



# Montagem de Biorreator para Produção de Hidrogênio Biológico em Batelada

Ricardo de Santana

## **Monografia em Engenharia Química**

### **Orientadores**

Magali Christe Cammarota  
Viridiana Santana Ferreira-Leitão  
Mariana de Oliveira Faber

Dezembro de 2019

# MONTAGEM DE BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO BIOLÓGICO EM BATELADA

*Ricardo de Santana*

Monografia em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharelado em Engenharia Química.

Aprovado por:

---

---

---

Orientado por:

---

Magali Christe Cammarota. D.Sc

---

Viridiana Santana Ferreira-Leitão. D.Sc

---

Mariana de Oliveira Faber. M.Sc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2019

Ricardo de Santana

Montagem de Biorreator para Produção de Hidrogênio Biológico em Batelada. Ricardo de Santana. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2019.

xi, 54 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2019.  
Magali Christe Cammarota, Viridiana Santana Ferreira-Leitão e Mariana de Oliveira Faber.

1. Biorreator. 2. Hidrogênio biológico. 3. Biogás. 4. Glicerol. 5. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 6. Magali Christe Cammarota, Viridiana Santana Ferreira-Leitão e Mariana Oliveira Faber. I. Montagem de Biorreator para Produção de Hidrogênio Biológico em Batelada.

Dedico este trabalho

À minha família, pois deles veio muito do que sou hoje;  
À Gabriela por ser meu anjinho, minha cúmplice e amada.

“You are what you are when nobody is looking”

Abigail Van Buren

## Agradecimentos

Às minhas orientadoras Prof<sup>a</sup>. D.Sc Viridiana Santana Ferreira-Leitão, Prof<sup>a</sup>. D.Sc Magali Christe Cammarota e a M.Sc Mariana de Oliveira Faber, pelo aprendizado, pela paciência e compreensão nesse período conturbado que se torna o final da graduação. Agradeço também a liberdade que me foi concedida para criar e desenvolver todo o projeto do biorreator, por acreditarem em mim e por propiciarem todo o aprendizado que levarei daqui para frente.

Aos amigos de bancada, Alvaro Monteiro, Morgana Soares e Tiago Martins Guimarães por terem me recebido e me ensinado as rotinas de laboratório. Ao Felipe Rafael, Paulo Vitor e David que acompanharam todas as minhas idas e vindas para testar a estanqueidade do biorreator e sempre estiveram presentes nas risadas e bons momentos na bancada.

À minha companheira de bancada Carolina Lazaro por tornar o dia-a-dia mais leve e sempre estar ao meu lado nas minhas “missões” mesmo as mais simples e das quais uma única pessoa seria capaz de fazer.

A toda a equipe do Laboratório de Biocatálise (LABIC) por cada um de sua maneira estar junto em prol de um bem maior e por contribuir para o clima agradável e colaborativo que torna o LABIC muito especial.

Ao Robson Ferreira Meneses por auxiliar na escolha das peças do biorreator e por confiar em mim e muitas vezes encomendar, personalizar e adaptar peças mesmo antes do pagamento.

A todos que moram comigo na república Henrique Auxêncio, Cleber, Gustavo Domingues, Rebeca Schettini, Arthur Braga, Amanda de Oliveira, que apesar de não estarem diretamente auxiliando na construção do trabalho, deram-me suporte e tornaram a vida no Rio de Janeiro mais especial e engrandecedora.

À pessoa que definitivamente foi a maior responsável por eu chegar até aqui, à cúmplice de todos os dias, à minha joia mais preciosa, agradeço imensamente a Gabriela de Queiroz Mathias pelas conversas, conselhos, puxões de orelha, paciência, afeto e amor.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharelado em Engenharia Química.

## **MONTAGEM DE BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO BIOLÓGICO EM BATELADA**

Ricardo de Santana

Dezembro, 2019

Orientadores: Magali Christe Cammarota. D.Sc  
Viridiana Santana Ferreira-Leitão. D.Sc  
Mariana de Oliveira Faber. M.Sc

Os processos fermentativos são estudados em diversos tipos de biorreatores, que possuem diferentes aplicações, vantagens e desvantagens. O frasco penicilina é um exemplo de biorreator batelada que é amplamente empregado para o estudo da produção biológica de hidrogênio, por ser de simples utilização e de baixo custo. No entanto, as formas de quantificação do volume de biogás produzido durante a fermentação possuem diversas limitações, e em caso de produção significativa de biogás o frasco pode estourar devido à elevada pressão interna. Tendo em vista esses problemas, no presente trabalho foi projetado, construído e validado um biorreator batelada de baixo custo para complementar a atual metodologia conduzida em frasco penicilina, propiciando uma medida mais precisa do biogás produzido, um sistema mais seguro e a simplificação dos ensaios de cinética e batelada alimentada. O modelo final do biorreator construído se mostrou robusto e nos ensaios de validação, operando em regime de batelada utilizando como substrato o glicerol, foram obtidos resultados semelhantes quando comparados com a metodologia em frasco penicilina. Para a fermentação com teor de sólidos suspensos voláteis do inóculo de 7500 mg/L e concentração inicial de glicerol de 1 g/L, a produção de hidrogênio após 24 h, utilizando a metodologia em frasco penicilina resultou em um rendimento de  $0,215 \pm 0,033$  mol-H<sub>2</sub>/mol-glicerol, enquanto que nos ensaios com o biorreator projetado, sob as mesmas condições o rendimento foi de  $0,211 \pm 0,006$  mol-H<sub>2</sub>/mol-glicerol. Além disso, a produção de ácido acético, 1,3-propanodiol e ácido butírico para os ensaios em frasco penicilina foram, respectivamente,  $0,113 \pm 0,004$  g/L,  $0,444 \pm 0,005$  g/L e  $0,222 \pm 0,026$  g/L. Nos ensaios em biorreator a concentração de ácido acético foi de  $0,175 \pm 0,004$  g/L, a de 1,3-propanodiol foi de  $0,432 \pm 0,001$  g/L e a de ácido butírico foi de  $0,252 \pm 0,005$  g/L. Tais resultados comprovam a reprodutibilidade do biorreator e que esse estudo pode servir de base para o desenvolvimento de outros equipamentos que simplifiquem, ampliem e melhorem os procedimentos já estabelecidos de maneira simples, barata e acessível.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Etapas da digestão anaeróbia, partindo do substrato, por cultura mista	<b>14</b>
<b>Figura 3.2</b>	Número de plantas de biometano na Europa em 2017	<b>15</b>
<b>Figura 3.3</b>	Fluxograma do processo de produção de biodiesel e glicerina	<b>20</b>
<b>Figura 3.4</b>	Volume de glicerina produzida no Brasil até o ano de 2017	<b>21</b>
<b>Figura 3.5</b>	Principais destinos do glicerol (A). Principais matérias-primas para produção de biodiesel (B)	<b>21</b>
<b>Figura 3.6</b>	Total de exportação de glicerina para o mundo ao longo dos anos (A). Em vermelho a quantidade exportada apenas para a China. Evolução dos preços de exportação do glicerol bruto ao longo dos últimos anos (B)	<b>22</b>
<b>Figura 3.7</b>	Classificação dos biorreatores	<b>23</b>
<b>Figura 3.8</b>	Classificação dos biorreatores de fase não-aquosa. As setas indicam o sentido do escoamento do ar.	<b>24</b>
<b>Figura 3.9</b>	Classificação dos biorreatores em fase aquosa.	<b>25</b>
<b>Figura 3.10</b>	Registro do frasco penicilina quebrado ao final da fermentação.	<b>30</b>
<b>Figura 3.11</b>	Sensor de escoamento de roda de pás	<b>31</b>
<b>Figura 3.12</b>	Esquema do método de quantificação de volume de biogás utilizando seringa.	<b>32</b>
<b>Figura 3.13</b>	Esquema para determinação do biogás descrito por Hiligsmann	<b>32</b>
<b>Figura 3.14</b>	Esquema de uma das possíveis maneiras de executar o método de deslocamento de água para determinação do volume de biogás produzido	<b>33</b>
<b>Figura 4.1</b>	Testes de estanqueidade.	<b>37</b>
<b>Figura 4.2</b>	Foto de um frasco penicilina com a representação do volume de “headspace” destacada em vermelho	<b>48</b>
<b>Figura 4.3</b>	Purga do biorreator. Entrada de nitrogênio pela válvula a direita e a saída de gás pela válvula a esquerda.	<b>40</b>
<b>Figura 4.4</b>	Saída de líquido para amostragem de líquido.	<b>41</b>
<b>Figura 5.1</b>	Primeiro protótipo de biorreator.	<b>42</b>
<b>Figura 5.2</b>	Segundo protótipo.	<b>43</b>
<b>Figura 5.3</b>	Imagem gerada a partir das dimensões fornecidas pelos fabricantes.	<b>44</b>
<b>Figura 5.4</b>	Biorreator finalizado.	<b>44</b>
<b>Figura 5.5</b>	Gráfico em barras dos principais produtos líquidos da fermentação do glicerol nos tempos de zero horas e de 24 horas para o ensaio comparativo em biorreator e em frasco penicilina.	<b>45</b>
<b>Figura 5.6</b>	Rendimento $Y_p/s$ para a 24h de fermentação nos ensaios em batelada e penicilina.	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Estudos mais citados e alguns dos mais recentes trabalhos sobre produção de hidrogênio a partir da fermentação do glicérol.	<b>18</b>
<b>Tabela 3.2</b>	Estudos mais citados e alguns dos mais recentes trabalhos sobre produção de hidrogênio por via biológica.	<b>29</b>
<b>Tabela 4.1</b>	Lista de materiais utilizados nos dois primeiros protótipos desenvolvidos.	<b>35</b>
<b>Tabela 4.2</b>	Lista de materiais utilizados no terceiro protótipo	<b>36</b>

## NOMENCLATURA

CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
PTT	Politereftalato de trimetileno
PDO	1, 3-Propanodiol
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
B3, B4, ..., B9	Percentual de biodiesel no diesel
$Y_{p/s}$	Rendimento mol de produto por mol de substrato
$P_{total}$	Pressão total
$P_{atm}$	Pressão atmosférica
$P_{man}$	Pressão manométrica
R	Constante dos gases ideais
T	Temperatura de fermentação
n	Número de mols totais de gás
$V_h$	Volume do “headspace”
NPT	“National Pipe Thread” - rosca de tubo em formato cônico
BSP	“British Standard Pipe” – rosca de tubo em formato paralelo
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PEAD	Polietileno de alta densidade
SBR	Borracha de estireno butadieno
TOC	Carbono Orgânico Total
POME	Efluente do processamento do óleo de Palma

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1. <i>Objetivo geral</i>	13
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
3.1. <i>Aspectos gerais da produção de biogás</i>	14
3.2. <i>Aplicações do biometano</i>	15
3.3. <i>Processos de produção de hidrogênio</i>	16
3.4. <i>Características, produção e mercado do glicerol</i>	20
3.5. <i>Tipos de biorreator</i>	22
3.5.1. <i>Reatores de fase não-aquosa</i>	23
3.5.2. <i>Reatores de fase aquosa</i>	24
3.6. <i>Formas de condução de um processo fermentativo</i>	26
3.6.1. <i>Contínuo e semi-contínuo</i>	26
3.6.2. <i>Descontínuo e descontínuo alimentado</i>	26
3.7. <i>Reatores utilizados para produção biológica de hidrogênio</i>	27
3.7.1. <i>Modo de operação</i>	30
3.7.2. <i>O frasco penicilina e suas limitações</i>	30
3.8. <i>Método de quantificação de biogás</i>	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1. <i>Construção do biorreator</i>	34
4.2. <i>Testes de estanqueidade, citar a literatura</i>	36
4.3. <i>Origem e pré-tratamento do lodo anaeróbio</i>	37
4.4. <i>Fermentação</i>	38
4.5. <i>Determinação do volume de “headspace”</i>	38
4.6. <i>Métodos analíticos</i>	39
4.7. <i>Purga com nitrogênio</i>	40
4.8. <i>Amostragem de Líquido e Gás no Biorreator</i>	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
5.1. <i>Primeiro protótipo</i>	42
5.2. <i>Segundo protótipo</i>	42
5.3. <i>Protótipo final</i>	43
5.4. <i>Caracterização do Lodo Anaeróbio</i>	45
5.5. <i>Principais produtos líquidos da fermentação em biorreator e em frasco penicilina</i>	45
5.6. <i>Rendimento dos principais produtos da fermentação</i>	46
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>47</b>
<b>7. TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A tendência mundial se volta para a utilização de materiais residuais com processamento de baixo impacto ambiental. Nesse caminho, a produção biológica de hidrogênio a partir da glicerina, proveniente da produção de biodiesel, é uma alternativa promissora para o beneficiamento desse coproduto. No cenário brasileiro, a glicerina tem levantado particular preocupação devido à crescente demanda de biodiesel no mercado interno. No Brasil a política de obrigatoriedade de adição de biodiesel ao diesel alavancou a geração de glicerina no país. Ao longo dos últimos 11 anos, a produção de biodiesel passou de menos de 1,3 bilhões de litros em 2008 e alcançou mais de 4 bilhões de litros em 2018, o que representa uma produção de glicerina de mais de 350 mil litros (ESTATÍSTICO - ANP, 2018). Em outubro de 2018, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) anunciou o aumento gradual até a marca de 15% de biodiesel adicionado ao diesel. O que representará um aumento de 82% na produção anual do Brasil, correspondendo a um crescimento da produção de glicerina em mais de 637 mil litros (MIGUEL et al., 2018). Esse aumento preocupa a indústria, pois atualmente apenas metade da glicerina gerada é exportada e por um baixo preço, US\$ 0,34 por quilograma de glicerina, principalmente para a China. Em 2018, cerca de 80% da glicerina exportada teve esse país como destino (MDIC/COMEXSTAT, 2019). Sendo assim, existe uma perspectiva de acúmulo da glicerina no mercado interno.

À luz dessa situação pouco animadora, algumas alternativas para o aproveitamento da glicerina vêm sendo estudadas. Dentre as muitas, uma particularmente promissora é a produção de biocombustíveis, como o hidrogênio ( $H_2$ ) e o metano ( $CH_4$ ), por rota biológica utilizando cultura mista (SELEMBO et al., 2009). Em ensaios em escala de bancada, para investigação de parâmetros do processo e seu entendimento científico, a metodologia geralmente utilizada é a fermentação ou digestão anaeróbia em batelada, conduzida em frascos penicilina de 100 mL. Esta metodologia possui uma série de vantagens e desvantagens. Por demandar volume pequeno de meio fermentativo existe a possibilidade de se executar diversos testes de maneira rápida; mas em ensaios longos essa metodologia fica trabalhosa, por se tratar de frascos de exclusão. Além disso, esse sistema inviabiliza o acompanhamento do aumento da pressão interna ocasionada pela produção de biogás, o que pode causar o rompimento do lacre e até mesmo a quebra do vidro gerando um acidente grave.

