3.2. UTILIZAÇÃO DO HIDROGÊNIO COMO FONTE ENERGÉTICA	18
3.3. SORO DE LEITE	21
3.4. CONSIDERAÇÕES	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	25
4.2. INOCULAÇÃO E FERMENTAÇÃO	27
4.2.1. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO MÁXIMA DE CADA COMPLEXO	28
4.2.2. FERMENTAÇÃO EM MAIOR ESCALA	28
4.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS	29
4.3.1. BIOLOGIA MOLECULAR (BIOMOL)	29
4.3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	29
4.3.3. CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)	30
4.3.4. DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)	31
4.3.5. DETERMINAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA E BIOLÓGICA DE OXIGÊNIO (DQO E DBO)	31
4.4. CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS	31
5. RESULTADOS E DISCURÇÃO	33
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE	33
5.2 – DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA NA PRODUTIVIDADE DE GÁS VIA PROCESSO FERMENTATIVO	35
5.3. FERMENTAÇÃO	36
5.3.1. PRODUÇÃO DE GÁS	37
5.3.1.1 CAPACIDADE PRODUTIVA DOS COMPLEXOS EM UMA GERAÇÃO	38
5.3.1.2. PRODUÇÃO DE GÁS (BIOGÁS)	38
5.3.1.2.1 CBPU	41
5.3.1.2.2 CBPO	42
5.3.1.2.3 CBTE	43

5.3.1.2.4 CBBO	44
5.3.2. PRODUÇÃO DE BioH <sub>2</sub>	45
5.4. CAPACIDADE BIODEGRADANTE DOS COMPLEXOS BACTERIANOS E SUA ADAPTAÇÃO	49
5.5. PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	51
5.6. BIOMOL COMPLEXO MAIS PRODUTIVO	52
6. CONCLUSÃO	54
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

## RESUMO

SOUZA, André L. Viana, Universidade Estadual do Paraná – UNIOESTE, Setembro – 2018. Produção de Biohidrogenio ( $\text{BioH}_2$ ) a partir do processo fermentativo do soro de leite utilizando diferentes complexos bacterianos. Orientador Drº Carlos Eduardo Borba e Coorientador Dr. Eduardo Bittencourt Sydney.

O desenvolvimento das sociedades, sempre esteve interligadas as fontes energéticas, desta forma o  $\text{H}_2$  aparece como possível fonte. Atualmente a via biológica, a fermentação bacteriana, vem apresentando destaque, por apresentar boa produtividade e baixo custo. O presente trabalho propõem-se a avaliar o potencial de consórcios microbianos, de fácil acesso na produção de  $\text{BioH}_2$ , por via fermentativa, utilizando o soro de leite como meio de cultivo. Esta foi realizada por complexos produtivos denominados de CBPU (Complexo Bacteriano Puro), CBPO (Complexo Bacteriano Porco), CBTE (Complexo Bacteriano Terra) e CBBO (Complexo Bacteriano Boi), onde o meio fermentativo foi formado com um 1ml de cada complexos e 6ml de meio de cultivo, mantidos em uma estufa com a temperatura em  $33^\circ\text{C}$ , por um período de 07 dias, onde foi verificado a concentração e produção dos gases e ácidos orgânicos, tendo como resultado no CBPU 35% e 700  $\text{mLBioH}_2/\text{L}_{(\text{substrato})}$  e com maior produtividade de ácido acético, o CBPO 36% e 1594  $\text{mLBioH}_2/\text{L}$ , com maior concentração de ácido butírico, o CBTE 37% e 1691  $\text{mLBioH}_2/\text{L}$ , com maior produtividade de ácido succínico e o CBBO 51% e 4371  $\text{mLBioH}_2/\text{L}$ , com a produtividade de ácidos orgânicos dividida em butírico e succínico. Os resultados obtidos demonstraram ter capacidade produtiva de  $\text{BioH}_2$  e de ácidos orgânicos, que no caso do CBBO obteve rendimento produtivo maior que trabalhos encontrados na literatura atual, possibilitando um direcionamento para novas pesquisas e análises a serem feitas posteriormente.

Palavras Chaves: Biohidrogênio, Fontes Energéticas, Carga Orgânica, Complexo Bacteriano;

## ABSTRACT

SOUZA, André L. Viana, Universidade Estadual do Paraná – UNIOESTE, Setembro – 2018. Production of Biohydrogen (BioH<sub>2</sub>) from the fermentative process of the milk whey using different bacterial complexes. Orientador Dr<sup>o</sup> Carlos Eduardo Borba e Coorientador Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

The development of societies, has always been interconnected energy sources, this way the H<sub>2</sub> appears as a possible source. Nowadays, the biological pathway, the bacterial fermentation, has been highlighted, as it presents good productivity and low cost. The present work proposes to evaluate the potential of microbial consortia, which are easily accessible in the production of BioH<sub>2</sub>, by fermentation using the whey as a culture medium. This was done by productive complexes called PUBC (Pure Bacterial Complex), PIBC ( Pig Bacterial Complex), LACB (Land Bacterial Complex) and OXBC (Ox Bacterial Complex), where the fermentative medium was formed with 1ml of each complex and 6ml of culture medium, kept in a greenhouse with a temperature of 33°C for a period of 07 days, where the concentration and production of the organic acids and gases were verified, resulting in 35% PUBC and 700 mL BioH<sub>2</sub> / L (substrate) and with higher productivity of acetic acid, PIBC 36% and 1594 mL BioH<sub>2</sub> / L, with higher concentration of butyric acid, LACB 37% and 1691 mL BioH<sub>2</sub> / L, with higher productivity of succinic acid and OXBC 51% and 4371 mL BioH<sub>2</sub> / L, with the productivity of organic acids divided into butyric and succinic. The results obtained showed a productive capacity of BioH<sub>2</sub> and of organic acids, which in the case of OXBC obtained higher productive yield than works found in the current literature, making possible a new research and analysis to be done later.

Key Words: Biohydrogen, Energy Sources, Organic Load, Bacterial Complex

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da sociedade, sempre esteve vinculado às fontes energéticas e/ou a necessidade de suprir as demandas, criadas pelas inovações tecnológicas. A primeira fonte energética a ser utilizada pelo o homem foi o fogo, tendo como recurso a madeira, que era consumida a partir da combustão. O domínio deste recurso proporcionou uma maior qualidade de vida, a partir da luz emitida, que gerava proteção e do calor, que amenizava os efeitos climáticos e melhorava as fontes alimentares.

Com o passar dos anos e o desenvolvimento da sociedade, foram surgindo novas demandas energéticas, sendo suprida inicialmente pelas forças dos ventos e das águas. Os ventos eram utilizados na locomoção dos barcos e na manufatura de grãos, as águas na hidrostática e na irrigação, estes sendo responsáveis pelo desenvolvimento e expansão territorial da sociedade.

No século XVIII, o mundo passava por mudanças tecnológicas, como o advento dos motores a combustão de Thomas Severy e James Watt, da eletricidade através dos experimentos de Thomas Edison, Nicola Tesla e Wildman Whitehouse. Surgindo assim uma nova demanda energética mundial, sendo suprida pela combustão do carvão mineral e vegetal, da descoberta do Petróleo e seus derivados e das hidroelétricas.

Como nota-se a combustão sempre esteve como integrante majoritária da matriz energética mundial. Este fenômeno químico ocorre entre 02 reagentes ou mais, geralmente a partir de oxidação dos componentes orgânicos presentes nos reagentes. Este processo pode ter como produto final, poluentes a base de carbonos e de nitrogênios, a liberação em excessos destes poluentes causaram efeitos nocivos ao planeta. Com o aumento de suas concentrações na atmosfera, provocou graves problemas ambientais, como o aquecimento global, mudanças climáticas, dentre outros.

Com o aumento populacional e da poluição no planeta, criou-se assim uma nova demanda energética, tornando-se necessário a introdução de novas fontes energéticas, baseadas em uma menor emissão de poluentes e com uma renovação sistemática. Possibilitando termos um planeta mais sustentável, com a redução da concentração de carbono na atmosfera, minimizando assim os impactos causados, principalmente no tocante ao aquecimento global.

No contexto atual, estudos são realizados em todo o mundo, visando melhorar o desempenho da matriz energética, mediante a substituição ou introdução de novas fontes de energias limpas e renováveis que possam suprir as necessidades da sociedade. Estas podem ser produzidas fisicamente, a partir do aproveitamento da energia solar, eólica e motriz, quimicamente pela pirólise, combustão e eletrólise e biológica por meio da conversão da biomassa, fermentação e decomposição bacteriana. Utilizando como fontes primárias os mais diversos compostos orgânicos e inorgânicos.

As bioenergias e os biocombustíveis aparecem como prováveis candidatos, a melhorar a matriz energética mundial. As bioenergias formadas pelas energias eólica, solar, hidroelétrica e motriz e os biocombustíveis são o etanol, o bioóleo e os gasosos. Algumas destas fontes têm o registro de uso inicial a mais de 100 anos, porém com a aparição na matriz energética a partir da década de 90.

Neste contexto, o H<sub>2</sub> (Hidrogênio) surge como umas das fontes, que podem substituir todos os combustíveis altamente poluidores. Por se considerado o composto químico com a maior concentração na atmosfera. Este composto possuiu uma capacidade de geração de energia por unidade de peso (142 kJ g<sup>-1</sup>), além de conter a maior densidade de energia gravimétrica conhecida entre os combustíveis. Observa-se também a compatibilidade com os processos eletroquímicos e de combustão, utilizados para conversão de energia. Atualmente é explorado como um reagente químico na produção de fertilizantes, no refino do diesel e na síntese industrial da amônia (Guo *et al.*, 2010; Sydney *et al.*, 2014; Sargsyan, Gabrielyan e Trchounian, 2016).

Atualmente a produção de H<sub>2</sub> por via biológica (Biohidrogênio ou BioH<sub>2</sub>) vem tendo uma aumento exponencial nos periódicos pelo mundo, sendo vista como uma das principais fontes a substituição ao petróleo e seus derivados. Por possuir potencial energético capaz de substituir os combustíveis fósseis. Neste contexto a fermentação bacteriana aparece como uma alternativa viável, por requerer uma baixa quantidade energia, utilizar como substrato compostos orgânicos de baixo valor e possuir uma alta produtividade média (Sydney *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

Os resíduos agroindustriais, como os das indústrias de laticínios, são compostos orgânicos com alta concentração carbônica e com a necessidade de tratamento. Por possuírem características físico-químicas que possibilitam a produção de BioH<sub>2</sub>, além da

necessidade de diminuição da sua carga orgânica. A utilização da via fermentativa aparece como uma alternativa viável, observando a grande quantidade de material orgânico, proteínas, polissacarídeos e ácidos húmicos e por se mostrar uma opção ambientalmente sustentável (Huang *et al.*, 2016; Sattar *et al.*, 2016).

A utilização de cepas puras ou de consórcios bacterianos, com seres do gênero *Clostridium* ou *Rhodobactéria* para produção de BioH<sub>2</sub>, mostra-se economicamente mais viável, observado sua comprovada capacidade produtiva e com simples operação. Isto é ressaltado por estes possuírem altas taxas de conversão de carbono e nitrogênio, serem altamente adaptados e resistentes a mudanças nas condições do meio, além de rápida forma de propagação (Harde *et al.*, 2016; Sargsyan, Gabrielyan e Trchounian, 2016; Sattar *et al.*, 2016).

Assim este trabalho tem como perspectiva a descoberta de novos complexos bacterianos que possuam um valor mais acessível de obtenção, fácil adaptação ao substrato e com alta produtividade de BioH<sub>2</sub>, contrapondo aos seres bacterianos puros.

## **2. Objetivos**

### **2.1 – Objetivo Geral**

Este trabalho avaliou o potencial de consórcios microbianos na produção de BioH<sub>2</sub>, por via fermentativa utilizando o soro de leite como meio de cultura.

### **2.2 – Objetivos Específicos**

- Analisar o desempenho na produção de BioH<sub>2</sub> por 03 complexos bacterianos de diferentes origens e 01 cepa pura;
- Identificar a composição de ácidos graxos voláteis produzidos durante a fermentação pelos complexos bacterianos e pela cepa pura;
- Avaliar a redução do potencial poluente do soro de leite a partir de análise físico-química;
- Identificar as bactérias presentes no consórcio que apresentarem maior produtividade de BioH<sub>2</sub>.

### **3. Revisão Bibliográfica**

---

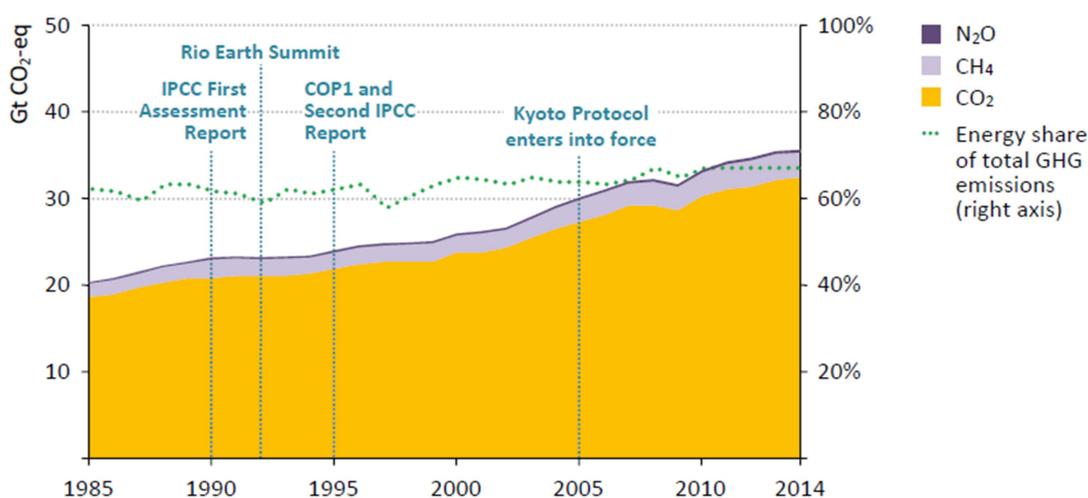
#### **3.1 – Bioenergias e Energias Renováveis;**

A evolução do Homem tem ligações diretas com o uso das fontes energéticas. Nos primórdios com o descobrimento do fogo, o homem passou ter mais longevidade, segurança e proteção, mediante a iluminação noturna, preparação de alimentos, e do uso para o afugentamento dos animais, dentre outros. A referida descoberta possibilitou a implantação da agricultura e pecuária, oportunizando a fixação do homem e o seu desenvolvimento (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010; Guo, Song e Buhain, 2015).

Com o desenvolvimento das ciências, a humanidade começa a descobrir novas fontes de produção de energia, como o uso das águas, por meio da hidrostática, que auxiliaria na irrigação e no represamento das águas e dos ventos, utilizados na locomoção dos barcos e de moinhos responsáveis pela manufatura dos grãos (Cavalcante, 2015).

O melhoramento tecnológico possibilitou, além de uma melhor utilização da madeira, mas também o aproveitamento do carvão vegetal e mineral como fontes energéticas. Oriundas dos compostos fossilizados de origem animal e vegetal, que revolucionaram o mundo. Mudando drasticamente a sociedade, observado a sua versatilidade e constância (Farias e Sellitto, 2011; Cavalcante, 2015).

O uso destes recursos e a falta de controle da poluição causada, principalmente pela emissão dos resíduos de sua combustão, como os óxidos carbônicos (CO, CO<sub>2</sub>) e oxido nitroso (NO<sub>x</sub>). Estes geraram um aumento da concentração de poluentes na atmosfera do planeta durante anos, como observado na Figura 3.1. Os efeitos causados pelas crises do petróleo no mundo, que restringiram o fornecimento deste combustível para vários países, levaram os governantes Mundiais a começarem a investir na pesquisa de novas fontes energéticas, que possuíssem a capacidade de substituir ou diminuir o uso deste, além de minimizar os impactos ambientais gerados pelo seu consumo (Santos e Siqueira, 2011; Farias e Sellitto, 2011; Guo, Song e Buhain, 2015).



**Figura 3.1** – Concentrações dos gases poluentes emitidos ao longo dos anos com a indicação dos resultados obtidos após as conferências ambientais, baseando-se na emissão dos gases do efeito estufa (GHG), adapta do IEA 2015.

No período compreendido entre o final do século XIX e começo do século XX, Estados Unidos, Canadá, União Europeia, Japão e Brasil começaram a desenvolver pesquisas sobre novas fontes energéticas. Com a capacidade de substituir ou, ao menos, diminuir a quantidade de sua utilização. Assim, foram registrados os primeiros passos em direção ao desenvolvimento das Bioenergias e das energias renováveis. Inicialmente a partir do uso de hidroelétricas, onde foram construídas: uma nas cataratas do Niágara no Canadá e no rio Ribeirão do Inferno no Brasil; e do uso do etanol, este sendo testado pela primeira vez em 1925, sendo produzido a partir de processos fermentativos do milho, da beterraba e da cana de açúcar, considerado o primeiro combustível renovável produzido e comercializado em larga escala (ANEEL, 2008 e Guo, Song e Buhain, 2015).

Estas novas fontes energéticas, se desenvolveram e se diversificaram com maior intensidade, a partir da década 70, principalmente no Brasil, com advento do pro-álcool (Decreto Federal 76.593 de 14 de novembro de 1975) que estimulou a produção de etanol com foco no aumento da demanda e incentivos produtivos. Na década de 90 por uma pressão, cada vez maior, dos ambientalistas que, por intermédio de vários eventos mundiais. Estes demonstravam como a emissão de poluentes, oriundos dos combustíveis fósseis modificava o meio ambiente e alterava as condições de vida no planeta, indicando a importância de uma alteração drástica de nossa planta energética mundial (Rosenqvist *et al.*, 2003; Livermam, 2009; Lau, Lee e Mohamed, 2012; Gimenez 2018).

