



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017014811-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017014811-4

(22) Data do Depósito: 10/07/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 22/01/2019

(51) Classificação Internacional: C12P 3/00; C12R 1/00; C12N 1/22.

(54) Título: PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DA NOPALEA COCHENILLIFERA (PALMA FORRAGEIRA) EM REATORES ANAERÓBIOS DESCONTÍNUOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM; STEPHANE LIMA PEREIRA DE ANDRADE; EMMANUELLE DE SOUZA BALBINO; GABRYEL PONTES LIMA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/07/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 01/04/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório descritivo da patente de invenção para **“Produção de biohidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) em reatores anaeróbios descontínuos”**

[001] O objetivo da presente patente de invenção é produzir hidrogênio a partir da utilização da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira). A utilização dessa biomassa pré-hidrolisada presente em maior quantidade no semiárido alagoano e pernambucano surge como alternativa para a produção de energia renovável e minimização de impactos ambientais gerados pelo seu descarte incorreto, e também do inóculo de efluente de suinocultura utilizado nos reatores. O procedimento consiste em obtenção e preparo da biomassa antes de colocá-la nos reatores, utilização de pré-tratamentos alcalino (NaOH) ou ácido (HCl), pré-tratamento térmico do inóculo, incubação e cromatografia gasosa.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[002] Com o crescimento da população a demanda por fontes de energia aumenta cada vez mais, despertando a necessidade de substituição dos combustíveis fósseis devido ao seu esgotamento, por fontes de energia renováveis que satisfaçam as necessidades energéticas globais além de contribuir com a minimização dos impactos ambientais provocados pela combustão de matérias como carvão, petróleo e gás natural (HAN, W; LIU, D. N; SHI, Y. W; TANG. J. H; LI, Y. F; REN, N. Q. Biohydrogen production from food waste hydrolysate using continuous mixed immobilized sludge reactors. Bioresource Technology, Hangzhou, v.180, p. 54-58, 2015).

[003] Como alternativa para fonte de energia limpa aparece o gás hidrogênio devido à sua abundância no planeta, alto rendimento energético e também por sua combustão gerar apenas água como produto. Para a obtenção do hidrogênio existem vários métodos, entre eles citam-se: processos físicos, químicos e também os biológicos, tais como fermentação anaeróbia e foto-fermentação, que ocasionam menos impactos ambientais e necessitam de menos energia para a produção do gás, o que diminui o custo do processo (KUMAR, G; BAKONYI, P; PERIYASAMY, S; KIM, S. H; NEMESTÓTHY, N; BÉLAFI-BAKÓ, K.

Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Gyeongbuk, v.44, p. 728-737, 2015).

[004] No entanto, a fermentação anaeróbia ainda apresenta vantagens em relação aos outros processos: simplicidade de execução, taxas mais altas de produção de hidrogênio e utilização de resíduos de baixo valor como matérias-primas. Entre essas matérias-primas que podem ser utilizadas destacam-se os resíduos de biomassa verde, principalmente por serem uma rica fonte de carboidrato e além disso, pelas altas quantidades que são geradas anualmente desse tipo de resíduo, estando por volta de 220 bilhões de toneladas (CUI, M; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. Science Direct, Beijing, v.37, p. 1120-1124, 2012).

[005] Os resíduos de biomassa verde envolvem materiais como: grama, palha de coqueiro, folhas em geral e espécies de plantas como a palma forrageira. São compostos em sua maior parte pela celulose, hemicelulose e a lignina (Figura 1). A celulose é o principal polímero presente nessas matérias, apresentando em sua composição a glicose (RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010).

[006] Já a hemicelulose promove a ligação entre a lignina e a celulose, apresentando em sua estrutura pentoses e hexoses. Tanto a celulose como a hemicelulose apresentam unidades de açúcares que beneficiam a produção de hidrogênio a partir da utilização da biomassa verde (KUMAR, G; BAKONYI, P; PERIYASAMY, S; KIM, S. H; NEMESTÓTHY, N; BÉLAFI-BAKÓ, K. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Gyeongbuk, v.44, p. 728-737, 2015).