Com o intuito de solucionar essas limitações da metodologia com frascos penicilina, o presente trabalho visa a projetar, construir e validar um protótipo de biorreator que, além de facilitar a operação nos ensaios em batelada, possibilite a utilização em ensaios que são de difícil operação em frascos penicilina, tais como a determinação da cinética de produção de biogás e batelada alimentada, bem como calcular com maior precisão e simplicidade o volume de gás produzido.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Planejar, construir e validar um biorreator batelada para processos de fermentação.

### **2.2. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Construir um protótipo de biorreator batelada;
- ❖ Avaliar os problemas e potenciais melhorias deste biorreator;
- ❖ Construir o biorreator batelada;
- ❖ Validar o biorreator utilizando glicerol como substrato para a fermentação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Aspectos gerais da produção de biogás

O biogás é produzido em processos de degradação da matéria orgânica na ausência de oxigênio. Esse processo anaeróbio ocorre naturalmente em resíduos acumulados como em lixões ou aterros sanitários e, nesses casos, a matéria orgânica que está em contato com o ar, nas camadas superiores, é digerida por microrganismos aeróbios ou aeróbios facultativos e, na parte interna, por microrganismos anaeróbios (MARIANI, 2018).

Esse processo natural pode ser potencializado quando é conduzido em biodigestores, nos quais além de tratar o efluente podem ser gerados produtos de interesse comercial, tais como biogás e biofertilizante (COIMBRA-ARAÚJO et al., 2014).

A fermentação anaeróbia da matéria orgânica pode ocorrer tanto por culturas puras quanto por culturas mistas, como as constituintes do lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto (ETE). A digestão realizada por lodo anaeróbio de ETE é amplamente relatada na literatura e se caracteriza, de forma geral, por 3 etapas partindo de um substrato solúvel (como por exemplo, o glicerol): acidogênese, acetogênese e metanogênese. Cada etapa da digestão possui uma classe de microrganismo predominante, como pode ser visto na Figura 3.1, sendo o biogás gerado composto majoritariamente por  $\text{CH}_4$ , seguido de  $\text{CO}_2$  e ocasionalmente  $\text{H}_2\text{S}$ .

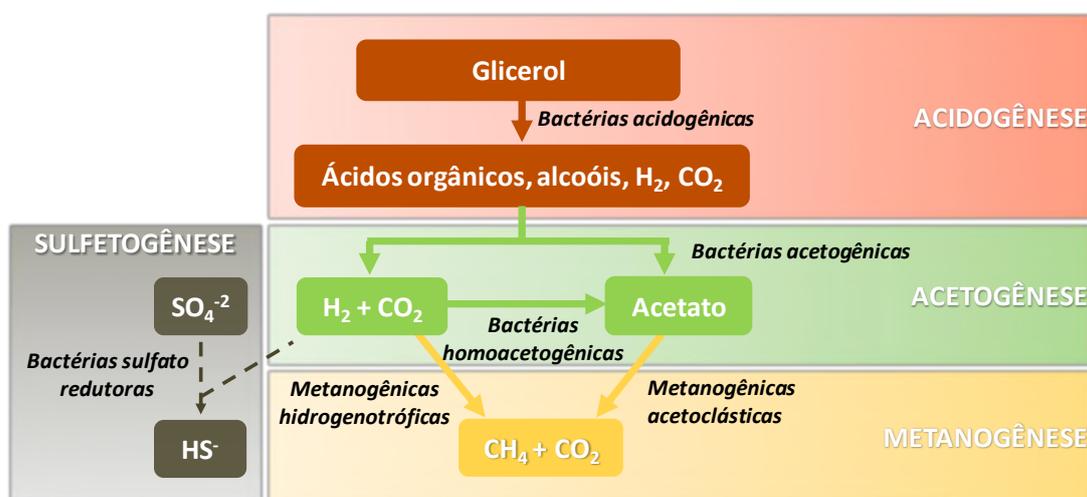


Figura 3.1: Etapas da digestão anaeróbia de substrato solúvel (glicerol) por cultura mista. Adaptado de (SÁ, DE; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014)

O hidrogênio é formado na acidogênese e é consumido nas demais etapas; portanto, se o objetivo for a obtenção de hidrogênio, os microrganismos consumidores deste gás devem ser inibidos. As estratégias para evitar o consumo de hidrogênio consistem na diminuição de sais de sulfetos, evitando a sulfetogênese (SÁ, DE; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014); remoção de  $\text{CO}_2$  da fração gasosa, evitando a formação de acetato pelas bactérias homoacetogênicas (WOOSHIN PARK,

SEUNG H. HYUN, SANG-EUN OH, BRUCE E. LOGAN, 2005); e promoção do pré-tratamento do inóculo, para inibir as arqueias metanogênicas.

Portanto, o biogás consiste em uma mistura gasosa composta principalmente por metano (CH<sub>4</sub>), gás carbônico (CO<sub>2</sub>), gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e hidrogênio (H<sub>2</sub>), e o seu processo de produção consiste, de forma geral, do pré-tratamento do substrato ou do inóculo (dependendo do gás de interesse), digestão anaeróbia, armazenagem, refino e aplicação do biogás (MARIANI, 2018).

Segundo Coimbra-Araújo et al. (2014), o biogás não é apenas uma fonte de energia, pois o mesmo age como um mobilizador do desenvolvimento regional devido ao potencial de produção a partir de diversas atividades produtivas locais, como a agropecuária, indústria, aterros sanitários e estações de tratamento de efluentes. O biogás é ambientalmente, socialmente e economicamente sustentável e seu uso se mostra muito promissor. A seguir, são descritas as aplicações do biogás, de acordo com sua composição.

### 3.2. Aplicações do biometano

O biometano, segundo a Resolução ANP N° 08/2015, atualizada pela Resolução ANP N° 685/2017, é um biogás que possui composição similar ao gás natural; portanto, o biogás deve passar por um processo de refino. A concentração de metano no biometano deve ser de no mínimo 96,5% em base molar (MARIANI, 2018).

O biometano pode ser empregado nas redes de gás natural, no abastecimento de veículos e em aplicações industriais. A produção europeia em 2017 foi de mais de 19 mil GWh. E contava com 187 plantas em 2011, passando para 540 plantas no final de 2017 (EBA, 2017). Segundo o relatório da *European Biogas Association* (EBA, 2017), os países que possuíam maior número de plantas de biometano eram Alemanha com 195, seguido do Reino Unido com 92 e Suécia com 70 (Figura 3.2).

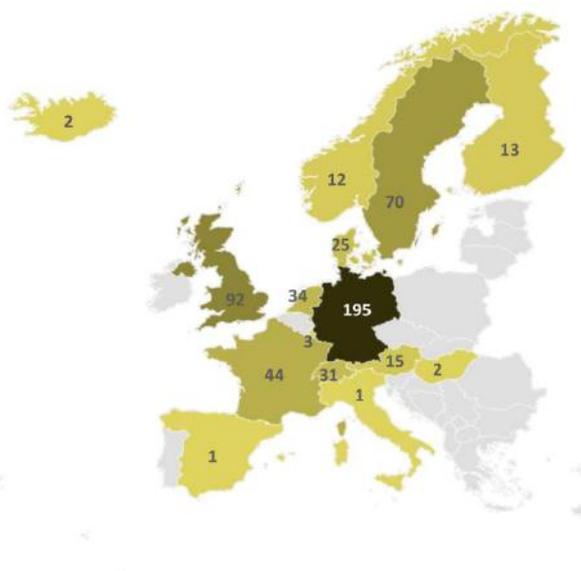


Figura 3.2: Número de plantas de biometano na Europa em 2017. Adaptado de (EBA, 2017).

A matéria-prima utilizada para a produção de biometano nesses países varia mas, de maneira geral, são empregados resíduos e efluentes provenientes da agricultura, indústria e resíduos orgânicos. A produção de biometano na Europa ganhou ainda mais incentivo quando, em 2009, houve a disputa comercial pelo gás natural entre Rússia e Ucrânia, que colocou em risco o trânsito desse combustível nos países da Europa (EBA, 2017).

Portanto, o biometano é um vetor energético em ascensão em todo o mundo; especificamente no Brasil o biometano obtido a partir de materiais residuais tem despertado atenção da indústria, por seu caráter renovável, sustentável e de acordo com as diretrizes de química verde e do RenovaBio (ARTUR, 2018).

### 3.3. Processos de produção de hidrogênio

Nesse item são discutidos diversos aspectos da produção de hidrogênio, pois o hidrogênio foi o principal produto estudado nesse trabalho.

As mudanças climáticas têm chamado a atenção do mundo para um cenário já previsto de que a era do petróleo não terminará por falta dele, mas sim pelos efeitos danosos que o uso do combustível fóssil causa. Uma das alternativas vistas como mais promissoras é a utilização do hidrogênio como vetor energético (MIRANDA, 2017).

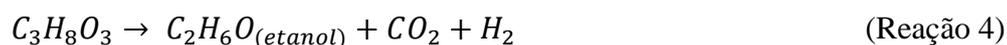
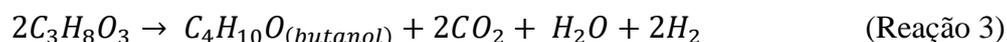
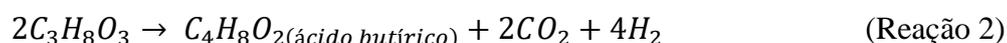
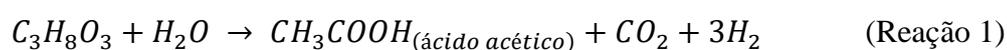
O hidrogênio é um portador de energia versátil, devido à sua gama de aplicações (pilha a combustível, combustão direta) e por ser limpo, pois na sua combustão o hidrogênio reage com o oxigênio e libera água e energia ( $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O + Energia$ ). A aplicação do  $H_2$  como vetor energético é promissora, porém o principal uso deste gás nos dias atuais é na indústria, principalmente para produção de amônia, mas também como produto químico, nas indústrias petroquímica, siderúrgica e alimentícia (MIRANDA, 2017).

Trocar o afloramento O hidrogênio pode ocorrer naturalmente em lagos de pH ultra básico, como os encontrados em Omã (VACQUAND et al., 2018), regiões terrestres como em Mali (PRINZHOFER; TAHARA CISSÉ; DIALLO, 2018) ou na Bacia de São Francisco no Brasil (PRINZHOFER et al., 2019). Essas fontes de hidrogênio, por serem afloramentos, produzem quantidades pequenas de hidrogênio e em geral estão espalhadas em uma região grande cilíndrica o que dificulta a sua captação. Mesmo em Mali, onde a petroleira Petroma, que em 2011 iniciou sua operação para extrair o hidrogênio do local, já ter comprovado que é possível extrair hidrogênio com alta pureza sem custos com processos de transformação, ainda são reservatórios pouco conhecidos e a capacidade produtiva não é significativa.

A produção de hidrogênio ocorre principalmente a partir da reforma a vapor do gás natural, a produção é de baixo custo, mas a principal desvantagem da utilização do gás natural, além de ser um combustível fóssil, é que este emite quantidades consideráveis de  $CO_2$  durante seu processamento. Outras rotas estudadas são a produção de hidrogênio a partir da eletrólise da água ou da gaseificação de biomassa.

Outra forma de produção de hidrogênio é a partir de rotas biológicas por meio do uso de resíduos agroindustriais, tais como vinhaça, POME, bagaço da cana-de-açúcar, semente de açaí, suco de sisal; ou glicerina, que é um subproduto com baixo valor agregado (SARMA, S. J.; PACHAPUR et al., 2015).

O glicerol, molécula mais abundante da glicerina, é o substrato utilizado no presente trabalho. Oriundo da indústria do biodiesel, pode ser metabolizado por diferentes espécies de bactérias, tais como: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Os principais produtos dessa fermentação são álcoois, cetonas, ácidos carboxílicos e hidrogênio (SARMA et al., 2015). De acordo com a estequiometria, apresentada nas reações 1, 2, 3 e 4 a seguir, pode-se observar que a produção biológica de alguns compostos orgânicos é acompanhada da produção de hidrogênio, durante a fermentação.



Um parâmetro importante para avaliar a eficiência da fermentação consiste na comparação com o rendimento máximo teórico (LOGAN et al., 2002). Considerando que os microrganismos presentes no meio fermentativo promovam apenas a rota do ácido acético (Reação 1), a rota com maior produção de hidrogênio por mol de glicerol, a cada mol de glicerol seriam produzidos 3 mols de hidrogênio.

Uma estratégia amplamente utilizada na literatura é a combinação de diferentes microrganismos. A utilização de cultura mista para produção de hidrogênio possui uma série de vantagens, quando comparada às culturas puras. A mais significativa delas é a simplificação nos processos, devido ao baixo nível de esterilidade (SARMA et al., 2015). No entanto, o inóculo proveniente de estações de tratamento de esgoto possui uma grande diversidade microbiológica e a estratégia adotada para favorecer as produtoras de H<sub>2</sub> consiste em pré-tratar o lodo. O pré-tratamento (ácido, térmico, básico, entre outros) visa a diminuir a população de microrganismos consumidores de H<sub>2</sub> e, conseqüentemente, favorecer os produtores de hidrogênio.

Dentre os microrganismos acima citados os do gênero *Clostridium* se destacam como potenciais produtores de H<sub>2</sub>. Essa capacidade em consumir um determinado substrato e produzir hidrogênio está relacionada à presença de hidrogenases. Em muitos estudos o nível de expressão do gene hidrogenase tem sido utilizado como indicador da produção de H<sub>2</sub> em diferentes sistemas, bem como a utilização da razão ácido acético/ácido butírico (H<sub>Ac</sub>/H<sub>but</sub>) (SÁ, DE; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). O pré-tratamento térmico aumenta a razão de ácido acético/ácido butírico, e em estudos de biologia molecular foi possível observar três vezes mais expressão do gene hidrogenase de *Clostridium* em inóculo pré-tratado termicamente quando comparado com o inóculo

*in natura*, indicando elevada produção de H<sub>2</sub> (SÁ, DE; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Na literatura existem diversos estudos de produção de hidrogênio biológico utilizando especificamente o glicerol como substrato. Na Tabela 3.1 estão resumidos alguns dos estudos mais recentes e alguns dos mais citados. Nessa busca foi empregada a metodologia descrita no item 4.1 e buscou-se identificar quatro informações principais: o tipo de inóculo, modo de operação (reator utilizado), método de quantificação de biogás e o rendimento de hidrogênio. As informações sobre o modo de operação e método de quantificação foram buscadas, pois serão importantes para discussões futuras nesse trabalho.