O primeiro encontro mundial, para discutir a emissão de poluentes ocorreu em Toronto no Canadá, 1988. Dois anos após, em Estocolmo na Suécia, e 1992 no Rio de Janeiro, Brasil. Entretanto, o primeiro objetivo dos ambientalistas foi alcançado apenas 2005 em Kyoto, Japão. A partir da assinatura de um termo de responsabilidade de todas as nações do controle e diminuição da emissão de poluentes e criação de novas tecnologias ambientalmente sustentáveis. Este ficou conhecido como Protocolo de Kyoto (Rosenqvist *et al.*, 2003; Livermam, 2009; Lau, Lee e Mohamed, 2012).

Atualmente encontra-se em vigência o acordo ambiental assinado em 2015 em Paris por 175 países, onde foi adotada a redução para as emissões agregadas consistentes, manutenção do aumento da temperatura média global a menos de 2°C acima dos níveis indústrias (Nações Unidas, 2016).

As Nações Unidas, a partir das conferências ambientais tentam melhorar as condições da sustentabilidade do mundo, o acordo de Paris, foi assinado por mais de 200 países que se dispuseram a uma redução drástica das emissões de gases. Durante esta conferencia os países desenvolvidos prometeram potencializar os investimentos com o intuito de melhorar a matriz energética mundial a partir das energias limpas e bioenergias (Nações Unidas 2016; Rei, Gonçalves e Souza, 2017)

A utilização das bioenergias em substituição dos combustíveis fósseis ou na estabilização do seu consumo foi um dos principais objetivos traçados nas conferências mundiais sobre as alterações climáticas para a sustentabilidade do planeta. Como observado na Figura 3.2 a partir do ano 2000, começamos a ter um aumento na utilização de fontes ambientalmente limpas gerando assim uma estabilidade na matriz energética (Jebaraj e Iniyar, 2006; ANEEL, 2008; Hass *et al.*, 2011; IEA 2015).

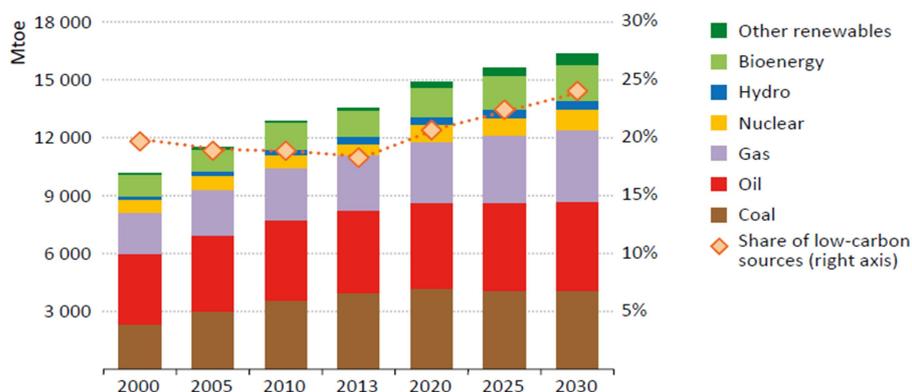


Figura 3.2 – Demanda energética Mundial por fonte produtiva e desenvolvimento das fontes com baixa emissão de carbono, Adaptado de IEA (2015).

Com a premissa de se tornarem sustentáveis, as grandes potências Mundiais investiram na criação novas fontes energéticas. Em princípio, com o intuito inicial de diminuir a quantidade de petróleo utilizado, posteriormente, suprir as necessidades energéticas resultante do aumento do consumo gerado pelo crescimento populacional (Jebaraj e Iniyar, 2006; IEA, 2015).

No final do século XX e nos primórdios do século XXI, a energia solar, dos ventos, geotermal e as provenientes da biomassa como etanol, biodiesel e biogás. Começam a aparecer nas matrizes energéticas, de onde se afere uma atuação cada vez maior destas fontes, como pode ser observado na Figura 3.3, que demonstra a evolução das energias limpas durante os anos (Jebaraj e Iniyar, 2006; IEA, 2015).

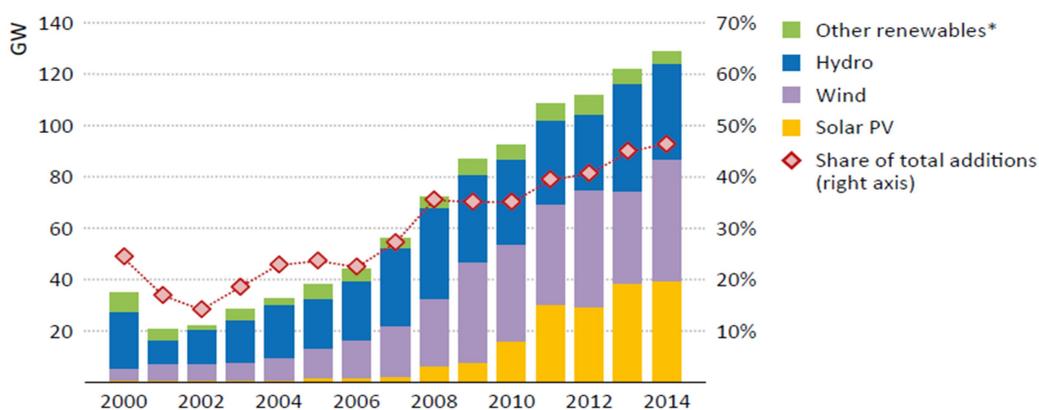


Figura 3.3 – Evolução e previsão da matriz energética mundial, com foco nas bioenergias e das energias renováveis, Adaptada do IEA (2015).

### **3.1.1 – Energia Solar**

O aumento da temperatura terrestre, decorrente da degradação da camada de ozônio, possibilitou uma maior disponibilidade para captação da energia solar, propiciando a esta ser considerada uma grande fonte para produção energética no mundo. Isto porque 70% da superfície terrestre recebe a irradiação solar, com a capacidade produtiva em níveis aceitáveis (Bird *et al.*, 2016).

A produção deste tipo de energia ocorre a partir da conversão da energia solar em energia elétrica, a principal via produtiva advém da tecnologia fotovoltaica, onde placas de captação, feitas com materiais semicondutores geralmente a sílica. Estas com a capacidade de conversão dos raios solares, que por meio da criação de um campo elétrico em suas camadas produz energia elétrica. A capacidade de produção deste sistema é regulada a partir da quantidade de recepção de irradiação solar e do tempo de incidência (Bird *et al.*, 2016; Mandal e Sharma, 2016; Kannan e Vakeesan, 2016).

Este tipo de produção energética vem ocupando um importante lugar no mercado energético mundial mediante as políticas públicas, incentivos acadêmicos e descobertas tecnológicas com o intuito de captar, converter e armazenar cada vez mais a energia, aumentando assim seu potencial produtivo e diminuição de seus custos (Bird *et al.*, 2016; Mandal e Sharma, 2016; Kannan e Vakeesan, 2016).

O uso desta tecnologia como fonte energética tem o seu desenvolvimento em países que não possuem uma alta incidência de irradiação solar como Canadá e Suécia. Enquanto países principalmente africanos e sul-americanos, onde se tem a capacidade de produção muito alta, porém com uma baixa importância nos seus mercados energéticos (Energy Revolution, 2015; Kannan e Vakeesan, 2016).

### **3.1.2 – Energia Eólica**

A energia eólica se constitui como uma das formas energéticas mais antigas utilizadas pelo homem. Entende-se que sua utilização começou a partir da navegação e da utilização nos moinhos pra produção de cereal. Nos dias atuais, sua aplicação ocorre por rotores ligados a aerogeradores que são movidas utilizando a força dos ventos e, assim, produzem energia (Roy e Bandyopadhyay, 2012; Energy Revolution, 2015).

Sabe-se que, existem equipamentos capazes de produzir até 7 megawatts de energia por aparelho. Sua utilização ocorre principalmente na Europa, contudo, vem sendo disseminada por todos os outros continentes, a fácil aceitação da população, a aparente redução de custo de implantação e sua maior capacidade produtiva, decorrente de inovações tecnológicas sofridas nos rotores de produção e nos modelos das hélices (Roy e Bandyopadhyay, 2012; Energy Revolution, 2015).

A produção ocorre mediante ao aproveitamento da energia cinética contida nas massas de ar em movimento. Desta forma, é realizada a partir da conversão da energia cinética de translação, em energia cinética de rotação, sendo convertida pelas turbinas eólicas, denominadas aéro geradores. (Roy e Bandyopadhyay, 2012).

### **3.1.3 – Energia das Águas**

#### **3.1.3.1- Hidroelétricas**

Este tipo de produção energética teve sua primeira introdução nas cataratas do Niágara nos Estados Unidos. Passados mais de 100 anos, a energia hidroelétrica é vista como uma das principais fontes de produção de energia limpa do mundo, tendo sua expansão em todos os continentes (ANEEL, 2008; Energy Revolution, 2015).

No Brasil, essa fonte renovável é responsável por cerca de 65% (sessenta e cinco por cento) da produção de energia elétrica, levando o país a um status de ambientalmente sustentável, a produção baseia-se na captação de um fluxo de água direcionado a turbinas as quais transformam energia cinética em energia elétrica (ANAEL, 2008 e BEN, 2015).

### **3.1.4 – Biocombustíveis Líquidos**

#### **3.1.4.1 – Etanol**

Este é considerado um combustível limpo, tendo em vista que, sua matriz produtiva é renovável. Além disto, o processo produtivo tem baixa emissão de carbono. A produção deste composto ocorre mediante a uma via fermentativa, pelo meio de leveduras selecionadas, adicionadas a um caldo retirado de alguns vegetais ricos em amido. Destaca-se principalmente como fonte produtiva a cana de açúcar e o milho, responsáveis por quase 90% da produção de etanol (Malajovich, 2011; Embrapa, 2012; Guo, Song e Buhain, 2015).

O etanol foi utilizado pela primeira vez em 1925, em motores de ciclo Otto. Desde então, é notório o crescimento nos estudos para o desenvolvimento, por ser considerado postulante a substituir a gasolina. Isto porque, além de diminuir o uso do petróleo, protelando assim a existência deste mineral, danifica menos os motores, tendo em vista, que durante sua queima, ocorre a produção de compostos menos carbonados e água (Malajovich, 2011; Guo, Song e Buhain, 2015).

Este combustível possui uma maior octanagem em relação à gasolina. A sua maior desvantagens em relação à gasolina é evidenciada a partir do seu consumo onde 1 L deste combustível chega a render 30% a mais que um 1 L o etanol (Malajovich, 2011; Embrapa, 2012; Guo, Song e Buhain, 2015).

Outro fator impeditivo para o aumento do consumo do etanol ante a gasolina, principalmente no caso do gerado a partir da cana-de-açúcar, ocorre por este não ser o principal produto e sim o açúcar, que além de ter uma produção mais rápida e com menor custo. Além da comprovada importância na alimentação, sendo uns dos compostos mais utilizados no mundo. Desta forma, estudasse maneiras de diminuir o custo produtivo para torna-lo, mas atrativo para a indústria (Malajovich, 2011; Embrapa, 2012).

As principais vias estudadas, que possibilitam uma maior produtividade do etanol, baseiam-se, no reaproveitamento do bagaço da cana e a utilização de compostos lignocelulósico, denominados como etanóis de 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração e com a utilização de bactérias e microalgas (Malajovich, 2011; Embrapa, 2012).

A forma mais utilizada para produção deste combustível ocorre a partir do processamento do vegetal, e formação de um caldo, onde são adicionado nutrientes e antissépticos, ajustados alguns parâmetros como, o pH e a temperatura, após chegar às condições ótimas é introduzidos nos biorreatores (conhecidos como Dornas) e inoculado as leveduras selecionadas. Após o processo de fermentação, obtém a produção de vinhosa e do flegma este dando origem a o etanol hidratado ou anidro. (Malajovich, 2011; Embrapa 2012; Guo, Song e Buhain 2015).

#### **3.1.4.2 – Biodiesel**

O biodiesel é composto químico oriundo de plantas oleaginosas, da gordura animal e vegetal e das microalgas. Seu estudo e desenvolvimento vêm sofrendo melhorias

constantes, dada sua importância ambiental, tendo em vista a possibilidade de substituir o diesel. Que é considerado um combustível com amplo consumo no mundo e altamente poluente, observado que a sua combustão emite compostos com enxofre, principal responsável pela chuva ácida (Malajovich, 2011; Embrapa, 2012).

O biocombustível tem sua principal via de produção o processo de transesterificação, um dos grandes problemas desta produção é a grande quantidade de glicerol produzido, além de outras substâncias recorrentes de sua purificação. No mundo existem programas de substituição e diluição, principalmente na Europa, onde a produção de biodiesel corresponde a 60%. No Brasil o seu desenvolvimento começou a partir do PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), onde regulamentou a inserção de 5% de biodiesel ao diesel e programou o aumento deste ao passar dos anos chegando a 20% em 2020 (Brasil, 2004).

### **3.1.5 – Biocombustíveis Gasosos**

#### **3.1.5.1 – Biogás (Biometano)**

O Biogás foi descoberto por Shirley em 1667, conhecido como gás do pântano, sendo que as primeiras pesquisas sobre a utilização de Biogás, pelo homem datam de 1857, com o experimento conduzido por Ulysses Gayon, aluno de Louis Pasteur. O primeiro experimento foi realizado a partir de uma mistura de esterco e água, induzido a uma temperatura de 35° obteve a produção de 100 litros de gás por m<sup>3</sup> da matéria base (Prati, 2010 apud Villen *et al.*, 2001).

A primeira utilização como fonte energética, ocorreu na Índia em um hospital em 1859 e a primeira utilização europeia descrita ocorreu cidade de Exter, na Inglaterra onde foi utilizado o biogás para iluminação de algumas ruas (Prati, 2010 apud Villen *et al.*, 2001).

Com a revolução industrial a utilização do biogás foi deixada de lado e pela alta utilização de recursos não renováveis como carvão, gás natural e o petróleo. Com o incremento da Segunda Guerra Mundial, a Europa e a Ásia voltaram-se novamente a busca pela utilização de biogeradores, sendo que a Índia e a China se destacaram pelas criações de modelos próprios para produção de gás para utilização doméstica (Villela e Silveira 2005).

Como observado em Cardinale-Rezende *et al.* (2012), a Europa se preocupa em extrair energia e biogás do lixo desde 1995, com a criação da primeira planta para produção de Biometano em larga escala, situado na Espanha. Observa-se um maior desenvolvimento de pesquisas, principalmente em países como a Alemanha, Dinamarca e a Espanha, considerados os maiores responsáveis pelos avanços e obtenção destes materiais, onde se tem uma perspectiva de que em 2020 terá uma produção de 77,9 bilhões de m<sup>3</sup> de biogás oriundos de Aterros Sanitários.

No Brasil, os primeiros estudos foram direcionados para produção de Biogás, remetem da década de 80, quando o pesquisador José Aníbal C. Filho, lançou uma circular que, dispunha técnicas para produção de energia através do biogás, em áreas remotas do Pantanal Mato-grossense. Ocorria mediante a um modelo de biodigestor simples, utilizando como substrato os dejetos oriundos da agropecuária, dando ênfase aos de animais criados em cativeiro como porcos, bois, dentre outros (Souza *et al.*, 2005).

A produção de biogás ocorre principalmente em aterros sanitários e da agroindústria, sendo observando uma constata a evolução produtiva nos últimos 20 anos. Isto ocorre, pelo intermédio do melhoramento gradativo da tecnologia, facilitação na implantação de polos produtivos, melhorias na legislação e incentivos financeiros, para que este possa um baixo custo e se torna atrativo para o consumo. Porém como todas novas tecnologias, observa-se a existência de um grande conhecimento em escala laboratorial, porém poucas destas entram em comercialização (Budzianowski, 2016).

O Biogás é proveniente da digestão anaeróbica, onde o material orgânico degradado por microrganismos é convertido em complexos orgânicos, Metano (CH<sub>4</sub>) e outros compostos (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>S), podendo conter traços de outros gases e ácidos com baixo peso molecular (Leite *et al.*, 2009).

Os responsáveis por este processo são as bactérias, porém pode ocorrer a presença de outros organismos como protozoários (flagelados, amebas e ciliados), fungos imperfeitos e leveduras, podendo auxiliar, no processo de obtenção de metano, que requer uma intensa cooperação da biota presente e um maior grau de especialização metabólica nos organismos anaeróbios em relação aos aeróbios (Ferreira, 2015 apud Quaresma, 1992).

Segundo Cardinale-Rezende *et al.*, (2012), Ali Shah *et al.*, (2014) e Silva, Soares e Seo, (2015) e, a produção do biogás tem uma relação direta como os resíduos orgânicos e

as bactérias responsáveis pela sua degradação. Este processo ocorre mediante a conversão de matéria orgânica na ausência de oxigênio, em metano como demonstrado na Figura 3.4. Este sendo realizado por bactérias hidrolíticas, bactérias acidogênicas, bactérias acetogênicas, e microrganismos metanogênicos. O processo pode ser dividido em quatro partes como descrito na figura 3.4, onde há necessidade de controle de temperatura, observado que o desenvolvimento bacteriano decresce em temperaturas abaixo de 20° C;

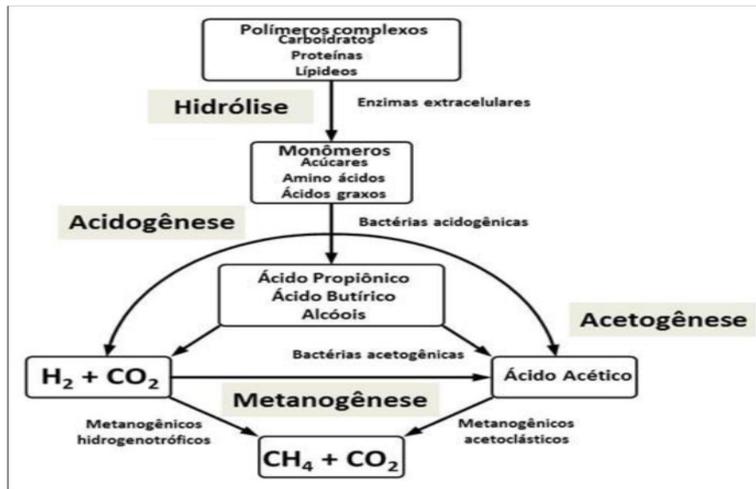


Figura 3.4 – Fluxograma da produção de Biogás demonstrando cada fase da decomposição da matéria orgânica, Figura adapta de Zorel (2013).