[007] A lignina é o segundo polímero em maior quantidade presente nos vegetais (ficando atrás apenas da celulose), é uma estrutura recalcitrante que dificulta o acesso aos carboidratos da biomassa lignocelulósica por apresentar uma degradação difícil e também por existir uma pequena quantidade de organismos capazes de promover essa degradação, essa característica faz com que seja necessário a aplicação de tecnologias que otimizem a geração de H₂ tentando diminuir os efeitos provocados por esse interferente (KUMAR, G; BAKONYI, P; PERIYASAMY, S; KIM, S. H; NEMESTÓTHY, N; BÉLAFI-BAKÓ, K. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Gyeongbuk, v.44, p. 728-737, 2015).

[008] Apesar das baixas taxas de H₂ produzidas através desse tipo de resíduo, vários estudos têm sido realizados com o intuito de contornar essa dificuldade. A partir disso são aplicados os mais diversos tipos de tecnologias de pré-tratamento antes da fermentação, sejam eles de natureza física, química, físico-químicas, térmicas ou biológicas (BUNDHOO, M. A. Z; MOHEE, R; HASSAN, M. A. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. Journal of Environmental Management, Réduit, v.157, p. 20-48, 2015).

[009] É importante citar que esses pré-tratamentos necessitam de energia para funcionar, o que pode aumentar o preço do procedimento, além de apresentarem como desvantagem a produção de compostos inibidores da fermentação, como os manômeros fenólicos, derivados de furano e o ácido acético.

[010] Levando-se em conta a importância de utilização de novas fontes de energia renovável e reutilização dos resíduos gerados mundialmente, é de grande necessidade o aprimoramento das técnicas utilizadas para determinados fins, no que diz respeito à fermentação anaeróbia da biomassa lignocelulósica e os pré-tratamentos utilizados para aumentar o rendimento de H₂, de forma que seja possível obter um maior controle dos sub-produtos gerados no processo (SIQUEIRA, M. R; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by

hydrolysis by products of lignocellulosic substrates. Renewable Energy, Ribeirão Preto, v. 80, p. 109-116, 2015).

[011] A biomassa lignocelulósica utilizada nesse trabalho foi a palma forrageira (*nopalea cochenillifera*) e para o promover o seu tratamento foi utilizado o reator anaeróbio em batelada, que apresenta alta eficiência para a produção de hidrogênio devido à boa conversão do substrato e tempos de detenção curtos.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[012] A utilização do processo da digestão anaeróbia para produzir energia renovável a partir da biomassa verde (*nopalea cochenillifera*) e tratar o efluente que seria descartado de forma incorreta no meio ambiente, atua no campo da Engenharia Sanitária.

ESTADO DA TÉCNICA

[013] A *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) é utilizada em sua maior parte para alimentação de ruminantes, principalmente por ser um tipo de vegetal típico das regiões semiáridas que se adapta bem ao clima seco e à escassez de água, suprimindo as necessidades nutricionais dos animais. Porém, quando essa biomassa lignocelulósica é utilizada como fonte de carboidratos para a produção de energia renovável a partir do gás hidrogênio, encontram-se poucos trabalhos que estudam o seu uso para essa finalidade. Seguem alguns estudos a respeito da produção de hidrogênio utilizando como substrato algum tipo de biomassa lignocelulósica, porém com metodologias diferentes da que foi utilizada nesse trabalho:

[014] PATENTE BR 102015030118-9 A2: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO (H₂) E USO DE PELO MENOS UMA FONTE DE CARBONO E DE PELO MENOS UMA FONTE DE NITROGÊNIO. Vale S/A, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG, Universidade Federal de Uberlândia- UFU. BATISTA, F.R.X; CARDOSO, V. L; OLIVEIRA, T.V; FERREIRA, J. S. Depósito em 01/12/2015 e Publicação em 06/06/2017.