Nessa pesquisa, os trabalhos de Yin (2017), Trchounian (2017), Sarma (2019), Jáuregui (2018), Kurahashi (2018) e Moreno (2015) utilizaram microrganismos do gênero *Clostridium* e o rendimento  $Y_{p/s}$  variou entre 0,34 e 1,21 mol de H<sub>2</sub>/mol de Glicerol. Como visto anteriormente, o máximo teórico é de 3 mol de hidrogênio por mol de glicerol o que representa uma eficiência na produção de hidrogênio no intervalo de 11 a 40%.

Tabela 3.1: Estudos mais citados e alguns dos mais recentes trabalhos sobre produção de hidrogênio a partir da fermentação do glicerol.

Tipo de inóculo	Modo de operação	Método de quantificação de biogás	Rendimento	Referência	Nº de Citações
<i>Klebsiella sp. TR17</i>	Frasco Penicilina de 60 mL	Não especificado	0,00574 mol H <sub>2</sub> /g DQO	Chookaew (2015)	32
<i>C. butyricum INET1</i>	Erlenmeyer de 150 mL	Não especificado	0,67 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Yin (2017)	17
Lodo pré-tratado com solução ácida (HCl 10 mol/L pH 2)	Frasco Penicilina de 100 mL	Não especificado	2,44 mol H <sub>2</sub> /mol glicerina	Faber (2016)	16
<i>C. beijerinckii DSM791</i>	Frasco Penicilina de 120 mL	Seringas graduadas	1,21 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Trchounian (2017)	12
<i>Enterobacter sp</i>	Frasco reagente Duran® 2 L	Respirômetro AER-200	0,0144 mol H <sub>2</sub> /L <sub>meio</sub>	Maintinguer (2017)	12
<i>C. pasteurianum</i>	Erlenmeyer de 250 mL	Método de deslocamento de água (solução salina)	0,627 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Moreno (2015)	3
<i>C. pasteurianum</i>	Não especificado	Seringa graduada	0,34 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Kurahashi (2018)	1
Lodo pré-tratado termicamente	Frasco com 3 saídas	Não especificado	0,59 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Kondaveeti (2019)	1
Lodo pré-tratado com clorofórmio	Frasco reagente Duran® 0,2 L	Método de deslocamento de água	0,208 mol H <sub>2</sub> /mol glicerina	Viana (2019)	0
<i>C. pasteurianum</i>	Frasco Penicilina de 100 mL	Seringas estéreis	1,1 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Sarma (2019)	0
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e <i>C. butyricum</i> DSM 2578	Frasco não especificado	Seringa selada com silicone	0,37 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Jáuregui (2018)	0

### 3.4. Características, produção e mercado do glicerol

O glicerol é um líquido viscoso, incolor, inodoro, também conhecido como 1, 2, 3-propanotriol de fórmula molecular  $C_3H_8O_3$ , com ponto de ebulição de  $290^\circ C$  (PERRY, 1997). Foi descoberto por Carl Wihelm Scheele em publicação de 1783 e pode ocorrer naturalmente em formas combinadas, como nos triglicerídeos, sendo obtidos na saponificação com hidróxido de sódio ou potássio no processo de manufatura de sabões.

Existem diversas rotas para produção de glicerol. A Dupont© possui uma patente que descreve a produção de glicerol a partir de uma fonte de carbono. A patente descreve todo o processo de produção de politereftalato de trimetileno (PTT) a partir do 1,3-propanodiol (PDO), que por sua vez é produzido a partir do glicerol. Esse glicerol provém de uma rota verde utilizando como matéria prima o milho (BURCH, 2001). Outra rota biológica para produção de glicerol consiste na utilização de algas. Algumas espécies de algas unicelulares do gênero *Dunaliella* são capazes de produzir glicerol com o objetivo de armazenar energia (HADI; SHARIATI; AFSHARZADEH, 2008).

Atualmente, a produção a partir da transesterificação de óleos e gorduras é a principal rota de produção de glicerol no mundo (CHUAH et al., 2017). A matéria-prima sofre um processo preliminar para remoção de partículas sólidas e a reação de transesterificação do triglicerídeo com o álcool ocorre em meio catalisado (meio básico). Essa mistura é separada em uma fase aquosa, que resulta no biodiesel, e outra orgânica, que resulta na glicerina (Figura 3.3).

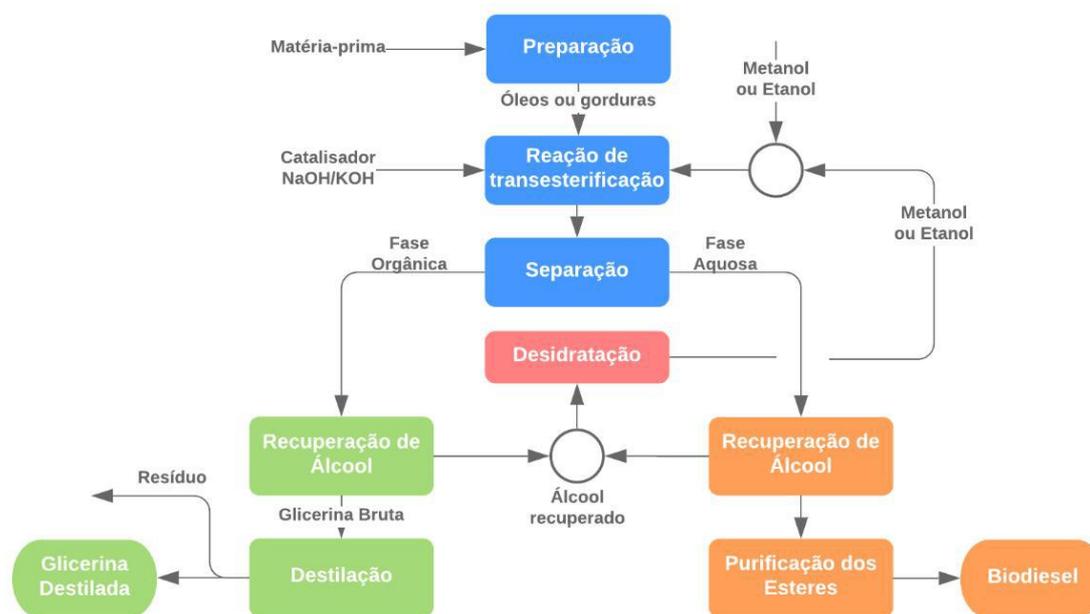


Figura 3.3: Fluxograma do processo de produção de biodiesel e glicerina. Adaptado de Embrapa (DELGROSSI BARROS e JARDINE, 2019)

A produção de biodiesel no Brasil cresce a cada ano. Muito desse crescimento é resultado da política de obrigatoriedade de uma parcela do diesel ser constituído de biodiesel, que teve início em 2008 e em 2019 chegou a 11% (B11). Esse aumento ao

longo dos anos está resumido na Figura 3.4, na qual o número após o “B” no topo da barra significa o percentual obrigatório de biodiesel no diesel.

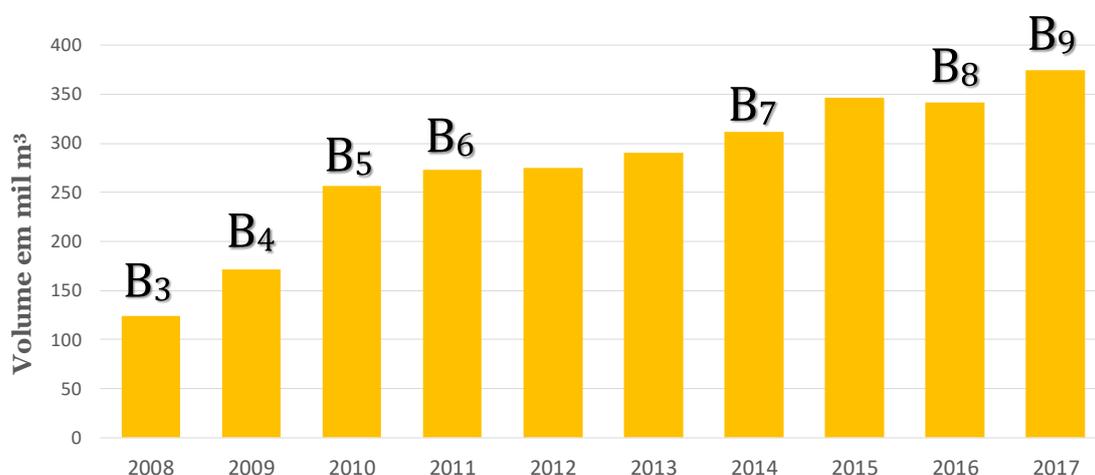


Figura 3.4: Volume de glicerina produzida no Brasil até o ano de 2017. No topo da barra o símbolo do percentual de biodiesel no diesel, em que o número após o “B” representa o percentual de biodiesel (ESTATÍSTICO - ANP, 2018).

A glicerina produzida na indústria do biodiesel representa cerca de 10% do volume de biodiesel e após processo de purificação o glicerol gerado é destinado em sua maioria para a indústria de cosméticos (Figura 3.5 A). Na Figura 3.5 B pode-se ver as principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel.

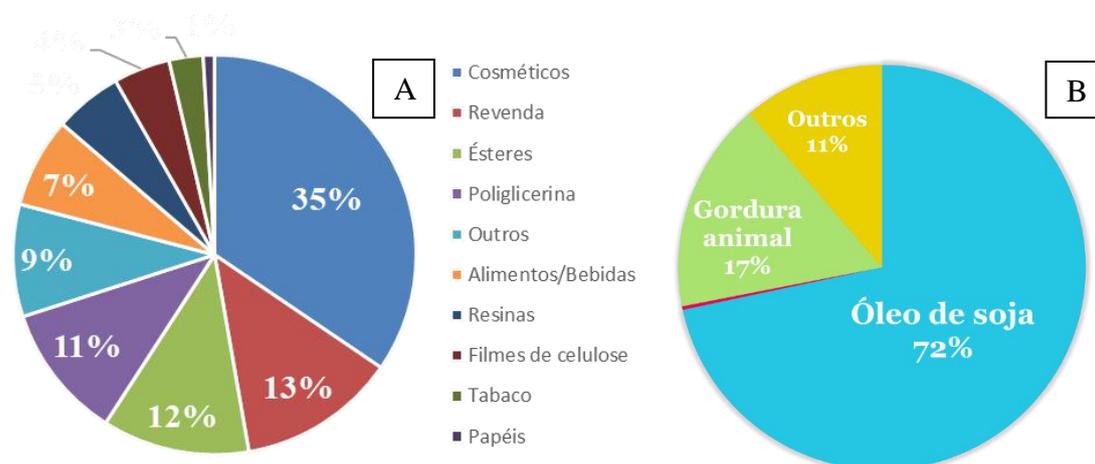


Figura 3.5: Principais destinos do glicerol (A), Principais matérias-primas para produção de biodiesel (B) (ESTATÍSTICO - ANP, 2018).

A glicerina é um produto bruto e o valor de exportação é baixo. Em 2016 chegou a pouco mais de 15 centavos de dólar e mesmo nos anos de maior valor de exportação não passa de 35 centavos de dólar por quilo. A evolução dos preços de exportação na última década está resumida na Figura 3.6.

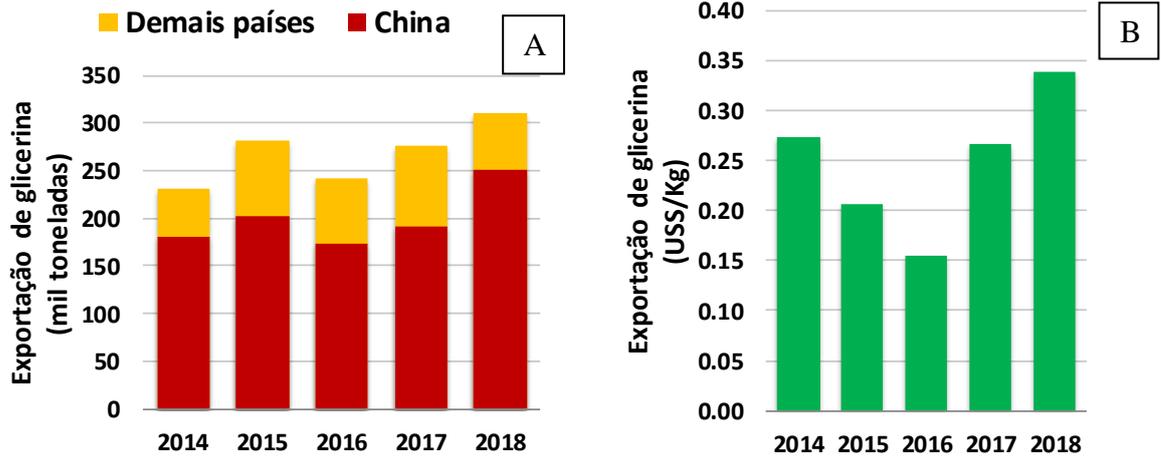


Figura 3.6: Total de exportação de glicerina para o mundo ao longo dos anos (A). Em vermelho a quantidade exportada apenas para a China. Evolução dos preços de exportação do glicerol bruto ao longo dos últimos anos (B) (MDIC/COMEXSTAT, 2019).

O baixo valor agregado da glicerina e as perspectivas de aumento de produção revelam um futuro preocupante, pois o aumento da oferta tende a reduzir o preço por quilograma do produto. No entanto, esse aumento pode ser promissor quando o glicerol bruto é destinado para outros fins, tais como a produção de hidrogênio por rota fermentativa.

### 3.5. Tipos de biorreator

Existe uma gama de biorreatores e a sua configuração varia em função do processo biológico e do microrganismo empregado. Em sua maioria os biorreatores são do tipo reator de mistura, mas existem outros que podem ser classificados de acordo com o tipo de agitação, pela configuração ou pelo tipo de biocatalisador e pelo fenômeno de transporte (calor, massa, quantidade de movimento) (EEL, 2009). Na Figura 3.7 está exemplificada uma das possíveis classificações.