- A hidrólise, realizadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas, onde ocorre à separação dos compostos insolúveis em água, como carboidratos, proteínas e gorduras, sendo transformados em compostos moleculares menores como monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, está corresponde a 50% da biodegradação (Cardinale-Rezende *et al.*, 2012; Ali Shah *et al.*, 2014).

- Acidogênese, realizada pelas bactérias acidogênicas fermentativas, onde ocorre a transformação das substâncias solúveis em água, juntamente com os compostos resultantes da hidrólise, em composto orgânicos de cadeia curta (ácido fórmico, acético, propiônico, butírico e pentanoíco), em álcoois (metanol e etanol), em aldeídos, em ácido carboxílico e hidrogênio (Cardinale-Rezende *et al.*, 2012; Ali Shah *et al.*, 2014).

- Acetogênese, realizada pelas bactérias acetogênicas, produtoras de acetato e hidrogênio, como explicito, elas transformam os produtos obtidos da fase acidogênese em acetato e hidrogênio (Cardinale-Rezende *et al.*, 2012; Ali Shah *et al.*, 2014).

- Metanogênese, realizada pelas bactérias metanobactérias, estas transformam o acetato e o hidrogênio, em Metano e Dióxido de Carbono, onde cerca de 70% do metano produzido é proveniente da redução de acetato, enquanto que aproximadamente 30% provêm da redução de CO<sub>2</sub> com H<sub>2</sub>. (Cardinale-Rezende *et al.*, 2012; Ali Shah *et al.*, 2014).

### 3.1.5.1 – Biogás (BioH<sub>2</sub>)

Entre todos os possíveis produtores de combustíveis sustentáveis, o hidrogênio destaca-se, por ser a molécula mais abundante no planeta, possui a capacidade geradora de energia por unidade de peso de 142 kJ g<sup>-1</sup>, possui a maior densidade de energia gravimétrica entre os combustíveis, dentre outros vistos anteriormente.

Desta forma, o BioH<sub>2</sub> tem a possibilidade de suprir as necessidades energéticas, em substituição aos combustíveis fósseis, tendo em vista o reconhecimento como uma fonte energética limpa, renovável e eficiente (Guo *et al.*, 2010; Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010; Sydney *et al.*, 2014; Sargsyan, Gabrielyan e Trchounian, 2016).

O hidrogênio pode ser produzido a partir de processos químicos, físicos e biológicos, com baixa utilização de energia para sua produção e com pouca ou nenhuma produção de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos 2010; Sydney *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

A pesquisa de produção de hidrogênio por via biológica é considerada uma das perspectivas do campo da biotecnologia, com várias propostas de geração renovável, ecologicamente limpa e de vários substratos, porém como observado em Arunasri *et al.*, (2016).

Atualmente a produção de BioH<sub>2</sub>, via fermentação, teoricamente tem seu limite em 4 mols de bioH<sub>2</sub>, quando comparando a conversão derivada de 1 mol de glicose para 12 mols de BioH<sub>2</sub>. Isto ocorre principalmente porque a glicose não é completamente mineralizada pelo CO<sub>2</sub>, desta forma podem ser criados outros produtos como resultantes desta oxidação incompleta, como exemplo, ácidos orgânicos (Arunasri *et al.*, 2016; Sargsyan, Abrielyan e Trchounian, 2016; Wu *et al.*, 2016).

O conhecimento sobre o complexo produtivo se torna necessário, observado que a determinação da técnica, do complexo bacteriano e da escolha do substrato utilizados na

produção, pode impactar diretamente na produtividade (Arunasri *et al.*, 2016; Sargsyan, Abrielyan e Trchounian, 2016; Wu, *et al.*, 2016).

### **3.2 – Utilização do Hidrogênio como Fonte Energética**

O hidrogênio é apontado por muitos cientistas, como a principal fonte energética do futuro, observado que a sua utilização não gera impactos ambientais ao planeta, é reconhecida como a molécula mais abundante da terra e em algumas de suas utilizações pode gerar como resíduo final H<sub>2</sub>O.

Nos dias atuais a sua utilização ocorre principalmente, como reagentes de insumos agrícolas, no tratamento de petróleo bruto e hidrocarbonetos pesados, como combustível de foguete e cápsulas espaciais, além de células de combustíveis e pilhas (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010; De Sá, Cammarota E Ferreira-Leitão, 2014).

Nota-se que nos últimos anos a pesquisa sobre formas de obtenção obtiveram um crescimento exponencial no mundo (Sydney, (2013)), já sendo testado em motores de carro como observado em Tsujimura e Suzuki, (2017), em que adaptaram um motor de 4 cilindros de combustão interna, onde utilizaram a eletrólise da água para produção de H<sub>2</sub> gerando um ganho de 80% de eficiência com zero emissão de poluentes.

Na Tabela 3.1, é demonstrado como a produção de hidrogênio ocorre principalmente pelas vias químico-físicas e biológicas, sendo a última é a mais estudada atualmente por ter uma boa produtividade, tem um baixo custo e pode atuar como fonte de tratamento de substratos ambientalmente poluentes como pode ser observado (Sydney, 2013; De Sá, Cammarota e Ferreira-Leitão 2014).

Tabela 3.1- Tabela adaptada de Sydney (2013), demonstrando as principais vias produtivas de H<sub>2</sub> atual.

Método	Processo	Matéria-prima
Térmico	Reforma a Vapor	Gás Natural
	Divisão Termoquímica da Água	Água
	Gaseificação	Carvão E Biomassa
	Pirolise	Biomassa
Eletroquímico	Eletrolise	Água
	Foto eletroquímico	Água
Biológico	Fotobiológico	Água E Algas
	Digestão Anaeróbica	Biomassa
	Fermentação Microbiológica	Biomassa

Os métodos mais utilizados, para produção em larga escala de H<sub>2</sub> no mundo são as que se baseiam, principalmente, na reforma de hidrocarbonetos ou oxidação parcial dos mesmos, onde é utilizado como matéria prima derivados do petróleo, ou carvão, ou amônia (Lepecki, 2011; De Sá, Cammarota e Ferreira-Leitão, 2014).

A reforma de gás ocorre, a partir da mistura da água com hidrocarbonetos em alta temperatura na presença de um catalizador, que produz uma mistura de dióxido de carbono e hidrogênio exemplificado da seguinte maneira;  $CH_4 + 2 H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 4H_2$ . Já na oxidação utiliza-se o oxigênio no lugar da água e resultando em;  $2 CH_4 + O_2 \rightarrow 2 CO_2 + 4H_2$ . Observa-se na primeira reação, que o gás natural é o hidrocarboneto mais utilizado e na segunda, a oxidação tem uma gama maior de matéria-prima a ser utilizada. Outras formas produtivas por esta via são a gaseificação e a pirólise que utilização a biomassa principalmente como fonte produtiva (Lepecki, 2011; De Sá, Cammarota E Ferreira-Leitão, 2014).

Atualmente o H<sub>2</sub> tem como principal via produtiva, a físico-química, porém nos últimos anos, com o crescimento exponencial das pesquisas biológicas, entende-se que futuro esta forma ganhará grande importância na cadeia produtiva. Existem três principais formas biológicas de produção, a via fermentativa por meio da fermentação clara e escura, a decomposição bacteriana e a produção por algas (Sydney, 2013).

Os principais fatores para a produção do BioH<sub>2</sub> em larga escala, encontram-se principalmente nas fontes de obtenção de Carbono e nos complexos fermentativos. Observado que as fontes ricas em Carbono e os seres bacterianos puros possuem elevado

valor comercial, inviabilizando a sua produção. A indução de novas pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias, que possam torna estes processos se tornem mais acessíveis e com baixo custo (Arunasri *et al.*, 2016; Sargsyan, Gabrielyan e Trchounian, 2016).

A fermentação bacteriana é um processo biotecnológico, que vem sendo desenvolvido pelo homem desde a antiguidade, onde era utilizada principalmente para preparação e conservação de alimentos e bebidas. Com a descoberta e a classificação dos envolvidos neste, possibilitou o aumento da produtividade. Além da introdução de novos complexos bacterianos e elementos na fermentação, com o intuito de obter um maior controle e produtividade deste processo (Malajovich, 2011; Bach, 2012).

A via fermentativa atualmente é a mais estudada, onde o baixo custo produtivo, principalmente na fermentação escura, a possibilita a utilização de vários substratos como fontes de carbono, alta capacidade de produção de gás e uma ampla diversidade bacteriana, tendo o gênero *Clostridium* como mais estudado e utilizado (Patel *et al.*, 2016).

A fermentação escura é uma oxidação incompleta, que ocorre mediante a degradação, principalmente dos carboidratos de cadeia longa e dos açúcares por complexos bacterianos. Este processo ocorre em um ambiente anaeróbico e com controle de temperatura e pH. A produção de BioH<sub>2</sub> e de ácidos orgânicos, principalmente acético e butírico, ocorre na fase acetogênica, mediante a degradação da glicose pelos seres bacterianos, tendo sua produção máxima em 4 mol de H<sub>2</sub> como podemos nas Equações 3.1 e 3.2 e na Figura 3.5.

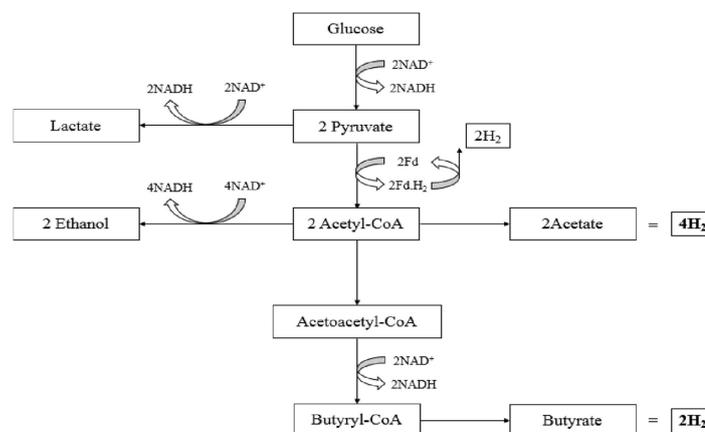


Figura 3.2.1. – Fluxograma da degradação da Glicose por um complexo bacteriano de *Clostridium* e a formação de ácidos orgânicos e BioH<sub>2</sub>, adaptado do Aly *et al.*, (2018).



A fermentação clara ou foto fermentação ocorre em modelo parecido com a fermentação escura, porem com o controle do pH mais próximo da neutralidade, além da presença de luz. Os modelos atualmente usam as bactérias do gênero *Rhodobactérias* para uma maior produtividade chegando a 6 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicose (Hosseini *et al.*, 2015; Zagrodnik e Laniecki, 2015).

Atualmente estuda-se a eficácia da utilização da fermentação clara e escura de forma que uma de continuidade a outra, como em Zagrodnik e Laniecki, (2015), demonstram que a utilização deste modelo pode atingir uma produção de 12 mol de BioH<sub>2</sub> por mol de glicose, ampliando ainda mais as possibilidades de estudo nesta área, conhecido como modelo 2 fases.

### 3.3 – Soro de Leite

O soro de leite é oriundo do beneficiamento do leite principalmente de origem bovina, onde em média para cada litro de leite beneficiado (produção de queijos, creme de leite, leite condensado e doce), ocorre à produção de 5 a 9 litros de soro produzidos para descarte pela indústria de laticínios no Brasil (Bach, 2012; Zempulski, 2013).

Este resíduo pode ser reaproveitado para produção principalmente de bebidas fermentadas e suplementos alimentares com carga proteica. No Brasil em 2013 foi produzido cerca de 23,000 milhões de leite (IBGE, (2017)). Rocha (2014) discorre sobre a produtividade de queijo no Brasil, obtendo como resultado cerca de 1,032 milhão de kg, o que equivale a aproximadamente 35% da utilização da produção de leite, o que gerou aproximadamente 9 milhões de litros soro de leite. No brasil os maiores produtores de queijo, são os estados de Minas Gerais como maior produtor, seguido do Rio Grande do Sul e Paraná (Bach, 2012; Brasil, 2013).

O desenvolvimento desta indústria iniciou-se a partir do ano de 1980, onde ate o ano de 2011 obteve um crescimento exponencial, calcula-se entorno de 350%. Isto pode ser evidenciado a partir do melhoramento genético dos rebanhos, que possibilitou o aumento da produtividade de leite por animal, que era de 665 L por ano em média,

atingindo a marca de 1.381 L por ano (Bach, 2012; Zempulski, 2013; Lima *et al.*, 2016; IBGE, 2017).

O leite tem em sua composição cerca de 85% de água e o restante formado por lipídios, carboidratos, proteínas principalmente a lactose e sais minerais. O soro de leite produzido herda 55% em média destas substâncias, sendo o mesmo rico em carbono e açúcares, componentes ideais para as ações bacterianas na fermentação (Bach, 2012; Zempulski, 2013; Lima *et al.*, 2016).

O soro de leite tem uma forma aquosa de cor amarelo-esverdeado, se apresentam de 2 formas, a doce e a ácida, essas são determinadas pelo pH, onde a ácida tem o valor em torno de 4,7 e 5,5, o doce fica entre 6,3 e 6,7. Atualmente, sabe-se que este resíduo é difícil biodegradabilidade, sendo necessário um tratamento químico, para a diminuição dos seus impactos ao meio ambiente. Como observado em Bach, (2012) cada tonelada de soro de leite não tratado gera uma poluição equivalente a uma população de 470 pessoas (Zempulski, 2013; Lima *et al.*, 2016).

Atualmente entende-se o soro de leite como um resíduo, com um alto poder poluente, com um alto custo de tratamento para a indústria. Uma das formas utilizadas diminuir a geração deste, dar-se a partir de sua reutilização na indústria alimentícia, como fonte de complexos proteicos de alto teor. Utilizados como suplemento alimentar e na produção de bebidas lácteas, observado que o mesmo é formado basicamente por carboidratos e proteínas (Bach, 2012; Lima *et al.*, 2016).

Na Tabela 3.2, foi agrupado autores que utilizaram o soro de leite como substrato para produção de BioH<sub>2</sub>, onde o soro de leite possui um valor energético de aproximadamente 3000 kcal kg<sup>-1</sup>, sua composição é formada por cerca de 70% de carboidratos, com a presença de lactose e proteínas. O soro possui uma alta demanda química de oxigênio, ficando entre 30 a 120 g/L<sup>-1</sup>, sendo formado principalmente por carbonos, açúcares e nitrogênio. Desta forma, entende-se que este resíduo por possuir uma alta carga de compostos orgânicos, sendo considerado de difícil tratamento, levando ao entendimento da importância, de pesquisas que possam aumentar aproveitamento e a reutilização deste. (Bach, 2012; Zempulski, 2013; Lima *et al.*, 2016).

Tabela 3.2 – Caracterização da composição do soro de leite por diferentes autores.

AUTORES / ANO	DQO	Lactose	Carbono	Nitrogênio
	Valor (g/L)	Valor (%)	Valor (g/L)	Valor (g/L)
Azbar <i>et al.</i> , 2009	83,3	4,26	6,9	0,2
Bach, 2012	77	4,76	-	-
Zempulski, 2013	149	7,5	-	-
Moreno <i>et al.</i> , 2105	122±5.6	-	-	1,2±0,026
Akhlaghi <i>et al.</i> , 2017	-	-	29,2±1,5	1,3±0,02
Vasmara e Marchetti 2017	52	-	5,74±0,11	0,0027±0,004
Castelo <i>et al.</i> , 2018	60±5	-	-	1,335

### 3.4 – Considerações da Revisão Bibliográfica

Como observado, verifica-se a necessidade de descobertas de novas fontes ambientalmente aceitáveis para produção de energia, para suplementar a necessidade do desenvolvimento do homem e que não produzam mais impactos sobre a natureza.

Desta forma apresenta-se a produção de BioH<sub>2</sub> por via fermentativa, como uma fonte capaz de atender esta necessidade, observado a capacidade de produtiva de gás, a formação de componentes químicos que pode agregar valor ao produto final, como exemplo os ácidos orgânicos, além de auxiliar no tratamento biológico de vários efluentes com uma alta carga orgânica, desta forma mostrando-se viável a sua produção (Boboescu *et al.*, 2013; Sydney *et al.*, 2014; Arunasri *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016).

Atualmente observa-se que as maiores dificuldades na produção de BioH<sub>2</sub> via fermentação bacteriana, fixam-se no custo dos sistemas produtivos, que necessitam de controles rigorosos do sistema principalmente do pH e da temperatura e no custo dos complexos bacterianos com alto grau de pureza, por apresentarem alta produtividade. Assim observa-se a necessidade da ampliação nos estudos, que possibilitem descobertas de novos complexos bacterianos produtivos, com baixo custo de obtenção e de fácil acesso (Sydney, 2013; Arunasri *et al.*, 2016; Sargsyan, Gabrielyan e Trchounian, 2016; Aly *et al.*, 2018; Pachiega *et al.*, 2018).

A partir dos estudos realizados na literatura, notou-se a capacidade do soro de leite em ser utilizado como substrato para formação do meio de cultivo, observado que o mesmo possui os nutrientes necessários para o desenvolvimento bacteriano. Possam

fornece substâncias essenciais para a produção de compostos orgânicos e sucessivamente BioH<sub>2</sub>.

Com o intuito de realizar pesquisas exploratórias, para captação de complexos bacterianos de fácil acesso, observado a necessidade de diminuição do custo do processo produtivo, além da capacidade de degradar o soro de leite mediante a diminuição da carga orgânica e com uma capacidade produtiva de BioH<sub>2</sub> e de ácidos orgânicos.