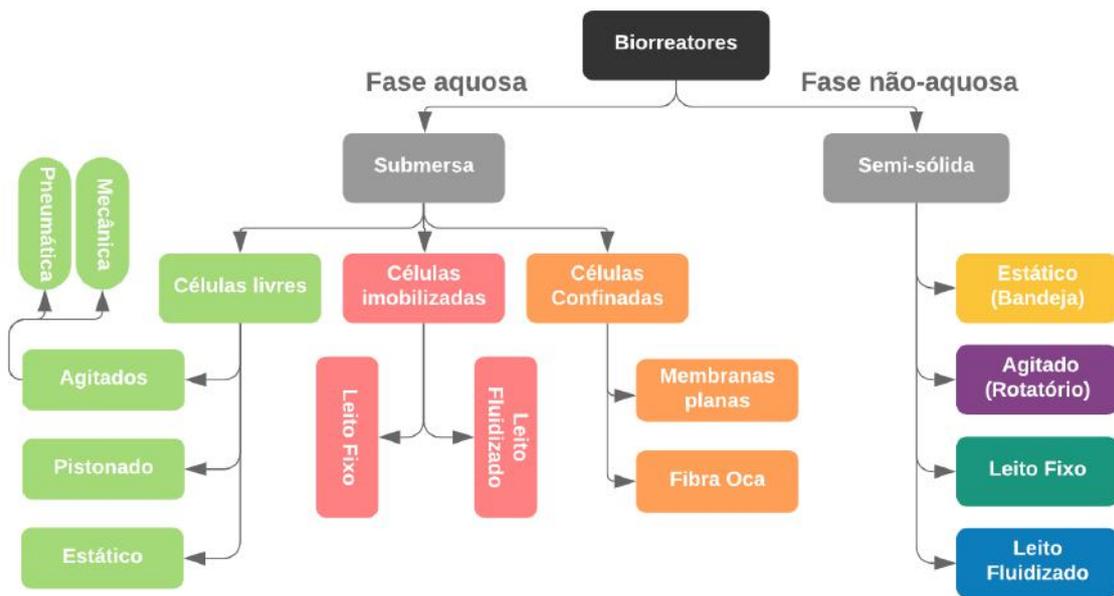


Figura 3.7: Classificação dos biorreatores. Adaptado do slide de aula da Escola de Engenharia de Lorena- USP (EEL, 2009).

### 3.5.1. Reatores de fase não-aquosa

Os reatores de fase não-aquosa são empregados em cultivos semi-sólidos ou em estado sólido, as quais ocorrem na superfície de materiais sólidos e se caracterizam pela ausência de água livre. O material sólido pode ser biodegradável e propiciar condições para o desenvolvimento do microrganismo ou atuar somente como suporte inerte (COUTO; SANROMÁN, 2006). O material é geralmente simples (resíduos agrícolas não refinados) e podem conter a maioria dos nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Isso significa que os processos de pré-tratamento são simples: apenas um cozimento ou moagem. Além disso, o baixo teor de água reduz os custos com esterilização por aquecer menos água, o sistema é menos suscetível a contaminações e a aeração forçada, se necessária, é facilitada devido à porosidade do suporte. Por outro lado, os microrganismos que crescem em baixos teores de umidade são reduzidos, limitando as aplicações, os parâmetros importantes de qualquer processo biológico são dificultados pela natureza sólida do substrato (pH, temperatura, umidade e concentração) e o tempo de fermentação é mais longo devido ao metabolismo dos microrganismos compatíveis com o cultivo em estado sólido (SALLES, 2013).

Esses reatores podem ser divididos em quatro categorias: estático, agitado, leito fixo e leito fluidizado. Os reatores estáticos são comumente operados em bandejas e o meio sólido fica espalhado pela superfície do recipiente (Figura 3.8 A). Esse modo de operação, quando comparado com o processo agitado, é menos homogêneo e acarreta gradientes de transferência calor e de disponibilidade de nutriente; portanto, de maneira geral, são menos eficientes. No entanto, alguns microrganismos não toleram agitação e esse processo se mostra o mais indicado. Além disso, essa heterogeneidade, em muitos casos promove maior rendimento de produtos e a fermentação em estado sólido pode promover um ambiente adequado para determinadas fisiologias microbianas (SANTOS, 2014). Por sua vez, os reatores agitados podem ser do tipo tambor rotativo ou tambor agitado. Esse tipo de reator ainda possui uma série de subcategorias devido às diferentes

configurações das pás (Figura 3.8 C). Além disso, esses reatores são amplamente utilizados na indústria como misturadores, secadores e reatores de processamento de materiais granulados (SANTOMASO; OLIVI; CANU, 2004).

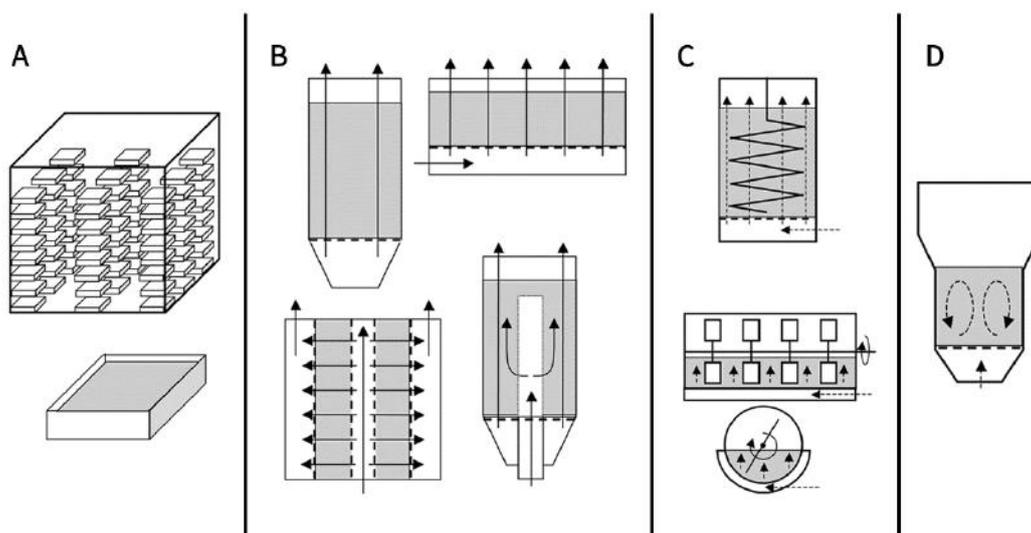


Figura 3.8: Classificação dos biorreatores de fase não-aquosa. As setas indicam o sentido do escoamento do ar. A – Estático. B – Leito Fixo. C – Rotativo. D – Fluidizado. Adaptado de Mitchell (2006).

Os reatores de leito fixo ou empacotado são caracterizados pelo estado estacionário do biocatalisador e a solução do substrato circula através do recheio (Figura 3.8 B). Esses reatores variam de acordo com o tipo de escoamento, podendo ser de fluxo ascendente, de duto central (o escoamento é baixo nas extremidades), de escoamento radial e de *short-wide* que combina bandeja com aeração forçada (MITCHELL; STUART et al., 2006).

Os reatores de leito fluidizado se caracterizam pela introdução de ar através de um suporte permeável que, além de suportar o material sólido, ainda funciona como um aspersor. Esse ar que entra em alta vazão no reator agita as partículas, conforme ilustrado na Figura 3.8 D. Esses biorreatores atingem melhores transferências de massa e controle de temperatura.

Todos os tipos de reatores mencionados até o presente são ditos reatores em fase não-aquosa; entretanto, há ainda os reatores em fase aquosa, que são mais comuns e mais utilizados na indústria e sua capacidade é bastante variável, conforme o processo.

### 3.5.2. Reatores de fase aquosa

Os biorreatores classificados em fase aquosa, também conhecidos como biorreatores de fermentação submersa, são divididos em sete diferentes tipos: reator de tanque agitado, pneumático com fluxo ascendente aleatório (coluna de bolhas), pneumático com fluxo orientado (“air-lift”), leito fixo, leito fluidizado, membranas planas e fibras ocas (Figura 3.9 A – G, respectivamente). Dentre estes, o reator agitado é mais

utilizado, representando cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente (SCHMIDELL et al., 2001). Esse reator consiste em um tanque cilíndrico com chicanas e possui um agitador mecânico central que pode conter uma ou mais pás (turbinas) formando uma série de braços que podem ser de diferentes formatos, as mais comuns são as pás planas (turbinas “Rushton”).

Nos reatores pneumáticos a agitação do líquido é promovida pelo borbulhamento de gás no líquido, ou seja, esses reatores não possuem o agitador mecânico. O borbulhamento pode ocorrer de maneira orientada (Figura 3.9 C) onde se tem uma movimentação cíclica do fluido bem definida, através de dispositivos e arranjos internos construídos especialmente para esse propósito, enquanto que o sem orientação (Figura 3.9 B) tem um movimento aleatório do líquido no reator. Essa menor taxa de cisalhamento é ideal para cultivo de células animais e vegetais (SCHMIDELL et al., 2001).

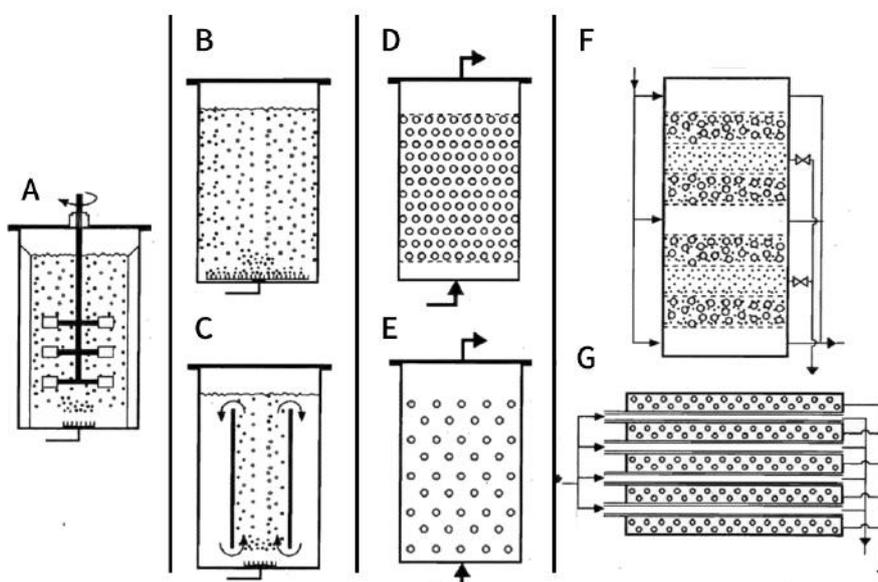


Figura 3.9: Classificação dos biorreatores em fase aquosa. A - Reator agitado. B - Pneumático com fluxo ascendente aleatório. C - Pneumático com fluxo orientado (“air-lift”). D - Leito fixo. E - Leito fluidizado. F - Membranas planas. G - Fibras ocas. Adaptado de Mitchell (2006).

Os reatores de leito fixo, onde a movimentação do material é praticamente inexistente, e os de leito fluidizado, onde há uma intensa movimentação das partículas provocada pela injeção de ar, possuem biocatalisadores imobilizados em um suporte inerte ou empregam células e enzimas coimobilizadas (Figuras 3.9 D e E, respectivamente). A estratégia de imobilizar as células ou enzimas no biorreator se faz promissora devido à manutenção de elevadas concentrações de células ou enzimas no meio, podendo atingir elevada produtividade no processo (SCHMIDELL et al., 2001).

Por sua vez, os reatores de membranas planas e os reatores de fibra oca caracterizam-se por manterem as células confinadas entre as membranas semipermeáveis (Figuras 3.9 F e G). Esse tipo de reator prevê uma separação de fluxo de nutriente e produtos metabólicos, o que simplifica as etapas posteriores de purificação (SCHMIDELL et al., 2001).

Além dos diferentes tipos de biorreator, ainda existem classificações quanto à forma de condução de um processo fermentativo. Essa operação pode ocorrer de maneira contínua, quando o processo ocorre de maneira ininterrupta; descontínua (também conhecida como batelada), quando no processo ocorre apenas uma única carga no início; e por último o processo semicontínuo (batelada alimentada), no qual o processo ocorre ciclicamente, ou seja, cargas são adicionadas durante a batelada.

### **3.6. Formas de condução de um processo fermentativo**

De maneira geral, um reator biológico pode ser operado das seguintes formas: descontínuo com um inóculo por tanque, descontínuo com recirculação de células, semi-contínuo ou contínuo com ou sem recirculação de células. Esses seis tipos de operação são descritos em mais detalhes a seguir.

#### **3.6.1. Contínuo e semi-contínuo**

O processo contínuo é um exemplo de sistema aberto no qual se procura estabelecer um fluxo contínuo de líquido através do reator. A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância para se atingir o regime permanente. O estado estacionário permite a operação sem interrupções e consequentemente aumenta a produtividade do processo, em detrimento da redução dos tempos de carga e descarga, “tempo morto” e lavagem. Além disso, o processo contínuo possibilita o emprego de controles avançados e menores gastos com mão-de-obra.

Por outro lado, essa forma de condução pode ocasionar a formação de espumas em processos aerados, que deve ser evitada, seja com o uso de antiespumante ou a retirada mecânica. Esse processo exige maior investimento inicial na planta, potencializa os efeitos de mutação genética espontânea, modificando o processo, além de ser mais suscetível a contaminações.

No processo semi-contínuo aguarda-se o término da fermentação, retira-se parte do meio fermentado e adiciona-se um volume de meio de mesmo volume do retirado. Portanto, permanecem no reator parte do meio com os produtos da fermentação e boa parte da microbiota inicial. Essas etapas são repetidas até se perceber queda na produtividade. O processo de produção de vinagre usado antigamente se baseava nessa forma de operação (SCHMIDELL et al., 2001).

#### **3.6.2. Descontínuo e descontínuo alimentado**

O processo descontínuo ou batelada pode ocorrer de maneira simples, aquele efetuado com um inóculo por tanque, e com recirculação de células; ou aquele em que ao final da batelada efetua-se a separação das células para uso posterior. A batelada é o processo fundamental para qualquer sistema, pois as formas de conduções vistas anteriormente pressupõem o conhecimento cinético e esse precisa ser bem dominado no processo descontínuo. Além disso, a batelada será sempre a base para a comparação de eficiência de processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento das formas alternativas já descritas (SCHMIDELL et al., 2001).

Nessa forma de condução da fermentação a matéria-prima, estéril ou não, é inoculada com o microrganismo, podendo ser uma cultura pura ou mista, e incubada de modo a permitir a fermentação. No decorrer do processo nenhum substrato ou microrganismo é adicionado, mas pode ocorrer a adição de oxigênio quando o processo é aeróbio, antiespumante, ácidos ou bases para controle de pH (SCHMIDELL et al., 2001).

Terminada a fermentação o biorreator é descarregado, o meio fermentativo segue para os tratamentos finais, o recipiente é lavado e recarregado com inóculo e substrato. Todo esse processo ocorre em sistema fechado e, portanto, não há perdas de líquido por evaporação e o volume de meio permanece constante. Essa única carga feita no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão por substrato, e apresenta “tempo morto”, fase de adaptação do microrganismo; além desse tempo o processo ainda conta com perdas associadas ao tempo gasto nas lavagens e nas cargas e descargas do reator (SCHMIDELL et al., 2001).

Por outro lado, apresenta menores riscos de contaminação, quando comparado com as formas de condução anteriores, possui grande flexibilidade de operação, em detrimento do uso de um mesmo reator para diferentes processos, ainda conta com um controle mais estreito da estabilidade genética e possibilidade de identificação de todos os materiais relacionados ao sistema (SCHMIDELL et al., 2001).

Os reatores descontínuos alimentados ou batelada alimentada são definidos como uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo podendo ser gradual ou intermitentemente adicionados e que necessariamente não há remoção do meio fermentativo até o final da fermentação. Esse processo tem fundamental importância tanto em escala industrial como em nível de pesquisa, pois é a partir de uma nova carga que pode-se descobrir a resposta dos microrganismos ao longo do tempo (SCHMIDELL et al., 2001).

Os reatores agitados operados em batelada, como já foi amplamente discutido, são de suma importância para determinação de parâmetros fundamentais no entendimento do sistema fermentativo e nessa direção buscou-se na literatura compreender como esses biorreatores são usados e quais são usados. Os resultados encontram-se no próximo item.

### **3.7. Reatores utilizados para produção biológica de hidrogênio**

Com o intuito de obter um bom panorama das diferentes metodologias acerca dos diferentes modelos de reatores batelada para a produção de hidrogênio, uma busca minuciosa foi feita na literatura empregando-se metodologia adequada.

No presente trabalho o processo estudado foi o de batelada aplicado à fermentação para produção de hidrogênio, portanto os estudos relacionados aos outros tipos de biorreatores ou para processos contínuos e semi-contínuos não foram avaliados. Além disso, dentro de cada trabalho foram analisados os detalhes da metodologia de quantificação de biogás produzido, bem como os cálculos envolvidos nessa quantificação.

Essa pesquisa na literatura teve como foco a obtenção das seguintes informações: matéria-prima, tipo de inóculo, modo de operação, método de quantificação de biogás e o resultado do estudo (rendimento de hidrogênio por mol de substrato). Os trabalhos mais citados e alguns dos mais recentes estão sintetizados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Estudos mais citados e alguns dos mais recentes trabalhos sobre produção de hidrogênio por via biológica.

Matéria-prima	Tipo de inóculo	Modo de Operação	Método de quantificação de biogás	Rendimento	Referência
Lactato	Lodo ETE tratado com 2-bromoetanosulfonato	Reator de 2,5 L	Medidor de gás - Ritter	0,4 mol H <sub>2</sub> / mol lactato	Noblecourt (2018)
Glicose	<i>Clostridium</i> sp. YM1	Frasco reagente de 1 L	Método de deslocamento de água	1,7 mol H <sub>2</sub> /mol glicose	Abdeshahian (2014)
Glicose	<i>Clostridium</i> CWBI1009	Reator cilíndrico de Leito fixo c/ 400 mL	Medidor de gás - Ritter	2,43 mol H <sub>2</sub> /mol glicose*	Hiligsmann (2014)
Manose	<i>Bacillus anthracis</i> PUNAJAN 1	Frasco Penicilina de 150 mL	Respirômetro AER-200	0,01 mol H <sub>2</sub> /g de DQO*	Mishra (2017)
POME	<i>Clostridium butyricum</i> EB6	Reator de 2 L	Método de deslocamento de água (solução ácida de pH entre 2 e 3)	0,24 mol H <sub>2</sub> /mL de POME*	Singh et al. (2013)
Resíduo agroindustrial	Lodo anaeróbio pré-tratado termicamente	Erlenmeyer de 250mL	Método de deslocamento de água	0,003 mol H <sub>2</sub> /g SSV*	Sekoai (2013)
Glicose	<i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009	Frasco Penicilina de 270 mL	Seringas graduadas - Método de absorção de CO <sub>2</sub> em solução KOH 9 N	1,43 mol H <sub>2</sub> /mol glicose	Hamilton et al. (2018)
Efluente do processamento da polpa de pêssego	Lodo anaeróbio pré-tratado termicamente	Frasco Penicilina de 250 mL	Método de deslocamento de água	0,006 mol H <sub>2</sub> /gTOC*	Argun (2017)
POME	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Frasco Penicilina de 250 mL	Método de deslocamento de água	0,009 mol H <sub>2</sub> /gDQO*	Mamimin (2015)
Resíduo de frutas e legumes	Consórcio anaeróbio pré-tratado termicamente	Biorreator Labfors 5 de 8 L	Medidor de fluxo de baixa vazão	0,003 mol H <sub>2</sub> /g SSV <sub>removida</sub> *	Keskin et al. (2019)
Glicerina	<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC 116 (ATCC 6013)	Frasco Penicilina de 100 mL	Não especificado	0,627 mol H <sub>2</sub> /mol glicerol	Sarma (2016)
Hidrolisado de trigo	Lodo anaeróbio pré-tratado termicamente	Frasco penicilina	Método de deslocamento de água	3,21 mol H <sub>2</sub> /mol glicose	Gokfiliz-Yildiz (2018)

\*O valor apresentado pelo trabalho estava em mililitros e foi feita a conversão considerando comportamento ideal nas condições normais de temperatura e pressão.

### 3.7.1. Modo de operação

O modo de operação consiste na verificação da metodologia utilizada na fermentação anaeróbia, portanto nesse tópico a principal informação buscada diz respeito às características do biorreator, tais como volume e tipo de frasco. Na maioria dos trabalhos encontrados o modo de operação ocorre em frasco penicilina, o volume do frasco e de meio varia de acordo com o trabalho. No estudo de Keskin et al. (2019), foi utilizado um biorreator comercial modelo INFORS HT Labfors 5 com volume de trabalho de 8L. Além disso, uma menor parte dos trabalhos avaliados utilizou frasco reagente ou erlenmeyer para a etapa de fermentação.

### 3.7.2. O frasco penicilina e suas limitações

O frasco penicilina é vedado com tampa de borracha e lacre de alumínio. Este tipo de vedação dificulta a aferição de baixas pressões, pois para esses casos a pressão interna não é suficiente para deslocar o embolo da ampola gasométrica ou da seringa graduada. Portanto, a determinação do volume ou da pressão interna desse sistema é imprecisa e gera muitos erros. Além disso, as dimensões do gargalo do frasco (de aproximadamente 20 mm), bem como seu tamanho, impedem a adaptação de qualquer sistema eficiente de medição.

Para ensaios de cinética, por exemplo, o uso de frasco penicilina implica na exclusão de determinado número de frascos a cada tempo de incubação analisado, aumentando consideravelmente o número inicial de frascos incubados e o espaço ocupado por eles.

Outro problema dos frascos penicilina está relacionado com a segurança. Durante a fermentação, a produção de gás ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ) aumenta a pressão interna e a tampa do frasco penicilina pode romper ou o frasco quebrar. Para o caso de a tampa ser projetada, além do projétil que consiste de uma tampa de borracha e um lacre de alumínio, o meio fermentativo se espalha no local e nenhum acidente grave ocorre. Por outro lado, no caso de o frasco estourar, o vidro, que não é temperado, solta estilhaços e esses podem causar acidentes gravíssimos em laboratório (Figura 3.10).



Figura 3.10: Registro do frasco penicilina quebrado ao final da fermentação. O acidente ocorreu dentro do Shaker e não houve feridos.

Nesse tipo de experimento, não há monitoramento sobre o que está acontecendo, ou seja, a pressão aumenta e só se saberá o volume final de biogás gerado ao término da análise. Isso pode ter consequências indesejáveis, tendo em vista que em laboratório busca-se o máximo de informação possível sobre os sistemas estudados e, portanto, em linhas gerais não se tem muita noção da produção de biogás em tempo real.

Portanto, para o biorreator projetado neste estudo foram utilizados dados do fabricante para estimar a pressão máxima suportada pelo frasco e, além disso, a pressão foi monitorada através de uma leitura rápida do manômetro acoplado em sua tampa.

### 3.8. Método de quantificação de biogás

Os métodos descritos na literatura para quantificação do volume de gás gerado são: deslocamento de água, medidores comerciais ou seringas graduadas. Nos trabalhos de Noblecourt et al. (2018) e Hiligsmann et al. (2014) foram utilizados medidores de gás da marca Ritter. No trabalho de Keskin et al. (2019) o autor descreve que a medição de gás ocorreu por meio de um medidor de escoamento de baixa vazão. Os medidores comerciais em sua maioria determinam a vazão de fluido e a partir de dados de área da seção de tubo é possível determinar o volume de fluido que passa pelo equipamento. A vazão pode ser determinada por diversas formas, uma delas é a de rodas de pás. Nesse medidor o fluido passa pelo tubo e promove a rotação das pás conforme ilustrado na Figura 3.11. Em cada uma dessas pás existe um ímã que induz uma corrente elétrica no sensor e esses pulsos elétricos são proporcionais à taxa de escoamento do fluido (OMEGA, 2019). Esse tipo de sensor é eletrônico e necessita de *hardware* e *software* para obter os resultados, tornando esse medidor mais caro.

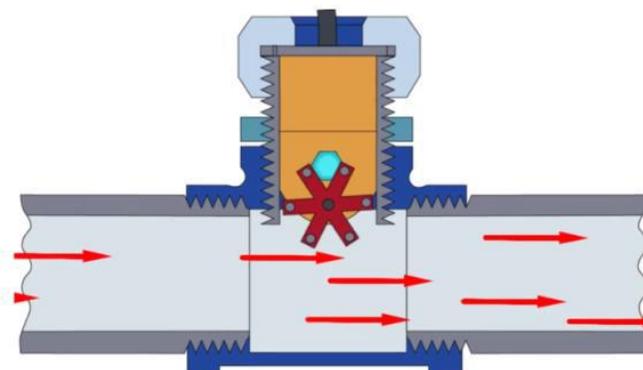


Figura 3.11.: Sensor de escoamento de roda de pás. Adaptado de (OMEGA, 2019)

Segundo Hamilton et al. (2018), é possível obter boas medidas através do uso combinado de seringas graduadas e pelo método da absorção de  $\text{CO}_2$  (solução de  $\text{KOH}$  9N). A medição do volume de biogás utilizando seringa graduada é simples e prática, no entanto os erros associados ao atrito da seringa limitam em muito a sua utilização. O esquema do uso de seringas está representado na Figura 3.12.

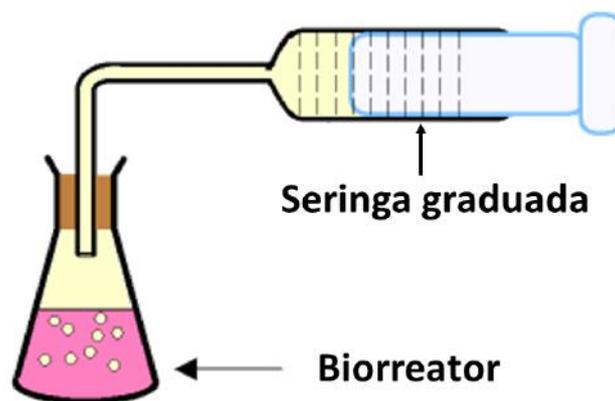


Figura 3.12: Esquema do método de quantificação de volume de biogás utilizando seringa. Adaptado de [gcsescience.com/igasyringe.htm](http://gcsescience.com/igasyringe.htm)

O método de adsorção de  $\text{CO}_2$  descrito por Hamilton et al. (2018) foi baseada no estudo de Hiligsman et al. (2011), que consiste no uso de uma solução básica de  $\text{KOH}$  9N na configuração mostrada na Figura 3.13. O biogás contido na seringa é injetado na solução básica que está dentro de uma seringa graduada invertida. Como a maior parte do  $\text{CO}_2$  se solubiliza e reage com o  $\text{KOH}$  formando carbonato de potássio o volume marcado na proveta representa o volume de hidrogênio e nitrogênio. Segundo o autor é possível calcular com boa precisão o volume de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{N}_2$ , visto que o nitrogênio pode ser calculado pelo “*headspace*”, o hidrogênio pela subtração do volume marcado na proveta invertida pelo volume de nitrogênio. Por fim, sabendo-se o volume inicial obtido pela seringa (aquela que coleta todo o biogás do reator) menos a soma do volume de  $\text{H}_2$  mais o volume de  $\text{N}_2$  obtêm-se o volume de  $\text{CO}_2$ . Porém, não é possível identificar a geração de  $\text{CH}_4$  no biogás, caso o pré-tratamento do lodo anaeróbico de ETE não tenha sido eficiente, possibilitando tanto erros de quantificação quanto de qualificação do biogás.

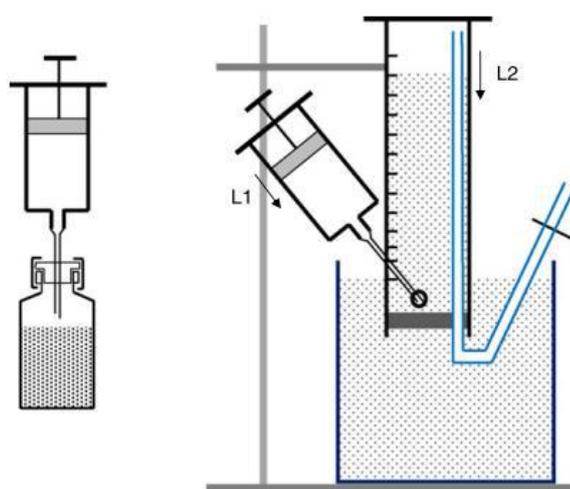


Figura 3.13: Esquema para determinação do biogás descrito por Hiligsmann et al. (2011). São utilizadas duas seringas, uma para coletar o biogás produzido e outra para medir o deslocamento da solução alcalina. Fonte: Adaptado de Hiligsmann et al. (2011).

Nos demais trabalhos o método empregado foi o de deslocamento de água. Esse método consiste na utilização de um recipiente que receberá o biogás produzido na fermentação e o deslocamento de líquido é proporcional a esse volume de gás. Existem diversas

maneiras de mensurar o biogás por meio do deslocamento de líquido, uma das possíveis maneiras está representada na Figura 3.14. Este método fornece como resposta apenas o volume de biogás gerado e possui como interferentes da medida o volume do tubo conector, as possíveis perdas de gás pela lateral da agulha e a incerteza da graduação da proveta.