## 4. Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido seguindo três etapas: (i) produção do meio de cultura, (ii) condução das fermentações anaeróbicas para produção de BioH<sub>2</sub> e, (iii) análises químicas e biológicas.

### 4.1 – Preparação do meio de cultivo

O Soro de leite foi adquirido em uma empresa de Laticínios situada no município de Toledo-PR. O soro de leite, o qual é derivado da produção de queijos, creme de leite, doce de leite e leite condensado, foi coletado e armazenado em congelador (-5° C) até sua utilização nos experimentos.

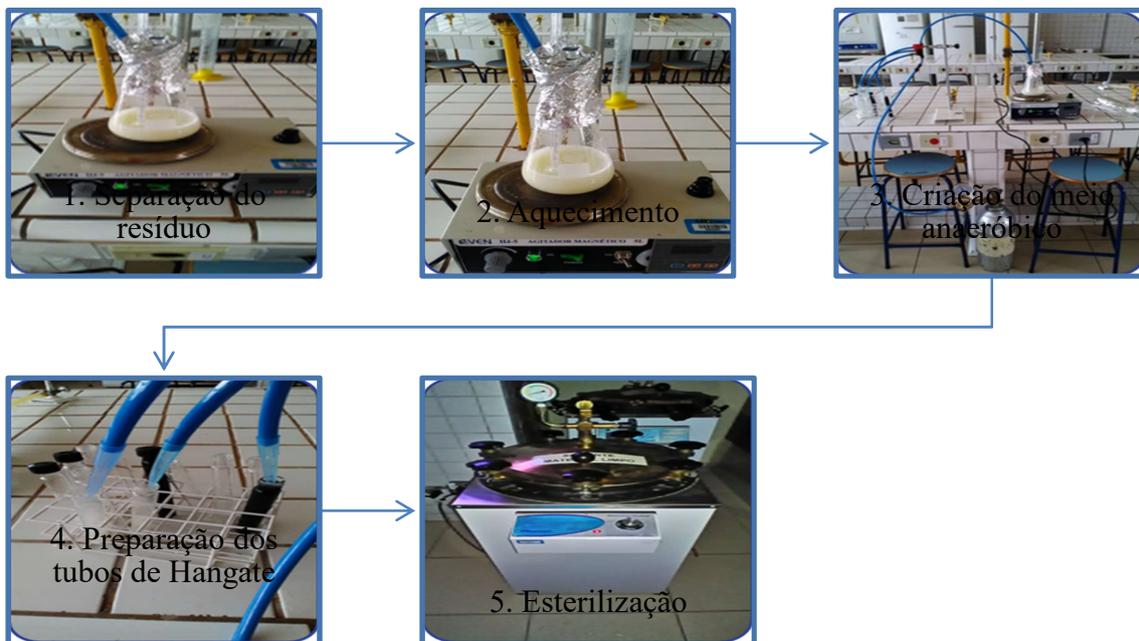


Figura 4.1 – Fluxograma das etapas para a produção do meio de cultivo.

Para a produção do meio foi seguida a técnica desenvolvida por Ralph S. Wolfe (1970). Um volume de 200 mL de soro de leite foi colocado em erlenmeyer de volume de 500 mL, com a presença de bastão magnético, foi inserido papel alumínio na saída do mesmo, com o intuito de impedir a troca gasosa, além da inserção de uma via direta com fluxo contínuo de CO<sub>2(g)</sub> (1), para que seja obtida uma atmosfera anaeróbica que favorecendo o desenvolvimento bacteriano.

Após o preparo inicial, o erlenmeyer foi mantido sob agitação constante, utilizando um agitador magnético (visando o não acúmulo de moléculas de lipídios e proteínas deixando o meio mais homogêneo possível) e aquecendo até a temperatura de ebulição ( $\approx 100^{\circ}\text{C}$ ) (2). Posteriormente, o sistema de aquecimento foi desligado, aguardando-se a temperatura chegar a aproximadamente  $85^{\circ}\text{C}$ . Nesta condição de temperatura, foi adicionado ao meio bicarbonato de sódio, em uma proporção de 1 g para 1 L, para obtenção de um efeito tampão, visando auxiliar na manutenção do pH ideal (valor aproximado) favorecendo assim a produção de  $\text{BioH}_2$ , além de auxiliar na criação de uma atmosfera anaeróbica (3) (Sydney 2013).

Após o meio atingir a temperatura ambiente ( $25$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ), 6 mL foram transferidos para tubos de *Hungate* sob atmosfera anaeróbica ( $\text{CO}_2$  ultrapuro) (4). Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma pipeta ou seringa de vidro. Após a transferência estes foram hermeticamente fechados e colocados em uma autoclave por um período de 15 minutos a uma pressão de 1atm e temperatura média de  $120^{\circ}\text{C}$ , para purificação microbiológica do meio (5). Neste processo foram produzidos 30 tubos com meios estéreis que foram armazenados em temperatura ambiente até serem inoculados (Sydney, 2013).

#### **4.2 – Inoculação e fermentação**

Neste trabalho foram utilizadas diferentes complexos bacterianos como inóculo, para o desenvolvimento do processo fermentativo visando à produção de  $\text{BioH}_2$ : (i) *Clostridium beijerinckii* Prazmowsk ATCC 8260, cedida pelo Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR; (ii) um complexo obtido do rumem de Boi, retirado do material em processo digestivo do animal após o abate, todo o material presente no rumem foi coletado e armazenado em uma garrafa pet, para ser utilizado sempre que necessário, para a formação do inóculo foi retirado com o auxílio de uma espátula material e inserido no meio de cultivo, sendo denominado por CBBO; (iii) um complexo retirado do material em processo digestivo do intestino de porco do animal após o abate, passando pelos mesmos procedimentos acima descrito, nomeado CBPO; e por último (iv) um consórcio obtido a partir de uma amostra de solo, onde foi cavado um buraco de aproximadamente 15 cm da área de descarte de material orgânico do Jardim Zoobotânico de Toledo, retirado material úmido e depositado em uma garrafa pet, a preparação do inóculo, deu-se a partir da retirada de material armazenado com uma espátula e colocado diretamente no meio de cultivo, denominado como CBTE.

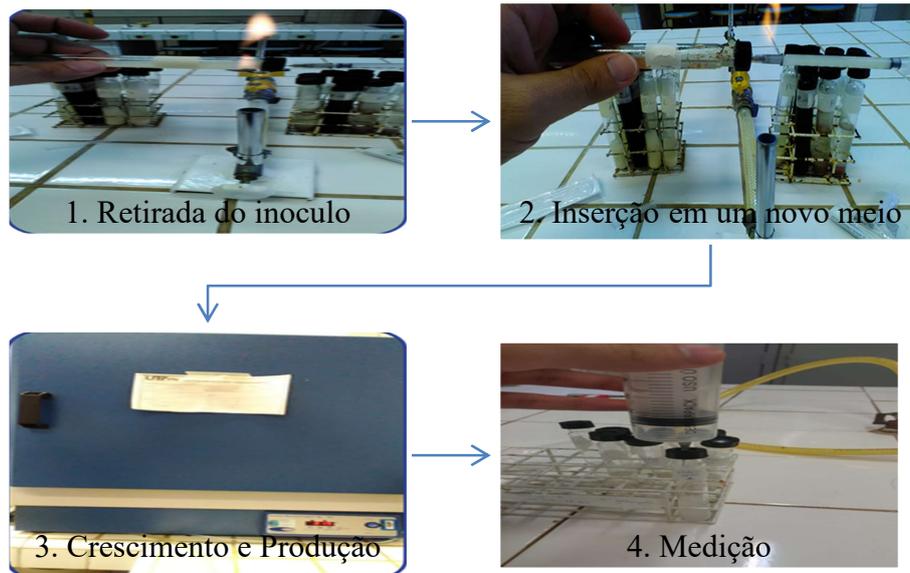


Figura 4.2 – Fluxograma das etapas de inoculação e fermentação.

As fermentações foram realizadas em tubos de *hungate* de 15 mL. A inoculação foi realizada com auxílio de uma seringa descartável e próximo à chama de um bico de Bunsen para garantir a uma condição asséptica ao meio inoculado (1), onde foi retirado 1mL do complexo bacteriano e inserido em um novo meio de cultivo (2). Após este procedimento, o meio inoculado foi encaminhado para uma estufa de esterilização e secagem com microprocessador digital, com a capacidade 64 Litros do Modelo SP-100/64, regulada a uma temperatura de 33°C por um período de 7 dias (3). O monitoramento das fermentações foi baseado na produção de gás, o qual foi realizado com o auxílio de uma seringa descartável (100 mL) acoplada aos tubos de *hungate*, onde o deslocamento do êmbolo da seringa foi utilizado para quantificar a produção de gás durante do processo fermentativo (4).

#### 4.2.1 – Determinação da Temperatura

Para definição da temperatura ideal de todos os complexos do sistema, foram realizadas fermentações testes, para cada complexo bacteriano. Estes foram realizados uma única vez, com a duração de 2 semanas, sendo coletado o volume de gás produzido a cada 04 dias, para estes foram utilizados as temperaturas de 31, 33, 35 e 37°C. A produtividade de gás foi a variável resposta avaliada nestes experimentos.

### **4.2.3 – Cinética da fermentação**

As fermentações foram mantidas na temperatura que apresentou maior produtividade de gás. Nestes experimentos, a cada sete dias (período denominado de geração) após a medição da produtividade de gás, o procedimento de renovação do meio de cultivo foi aplicada, dando continuidade ao desenvolvimento do complexo bacteriano. Os experimentos foram realizados por um período de 70 dias. **Nota:** A renovação do meio de cultivo consistiu na retirada 1 mL de inóculo da geração anterior e inserido em um novo meio de cultivo, este procedimento era realizado com o intuito de manter dos complexos bacterianos saudáveis e em plena produção além de certificar se os meios foram produzidos de maneira correta.

### **4.2.4 – Determinação da produção máxima de cada complexo.**

Após a 5ª geração de todos os complexos, foram inoculados a parte 4 tubos de *hungate*, denominados cada qual com o respectivo complexo, os mesmos não sendo renovado o seu meio de cultivo. A realização deste determinou o período máximo de produção de gás, por cada complexo, este foi definido a partir do volume produtivo colhido a cada 07 dias e sendo monitorado até a sua estagnação produtiva.

### **4.2.5 – Fermentação em maior escala.**

Para as análises de DQO, DBO, TOC, CLAE da fase líquida, foi necessário aumentar a escala produtiva do meio de cultivo, observado a necessidade volumétrica de líquido a serem utilizados. Com o intuito de manter o padrão produtivo, foram montados os sistemas proporcionalmente idênticos aos do item 4.1, padronizando assim os resultados.

Seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.1, foi inserido 1,2 L de soro de leite em erlenmeyer de 2 L, onde foi produzido 05 meios de cultivos depositados em balões volumétricos (1 L) cada um contendo aproximadamente 200 mL de meio, fechados pra evitar a troca de gases mantendo a atmosfera anaeróbica. Os meios de cultura foram separados 01 meio base sem inóculo e 04 denominados e inoculados com 24 mL de cada complexo bacteriano respectivo, mantendo a proporcionalidade do experimento. Estes foram armazenados em uma estufa a 33°C por um período de 14 dias, após o procedimento de fermentação do meio, este foi submetido a uma centrifugação a uma velocidade de 5000

rpm, por um período de 10 minutos, com a finalização deste procedimento o material foi filtrado, utilizando filtros com uma gramatura de 80 g/m<sup>2</sup>.

### **4.3 – Metodologias analíticas**

Neste trabalho foram realizadas de análises químicas e biológicas que pudessem determinar a composição do meio de cultura, para desta forma observa o que foi consumido e/ou transformado pelos complexos bacterianos para a produção de Hidrogênio.

#### **4.3.1 Biologia molecular**

A biologia molecular foi realizada no complexo bacteriano que se mostrou mais promissor no que tange a produção de gás, está sendo realizada conforme descrito por Caporaso *et al.*, (2010).

A purificação do DNA da amostra que foi realizada a partir do dispositivo, Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo), seguindo as orientações do fabricante. Após este processo, foi montado uma biblioteca com ampliações de PCR (Polymerase Chain Reaction) já conhecidas, onde foram utilizando 20 ng de DNA purificado foi utilizado no modelo de PCR com KlenTaq MM, usando primers para a região 16S V4, utilizando como código de barras descrito por (Caporaso *et al.*, 2010). A qualidade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e a quantificação da amplificação por Qubit (Invitrogen). O sequenciamento das bibliotecas de amplificação foram realizadas pelo kit Illumina MiSeq com o kit MiSeq Reagent 500V2, gerando leituras de final de par (2x de 250 bp), as análises de desmultiplexação e leitura foram realizadas com o canal Qiime 1.9, com uclust e 97% de identidade entre sequências como limiar de confiança.

#### **4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE**

Para a quantificação da concentração dos ácidos orgânicos no meio produtivo, foi utilizado a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento é composto por um cromatógrafo (LC-20AT) acoplado ao detector (SPD-20A) UV-VIS, Shimadzu e uma coluna C18 de fase reversa da marca NST (125mm x 4,0mm x 5µm). O detector UV foi ajustado no comprimento de onda da adsorção máxima,  $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ . A análise foi realizada de acordo com procedimento descrito por Li et al. (2009) que utiliza como fase móvel uma mistura de 90/10 metanol/água (v/v, %), e fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; com coluna a 25 °C; a leitura sendo realizada a 210 nm; o tempo de corrida de 15 minutos;

e o volume de injeção de 20 µL. (MIKHAIL; ZAKI; KHALIL, 2002). A curva de calibração foi construída na faixa de concentração de 0-500 mg L<sup>-1</sup>.

O preparo das amostras ocorreu com a retirada de um 1 mL de cada experimento ao total de 05 do meio produzido estas diluídas com água ultra pura na proporção de 1:4 mL, pela sua composição orgânica com alto teor de carbono as amostras foram refiltradas através de um filtro de 0,22 µm (membrana de nylon).

No preparo dos 05 padrões foram utilizados ácidos butírico a 99%, láctico a 85%, acético 99,7%, propanediol 98%, succínico 99%, D-L málico 99% e fórmico 98% em concentrações conhecidas, 0,05 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L, 0,75 g/L e 1,00 g/L, diluídos em água ultrapura, para construção das curvas de calibração, a leitura das amostras e as análise dos produtos de fermentação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

#### **4.3.3 Cromatografia Gasosa – CG**

Para a quantificação da composição gasosa foi realizado a técnica do CG. O equipamento utilizado foi Micro CG Agilent 300 com dois canais para análises de gás, o Hidrogênio (H<sub>2</sub>), o oxigênio (O<sub>2</sub>), o nitrogênio (N<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>), foram analisados através de uma coluna MoleSieve 5A (10m x 0.32mm) operada a 100°C, com uma temperatura de injeção de 95°C, usando Argônio como gás transporte a 30 psi. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrogênio sulfito (H<sub>2</sub>S), ar e vapor de água foram medidos em coluna PLOT U (8m x 0,32mm) operada a 70°C, na temperatura de 70°C, utilizando hidrogênio como gás transporte a 15 psi. Cada coluna foi conectada a um DCT (Detector de condutividade Termica) separado para detecção.

Estas análises que foram realizadas na UFPR campus de Curitiba, utilizou-se de um tubo de *hungate* com o volume de 7 mL de meio líquido, com 7 dias de inoculado, onde com o auxílio de uma seringa de vidro, retirando o gás produzido e inserido no CG.

#### **4.3.4 Determinação do Carbono Orgânico Total - COT**

Para quantificação dos carbonos e de nitrogênio contidos no meio foi realizado a técnica de COT (Carbono Orgânico Total), este foi realizado por um analisador orgânico por espectrometria NDIR (infravermelho não dispersivo), equipado com um mostrador OCT-L (Shumadzu, modelo TOC-L) e uma unidade de medição de Nitrogênio Total (TNm-1).

Observado que o substrato possui uma alta carga orgânica, as amostras tiveram que ser diluídas em média a 1:500 mL.

#### 4.3.5 Determinação da Demanda Química e Biológica de Oxigênio (DQO e DBO)

Estas análises foram realizadas pela GERPEL/INEO, onde a realização seguiu as orientações contidas a Standard Methods for Examination and Wastewater (APHA 1998) e utilizou o método 5210-B para a DQO e o 5220-D para DBO, dados informados pela responsável Técnico. Para a realização destas análises foram enviados 10 amostras, sendo separadas em; sem filtração e filtrada; cada grupo possuía 1 amostra de cada complexo bacteriano e 1 amostra do meio de cultivo.

#### 4.4 – Cálculos Estequiométricos

A via metabólica utilizada para a produção dos gases e dos ácidos orgânicos se dá principalmente pela conversão dos compostos orgânicos contidos no meio, como base de calculo foi utilizado a DBO e o COT para calcular a concentração dos ácidos produzidos e a produção de H<sub>2</sub>, como visto nos trabalho de Arudchelvam, Perinpanayagam e Nirmalakhandan (2010) e Kawai *et al.*, (2016).