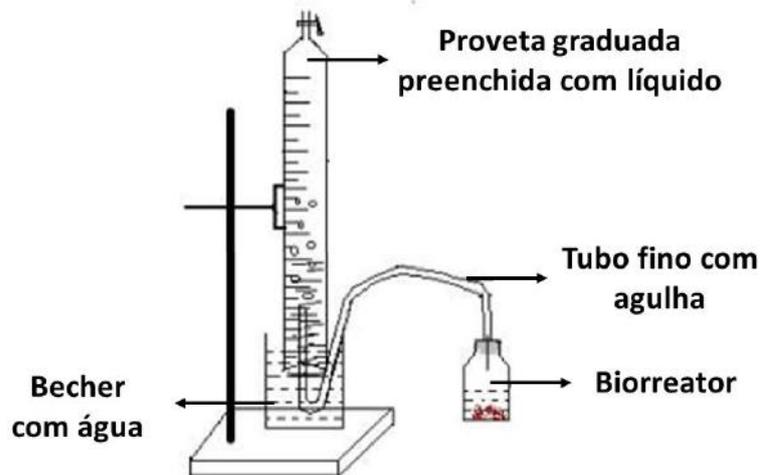


Figura 3.14: Esquema de uma das possíveis maneiras de executar o método de deslocamento de água para determinação do volume de biogás produzido. Adaptado de (ALAM; HANID, 2017).

No biorreator desenvolvido nesse trabalho o método de quantificação de biogás se baseia na determinação da pressão interna. Portanto, na tampa do frasco reagente foi adaptado um manômetro de ponteiro (mais detalhes no item 5). A determinação direta da pressão possui maior precisão quando comparada com as demais metodologias vistas acima, pois não há necessidade de montar um aparato, como é visto no método de deslocamento de água, e é mais barato quando comparado com medidores comerciais.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos empregados na construção do biorreator, o procedimento experimental adotado para avaliação da produção de hidrogênio em frascos penicilina e no biorreator e os métodos analíticos empregados nesta avaliação.

### **4.1. Construção do biorreator**

O projeto do biorreator foi desenvolvido com o intuito de sanar as principais limitações identificadas no emprego de frascos penicilina em ensaios fermentativos para produção de hidrogênio e ainda de viabilizar outros tipos de ensaios.

A ideia principal era que o sistema fosse o mais versátil possível. Portanto, escolheu-se como reator um frasco reagente de vidro de 200 mL, pois para todos os tamanhos utilizados em laboratório a tampa é a mesma. Além disso, o frasco é preparado para suportar ensaios sob pressão e temperaturas de até 140°C.

A partir da escolha do frasco (vaso de reação/fermentação), iniciou-se o procedimento de construção do biorreator, que foi melhorado por tentativa e erro até o protótipo final.

Na construção dos protótipos foram empregados os materiais listados nas Tabelas 4.1 e 4.2. A escolha dos materiais referentes aos dois primeiros protótipos foi por disponibilidade no laboratório. Os referentes ao 3º protótipo foram comprados seguindo um estudo minucioso das melhores especificações para atender às necessidades dos ensaios. Além disso, os testes de estanqueidade foram conduzidos a fim de verificar a existência ou não de vazamentos, conforme descrito no item 4.3.

Tabela 4.1: Lista de materiais utilizados nos dois primeiros protótipos desenvolvidos.

	<b>Material</b>	<b>Descrição</b>	<b>Finalidade</b>
<b>1° Protótipo</b>	Rolha de silicone	Diametro inferior 3 cm e superior 4cm	Vedar e tampar o frasco, bem como, auxiliar no encaixe das conexões
	Seringa descartável de 10 e 3 mL	Seringa em polipropileno tipo Luer Lock sem agulha	Auxiliar na retirada de alíquotas de gás e líquido
	Válvula descartáveis de duas vias	Válvulas tipo Luer Slip	Manter o sistema fechado entre as amostragens
	Tubo de inox para conexões de 1/8'	Seção de tubo para prolongar o acesso entre a tampa e o meio líquido	Extensor para coleta de líquido
	Mangueira de 6mm em silicone	Seções, do tamanho da rolha, que foram introduzidas através da rolha	Favorecer o encaixe entre a rolha de silicone e as válvulas
<b>2° Protótipo</b>	Manômetro de 3 bar	Manômetro reto caixa 62mm em aço carbono sem glicerina 1/4" BSP	Medir a pressão interna
	Tampa do frasco schott	Tampa em PEAD	Vedar e tampar o frasco, bem como, auxiliar no encaixe das conexões
	Seringa descartável de 10 e 3 mL	Seringa em polipropileno tipo Luer Lock sem agulha	Auxiliar na retirada de alíquotas de gás e líquido
	Válvula descartáveis de duas vias	Válvulas tipo Luer Slip	Manter o sistema fechado entre as amostragens
	Tubo de inox para conexões de 1/8"	Seção de tubo para prolongar o acesso entre a tampa e o meio líquido	Extensor para coleta de líquido
	O-ring de 1/4	O-ring com 3 mm de espessura em SBR	Promover a vedação entre o manômetro e a tampa

Tabela 4.2: Lista de materiais utilizados no terceiro protótipo.

	<b>Material</b>	<b>Descrição</b>	<b>Finalidade</b>
<b>3° Protótipo</b>	Manômetro de 1 kgf/cm <sup>2</sup>	Manômetro reto caixa 52mm em aço carbono sem glicerina 1/4" NPT	Medir a pressão interna
	Tampa do frasco schott	Tampa em PEAD	Vedar e tampar o frasco, bem como, auxiliar no encaixe das conexões
	Seringa descartável de 10 e 3 mL	Seringa em polipropileno tipo Luer Lock sem agulha	Auxiliar na retirada de alíquotas de gás e líquido
	Válvula esfera	Válvulas macho-fêmea em latão 1/8" BSP	Permitir a amostragem de líquido e manter o sistema fechado
	Conexão reta (para contra-porca)	Conexão em latão fêmea 1/8" BSP para tubo de 6mm de engate rápido	Usada para fixar a válvula esfera na tampa e conectar o tubo extensor de amostragem de líquido nessa válvula
	Conexão macho (para receber a seringa)	Conexão em latão macho 1/8" BSP para tubo de 6mm de engate rápido	Permite a fixação do tubo pneumático na válvula esfera.
	Tubo de 6 mm (interno)	Seção de tubo em PEBD para prolongar o acesso entre válvula esfera e o meio líquido.	Extensor para coleta de líquido
	Tubo pneumático de 6mm (externo)	Seções de tubo, com 3 cm de comprimento, para conectar a seringa na válvula esfera	Favorecer o encaixe entre a seringa e a conexão fêmea de engate rápido da válvula esfera
	Conexão T	T em latão para linhas de gases de 1/8"	Adaptar o manômetro e a válvula 600psi na tampa
	Contra porca	Porca em latão para linha de gases sem anilha	Fixar a conexão T na tampa do frasco schott
	Anel de vedação	Anel com 3mm de espessura em SBR	Promover a vedação entre a conexão T e a tampa
	Tubo de cobre 1/8"	Seção de cobre com anilha e porcas de 1/8" em latão	Conectar a válvula 600psi na conexão T e outro para conectar o conjunto adaptador-manômetro na conexão T
	Adaptador manômetro	Adaptador 1/8" NPT para tubo de 1/8"	Conectar o manômetro na conexão T
	Válvula 600 psi	Válvulas macho-macho 1/8" para tubo em inox	Permitir a amostragem de gás e manter o sistema fechado
O-ring de 1/4"	O-ring com 3 mm de espessura em SBR	Promover a vedação entre o manômetro e a tampa	

## 4.2. Testes de estanqueidade

A garantia de que não há vazamento de gás no sistema é de fundamental importância e para essa análise foram utilizados dois métodos: com espuma e imersão em

água. Em cada um dos métodos o sistema foi submetido a um aumento de pressão interna promovido pela adição de gás nitrogênio dentro do reator.

O método de imersão consistiu na utilização de uma bacia com água na qual foi imerso todo o sistema para verificação da formação de bolhas (Figura 4.1 A).

O método com espuma consiste na colocação de espuma, feita com detergente, em todas as possíveis superfícies de vazamento, tais como: conexões, roscas e vedações. O vazamento em alguma região é detectado ao se observar a formação de bolhas (Figura 4.1 B).



Figura 4.1: Testes de estanqueidade. A - Método de imersão com conexões totalmente imersas em água. B - Método com espuma mostrando vazamento na conexão do manômetro com a tampa.

### 4.3. Origem e pré-tratamento do lodo anaeróbio

O lodo anaeróbio empregado como inóculo nos experimentos foi coletado no adensador de lodo de uma estação de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro em 20 de dezembro de 2017. O intuito de coletar o lodo do adensador foi para garantir uma concentração elevada de microrganismos. Um volume total de 40 L foi dividido em dois recipientes de 20 L armazenados a uma temperatura ambiente de aproximadamente 27°C. Para a produção de hidrogênio, o lodo anaeróbio foi previamente tratado com o intuito de inibir os microrganismos consumidores de hidrogênio. O lodo foi acondicionado em frasco reagente com tampa, que foi aquecido em banho-maria com agitação de 150 rpm até atingir 65 °C (cerca de 20 min), e mantido nesta temperatura durante 30 min. Para melhorar a transferência de calor, a coluna de água do banho ficava acima do nível de lodo dentro do frasco. Após o período de aquecimento, o frasco foi colocado para resfriar até a temperatura ambiente e empregado como inóculo após ajuste do pH do meio fermentativo para 5,5 com solução de HCl 10M/NaOH 5M.

O lodo foi caracterizado por meio da quantificação da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV), de acordo com metodologia descrita por Wong e Wu (2014).

#### 4.4. Fermentação

A fermentação foi conduzida em frascos penicilina de 100 mL contendo 50 mL da mistura de lodo e substrato. Empregou-se uma concentração de  $SSV_{inóculo}$  de 7500 mg/L e solução de glicerol P.A. a 1 g/L. A concentração de SSV adotada foi a que apresentou melhores resultados em trabalhos anteriores (FERREIRA-LEITÃO et al., 2013). Glicerol P.A. foi empregado como substrato, em substituição à glicerina proveniente da indústria de biodiesel, para economizar a amostra do coproduto glicerina e porque em testes anteriores glicerina e glicerol P.A. levaram aos mesmos resultados (WONG; WU; JUAN, 2014). O pH do meio fermentativo foi ajustado para 5,5, os frascos foram purgados com  $N_2(g)$  por 45 s e posteriormente lacrados e incubados a 35 °C e 150 rpm (SARMA, S. J.; PACHAPUR et al., 2015).

A fermentação conduzida no biorreator seguiu o procedimento experimental descrito para os frascos penicilina, ou seja, com as mesmas concentrações de substrato e inóculo, com volume final de meio de 200 mL e tempo de purga de nitrogênio de 120 s.

Em ambos os ensaios (frascos penicilina e biorreator) amostras da fração líquida do meio fermentativo foram centrifugadas a 15 mil rpm por 10 minutos e posteriormente filtradas em filtro 0,22  $\mu m$ . As amostras livres de qualquer microrganismo foram analisadas nos tempos de 0 h e 24 h de incubação para quantificação das concentrações de glicerol e ácidos orgânicos. A produção de hidrogênio foi determinada após 24 h de incubação.

#### 4.5. Determinação do volume de “headspace”

O volume de armazenagem de gás produzido ou “headspace” foi calculado subtraindo-se o volume de meio fermentativo do volume total do frasco (Figura 4.2).

$$V_h = V_{total} - V_{líquido}$$



Figura 4.2: Foto de um frasco penicilina com a representação do volume de “headspace” destacada em vermelho

O volume total do frasco foi determinado com proveta graduada de 200 mL ou 500 mL.

#### 4.6. Métodos analíticos

As concentrações de glicerol e ácidos orgânicos foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando coluna Aminex HPX-87H acoplada com uma pré-coluna Carbo-H (Bio-Rad, USA) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M como fase móvel sob fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 55 °C.

A produção de hidrogênio foi determinada utilizando um micro-cromatógrafo (CG) a gás modelo 3000A da Agilent Technologies. As colunas utilizadas foram HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 µm) e HP-PLOT Molecular Sieve 5A (10 m x 0,32 mm x 12 µm) à temperatura de 60 °C e 100 °C e os gases de arraste foram hélio e nitrogênio, respectivamente. A partir dos valores das áreas correspondentes na curva padrão foi determinada a concentração de hidrogênio presente no “*headspace*” do recipiente. Para o frasco penicilina o volume de “*headspace*” foi de 62,5 mL e para o biorreator foi de 96,5 mL (determinado conforme descrito no item 4.6). Para o cálculo do número de mols de hidrogênio produzido é necessário determinar a pressão interna ou o volume de gás gerado. Optou-se pela medida da pressão, pois esta pode ser determinada com um manômetro. Utilizando a equação dos Gases Ideais:

$$P_{total}V_h = nRT$$

Em que:

*P<sub>total</sub>* é a pressão atmosférica mais a manométrica  
*V<sub>h</sub>* o volume do “*headspace*”  
*n* o número de mols totais  
*R* a constante dos gases  
*T* a temperatura do gás

Para o cálculo do número de mols foi considerada a temperatura de fermentação de 35 °C (308 K), o volume de “*headspace*” do recipiente, a constante dos gases (0,08205 atm.L.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) e a pressão como sendo a soma da pressão atmosférica (1 atm) mais a pressão manométrica.

O biorreator possibilita fazer a coleta de gás e líquido sem expor o ambiente interno, portanto não utiliza a metodologia de frasco de exclusão realizada em frasco penicilina. No entanto, a remoção de alíquota de gás e de líquido alteram tanto a pressão interna como o volume de meio. Por isso, para ensaios de cinética ou de batelada alimentada, são necessários obter ao menos 2 valores de pressão: a pressão inicial e a final após a retirada de gás e líquido. Em posse do primeiro valor, pode-se determinar o volume real de gás gerado na fermentação e o segundo valor serve de referência para o cálculo do volume por diferença. Logo, a pressão total usada na equação dos Gases Ideais será a soma da pressão atmosférica mais a manométrica corrigida:

$$P_{total} = P_{Atm} + P_{man}^{corrigida}$$
$$P_{man}^{corrigida} = P_2 + (P_1 - P_1^f)$$

Em que:

$P_1$  é a pressão manométrica inicial do primeiro ponto

$P_1^f$  é a pressão manométrica final do primeiro ponto

$P_2$  é a pressão manométrica inicial do segundo ponto

#### 4.7. Purga com nitrogênio

Como a fermentação precisa ser anaeróbia o processo de purga é fundamental para garantir que o sistema esteja livre de oxigênio. No frasco penicilina esse processo é feito adaptando o tubo do quadro de gases em uma pipeta de vidro que é inserida dentro do frasco. Após a purga o sistema é rapidamente tampado e lacrado.

No biorreator o processo é um pouco mais simples, pois o tubo do quadro de gases onde passa o nitrogênio é acoplado no engate rápido da válvula de saída de líquido, de forma que o gás passe pelo acesso de líquido e borbulhe o meio reacional. Para a purga ambas as válvulas precisam estar abertas conforme mostra a Figura 4.3.



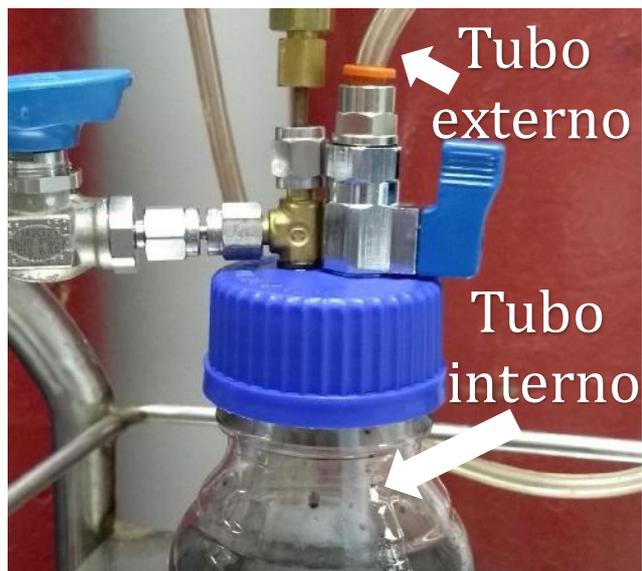
Figura 4.3: Purga do biorreator. Entrada de nitrogênio pela válvula à direita e a saída de gás pela válvula à esquerda.

#### 4.8. Amostragem de Líquido e Gás no Biorreator

As amostragens de gás ocorreram primeiro, pois a retirada de meio fermentativo alteraria a pressão interna. Portanto, a leitura da pressão foi feita ainda no Shaker e a amostragem de gás foi feita com uma ampola gasométrica ou com a saída de gás acoplada diretamente no micro CG.

As amostragens de líquido foram feitas por meio da saída de líquido no biorreator (Figura 4.4). Uma seção de tubo de PEAD foi acoplada no engate rápido da válvula e com uma seringa descartável foi possível coletar o líquido que estava dentro do tubo interno (volume de meio fermentativo). Essa amostra foi descartada, com o intuito de garantir uma amostra representativa do meio fermentativo, e mais 2 mL de meio foram retirados

e armazenados em microtubo. Além disso, a válvula foi aberta cuidadosamente para que não houvesse projeção do líquido interno devido à pressão interna.



*Figura 4.4: Saída de líquido para amostragem de líquido.*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Primeiro protótipo

O projeto do biorreator foi concebido buscando-se solucionar a maior parte dos problemas identificados no emprego dos frascos penicilina, e ainda viabilizar outros tipos de ensaios. A ideia principal era que o sistema fosse o mais versátil possível. Portanto, escolheu-se como reator o frasco reagente, pois para todos os tamanhos utilizados em laboratório a tampa é a mesma, o que favoreceria o trabalho com outros volumes de meio. Além disso, o frasco é preparado para suportar ensaios sob pressão e temperatura de até 140°C, possibilitando seu uso em diferentes ensaios.

Um dos grandes problemas de sistemas pressurizados consiste na garantia da estanqueidade do sistema. Uma solução descrita na literatura é a utilização de rolhas de silicone e tubos pneumáticos. Um sistema similar foi montado no laboratório (Figura 5.1) utilizando válvulas de duas vias em polipropileno e seringas para simular a amostragem de líquido e gás. Esse sistema mostrou alguns avanços na amostragem de hidrogênio apenas para baixas pressões (menos de 0,2 kgf/cm<sup>2</sup>). Para pressões um pouco mais elevadas a rolha escapou do frasco.



Figura 5.1: Primeiro protótipo de biorreator. I – Rolha de silicone. II - Extensão da saída de líquido, III - Seringas para coleta de líquido e gás. IV - Válvula de duas vias

Frente a esses problemas, optou-se pela utilização de tampas capazes de garantir a total estanqueidade do sistema.

### 5.2. Segundo protótipo

Com o intuito de solucionar as limitações do primeiro protótipo foram feitos alguns testes com a própria tampa do frasco reagente já que o mesmo possui uma tampa resistente e rosqueável. Adaptou-se a esta tampa um manômetro de 3 kgf/cm<sup>2</sup> e duas válvulas de plástico de duas vias, uma para saída de gás e outra para a saída de líquido (Figura 5.2). Como pode-se observar na imagem, o manômetro suportou pressões mais

elevadas e não apresentou vazamentos em nenhuma das conexões. Além disso, esse protótipo se mostrou eficiente para os testes sem agitação, mas em testes com agitação houve vazamento na rosca que unia o manômetro à tampa (apesar de haver vedação), pelo fato deste ser muito grande e não estar bem preso, propiciando alguns caminhos de passagem de gás.

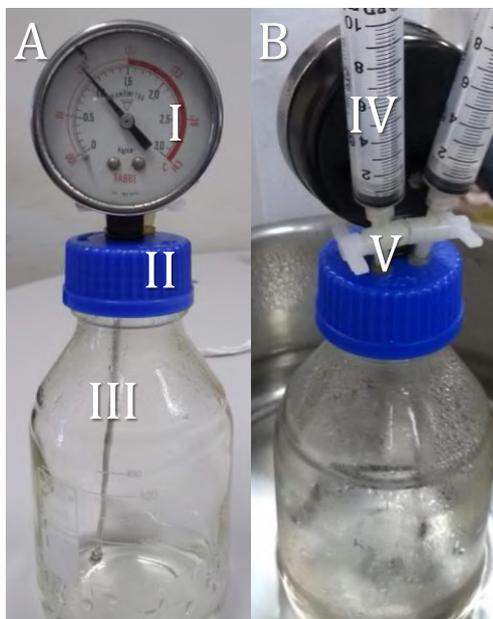


Figura 5.2: Segundo protótipo. Visão frontal (A) e visão posterior (B). I - Manômetro, II - Tampa do frasco reagente adaptada, III - Extensão da saída de líquido. IV - Seringas para coleta de líquido e gás. V - Válvula de duas vias.

À luz desses problemas identificados, partiu-se para um projeto mais robusto e menos suscetível a vazamentos.

### 5.3. Protótipo final

Apesar dos problemas identificados no segundo protótipo, toda a equipe pôde perceber o potencial que a utilização de um biorreator teria sobre os ensaios de fermentação. Por isso, o terceiro protótipo surgiu com a proposta de substituir definitivamente o frasco penicilina para alguns experimentos e ampliar a gama de ensaios que a equipe poderia executar. Para que isso se tornasse realidade, um projeto de biorreator, com peças comerciais e garantia de vedação, foi concebido junto ao corpo técnico da loja de conexões pneumáticas e com a colaboração de outros alunos de pós-graduação. Esse projeto consistiu na utilização de um manômetro menor e mais preciso, válvulas e conexões com encaixes apropriados. Um detalhamento dos materiais utilizados, bem como a descrição e a finalidade encontram-se nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Os dois primeiros protótipos foram montados utilizando materiais já existentes no laboratório, tais como: o manômetro que foi retirado de uma autoclave desativada, as válvulas que pertenciam a outro ensaio, além dos tubos e vedações. Para esse protótipo final cada item foi pensado de maneira que satisfizesse as exigências requeridas e que fosse robusto para suportar as exigências de agitação, pressão e temperatura.

O primeiro passo para se iniciar esse projeto foi recolher junto aos fabricantes as dimensões do frasco, da tampa, dos tipos de roscas que melhor se adaptariam às necessidades da equipe e as possíveis soluções existentes. Foram encontradas diversas soluções comerciais prontas, mas nenhuma delas atendia a todas as exigências, portanto partiu-se para o desenvolvimento do projeto. O esboço (Figura 5.3) foi desenhado muito mais para ilustrar e ter uma noção da disposição das conexões do que para ser um projeto da montagem do biorreator.

Com o intuito de ajustar as conexões na parte útil da tampa (espaço central que faz ligação com o interior do frasco) optou-se por reduzir as 3 saídas presentes no segundo protótipo para apenas duas e utilizar uma conexão T para a amostragem de gás. O maior desafio, antes de garantir a estanqueidade do sistema, consistiu na adaptação dessas conexões em uma área muito pequena (2,5 cm de diâmetro) que pertencia à área útil da tampa (Figura 5.3). Após alguns testes com diferentes tamanhos de roscas, as roscas de 1/8 de polegada foram mais apropriadas. Na Figura 5.4 pode-se conferir o protótipo final do biorreator.

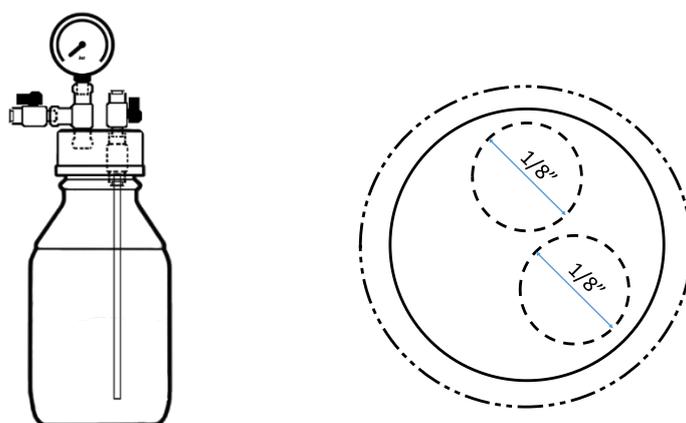


Figura 5.3: Imagem gerada a partir das dimensões fornecidas pelos fabricantes. Ilustração da vista superior da tampa do frasco reagente. O traço contínuo representa a área útil.



Figura 5.4: Biorreator finalizado. Em I - Manómetro, II - Conexão T. III - Válvula de gás. IV - Válvula de líquido. V - Extensão da saída de líquido em tubo de PEBD.

O sistema proposto nesse trabalho possibilita a medida da pressão em tempo real, retirada de amostras líquidas e gasosas e realimentação do sistema. Adicionalmente, o custo com peças e montagem é baixo, cerca de R\$ 170,00 e toda a montagem e testes de estanqueidades não levam mais do que um dia, além de ser um biorreator de fácil operação.

#### 5.4. Caracterização do Lodo Anaeróbio

O lodo foi coletado na estação de tratamento de esgoto em dezembro de 2017 e a quantidade de sólidos suspensos voláteis (SSV), que representa a quantidade de matéria orgânica no lodo e consiste numa estimativa indireta da quantidade de micro-organismos na cultura mista, foi de  $10,81 \pm 0,17$  g/L.

#### 5.5. Principais produtos líquidos da fermentação em biorreator e em frasco penicilina

Nos experimentos de fermentação foi observado o consumo de  $99,8 \pm 0,2$  % de glicerol para os ensaios em biorreator e de  $99,1 \pm 0,2$  % nos ensaios em frasco penicilina, tendo como principal produto o 1-3 propanodiol (PDO) com  $0,432 \pm 0,001$  g/L e  $0,444 \pm 0,005$  g/L, respectivamente.

Portanto, para ambos os ensaios houve consumo praticamente total de substrato; além disso, os principais produtos líquidos da fermentação, PDO e ácido butírico, foram produzidos em quantidades estatisticamente iguais em ambos os casos – utilizando o Teste t com intervalo de confiança de 95%. No entanto, para o ácido acético houve diferença, como pode ser visto na Figura 5.5, na qual as letras “B” são os valores estatisticamente iguais e as letras “A” os valores diferentes. O desvio padrão das análises em HPLC é da ordem de  $10^{-1}$  % e, portanto, no gráfico as barras de erro de algumas colunas não aparecem em detrimento da escala.

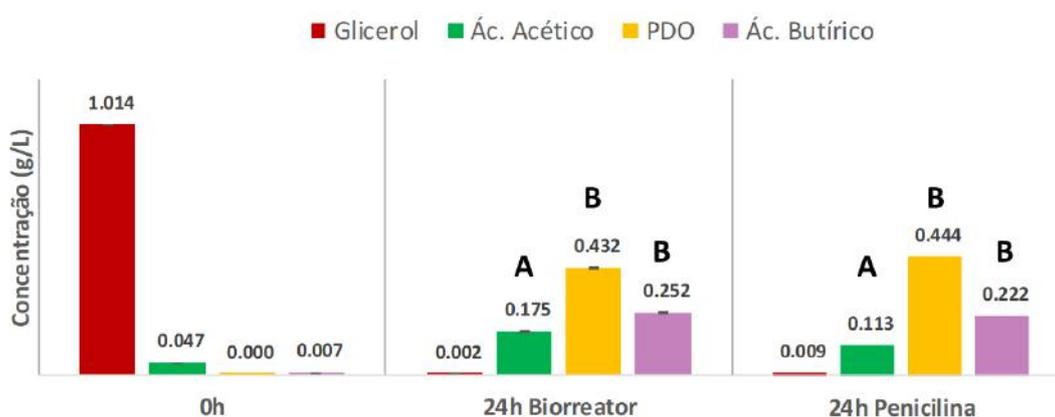


Figura 5.5: Gráfico em barras dos principais produtos líquidos da fermentação do glicerol nos tempos de zero horas e de 24 horas para o ensaio comparativo em biorreator e em frasco penicilina.

## 5.6. Rendimento dos principais produtos da fermentação

Os resultados de rendimento  $Y_{p/s}$  para os ensaios em biorreator e frasco penicilina estão resumidos na Figura 5.6, na qual as letras “B” são os valores estatisticamente iguais e as letras “A” os valores diferentes.

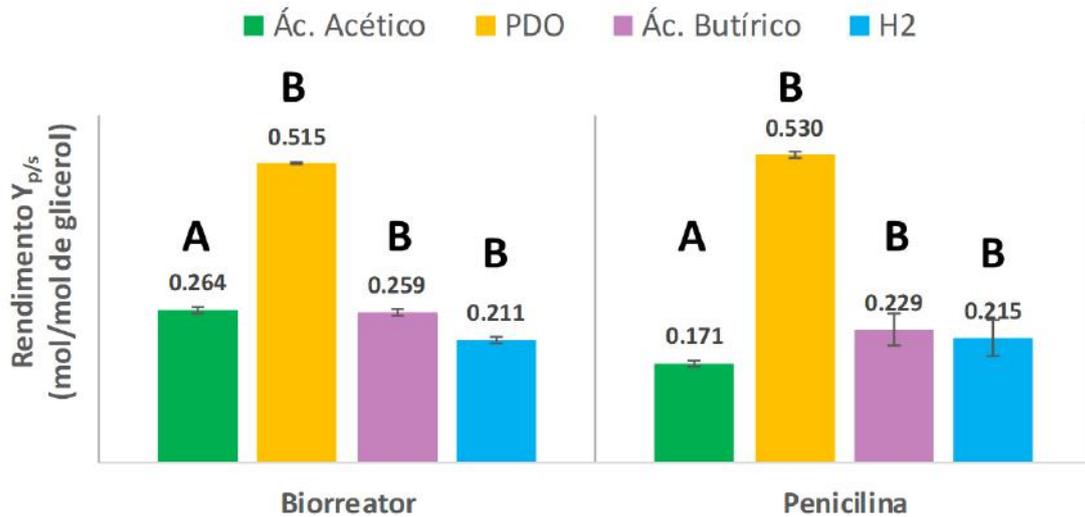


Figura 5.6: Rendimento  $Y_{p/s}$  para 24h de fermentação nos ensaios em batelada em biorreator e em frasco penicilina.