4.4.1 – Para o calculo do crescimento da Biomassa, usaremos a equação:

$$\text{Eq01. CB} = \frac{(\text{DQO SF CB} - \text{DQO SF})}{\text{DQOSF}} 100$$

CB – Crescimento da biomassa

DQO SF CB – Valor da DQO sem filtrar do inoculo

DQO SF – Valor da DQO sem filtrar do soro de leite

4.4.2 – Para o calculo da transformação dos carbonos e nitrogênio,

$$\text{Eq 02. TCg} = \frac{(\text{COI} - \text{COCB}) - \text{A}}{\text{COCB}} * 100$$

$$\text{Eq 03. TCC} = \frac{(\text{COI} - \text{COCB}) - \text{TCg}}{(\text{COI} - \text{COCB})} * 100$$

TCg – Taxa de carbono transformada em gás

AT – Valor total de ácidos transformados

COI – Valor da soma Carbono Total e do Nitrogênio Inicial

COCB – Valor da soma Carbono Total e do Nitrogênio Complexo Bacteriano

TCC – Taxa de carbono transformado em ácidos

4.4.3 – Para o calculo da taxa de consumo orgânico do Soro de leite

$$\text{Eq 04. CO} = \frac{(\text{DQO SL} - \text{DQO CB})}{\text{DQO SL}} * 100$$

CO – Consumo da carga orgânica

DQO SL – DQO Filtrada do soro de leite

DQO CB- DQO do complexo bacteriano

4.4.4 – Para o calculo da taxa atividade biológica

$$\text{Eq 05. AB} = \frac{(\text{DBO CB} - \text{DBO SL})}{\text{DBO SL}} * 100$$

AB – Atividade biológica

DBO SL – DBO do soro de leite

DBO CB – DBO do complexo Bacteriano

4.4.5 – Para calculo do volume produzido de H<sub>2</sub>

$$\text{Eq06. H} = \frac{\text{CH}}{\text{DQO SL} - \text{DQO CB}}$$

CH – Concentração produtiva de H<sub>2</sub> por litro, esse valor é dado a partir do calculo da produção de H<sub>2</sub> por mL de soro de leite e por proporção igualar a 1l tendo como resultado expresso em H<sub>2</sub> L/gDQO.

## 5. Resultados e Discussão

---

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho, relacionando-os aos encontrados na literatura. Para um melhor entendimento, estes foram dispostos da seguinte forma: caracterização do meio de cultivo; avaliação do efeito da temperatura na produtividade de gás pelos diferentes complexos bacterianos, avaliação da cinética do processo fermentativo para os diferentes complexos bacterianos; avaliação da capacidade biodegradante e adaptativa dos complexos bacterianos; avaliação dos ácidos orgânicos voláteis produzidos durante o processo fermentativo e identificação das bactérias do complexo que se mostrou mais promissor no que diz respeito a produção de  $H_2$ .

### 5.1 – Caracterização do meio de cultivo

Na Tabela 5.1 são apresentados valores dos parâmetros físico-químicos do meio de cultivo, o qual foi produzido a partir do soro de leite. O meio de cultivo, utilizado neste trabalho, apresentou valores de DQO, carbono orgânico dissolvido e nitrogênio similares (mesma ordem de grandeza) aos obtidos por diversos autores (ver Tabela 5.1).

A capacidade de produção de biogás ou  $BioH_2$ , a partir do processo fermentativo está diretamente ligado às características físico-químicas do substrato, principalmente, em relação sua carga orgânica. Azbar *et al.*, (2009) utilizaram soro de leite como substrato, para produção de  $BioH_2$  e obtiveram uma produtividade de 1500 a 3000 mL de gás por litro de substrato. Moreno *et al.*, (2015), utilizaram o soro de leite como substrato, obtendo uma produtividade de 1100 mL de  $BioH_2$   $L^{-1}$  substrato. Lima *et al.*, (2016) através do estudo de diferentes concentrações do soro de leite para a produção de  $BioH_2$  obtendo sua maior produtividade em 1080 mL de  $BioH_2$   $L^{-1}$  substrato. Akhlaghi *et al.*, (2017) estudaram a variação do pH e da concentração do soro de leite, na produtividade de  $BioH_2$ , obtendo um resultado de 371 mL de  $BioH_2$ /kg (carbono dissolvido). Castelo *et al.*, (2018) obtiveram uma produção de 800 mL  $BioH_2$   $L^{-1}$  substrato. Baseado nos resultados obtidos nos trabalhos acima citados, verifica-se que um meio de cultivo produzido a partir do soro de leite possui características físico-químicas que permitem a produção de  $BioH_2$  via processo fermentativo, mesmo sendo utilizado diferentes metodologias.

Tabela 5.1 – Teor de carga orgânica do meio de cultivo produzido a partir de soro de leite.

Referência	DQO	Carbono Orgânico Dissolvido (COD)	Nitrogênio Total
	Valor (g/L)	Valor (g/L)	Valor (g/L)
Este trabalho	118* / 47**	27	0,5
Azbar <i>et al.</i> , 2009	83	7	0,2
Moreno <i>et al.</i> , 2015	122	-	1,2
Lima <i>et al.</i> , 2016	54	-	-
Akhlaghi <i>et al.</i> , 2017	-	29	1,3
Castelo <i>et al.</i> , 2018	60±5	-	1,3

\* Valor encontrado para o meio de cultivo sem filtração  
 \*\* Valor encontrado para o meio de cultivo filtrado.

Outra característica físico-química do meio de cultivo que pode influenciar a produtividade em BioH<sub>2</sub>, via processo fermentativo, é o seu pH. O meio de cultivo utilizado neste trabalho apresentou um valor de pH igual a 5,3 ± 0,1. Conforme definido por Bach (2012) e Lima *et al.* (2016), este meio de cultivo pode ser classificado como ácido (4,7 a 5,5). Akhlaghi *et al.* (2017) avaliaram o efeito do pH (5,5 - 7) do meio de cultivo na produtividade de BioH<sub>2</sub>. A maior produtividade (6100 mL BioH<sub>2</sub>/kg<sub>COD</sub>) foi observada em pH igual 5,5. Alexandropoulou *et al.* (2018) e Sharma e Melkania (2018), os quais utilizaram soro de leite com pH igual a 5,4, como base, para o preparo do meio de cultivo, obtiveram em seus respectivos trabalhos valores de produtividade de BioH<sub>2</sub> significativos ( $\approx 1600 \text{ BioH}_2 \text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$ ). Assim, na condição de pH em torno de 5,3 – 5,5 é possível a produção de BioH<sub>2</sub> via processo fermentativo.

Além disto, baseado nos valores de DQO e DBO, o meio de cultivo utilizado neste trabalho, apresentou uma razão DQO/DBO igual a 5,5, sendo definido como de difícil biodegradabilidade (Braga *et al.*, 2006). De acordo com Braga *et al.* (2006) para uma razão DQO/DBO maior que 5, um efluente possui baixa biodegradabilidade e um tratamento baseado em oxidação química deve ser uma opção mais eficiente. Para razões DQO/DBO na faixa de 5 à 2,5 e menores que 2,5 o efluente é classificado como de média e baixa biodegradabilidade, respectivamente. Assim, a utilização do soro do leite como substrato para produção de BioH<sub>2</sub> (ou biogás) pode gerar ainda um efluente com maior biodegradabilidade.

Como descrito em Guo *et al.*, (2010), Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, (2010), Sattar *et al.*, (2016) e Sydney *et al.*, (2014), todo composto contendo proteínas, gorduras e carboidratos, são fontes passíveis de produção de BioH<sub>2</sub>, porém é necessário o estudo do substrato, para que se possa criar um ambiente favorável para fermentação, ajustando o substrato às bactérias. Baseado nas características físico-químicas tais como DQO, COD e pH, o meio de cultivo produzido a partir do soro de leite possui potencial para a produtividade de BioH<sub>2</sub> via processo fermentativo.

## 5.2 – Avaliação das Condições da temperatura na produtividade de gás via processo fermentativo

Na Tabela 5.2 são apresentados os resultados dos testes iniciais do comportamento produtivo de gás pelos complexos bacterianos em diferentes temperaturas, com o intuito de determinar a temperatura que favorecesse a produtividade em todos os complexos. Para ser definida a temperatura de  $33 \pm 2^\circ \text{C}$ , foi analisado a produtividade de gás em diferentes temperaturas, por um período de 02 semanas, sendo medida a produção de gás a cada 04 dias.

Tabela 5.2 – Resultados produtivos encontrados de gás durante os testes para definição da temperatura ideal.

Temperatura (°C)	CBPU	CBPO	CBTE	CBBO
	V <sub>gás</sub> (mL)	V <sub>gás</sub> (mL)	V <sub>gás</sub> (mL)	V <sub>gás</sub> (mL)
37	20	3	10	21
35	23	6	12	31
33	18	12	18	60
31	16	6	12	50

V<sub>gás</sub> produzido em um período de 4 dias

Para definir a temperatura, foi verificada a diferença do volume de gás produzido em todos os complexos, como o controle de temperatura da estufa possuiu uma variação de  $\pm 2^\circ \text{C}$ , adicionou-se ao resultado esta variação. Com verificado na Tabela 5.2 os valores produtivos de cada complexo obtiveram uma melhor produtividade entre as temperaturas de 33 e 35 °C respectivamente.

Como observado em Guo *et al.*, (2010) realizaram uma revisão dos principais fatores para uma boa produtividade na fermentação escura e Sydney (2013) estudou as

variações produtivas de diferentes complexos. Os autores demonstram a necessidade do conhecimento sobre as condições ideais de produção, neste caso a temperatura, resultam em uma maior produtividade dos complexos, observados que estes parâmetros podem considerados responsáveis na inibição e diminuição da produtividade.

### 5.3 – Avaliação do Processo Fermentativo Para produção de BioH<sub>2</sub>

Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados obtidos dos sistemas fermentativos, após o processo de fermentação, juntamente aos resultados obtidos pelo meio de cultivo (Soro). Estes foram condensados para explicitar de forma clara as diferenças entre os complexos. A discussão desta tabela é apresentada não seções em função da (i) produtividade; (ii) Biodegradabilidade; (iii) formação dos compostos orgânicos.

Tabela 5.3. Caracterização da fase gás e da fase líquida após o processo fermentativo do soro do leite conduzido sob ação de diferentes complexos bacterianos

Parâmetro	SORO	CBPU	CBTE	CBPO	CBBO
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Concentração de BioH <sub>2</sub> gás (% v/v)	-	35	37	36±0,006	51±0,35
Concentração de CO <sub>2</sub> gás (% v/v)	-	45	61	58±0,05	49±0,18
DQO (sem filtração) (g L <sup>-1</sup> )	118±0,05	138±0,05	158±0,05	160±0,05	170±0,05
DBO (pós filtração) (g L <sup>-1</sup> )	8,49±0,05	22±0,05	11±0,05	9±0,05	16±0,05
DQO (pós filtração) (g L <sup>-1</sup> )	47,05±0,05	32±0,05	25±0,05	22±0,05	24±0,05
Carbono Total (g L <sup>-1</sup> )	27,178	24,4	21,4	14,5	19
Carbono Orgânico Total (g L <sup>-1</sup> )	26,855	24,2	21,2	14,5	19
Carbono Inorgânico Total (g L <sup>-1</sup> )	0,327	0,2	0,2	0	0
Nitrogênio Total (g L <sup>-1</sup> )	0,512	0,4	0,3	0,2	0,4

SORO – Meio de Cultura /// CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

Nesta pesquisa foram utilizados 04 complexos fermentativos, denominados em CBPU, CBPO, CBTE e CBBO (descritos abaixo). Com base no trabalho de Sydney (2013), que testa a capacidade produtiva de vários complexos bacterianos em um único substrato, possibilitando a identificação de possíveis fatores, que inibam ou aumentem as das concentrações das substâncias produzidas.

O complexo bacteriano, denominado CBPU, é formado por bactérias do gênero *Clostridium*. Atualmente, este gênero tem sido um dos mais utilizados para produção de BioH<sub>2</sub>, por possuírem uma elevada taxa de transformação do carbono e do nitrogênio em ácidos voláteis e BioH<sub>2</sub>, quando submetidos a condições favoráveis (Aly *et al.*, 2018, Arunasri *et al.*, 2016, Boboescu *et al.*, 2016, Hitit, Lazaro e Hallenbeck, 2017 e Sydney *et al.* 2014). Assim, este complexo foi utilizado como uma referência para os demais testados neste trabalho. Neste experimento foi utilizado, especificamente, o complexo formado pela *Clostridium beijerinckii* Prazmowsk denominada comercialmente como ATCC 8260.

Os complexos CBPO, CBTE e CBBO, foram definidos para esta pesquisa, observando, a facilidade e baixo custo de aquisição, após uma correlação entre a origem deste e matérias encontrados na literatura. Alexandropoulou *et al.*, (2018) e Ravi *et al.*, (2018), a procura por novos complexos bacterianos que possuam uma alta capacidade produtiva de BioH<sub>2</sub>, começa-se a partir do conhecimento sobre o substrato ao qual é encontrado, onde a partir deste pode se definir, questões como temperatura e pH ideal.

### **5.3.1 – Produção de gás.**

A produção de gás via fermentação bacteriana ocorre mediante ao consumo dos compostos orgânicos por bactérias produzindo ácidos orgânicos e gás, este teoricamente pode ser composto por CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, BioH<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S com concentrações diferentes. Esta pesquisa teve o direcionamento voltado para a produção de BioH<sub>2</sub>. Para demonstrar os resultados alcançados usaremos os dados das Tabelas 5.2., 5.3., 5.4. e 5.5.e das Figuras 5.4.1, 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5 e por fim a Eq 06.

O processo fermentativo foi realizado em um período de 10 semanas, com o acompanhamento da produtividade de cada complexo, determinado a partir da capacidade produtiva de uma geração por complexo bacteriano e sua produção de gás coletada semanalmente.

#### **5.3.1.1 – Capacidade produtiva dos complexos em uma geração;**

Na Tabela 5.4, são apresentados os dados obtidos a partir da produtividade de uma única geração (5<sup>a</sup>) de cada complexo. Com o intuito de definir a capacidade máxima de produção de cada complexo, além da demonstração do comportamento de decaimento da produção bacteriana.

Tabela 5.4. Acompanhamento do período produtivo dos complexos bacterianos em uma geração (meio de cultivo produzido separadamente para esta análise com inoculo da 5ª geração de todos os complexos)

Parâmetro	CBPU	CBTE	CBPO	CBBO
	Valor	Valor	Valor	Valor
23/09/2017 (Volume de gás mL)	0	0	0	0
30/09/2017 (Volume de gás mL)	11	29	31	60
07/10/2017 (Volume de gás mL)	10	5	9	14
14/10/2017 (Volume de gás mL)	7	2	2	7
21/10/2017 (Volume de gás mL)	3	1	1	16
28/10/2017 (Volume de gás mL)	0	0	0	2
04/11/2017 (Volume de gás mL)	0	0	0	2

CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

A coleta de dados foi realizada como descrito na seção 4.2, esta perdurou por um período de 06 semanas como intuito de determinar a capacidade e comportamento produtivo de cada complexo ate a sua estagnação. Verifica-se que o CBPU obteve um volume total produzido de 21 mL em 28 dias, o CBTE 37 mL em 28 dias, e o CBPO 43 mL em 28 dias e o CBBO 101 mL em 35 dias. Como observado em Aly *et al.*, (2018) e Wu *et al.*, (2016), o conhecimento sobre o decaimento produtivo de Bioh<sub>2</sub>, pode indicar o período de máxima e mínima produção em biorreatores. Um fator que chama atenção nos resultados obtidos é o aumento produtivo que ocorreu no CBBO entre a 4ª e 5ª semana de coleta. Isso pode indicar que este complexo além de uma alta produtividade possui um maior tempo produtivo.

### 5.3.1.2 – Produção de Gás (Biogás).

Na Tabela 5.5, são apresentados os valores de produtividade total de gás, para os complexos bacterianos. Na qual também foi apresentada uma revisão dos trabalhos que empregaram soro de leite como substrato. A capacidade produtiva da pesquisa obteve, como resultado uma variação na produtividade 2000 até 8550 mL/L<sub>substrato</sub>, o que demonstra a proximidade dos resultados encontrados por outros autores.

Azbar *et al.*, (2009) desenvolveram uma pesquisa sobre a produtividade em diferentes tempos de retenção e um biorreator tendo como resultando em uma produtividade de 7900 mL/L<sub>substrato</sub>. Lima *et al.*, (2016), pesquisaram a influencia das

diferentes concentrações do soro de leite para produção de BioH<sub>2</sub>, obtendo como melhor resultado a produção de 1800 mL/L<sub>substrato</sub>, a um resultado menor ao obtido pelo CBPU. Patel *et al.* (2016) pesquisaram as diferentes produtividades de BioH<sub>2</sub>, em soro de leite bruto e com tratamento para esterilização, obtendo sua maior produtividade no soro de leite esterilizado com a produtividade 4785 mL/L<sub>substrato</sub>. Ottaviano *et al.* (2017), trabalharam com o incremento diferentes concentrações de lactose no meio de cultivo (soro de leite), obteve 6500 mL/L<sub>substrato</sub>. Estes volumes produtivos podem indicar um bom funcionamento dos complexos fermentativos estudados.

Tabela 5.5 – Acompanhamento produtivo de gás pelos complexos bacterianos, comparando-os com os resultados de outros trabalhos realizados com o soro de leite.

AUTORES	Metodologia	Complexo	Concentração		Gás
			Valor BioH <sub>2</sub> (%)	Valor (mL <sup>-1</sup> )	
Este Trabalho	Fermentação contínua, estudo a produtividade de BioH <sub>2</sub> , por diferentes consórcios bacterianos	CBPU	35	2000	
		CBPO	36	4420	
		CBTE	37	4580	
		CBBO	51	8550	
Azbar <i>et al.</i> , (2009)	Biorreator de bancada, estudo dos efeitos da variação do tempo de retenção hidráulica.	derivado do soro de leite	45	7900	
Lima <i>et al.</i> (2016)	Biorreator de batelada com fase líquida, influencia das concentrações do substrato na produção de BioH <sub>2</sub>	derivado da lactose	44	1817	
Patel <i>et al.</i> (2016)	Fermentação contínua, estudo a capacidade do soro de leite para produtividade de BioH <sub>2</sub>	<i>Clostridium sp.</i>	55	4785	
Ottaviano <i>et al.</i> (2017)	Biorreator de leite, estudo das concentrações de soro iniciais para produção de BioH <sub>2</sub>	derivado do tratamento de vinhaça	51	6500	

CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

O acompanhamento da produtividade de gás dos complexos foi apresentado na Figura 5.1. Observa que a produção do gás tem uma variação do seu volume a cada geração desde o início de sua produção até a sua estabilização produtiva, tendo como resultado no CBPU um volume de 14 mL, no CBTE 32 mL, no CBPO 31 mL e a CBBO

com 60 mL. Demonstrando assim comportamentos distintos de cada complexo. Nota: É chamado de geração o período 07 dias onde ocorre a fermentação, após este período o meio de cultura é renovado. Como observado os comportamentos dos complexos apresentados em relação são diferentes entre si, desta forma entendeu-se a necessidade de dispor cada complexo, para identificar fatores que possam ter causados esta diferença.

### 5.3.1.2.1 – CBPU (Complexo Bacteriano Puro)

Apresentam-se os valores da produtividade de gás, ao longo de 10 semanas de fermentação, obtidos pelo complexo CBPU. Na Figura 5.1 demonstram os dados experimentais indicam uma cinética favorável, pois após 7 dias (1ª geração) alcançou-se 23 mL de gás produzido. Até o 28º dia (4ª geração) a produção de gás manteve-se na faixa de 19 – 25, sendo que a partir 33º dia (5ª geração) observou-se um decréscimo do volume produzido para 16 mL e estabilizando a sua produção 56 (8ª geração) com 14 mL. Este decaimento não era esperado, uma vez que este complexo é utilizado como parâmetro produtivo, observado as pesquisas realizadas com este gênero bacteriano, além do grau de pureza do complexo.

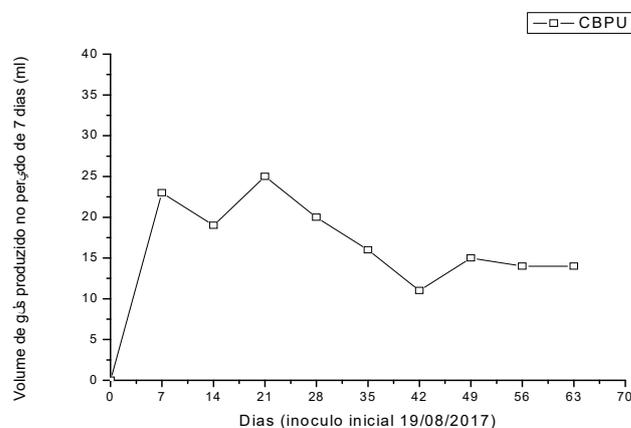


Figura 5.1 – Gráfico da evolução da produção de gás (mL) obtida durante 10 semanas do complexo CBPU.

Baseado no valor de produtividade de gás para este complexo o resultado de  $2000 \text{ mL}^{-1}_{\text{substrato}}$ , onde observa um melhor desenvolvimento produtivo na pesquisa de Patel *et al.* (2016) que trabalharam com a ação fermentativa de bactérias do gênero *Clostridium*, em uma temperatura  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e com a suplementação de lactose, obteve uma produtividade de  $4785 \text{ mL}^{-1}_{\text{substrato}}$  (Tabela 5.5). Esta diferença produtiva pode indicar a possível relação

da temperatura e uma maior disponibilidade de compostos carbônicos durante o desenvolvimento dos seres bacterianos deste gênero.

Outro fator comparativo apresentado na Tabela 5.3, e a diferença nas concentrações obtidas em outras pesquisas em relação ao CBPU, que obteve como resultado 35% de concentração de BioH<sub>2</sub>, enquanto os trabalhos apresentados tiveram em média de aproximadamente 50%. Esta relação pode ser identificada possivelmente a partir das diferentes metodologias seguidas, onde os autores (Tabela 5.5), utilizam biorreatores e concentrações de soro diferentes (Lima *et al.* (2016)) ou a adição de suplementos (Patel *et al.* (2016)).

### 5.3.1.2.2 – CBPO (Complexo Bacteriano Porco)

Os valores da produtividade de gás obtido pelo CBPO, ao longo de 10 semanas de fermentação (Figura 5.2), onde demonstra o comportamento produtivo de gás. Os dados experimentais indicam uma cinética favorável, após 7 dias (1<sup>a</sup> geração) alcançou-se 28 mL de gás produzido. Mantendo uma produtividade entre 22 - 30 mL até o 35 (5<sup>a</sup> geração) onde observou-se o crescimento produtivo até 49<sup>o</sup> dia (7<sup>a</sup> geração) onde alcançou a estabilização produtiva com um volume de 31 mL.

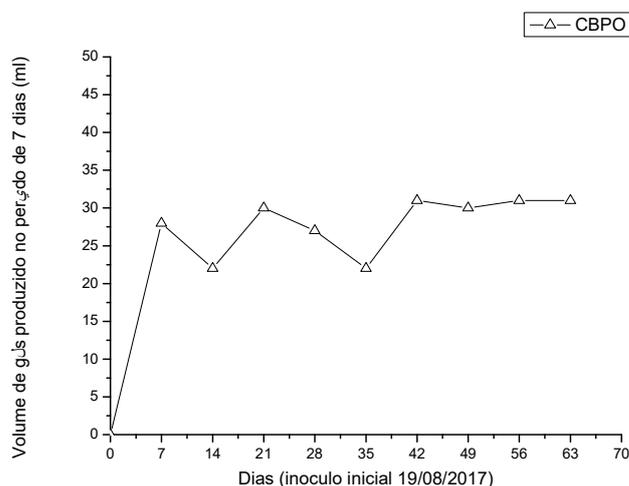


Figura 5.2 - Gráfico da evolução da produção de gás (mL) obtida durante 10 semanas do complexo CBPO

Com um volume produzido de gás produzido em cerca de 4400 mL<sup>-1</sup> (substrato), este complexo demonstrou uma produtividade maior, que o complexo parâmetro (CBPU) como

também em trabalhos com a utilização de soro de leite como substrato como o de Lima *et al.* (2016), que através dos estudo da produtividade de diferentes concentrações de soro de leite obteve uma produtividade de aproximadamente  $1800 \text{ mL}^{-1}$ , o que pode nos evidenciar uma boa produtividade para este complexo. Porém com uma baixa concentração de  $\text{BioH}_2$  (36%), que ao comparamos aos 44% obtidos por Lima *et al.*(2016) e por Azbar *et al.* (2009) com 45%, explicitando uma proximidade na produtividade de  $\text{BioH}_2$  (Tabela 5.5).

### 5.3.1.2.3 – CBTE (Complexo Bacteriano Terra)

Neste são apresentados os valores da produtividade de gás ao longo de 10 semanas de fermentação (Figura 5.3). Os dados experimentais indicam uma cinética favorável, além de uma pequena variação entre a primeira coleta no 7 dias (1ª geração) alcançou-se 28 mL de gás produzido e a sua estabilidade com 32 mL no 21 dia (3ª geração) do experimento. Neste caso ficou evidenciado a rápida adaptação do complexo bacteriano ao substrato.

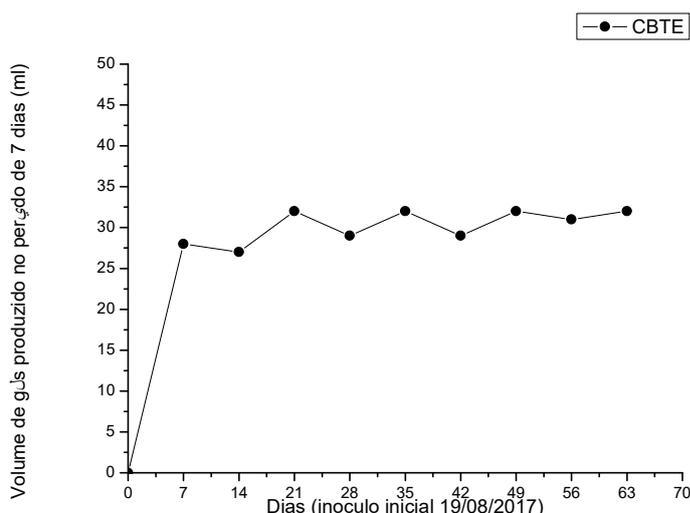


Figura 5.3 – Gráfico da evolução da produção de gás (mL) obtida durante 10 semanas do complexo CBTE

Com o volume produzido de gás  $4500 \text{ mL}^{-1}$  (substrato), o CBTE demonstrou também uma composição gasosa formada praticamente por 2 gases o  $\text{CO}_2$  com 61% e de 37% de  $\text{BioH}_2$  resultando 98% (Tabela 5.3). Este valores aos comparados com o trabalho de Azbar *et al.* (2009) que através do uso de um biorreator delineou a sua composição gasosa produzida somente com  $\text{CO}_2$  e  $\text{BioH}_2$ , onde com a utilização da variação da alcalinidade do sistema conseguiu diminuir a concentração de  $\text{CO}_2$  no gás produzido, obteve uma

produtividade de  $7900 \text{ mL}^{-1}$ , com uma concentração de 44% de  $\text{BioH}_2$ , porém chegou a aumentar até 92% esta concentração com um menor volume de gás produzido  $1500 - 3000 \text{ mL BioH}_2 \text{ L}^{-1}$  (Tabela 5.5).

#### 5.4.1.4 – CBBO (Complexo Bacteriano Boi)

Na Figura 5.4 são apresentados os valores da produtividade de gás ao longo de 10 semanas de fermentação. Os dados experimentais indicam uma cinética favorável, pois após 7 dias (1ª geração) alcançou-se 39 mL de gás produzido. Mantendo uma produtividade entre 26 - 60 mL até o 42 (7ª geração), onde no 56º dia (8ª geração) onde alcançou a estabilização produtiva com um volume de 60 mL, o volume alcançado por este é surpreendente observado que o meio de cultura possui 7 mL (6mL de soro de leite + 1mL de inoculo), o que nos dá um aumento volumétrico de 8 vezes, além de uma produtividade de  $8,5 \text{ mL/mL}$ (substrato).

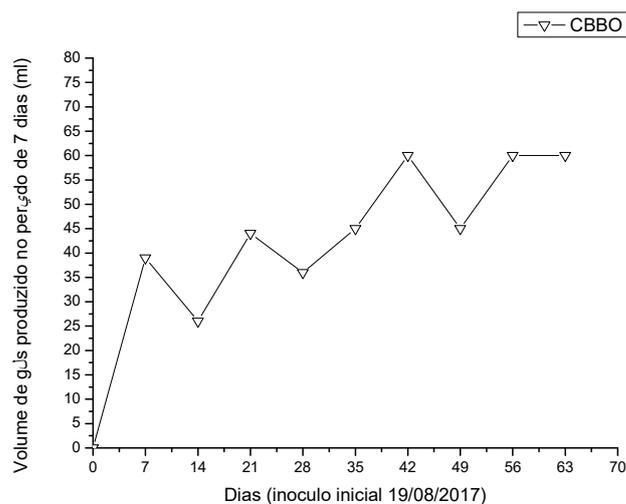


Figura 5.4 – Gráfico da evolução da produção de gás (mL) obtida durante 10 semanas do complexo CBBO

Com os resultados de  $8550 \text{ mL/L}$  em uma concentração de 51% de  $\text{BioH}_2$ , além de sua composição gasosa de 99,9% de  $\text{BioH}_2$  e  $\text{CO}_2$ . Este complexo demonstra excelentes resultados, que quando a comparamos os autores da Tabela 5.5, o que mais se aproxima são os resultados obtidos por Azbar *et al.*, (2009) e os de Ottaviano *et al.*, (2017) já discutido anteriormente.

Desta forma entende-se, que todos os complexos aqui apresentados, possuem características produtivas de gás, já mencionadas em estudo de vários autores, que utilizaram o soro de leite para a criação do meio de cultivo. Porém o resultado obtido pelo CBPU se demonstrou abaixo do esperado, observado o grau pureza do complexo e a suas referências produtivas contida na literatura e no caso do CBBO entende-se a possibilidade da descoberta de um complexo produtivo com a capacidade de melhorar a sua produtividade através da otimização.

### 5.3.2 – Produção de BioH<sub>2</sub>

Na tabela 5.6, são apresentados os valores de produtividade total de BioH<sub>2</sub>, para os complexos bacterianos. Na qual também foi apresentada uma revisão dos trabalhos que empregaram diferentes substratos visando uma maior produtividade e concentração de BioH<sub>2</sub>, além de diferentes complexos bacterianos. Os complexos fermentativos utilizados neste trabalho, com o intuito de produzir BioH<sub>2</sub>, obtiveram resultados 700 – 4371 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato, similares ao comparamos a diversos autores, com metodologias, substratos e complexos diferentes entre cada pesquisa. Sydney (2013), que utilizou a vinhaça como substrato, obteve uma produtividade de 5400 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato, em 30 dias de retenção em um biorreator. Ottaviano *et al.*, (2017), estudaram a produtividade de BioH<sub>2</sub>, através da suplementação de concentrações diferentes de lactose no soro de leite, obtendo como resultado 4100 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato. Castelo *et al.*, (2018), que investigaram as principais causas da instabilidade produtiva de BioH<sub>2</sub>, tendo como substrato o soro de leite obtendo uma produtividade de 900 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato. Aly *et al.*, (2018), que estudaram o aumento produtivo de BioH<sub>2</sub>, através da formação de um substrato de nitrogênio e ácido casamino, mantendo suas concentrações em 10g/L de cada substância, a partir da fermentação realizada por seres *Clostridium butyricum* RAK25832, obtendo como resultado a produtividade 2505 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato. Sharma e Melkania (2018), que estudaram a produtividade de BioH<sub>2</sub>, a partir da ação bacteriana de seres puros (*E. Coli*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter aerogenes*) em um substrato formado por lixo orgânico tratado, obtendo o seu melhor resultado com a *Bacillus subtilis* (1610 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> substrato). Assim demonstrando que todos complexos aqui estudado possuem referencias produtivas aceitáveis na literatura atual

Tabela 5.6 – Acompanhamento produtivo de gás pelos complexos bacterianos, comparando-os com os resultados de outros trabalhos realizados com o soro de leite.

AUTORES / ANO	Metodologia	Substrato	Complexo	Concentração	BioH <sub>2</sub>
	Valor	Valor	Valor	Valor BioH <sub>2</sub> (%)	Valor (mL <sup>-1</sup> )
Este Trabalho	Fermentação contínua, estudo a produtividade de BioH <sub>2</sub> , por diferentes consórcios bacterianos	Soro de Leite	CBPU	35	700
			CBPO	36	1600
			CBTE	37	1700
			CBBO	51	4371
Sydney (2013)	Biorreator, estudo das melhores condições para produção de BioH <sub>2</sub> e ácidos orgânicos	Vinhaça	ATCC 8260 (CBPU)	40	5400
Ottaviano <i>et al.</i> , (2017)	Biorreator de leite, estudo dos das concentrações de soro iniciais para produção de BioH <sub>2</sub>	Soro de Leite	Inoculo de tratamento de vinhaça	51	4100
Castelo <i>et al.</i> , (2018)	Biorreator de agitação, estuda as possíveis interferências na produtividade de BioH <sub>2</sub>	Soro de Leite	Consortio derivado do soro de leite	-	900
Aly <i>et al.</i> , (2018)	Fermentação contínua, estudo dos fatores que possibilitam o aumento da produtividade de BioH <sub>2</sub>	Fontes de carbono	<i>Clostridium butyricum</i> RAK25832	-	2505
Sharma e Melkania, (2018)	Fermentação contínua, estuda a produtividade de BioH <sub>2</sub> em diferentes concentrações inoculo	Lixo orgânico	<i>Bacillus subtilis</i>	-	1610

CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

O resultado expresso pelo complexo CBPU foi de 700 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>Substrato</sub>, observando a relação de produtividade em relação a degradação da carga orgânica em 0,045 L BioH<sub>2</sub>/gDQO, além da concentração 35 % de BioH<sub>2</sub>, obteve uma concentração de 48% de CO<sub>2</sub>. Observa-se neste complexo houve a formação de outros compostos gasosos, que provavelmente pela baixa concentração não foram detectados pelo CG, com provavelmente H<sub>2</sub>O<sub>gás</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>S. Sydney, (2013), que estudou a desempenho produtivo de vários complexos bacterianos, por meio da utilização da adição de fontes de carbono (Sacarose) na vinhaça. Dentre eles um complexo com seres gênero *Crostitidium* ATCC 8020, que obteve uma produtividade de 5420 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, com uma concentração de 40%. O que demonstra que o desenvolvimento do CBPU ficou abaixo do esperado.

O complexo CBPO obteve a produtividade de 1600 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>Substrato</sub>. Em relação ao consumo da carga orgânica em 0,064 L BioH<sub>2</sub>/gDQO. Este obteve como resultado a concentração de BioH<sub>2</sub> relatada na Tabela 5.3, juntamente a uma concentração de 58% de CO<sub>2</sub>. Com os resultados obtidos nota-se a provável produção de outros gases em baixa concentração. Como observado nos complexo anterior, este manteve uma boa produtividade, porém com uma baixa concentração de BioH<sub>2</sub>. Em Lima *et al.*, (2016) (Tabela 5.5) que estudaram a produtividade em diferentes concentrações de soro de leite, obteve como resultados uma concentração de 31 - 44% de BioH<sub>2</sub>, com um volume máximo produtivo de 1080 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>. O que pode indicar que o complexo em estudo pode melhorar a sua concentração de gás, a partir de ajustes na concentração do soro de leite.

O CBTE obteve uma produtividade com uma produtividade de 1700 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>. Com relação da consumição da carga orgânica em 0,07 L BioH<sub>2</sub>/gDQO, além da concentração já relatada de BioH<sub>2</sub>, o complexo obteve uma concentração de 61% de CO<sub>2</sub>, podendo ser considerada muito alta. Como visto na Tabela 5.3, o composto gasoso formado obteve uma composição de 98% de CO<sub>2</sub> e BioH<sub>2</sub>. Sharma e Melkania 2018, que trabalharam com seres bacterianos puros (*Bacillus subtilis*) em ação fermentativa no soro de leite, obtendo uma produção sua máxima produção em 1610 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub> em uma concentração de 35 - 50% da concentração produtiva de BioH<sub>2</sub>. Azbar *et al.* (2009) que através do uso de um biorreator delineou a sua composição gasosa produzida somente com CO<sub>2</sub> e BioH<sub>2</sub>, onde a partir do aumento alcalinidade conseguiu diminuir a concentração de CO<sub>2</sub>, que inicialmente em 55% ate 06%, com o aumento da alcalinidade

do meio. A composição gasosa deste complexo obteve a maior concentração de CO<sub>2</sub>, sendo necessários ajustes para que se possa diminuir esta concentração aumento a sua produtividade.