O rendimento  $Y_{p/s}$  para a fermentação conduzida em biorreator e em frasco penicilina para os principais produtos líquidos da fermentação resultaram em rendimentos estatisticamente iguais em ambos – utilizando o Teste t com intervalo de confiança de 95%. No entanto, para o ácido acético houve diferença estatística.

No presente trabalho o rendimento atingiu 0,21 mol de hidrogênio por mol de glicerol, enquanto na literatura são relatados resultados entre 0,34 e 1,21 mol de  $H_2$  por mol de glicerol. Essa menor produção provavelmente ocorreu devido a não otimização do processo, tais como pré-tratamento, pH, suplementação de nutrientes e quantidade de microrganismos. Portanto, foi possível verificar o potencial do biorreator, que já utilizado pela equipe em outros projetos com biogás e mais quatorze unidades do mesmo biorreator estão em fase de preparação.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os ensaios executados, foram obtidas as seguintes conclusões:

- Os testes de estanqueidade do biorreator funcionaram bem, pois não se registrou vazamento de gases durante a fermentação;
- A partir dos resultados das análises de hidrogênio e dos produtos em meio líquido da fermentação foi possível validar o biorreator;
- As fermentações em frasco penicilina e em biorreator foram praticamente iguais, tendo em vista que a pequena diferença observada na produção de ácido acético não é significativa para um intervalo de confiança de 95%;
- Comparativamente, os resultados de rendimento de hidrogênio por mol de substrato obtidos foram menores que os registrados na literatura devido a não otimização do processo.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se prosseguir este trabalho da seguinte forma:

- ❖ Executar um estudo cinético e sistematizar os cálculos com base nas variações de pressão observadas no manômetro;
- ❖ Planejar ensaios em modo semi-contínuo;
- ❖ Estudar a viabilidade de “*scale up*” do biorreator, variando-se apenas o volume do frasco reagente;
- ❖ Avaliar a produção sequencial de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>.

## REFERÊNCIAS

- ABDESHAHIAN, P. et al. **The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 39, n° 24, p. 12524–12531, 2014. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.05.081.
- ALAM, M. Z.; HANID, N. A. **Development of indigenous biofilm for enhanced biogas production from palm oil mill effluent.** *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, [s.l.], v. 39, n° 1, p. 1–8, 2017. ISSN: 22897879.
- ARGUN, H.; DAO, S. **Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 4, p. 2569–2574, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.06.225.
- ARTUR, Y. **BIOGÁS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: PANORAMA E PERSPECTIVAS.** In: *Biogás / BNDES Setorial*. [s.l.]: [s.n.], 2018.
- CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. **Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 40, n° 24, p. 7433–7438, 2015. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.02.133.
- CHUAH, L. F. et al. **A review of cleaner intensification technologies in biodiesel production.** *Journal of Cleaner Production*, [s.l.], v. 146, p. 181–193, 2017. ISSN: 09596526, DOI: 10.1016/j.jclepro.2016.05.017.
- COIMBRA-ARAÚJO, C. H. et al. **Brazilian case study for biogas energy: Production of electric power, heat and automotive energy in condominiums of agroenergy.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s.l.], v. 40, p. 826–839, 2014. ISSN: 13640321, DOI: 10.1016/j.rser.2014.07.024.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. **Application of solid-state fermentation to food industry-A review.** *Journal of Food Engineering*, [s.l.], v. 76, n° 3, p. 291–302, 2006. ISSN: 02608774, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
- DELGROSSI BARROS, TALITA ; GILBERTO JARDINE, J. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Transesterificação.** 2019. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj0847od02wyiv802hvm3juldruvi.html>>. Acesso em: 29/nov./19.
- EBA. **EBA Statistical Report.** *European Biogas Association*, [s.l.], 2017.
- EEL, U. **Biorreatores.** 2009. Disponível em: <[debiq.eel.usp.br/~amrprata/Biorreatores.ppt](http://debiq.eel.usp.br/~amrprata/Biorreatores.ppt)>.
- ESTATÍSTICO - ANP, A. **ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS.** 2018. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018>>.
- FABER, M. de O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. **Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production.** *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 219, p. 365–370, 2016. ISSN: 18732976, DOI:

10.1016/j.biortech.2016.07.141.

FERREIRA-LEITÃO, V. S. et al. **Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 38, n° 7, p. 2986–2997, 2013. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.

FRANCISCO WASHINGTON, S.; AUCKLAND BOGOTÁ CARACAS LISBON LONDON MADRID MEXICO CITY MILAN MONTREAL NEW DELHI SAN JUAN, D.; PERRY, R. H. **McGraw-Hill New York.** [s.l.]: [s.n.], 1997. ISBN: 0070498415.

GOKFILIZ-YILDIZ, P.; KARAPINAR, I. **Optimization of particle number, substrate concentration and temperature of batch immobilized reactor system for biohydrogen production by dark fermentation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 43, n° 23, p. 10655–10665, 2018. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.01.036.

HADI, M. R.; SHARIATI, M.; AFSHARZADEH, S. **Microalgal biotechnology: Carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, [s.l.], v. 13, n° 5, p. 540–544, 2008. ISBN: 1225700701, ISSN: 12268372, DOI: 10.1007/s12257-007-0185-7.

HAMILTON, C. et al. **Effect of the nitrogen source on the hydrogen production metabolism and hydrogenases of *Clostridium butyricum* CWBI1009.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 43, n° 11, p. 5451–5462, 2018. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.12.162.

HILIGSMANN, S. et al. **Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria.** *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 102, n° 4, p. 3810–3818, 2011. ISSN: 09608524, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.094.

\_\_\_\_\_. **Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc-like anaerobic reactors with biomass retention.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 39, n° 13, p. 6899–6911, 2014. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.02.139.

JÁUREGUI, M. A.; LADINO, A.; MALAGÓN-ROMERO, D. **The effect of the initial concentration of glycerol on the hydrogen produced by strains of the genus *Clostridium* spp.** *International Journal of Sustainable Engineering*, [s.l.], v. 11, n° 3, p. 205–210, 2018. ISSN: 19397046, DOI: 10.1080/19397038.2017.1387826.

KESKIN, T. et al. **Effect of percolation frequency on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes by dry fermentation.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 44, n° 34, p. 18767–18775, 2019. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.12.099.

KONDAVEETI, S. et al. **Co-generation of hydrogen and electricity from biodiesel process effluents.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 44, n° 50, p. 27285–27296, 2019. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.08.258.

KURAHASHI, K. et al. **Analysis of the Continuous Bioconversion of Glycerol by Promotion of Highly Glycerol-Resistant Glycerol-Degrading Bacteria.** *Waste and*

*Biomass Valorization*, [s.l.], v. 0, n° 0, p. 1–10, 2018. ISBN: 0123456789, ISSN: 1877265X, DOI: 10.1007/s12649-018-0344-4.

LOGAN, B. E. et al. **Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers.** *Environmental Science and Technology*, [s.l.], v. 36, n° 11, p. 2530–2535, 2002. ISSN: 0013936X, DOI: 10.1021/es015783i.

MAINTINGUER, S. I. et al. **Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 1, p. 152–160, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.11.104.

MAMIMIN, C. et al. **Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogen process for biohythane production from palm oil mill effluent.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 40, n° 19, p. 6319–6328, 2015. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.03.068.

MARIANI, L. **Biogás: diagnóstico e propostas de ações para incentivar seu uso no Brasil.** [s.l.], p. 144, 2018.

MDIC/COMEXSTAT. **No Title.** 2019. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br>>.

MIGUEL, M. et al. **PRESIDENTE DA REPÚBLICA DIRETORA-GERAL MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS.** [s.l.]: [s.n.], [s.d.].

MIRANDA, P. E. V. De. **O alvorecer da energia de hidrogênio.** [s.l.], 2017.

MISHRA, P. et al. **Fermentative hydrogen production from indigenous mesophilic strain *Bacillus anthracis* PUNAJAN 1 newly isolated from palm oil mill effluent.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 25, p. 16054–16063, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.05.120.

MITCHELL, D. A.; SRINOPHAKUN, P. et al. **Group II bioreactors: Forcefully-aerated bioreactors without mixing.** *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*, [s.l.], p. 77–94, 2006. ISBN: 3540312854, DOI: 10.1007/3-540-31286-2\_7.

MITCHELL, D. A.; STUART, D. M. et al. **Group III: Rotating-drum and stirred-drum bioreactors.** *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. [s.l.]: [s.n.], 2006. ISBN: 3540312854, DOI: 10.1007/3-540-31286-2\_8.

MORENO, R. et al. **Biohydrogen production from lactose: Influence of substrate and nitrogen concentration.** *Environmental Technology (United Kingdom)*, [s.l.], v. 36, n° 19, p. 2401–2409, 2015. ISSN: 1479487X, DOI: 10.1080/09593330.2015.1032365.

NOBLECOURT, A. et al. **Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes.** *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 247, n° July 2017, p. 864–870, 2018. ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.199.

OMEGA. **Flow meters | What is & How it Works | Omega Engineering.** 2019. Disponível em: <<https://www.omega.com/en-us/resources/flow-meters>>. Acesso em: 25/out./19.

PRINZHOFER, A. et al. **Natural hydrogen continuous emission from sedimentary basins: The example of a Brazilian H<sub>2</sub> -emitting structure.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 44, n° 12, p. 5676–5685, 2019. ISSN: 03603199, DOI:

10.1016/j.ijhydene.2019.01.119.

PRINZHOFER, A.; TAHARA CISSÉ, C. S.; DIALLO, A. B. **Discovery of a large accumulation of natural hydrogen in Bourakebougou (Mali).** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 43, n° 42, p. 19315–19326, 2018. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.08.193.

SÁ, L. R. V. DE; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. **Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais Brasileiros.** *Quimica Nova*, [s.l.], v. 37, n° 5, p. 857–867, 2014. ISSN: 16787064, DOI: 10.5935/0100-4042.20140138.

SALLES, P. **Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** [s.l.], p. 86, 2013.

SANTOMASO, A.; OLIVI, M.; CANU, P. **Mechanisms of mixing of granular materials in drum mixers under rolling regime.** *Chemical Engineering Science*, [s.l.], v. 59, n° 16, p. 3269–3280, 2004. ISSN: 00092509, DOI: 10.1016/j.ces.2004.04.026.

SANTOS, D. **Revisão.** *Resíduos agroindustriais*, [s.l.], v. 37, n° 5, p. 857–867, 2014.

SARMA, S. et al. **Homologous overexpression of hydrogenase and glycerol dehydrogenase in Clostridium pasteurianum to enhance hydrogen production from crude glycerol.** *Bioresource Technology*, [s.l.], p. 168–177, 2019. ISSN: 18732976, DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.074.

SARMA, S.; DUBEY, V. K.; MOHOLKAR, V. S. **Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using Clostridium pasteurianum.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 41, n° 44, p. 19972–19989, 2016. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.08.204.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K. et al. **A novel anaerobic two-phase system for biohydrogen production and in situ extraction of organic acid byproducts.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, [s.l.], v. 38, n° 6, p. 1097–1102, 2015. ISSN: 16157605, DOI: 10.1007/s00449-015-1352-4.

SARMA, S. J.; PACHAPUR, V. et al. **Hydrogen biorefinery: Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s.l.], v. 50, p. 942–951, 2015. ISSN: 18790690, DOI: 10.1016/j.rser.2015.04.191.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia Industrial Engenharia Bioquímica.** *edgar blücher*. [s.l.]: [s.n.], 2001. ISBN: 9788578110796, ISSN: 18238262, DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

SEKOAI, P. T.; GUEGUIM KANA, E. B. **A two-stage modelling and optimization of biohydrogen production from a mixture of agro-municipal waste.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 38, n° 21, p. 8657–8663, 2013. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.04.130.

SELEMBO, P. A. et al. **Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures.** *Biotechnology and Bioengineering*, [s.l.], v. 104, n° 6, p. 1098–1106, 2009. ISBN: 1097-0290 (Electronic)n0006-3592 (Linking), ISSN: 00063592, DOI: 10.1002/bit.22487.

SINGH, L. et al. **Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized *Clostridium butyricum* EB6 in polyethylene glycol.** *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 48, n° 2, p. 294–298, 2013. ISSN: 13595113, DOI: 10.1016/j.procbio.2012.12.007.

TRCHOUNIAN, K. et al. **Glycerol and mixture of carbon sources conversion to hydrogen by *Clostridium beijerinckii* DSM791 and effects of various heavy metals on hydrogenase activity.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 12, p. 7875–7882, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.01.011.

TRCHOUNIAN, K.; POLADYAN, A.; TRCHOUNIAN, A. **Enhancement of *Escherichia coli* bacterial biomass and hydrogen production by some heavy metal ions and their mixtures during glycerol vs glucose fermentation at a relatively wide range of pH.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 10, p. 6590–6597, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.02.003.

VACQUAND, C. et al. **Reduced gas seepages in ophiolitic complexes: Evidences for multiple origins of the H<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>-N<sub>2</sub> gas mixtures.** *Geochimica et Cosmochimica Acta*, [s.l.], v. 223, p. 437–461, 2018. ISSN: 00167037, DOI: 10.1016/j.gca.2017.12.018.

VIANA, M. B. et al. **The Source of Inoculum and the Method of Methanogenesis Inhibition Can Affect Biological Hydrogen Production from Crude Glycerol.** *Bioenergy Research*, [s.l.], 2019. ISSN: 19391242, DOI: 10.1007/s12155-019-09994-5.

WANG, J.; YIN, Y. **Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 8, p. 4804–4823, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.01.135.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. **A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s.l.], v. 34, p. 471–482, 2014. ISSN: 13640321, DOI: 10.1016/j.rser.2014.03.008.

WOOSHIN PARK, SEUNG H. HYUN, SANG-EUN OH, BRUCE E. LOGAN, I. S. K. **Removal of Headspace CO<sub>2</sub> Increases Biological Hydrogen Production.** *Environ. Sci. Technol.*, [s.l.], v. 39, p. 4416–4420, 2005. DOI: 10.1021/es048569d.

YIN, Y.; WANG, J. **Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production.** *International Journal of Hydrogen Energy*, [s.l.], v. 42, n° 17, p. 12173–12180, 2017. ISSN: 03603199, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.02.083.