O CBBO obteve uma atividade produtiva em relação à carga orgânica de 0,19 L BioH<sub>2</sub>/gDQO, e uma produtividade de 4371 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>. O que ao compararmos com a Tabela 5.6, nos evidencia ser um complexo com uma alta produtividade, além da formação de um composto gasoso com de 51% de BioH<sub>2</sub> e 49% de CO<sub>2</sub> com um alto grau de pureza.

Com o resultado de 4370 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>, obtido por este complexo, verifica-se que a produtividade próximas a esta adivinhem de produtividade total por um período de 30 dias em biorreatores. Sydney (2013), que obteve 5420 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>, através da suplementação do meio com sacarose e ação do complexo formado por seres puros do gênero *Clostridium*(ATCC 8260). Ottaviano *et al.* (2017) com uma produção máxima de 4100 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>, através da suplementação do soro de leite com lactose. Aly *et al.*, (2018) produzido por cepas puras (*Clostridium butyricum* RAK25832), que obteve seu maior rendimento em 3040 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup><sub>substrato</sub>, este com a montagem da concentração do substratos com características que possibilita uma alta produtividade, o que nos direciona a descoberta de um complexo com possibilidades produtivas ainda não vista na literatura.

#### **5.4.4 – Capacidade biodegradante dos complexos bacterianos e sua adaptação**

A capacidade de biodegradação por um composto bacteriano pode ser medida, a partir da diminuição da carga orgânica encontrada no resíduo, esta relação é determinada a partir da relação entre a DQO e DBO. O crescimento do complexo demonstra uma maior adaptação dos seres envolvidos no processo, para calcularmos usamos os resultados da DQO, DBO da Tabela 5.7 e as Equações 1, 4 e 5.

Na Tabela 5.7, demonstra que todos os complexos obtiveram uma diminuição da sua DQO e o aumento da DBO pós filtração, observando que a relação entre estes parâmetros, determina-se a efetividade no tratamento do soro. Onde o fator biodegradante do meio de cultivo ficou em 5,5, e os complexos bacterianos obtiveram como resultado CBPU 1,45, CBBO 1,5, CBTE 2,27 e CBPO 2,44. O que demonstra uma purificação deste resíduo em mais de 50% em todos os complexos, evidenciando assim a possível utilização deste no tratamento deste resíduo, como observado em Braga *et al.*, (2012), a redução da

DQO, juntamente ao fator de biodegradabilidade, pode evidenciar um bom tratamento do resíduo.

Tabela 5.7 – Caracterização dos componentes obtidos como resultado após o processo fermentativo do soro do leite conduzido sob ação de diferentes complexos bacterianos

Parâmetro		CBPU	CBPO	CBTE	CBBO
		Valor	Valor	Valor	Valor
Concentração BioH <sub>2</sub>	%	35	36	37	51
Concentração CO <sub>2</sub>	%	48	58	61	49
Produção de BioH <sub>2</sub>	BioH <sub>2</sub> /mL	700	1600	1700	4371
DQO (Sem filtração)	g L <sup>-1</sup>	138	158	160	170
DBO (Pós filtração)	g L <sup>-1</sup>	22	11	9	16
DQO (Pós filtração)	g L <sup>-1</sup>	32	25	22	24
Carbono total	g L <sup>-1</sup>	24,4	21,4	14,5	19
Carbono Orgânico Total	g L <sup>-1</sup>	24,2	21,2	14,5	19
Carbono Inorgânico Total	g L <sup>-1</sup>	0,2	0,2	0	0
Transformação da carga orgânica	LBioH <sub>2</sub> /gDQO	0,045	0,064	0,07	0,19
Fator degradabilidade		1,45	2,44	2,27	1,5
Consumo da COD	g/L	2,92	13	6,1	8,1

CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

Como visto na Tabela 5.3, ocorre comportamento diferenciado no consumo da carga orgânica em todos os complexos CBPU obteve a menor taxa obtendo como resultado 32% de redução, seguido da CBTE com 47%, CBBO 49% e a CBPO que obteve uma redução de 52% da carga orgânica. Com o intuito de tentar verificar os fatores que possivelmente influenciaram nestes resultados detalhou-se cada complexo.

No complexo CBPU foi observado a maior diminuição do fator biodegradante, porém menor resultado na transformação dos compostos orgânicos, este desempenho pode está associado a um baixo crescimento de 17% e a aumento de 163% na DBO. Esta desigualdade pode ser vista como fatores que o complexo não se obteve uma adaptação ao substrato testado, o que pode ter interferido na sua produtividade de gás Figura 5.2, está relação pode ser observada na seção a seguir.

No complexo CBTE observou-se, que ocorreu uma diminuição do fator degradativo em 2,27 e uma alta capacidade adaptativa, isto pode ser indicado pela relação próxima entre o crescimento bacteriano (33%) e o aumento da DBO (32%), o que nos leva a acreditar na fácil adaptação deste ao substrato, sendo possível observar mediante a produtividade de gás deste complexo, não obteve uma grande variação como visto na Figura 5.4, diferentemente da relação descrita abaixo.

O complexo CBPO obteve a menor diminuição do fator de degradabilidade, porém a maior redução da carga orgânica, esta relação foi evidenciada a partir do pouco aumento da DBO (9%). O complexo obteve uma taxa de crescimento bacteriano (36%), este comportamento diferenciado pode ter sido a possível causa dos resultados obtidos, principalmente no que tange a produção de ácidos orgânicos.

O CBBO nos apresentou uma redução de mais de 65% do fator de biodegradabilidade, além da maior taxa de crescimento de 44,49%, o que por si já nos indica uma adaptabilidade ao substrato, porém o mesmo obteve um aumento na DBO de 91%, o que pode nos levar a entender a diferença produtiva de gás até sua estabilização, como também a sua alta produtividade.

Como observado nos trabalhos de Kawai *et al.*, (2016) e Hitit, Lazaro e Hallenbeck (2017), o controle do consumo da carga orgânica do substrato a partir da DQO, pode identificar a necessidade de complementação ou diluição de substâncias contidas no meio de cultivo e como estes parâmetros podem influenciar diretamente na produtividade do sistema. Trevisan, Monteggia e Delabary (2014), uma produção contínua de BioH<sub>2</sub>, é necessário o entendimento não só de componentes (meio produtivo), mas também a pressão, a temperatura e o pH, além do consumo da carga orgânica por digestão bacteriana, observado que a concentração de algumas substâncias pode inibir a produtividade.

O entendimento sobre os fatores produtivos do complexo é observado em Sydney *et al.*, (2014), Lima *et al.*, (2016) e Alexandropoulou *et al.*, (2018), que o consumo da carga orgânica e a adaptabilidade dos complexos bacterianos, podem interferir diretamente na produtividade do sistema, não só na produção de gás como também na de ácidos orgânicos determinado a presença e as concentrações destes.

Por fim podemos criar algumas relações observadas nos resultados, onde quanto maior o crescimento do complexo bacteriano, maior sua produtividade como exemplo o

complexo CBBO. A relação entre a estabilidade produtiva de gás, em relação a proximidade das taxas de crescimento do complexo e de seu aumento da DBO, como observado no CBTE. E que a uma menor desenvolvimento da DBO em relação ao crescimento bacteriano pode aumentar a diminuição da carga orgânica do meio evidenciado pelo CBPO.

### 5.6 – Produção de ácidos orgânicos

Verifica-se a diferença da concentração produtiva de ácidos orgânicos diferentes em todos complexos, com uma maior concentração de ácido acético em (52%) no CBPU, o CBTE obteve o ácido succínico (52%), o ácido butírico (52%) no CBPO e no CBBO dividido entre ácido butírico (42%) e o succínico (38%).

Tabela 5.8 – Caracterização dos compostos orgânicos produzidos após o processo fermentativo do soro do leite conduzido sob ação de diferentes complexos bacterianos

Parâmetro		CBPU	CBPO	CBTE	CBBO
		Valor	Valor	Valor	Valor
Produção de BioH <sub>2</sub>	BioH <sub>2</sub> /mL	700	1600	1700	4371
Transformação da carga orgânica	LBioH <sub>2</sub> /gDQO	0,045	0,064	0,07	0,19
Fator degradabilidade		1,45	2,44	2,27	1,5
Consumo da COD	g/L	2,92	13	6,1	8,1
Ácidos orgânicos					
Acido Acético	g/L	1,54	0,31	0,57	3,04
Acido Succínico	g/L	1,39	1,81	3,34	5,97
Acido Propiónico	g/L	nd	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Acido Láctico	g/L	nd	< 0,5	nd	Nd
Acido Butírico	g/L	< 0,5	2,312	2,51	6,62
Total Transformado	%	99	33	101	170

CBPU – Complexo Bacteriano Puro /// CBTE – Complexo Bacteriano Terra /// CBPO – Complexo Bacteriano Porco /// CBBO – Complexo Bacteriano Boi

O complexo CBPU nos mostra que o carbono degradado na via metabólica foi utilizado na produção dos gases e ácidos voláteis onde uma concentração inicial de carbono de 27 g/L, e aproximadamente 0,5 g/l de nitrogênio, sendo transformado em 24 e 0,3 g/l sucessivamente. Estes compostos obtiveram uma conversão de quase 99% em ácidos orgânicos, divididos em 1,54 g de ácido acético, 1,32 g de succínico e com a presença do propiônico isso pode ser observado na Tabela 5.3. Esta relação pode ser

observa nos trabalhos de Ottaviano *et al.*, 2017 que obteve 44% de sua produtividade de ácido acético, a capacidade produtiva deste complexo possui um bom desempenho.

No complexo CBTE, observa-se também que este complexo foi capaz de converter em 100,16% dos carbonos e nitrogênios degradados do meio (6,093 g/L) em ácidos orgânicos (6,37 g/L). Os ácidos orgânicos produzidos foram o ácido succínico com 3,34 g/L, detentora de quase 50% dos compostos, o ácido butírico 2,51 g/L, o ácido acético com 0,52 g/L, além da presença de ácido propiônico em baixa quantidade. Como visto em Lima *et al.*, 2016 e Kawai *et al.*, 2016, a diminuição da carga orgânica do meio resulta em diferentes produtos, o que pode explicar o aumento da produção do ácido succínico, que obteve resultados produtivos diferentes a cada complexo testado.

No CBPO foi observado que apenas 44% dos carbonos e nitrogênios degradados pelo complexo foi transformada em ácidos orgânicos esta ação produziu ácido acético (0,31 g/L), lático (baixa concentração), succínico (1,81 g/L), propiônico (baixa concentração) e butírico (2,312 g/L). Que possivelmente houve a produção de mais substâncias não contidas nos padrões analisados. Em Vasmara e Marchetti 2017, o complexo gerou além de ácidos como valérico e capróico, produziu etanol, o que pode nos nortear quanto a diferença entre o que foi consumido de carbono e nitrogênio 13,074g/l e transformando apenas 4,43 g/L nos ácidos aqui analisados.

Como observado no comportamento dos complexos anteriores o desempenho deste na utilização dos carbonos e nitrogênio do meio, onde o soro de leite possuía 27,29 g/L e no CBBO 19,69 g/L. Este complexo obteve uma taxa de transformação destes compostos em 103%, onde foram transformados, em 6,62 g/L em de succínico, 3,04 g/L de ácido acético, 5,97 g/L de butírico e a presença em baixa concentração de ácido propiônico. Como visto nos trabalhos de Lima *et al.*, 2016 e Pachiega *et al.*, 2018, uma degradação acima de 30% da DQO, demonstra o bom funcionamento do complexo bacteriano.

### **5.7 - Biomol do complexo mais produtivo**

Com os resultados obtidos pelo complexo CBBO que produziu 60 mL de gás com uma concentração de 51% (30,6 mL) de BioH<sub>2</sub>, o que resulta em 4370 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Estes valores são mais altos que os encontrados nas pesquisas de Aly *et al.*, 2018, Alibardi, e Cossu, 2016, Lima *et al.*, 2016, Sharma e Melkania 2018, Sydney 2013, dentre outros, além de uma alta produtividade de ácidos orgânicos. Desta forma entendeu-se a

necessidade da identificação dos seres responsáveis por esta produtividade durante a fermentação, para isto foi realizado o Biomol do composto.

Como resultado, obtivemos um complexo formado por seres do gênero *Clostridium* (94%), *Bacillaceae* (2%), não identificáveis (3%) e 1% de "outros". Como observado os seres predominantes pertence a Classe Firmicutes, determinando assim na escala evolutiva que estes possuem um ancestral, o que pode entender a alta produtividade encontra neste consórcio (Lima *et al.* 2016). Como vistos nos trabalhos de Aly *et al.*, 2018, Castelo *et al.*, 2018, Moreno *et al.*, 2015 e Sydney 2013, o conhecimento sobre o complexo bacteriano pode não só melhorar a produção de BioH<sub>2</sub>, mas também direcionar a produção de ácidos orgânicos.

## 6. Conclusão

---

Este trabalho foi desenvolvido de forma experimental, com o intuito de descobrir novos complexos produtivos de BioH<sub>2</sub> e ácidos orgânicos, este utilizou como referência o CBPU. Complexo formado com cepas de uma única espécie de *clostridium*, que teoricamente possuem uma capacidade produtiva tanto de BioH<sub>2</sub>, como de ácidos orgânicos. Esta capacidade pode ser observada nos trabalhos de Lima *et al.* (2016) e Aly *et al.* (2018), dentre outros já relatados anteriormente. Porém a mesma não demonstrou a capacidade esperada tendo o resultado mais baixo do experimento. Isto pode ter ocorrido por alguns fatores, como não adaptação a meio de cultura, ao pH do substrato ou até a temperatura ao qual foi submetido durante o experimento.

Como visto no trabalho de Ottaviano *et al.* (2017) e Alibardi e Cossu (2016), a capacidade produtiva de um complexo bacteriano para H<sub>2</sub> possui uma variação de 40% a 60% em média. Porém para que esta seja atingindo, é necessário um alto controle do substrato, além de complexos bacterianos de alta pureza ou já trabalhados anteriormente. Assim vemos que os complexos aqui testados, como uma possível via produtiva de baixo custo. Observando que a sua aquisição de quase não obteve custo, fácil conservação e adaptabilidade ao meio de cultivo. Assim nos permiti pensar que, a partir, do ajuste do meio cultivo, como determinação da concentração ideal da composição encontrada no meio de cultivo. Além do melhoramento do processo produtivo, a partir da utilização de biorreatores, um maior controle da temperatura e da determinação do pH ideal, poderemos aumentar, intensificar e qualificar a produção de BioH<sub>2</sub>, diminuindo consequente a produção de CO<sub>2</sub> e de outros gases formados.

Reconhecendo com satisfatórios todos os resultados por estes apresentados em relação a todos os complexos testados. Proporcionado pela obtenção de concentrações e volumes produtivos descritos na literatura atual. Assim destaca-se a necessidade de ampliação dos estudos, observado as especificidades encontras em cada um dos complexos estudados, resultante dos diferentes resultados obtidos, na produtividade, na biodegradação e na adaptação e na formação de ácidos orgânicos.

O CBPO foi o complexo que obteve o melhor desempenho na consumo da carga orgânica do soro de leite com 52%, porém nas análises realizadas nesta pesquisa, não conseguimos avaliar toda a sua produção orgânica, observado que o mesmo pode ter

produzido etanol e ácidos não presentes em nossas referências como o valérico e o capróico.

O comportamento produtivo de gás no complexo CBTE, que foi dentre todos os testados o com menos variação de volume produtivo de gás, o que pode demonstrar uma rápida adaptação dos seres bacterianos presentes neste consórcio ao soro de leite. Porém o mesmo obteve uma alta concentração e produção de 61% CO<sub>2</sub>. Outro comportamento que chamou atenção foi o ácido mais produzido foi o succínico enquanto nos outros consórcios foi o butírico.

E o consórcio CBBO, que obteve uma produtividade de 4370 mL BioH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, o que é impressionante pela forma que o mesmo foi produzido, lembrando que o mesmo produziu um volume de gás 8 vezes maior que o volume de soro de leite ao qual foi incubado. Em relação a esta produtividade gasosa outro fator que chama atenção é que a composição deste é de quase 100% de BioH<sub>2</sub> (51%) e de CO<sub>2</sub> (49%). Este consórcio também foi o que mais cresceu durante o período fermentativo com um crescimento de 44%, isto pode ser um dos indicadores a alta produtividade deste. Já em relação a produção de ácidos orgânicos este complexo transformou mais de 100% dos carbonos consumidos em ácidos orgânicos com uma produção de 15,6 g/L divididos principalmente entre butírico e succínico.

Assim conclui-se que este trabalho mesmo realizado de forma experimental obteve êxito não só em comprovar que o tratamento do efluente soro de leite por via biológica é eficaz, agregando valor ao resíduo, mas em nos proporcionar descobertas de novos complexos bacterianos, com capacidade produtiva de BioH<sub>2</sub> e ácidos orgânicos, que no caso do CBBO com um rendimento produtivo maior que muitos trabalhos encontrados na literatura, atrelado a isso os complexos possuem um baixo custo e facilidade na aquisição e de manutenção, e por fim a abertura de uma infinidade de possibilidades de pesquisas e análises a serem feitas posteriormente.

## 7. Sugestões para trabalhos futuros

---

Com os resultados obtidos em nossa pesquisa, juntamente com a literatura disponível, abriu-se novas oportunidades para ampliação do conhecimento sobre ação dos consórcios bacterianos aqui testados, desta forma descreveremos algumas aplicações.

Otimização dos processos produtivos de  $\text{BioH}_2$ , para utilização de biorreatores que favorecem uma maior produtividade. Realização de testes para identificação da concentração de substratos, temperatura e do pH ideal, observado a influencia que estes tem sobre as substancias produzidas.

Ampliar os estudos sobre a produtividade de ácidos orgânicos e etanol, além da identificação da espécie dos seres presentes no processo produtivo, observado que o conhecimento desta pode direcionar uma maior produtividade de ácidos orgânicos.

Testar da ação destes consórcios em outros substratos, para que se possa verificar a produtividade de  $\text{BioH}_2$  e a capacidade adaptativa destes. Além de testar a ação biodegradante destes em outros substratos com alta carga orgânica e de difícil tratamento.

## 8. Referências Bibliográficas

---

1. Acordo de Paris Sobre o Clima. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/acordodeparis>, Acessado em 27/11/2018.
2. ALEXANDROPOULOU, MARIA; ANTONOPOULOU, GEORGIA; TRABLY, ERIC; CARRERE, HELENE; LYBERATOS, GERASIMOS.: Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis, *Journal of Cleaner Production* 174, (2018) 1054–1063.
3. ALI SHAH, F.; MAHMOOD, Q.; MAROOF SHAH, M.; PERVEZ, A.; AHMAD ASAD, S.; Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis; *Revista The Scientific World Journal*, (2014), Article ID 183752, 21fls.
4. ALY, SHAHIRA SAID ;IMAI, TSUYOSHI; HASSOUNA, MOHAMED SALAH; NGUYEN, DIEM-MAI KIM; HIGUCHI, TAKAYA; KANNO, ARIYO; YAMAMOTO, KOICHI; AKADA, RINJI; SEKINE, MASAHIKO.: Identification of factors that accelerate hydrogen production by *Clostridium butyricum* RAK25832 using casamino acids as a nitrogen source, *international journal of hydrogen energy* 43 (2018) 5300–5313.
5. ANEL, AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (BRASIL): Atlas de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica. 3. ed. – Brasília : Aneel, (2008) 236 p. : il. ISBN: 978-85-87491-10-7.
6. ALIBARDI, LUCA; COSSU,RAFFAELLO: Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products, *Journal Waste Management* 47 (2016) 69–77
7. ARUNASRI, KOTAKONDA; MODESTRA, ANNIE; YERUVA, DILEEP Y.; KRISHNA K. V.; MOHAN, S. V.: Polarized potential and electrode materials implication on electro-fermentative di-hydrogen production: Microbial assemblages and hydrogenase gene copy variation, *Bioresource Technology* 200 (2016) 691–698.
8. AKHLAGHIA, MASOUMEH; BONIA, MARIA ROSARIA; DE GIOANNISB, GIORGIA; MUNTONIB, ALDO; POLETTINIA, ALESSANDRA; POMIA, RAFFAELLA; ROSSIA, ANDREINA; SPIGAB, DANIELA.: A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey, *Journal Bioresource Technology* 244, (2017) 473–483.

9. ARUDCHELVAM, YALINI ; PERINPANAYAGAM, MALARMAGAL; NIRMALAKHANDAN, NAGAMANY.: Predicting VFA formation by dark fermentation of particulate substrates, *Journal Bioresource Technology* 101 (2010) 7492–7499
10. AZBAR, NURI; DOKGOZ, F. TUBA ÇETINKAYA; KESKIN, TUGBA; KORKMAZ, KEMAL S.; SYED, HAMID M.: Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions, *International journal of hydrogen energy* 34, (2009) 7441–7447
11. BACH, FABIANE; Avaliação Das Condições De Produção De Fermentado Acético De Soro De Leite, Toledo: Centro De Engenharias E Ciências Exatas. Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná, (2012) 124 p. Dissertação (Mestrado);
12. BIRD, LORI ; LEW, DEBRA; MILLIGAN, MICHAEL; CARLINI, E.MARIA; ESTANQUEIRO, ANA; FLYNN, DAMIAN; GOMEZ-LAZARO, EMILIO; HOLTINEN, HANNELE; MENEMENLIS, NICKIE; ORTHS, ANTJE ; ERIKSEN, PETER BØRRE; SMITH, J.CHARLES; SODER, LENNART; SORENSEN, POUL; ALTIPARMAKIS, ARGYRIOS; YASUDAM, YOH; MILLER, JOHN.: Wind and solar energy curtailment: A review of international experience, *Journal Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65 Denver (2016) 577–586
13. BRAGA, ERIKA DE A. SAMPAIO; DE AQUINO, MARISETE DANTAS; MALVEIRA, JACKSON DE QUEIROZ; NETO, JOSÉ CAPELO; ALEXANDRINO CRISTIANE DUARTE: Avaliação da biodegradabilidade das águas de lavagem provenientes da etapa de purificação do biodiesel produzido com óleo extraído das vísceras de tilápia, *REGA (Revista de Gestão de Águas) – Vol. 9, no. 2, p. 35-45, jul./dez. (2012).*
14. BRASIL, BANCO DO DESENVOLVIMENTO NACIONAL – BNDS; Produção Leiteira no Brasil (2014); disponível em: [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1514/1/A%20mar37\\_09\\_Produ%C3%A7%C3%A3o%20leiteira%20no%20Brasil\\_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1514/1/A%20mar37_09_Produ%C3%A7%C3%A3o%20leiteira%20no%20Brasil_P.pdf).
15. BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS – IBGE; Indicadores IBGE, Estatísticas de Produção Pecuária Jan – Mar 2018, Brasil (2018); disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2018\\_1tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_1tri.pdf)
16. BRASIL. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. Biodiesel, o novo combustível do Brasil. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, (2004) (Cartilha).

17. BOBOESCU, IULIAN ZOLTAN; GHERMAN, VASILE DANIEL; LAKATOS, GERGELY; PAP, BERNADETT; BÍRÓ, TIBOR; MARÓTI, GERGELY: Surpassing the current limitations of biohydrogen production systems: The case for a novel hybrid approach a review, *Bioresource Technology* 204 (2016) 192–201.
18. BUNDHOO, M.A. ZUMAR; MOHEE ROMEELA: Inhibition of dark fermentative biohydrogen production: A review, *International journal of hydrogen energy* 41 (2016) 6713-6733.
19. CAPPELLETTI, B.M. Efeito Da Concentração Inicial Da Água Residual Do Processamento Da Mandioca Na Produção De BioH<sub>2</sub> Por Clostridium Acetobutylicum ATCC 824, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 96 p Florianópolis, (2009).
20. CARDINALE-REZENDE, J.; COLTURATO, L. F. D. B.; COLTURATO, T. D. B.; CHARTONE-SOUZA E.; NASCIMENTO, A. M. A.; SANZ, J. L.; Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions; *Bioresource Technology* 119 (2012) 373–383.
21. CARVALHO, FÁTIMA; PRAZERES, ANA R.; RIVAS, Javier.: Cheese whey wastewater: Characterization and treatment, *Revista Elsevier, Journal of Science of the Total Environment* (2013) 385–396
22. CASTELLO, ELENA; BRAGA, LUCÍA; FUENTES, LAURA; ETCHEBEHERE, CLAUDIA: Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. *Revista Elsevier, international journal of hydrogen energy* 43 (2018) 2654-2665
23. CAVALCANTI, ALBERES VASCONCELOS: Diretrizes para o design de artefatos geradores de energia utilizando a captação dos ventos resultantes do deslocamento dos automóveis em vias expressas / Alberes Vasconcelos Cavalcanti. – Recife: O Autor, (2015) 129 f.: il.
24. CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D’OCA, M.G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de Método para Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis em Efluentes de Reatores Anaeróbios Empregando Cromatografia Líquida. *Química Nova*, Vol. 34, No. 1, 156-159, (2011).
25. Energy [R]evoLution: a sustainable world Energy Outlook’, Greenpeace international, 2007, 2008, 2010, 2012 and 2015.

26. FARIAS, L. MARQUES; SELKITTO, M. AFONSO, Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras, *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 12, n. 17, p. 01-106, jan./jun. (2011).
27. GIMENEZ, ANDRES R; ALTOPIEDI, LUIZ G; CARBALLO, NICOLAS V; SILVA, LEILA C M; LIRIA, CLEBER W: O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: Uma historia de sucesso. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 2, p. 01-19, e1472195 (2018).
28. GUO, XIN MEI; TRABLY, ERIC; LATRILLE, ERIC; CARRÈRE, HÉLÈNE; STEYER, JEAN-PHILIPPE, Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review; *International journal of hydrogen energy* 35(2010) 10660-10673.
29. GUO, MINGXIN; SONG, WEIPING; BUHAIN, JEREMY, Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42 (2015) 712–725.
30. HASS, REINHARD; PANZER, CHRISTIAN; RESCH, GUSTAV; RAGWITZ, MARIO; REECE, GEMMA; HELD, ANNE: A historical review of promotion strategies for electricity from renewable energy sources in EU countries: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 1003–1034
31. HITIT, ZEYNEP YILMAZER, LAZARO, CAROLINA ZAMPOL E HALLENBECK, PATRICK C: Increased hydrogen yield and COD removal from starch/glucose based medium by sequential dark and photo-fermentation using *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*, *International journal of hydrogen energy* 42, (2017), 18832-18843.
32. HUANG, XIANGFENG; MU, TIANSHUAI; SHEN, CHANGMING; LU, LIJUN; LIU, JIA; Effects of bio-surfactants combined with alkaline conditions on volatile fatty acid production and microbial community in the anaerobic fermentation of waste activated sludge, *International Biodeterioration e Biodegradation* 114 (2016) 24-30.
33. HARDE, SHIRISH M.; JADHAV, SWATI B.; BANKAR, SANDIP B.; OJAMO, HEIKKI; GRANSTRÖN, TOM; SINGHAL, REKHS S.; SURVASE, SHRIKANT A.; Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using the root hydrolysate after extraction of forskolin from *Coleus forskohlii*, *Renewable Energy* 86 (2016) 594-601.
34. IEA, INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, *Energy and Climate Change: World Energy Outlook Special Report*, copyright OECD/IEA, (2015).

35. IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
36. KIRLI, BETÜL; KAPDAN, ILGI KARAPINAR: Selection of microorganism immobilization particle for dark fermentative biohydrogen production by repeated batch operation, *Renewable Energy* 87 (2016) 697-702.
37. LAY, CHYI-HOW; HUANG, CIAO-YUN; CHEN, CHIN-CHAO; LIN, CHIU-YUE: Biohydrogen production in an anaerobic baffled stacking reactor: Recirculation strategy and substrate concentration effects, *Biochemical Engineering Journal*, 109 (2016) 59–64.
38. LEPECKI, W. A energia nuclear e a economia do hidrogênio. INEE, 2011;
39. LI, CANBING; SHI, HAIQING; CAO, YIJIA; WANG, JIANHUI; KUANG, YONGHONG; TAN, YI; WEI, JING, Comprehensive review of renewable energy curtailment and avoidance: A specific example in China, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41 (2015) 1067–1079.
40. LIMA, D.M.F; LAZARO, C.Z.; RODRIGUES J.A.D; RATUSZNEI, S.M; ZAIAT M., Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey, , *Journal of Environmental Management* 169 (2016) 191-201.
41. LOVATO,G.; LAZAROC, C.Z.; ZAIATA, M.; RATUSZNEIB, S.M.; J.A.D. RODRIGUES.: Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization, *Biochemical Engineering Journal* 128 (2017) 93–105
42. MALAJOVICH M. A., *Biotecnologia 2011*. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, (2012).
43. MANDAL, P; SHARMA S.: Progress in plasmonic solar cell efficiency improvement: A status review, *Journal Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65 (2016) 537 – 552
44. MORENO, R.; ESCAPA, A.; CARA, J.; CARRACEDO, B.; GOMEZ, X.: A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: Integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis, *International journal of hydrogen energy* 40 Leon (2015) 168-175
45. NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS G.; Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review, *revista Waste Biomass Valor* (2010) 1:21–39.

46. OTTAVIANO, LIVIA MARIA; RAMOS, LUCAS RODRIGUES; BOTTA, LÍVIA SILVA; VARESCHE, MARIA BERNADETE AMÂNCIO; SILVA, EDSON LUIZ.: Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial concentration, International journal of hydrogen energy 42 (2017) 4848-4860.
47. PATEL, ANIL KUMAR; VAISNAV, NEHA; MATHUR, ANSHU; GUPTA, RAVI; TULI, DEEPAK KUMAR: Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production, Journal Renewable Energy 98 (2016) 221-225
48. TREVISAN, VIVIANE; MONTEGGIA, LUIZ OLINTO; DELABARY, HENRIQUE DOS SANTOS.: A short-term test for the evaluation of hydrogen and volatile fatty acids production from industrial effluents. The use of a short-term test to evaluate organic matter concentration from industrial effluents for the production of hydrogen and volatile fatty acids. International journal of hydrogen energy 39, (2014) 7730-7734.
49. RABELO, C.A.B.S, Otimização Da Produção De Hidrogênio E Ácidos Orgânicos Em Reator Em Batelada A Partir De Consórcio De Bactérias Autóctones E Alóctones Do Bagaço De Cana-de-açúcar. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo São Carlos (2018), 154 p. Tese (Doutorado).
50. RAVI, PADMA PRIYA; LINDNER, JONAS; OECHSNER, HANS; LEMMER, ANDREAS.: Effects of target pH-value on organic acids and methane production in two stage anaerobic digestion of vegetable waste. Journal Bioresource Technology 247 (2018) 96–102
51. REMÓN, J.; LASECA, M.; GARCÍA, L.; ARAUZO, J.: Hydrogen production from cheese whey by catalytic steam reforming: Preliminary study using lactose as a model compound, Journal Energy Conversion and Management 114 (2016) 122–141
52. ROCHA, ALDA DE AMARAL, Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros, Revista Valor Econômico, São Paulo (2014), acessado no link: <http://www.abiq.com.br/imprensa/namidia/Valor%20Economico%20%20Fabio%20Scarce%20%20Mercado%20de%20queijos%20cresce%20no%20pa%C3%ADs%20e%20atrai%20estrangeiros.pdf>.
53. SARGSYAN, HARUTYUN; GABRIELIAN, LILIT; TRCHOUNIAN, ARMEN.; The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing bio-hydrogen by Rhodobacter sphaeroides, Biomass and Bioenergy 90 (2016) 90-94.

54. SATTAR, ASMA; ARSLAN, CHAUDHRY; JI, CHANGYING; SATTAR, SABA; UMAIR, MUHAMMAD; SATTAR, SUMIYYA; BAKHT, MUHAMMAD ZIA,; Quantification of temperature effect on batch production of bio-hydrogen from rice crop wastes in an anaerobic bio reactor; International journal of hydrogen energy 41 (2016) pg 11050-11061.
55. SANTOS, D. M. F.; SEQUEIRA, C. A. C.; Sodium borohydride as a fuel for the future, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15 (2011) 3980-4001.
56. SHARMA, PREETI; MELKANIA, UMA: Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. International journal of hydrogen energy 43 Pantnagar (2018) 7290-7298
57. SYDNEY, EDUARDO BITTENCOURT; LARROCHE, CHRISTIAN; NOVAK, ALESSANDRA CRISTINE; NOUAILLE, REGIS; SARMA, SAURABH JYOTI; BRAR, SATIDER KAUR; LETTI, LUIZ ALBERTO JUNIOR; SOCCOL, VANETE THOMAZ; SOCCOL, CARLOS RICARDO.; Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source, Journal Bioresource Technology 159 (2014) 380–386.
58. SYDNEY, EDUARDO BITTENCOURT, Valorization Of Vinasse As Broth For Biological Hydrogen And Volatile Fatty Acids Production By Means Of Anaerobic Bacteria: Centro de engenharia de bioprocessos e biotecnologia. Universidade Federal do Paraná, (2013) 110p Tese (PHD)
59. SILVA, L. A.; SOARES, F. R.; SEO, E. S. M.; Avaliação do ciclo de vida do processo biodigestão anaeróbia dos resíduos sólidos urbanos para geração de energia; Revista InterfacEHS – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade - Vol. 10 no 1 – Junho de (2015).
60. REI, FERNANDO C F; GONÇALVES, ALCINDO F; DE SOUZA, LUCIANO P: Acordo De Paris: Reflexões e Desafios Para o Regime Internacional De Mudanças Climáticas: Veredas do Direito, Belo Horizonte, . v.14 . n.29 . p.81-99 . Mai./Ago. de (2017)
61. TSUJIMURA, TAKU; SUZUKI, YASUMASA.: The utilization of hydrogen in hydrogen/diesel dual fuel engine, International journal of hydrogen energy 4 2 (2017) 14019-4029
62. ZEMPULSKI, DENISE APARECIDA; Produção de Ácidos Graxos Voláteis por Fermentação Anaeróbica de Manipueira e de Permeado de Soro de Queijo Toledo: Centro De Engenharias E Ciências Exatas. Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná, (2013) 82 p. Dissertação (Mestrado) ;

63. ZOREL, JOSE AUGUSTO; Identificação De Proteínas Microbianas Produzidas Durante A Digestão Anaeróbia De Matéria Orgânica, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, (2103) 80p Dissertação (Mestrado);
64. KANNAN, NADARAJAH; VAKEESAN, DIVAGAR.: Solar energy for future world: A review, Journal Renewable and Sustainable Energy Reviews 62 (2016) 1092 – 1105.
65. KAWAI, MINAKO; NAGAO, NORIO; KAWASAKI, NOBUYUKI; IMAI, AKIO; TODA, TATSUKI.: Improvement of COD removal by controlling the substrate degradability during the anaerobic digestion of recalcitrant wastewater, Journal of Environmental Management 181 (2016) 838-846
66. WU, YI-NING; WEN, HAN-QUAN; ZHU, JIA-NI; REN, NAN-QI; LIU, BING-FEND,; Best mode for photo-fermentation hydrogen production: The semi-continuous operation; international journal of hydrogen energy, (2016) pg 1-7.