[015] Refere-se a um processo de produção de gás hidrogênio (H₂), por fotofermentação de cepas de bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS), em que

se utiliza pelo menos uma fonte de carbono e pelo menos uma fonte de nitrogênio como substratos. Refere-se também ao uso destas fontes de carbono e nitrogênio na produção de gás hidrogênio (H₂) por fotofermentação de cepas de bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS).

[016] Porém, sabe-se que a fotofermentação apresenta como principal fator limitante a necessidade da luz para que os microrganismos possam degradar a matéria orgânica e produzir a energia renovável, o que se torna um problema principalmente pela dificuldade de incidência da luz dentro dos reatores.

[017] PATENTE BR 10 2012 031841-5 A2: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E/OU AMILÁCEA. BRAERG - Grupo Brasileiro de Pesquisas Especializadas LTDA. MARQUES, D.S; MARQUES, M.S. Depósito em 13/12/2012 e Publicação em 23/09/2014.

[018] Descreve um processo de obtenção de biocombustível a partir de biomassa lignocelulósica e/ou amilácea, através da fermentação em pelo menos uma etapa, mediante utilização de um consórcio de microrganismos, para obtenção de açúcares que posteriormente são transformados em álcoois, utilizando métodos ambientalmente amigáveis e economicamente viáveis, em contrapartida às práticas convencionais de hidrólise ácida e hidrólise enzimática.

[019] Apesar dos vários tipos de pré-tratamentos existentes, tem-se que um dos mais eficientes já estudados são os que envolvem a inserção de ácidos, como por exemplo: ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido acético, e também os que envolvem a aplicação de bases, como: NaOH, amônia e Ca(OH)₂ (KUMAR, G; BAKONYI, P; PERIYASAMY, S; KIM, S. H; NEMESTÓTHY, N; BÉLAFI-BAKÓ, K. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Gyeongbuk, v.44, p. 728-737, 2015). Logo, o pré-tratamento biológica não é tão eficiente como esses, além disso poucos microrganismos conseguem realizar a degradação da lignina.

[020] PATENTE PI 0718757-2 A2: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO. Universitât Duisburg-Essen. RAABE, M; KRUPP, M; WIDMANN, R; BRUNSTERMANN, R. Depósito em: 13/11/2007 e Publicação em 03/12/2013.

[021] Refere-se a um processo para a produção de hidrogênio a partir de uma substância biogênica, especialmente resíduo. Bactérias formadoras de esporos degradam a substância biogênica de forma anaeróbia e no escuro, sendo produzido hidrogênio. Sendo possível obter uma separação ou produção de hidrogênio muito efetiva pelo fato, de que as bactérias são aquecidas pelo menos, por pouco tempo de tal maneira que as bactérias formadoras de metano são mortas. Alternativamente ou adicionalmente, as bactérias são enxaguadas com oxigênio ou ar, para estimular a produção do hidrogênio e/ou para suprimir bactérias formadoras de metano.

[022] Na patente presente não há a necessidade de enxaguar as bactérias com oxigênio, pois o tratamento térmico realizado no inóculo demonstrou-se eficiente para a eliminação da atividade metanogênica, o que torna o processo da produção de hidrogênio mais simples.

[023] PATENTE BR 102015024183-6 A2: PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE NOPALEA COCHENILIFERA POR TRATAMENTOS QUÍMICOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. ALMEIDA, R. M. R. G; SILVA, M. C. S; SILVA, C.E.F; VIEIRA, R.C; OLIVEIRA, J. H. S; SOARES, E.L.S; ANTUNES; D.P.C; ROCHA, M.S.R.S; GOMES, M.A. Depósito em 21/09/2015 e Publicação em 28/03/2017.

[024] O objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade da produção do etanol a partir da palma forrageira *Nopalea cochenillifera*. A biomassa foi submetida a dois tipos de pré-tratamentos, através de planejamento experimental, utilizando-se H₂SO₄ e NaOH diluídos, ambos com concentração de 0,25 e 0,75%, massa de biomassa de 1,5g e 4,5g, e tempo de 5 e 15 min. Os pré-tratamentos foram realizados em reator tipo autoclave, à 120°C/1atm.

[025] Foram utilizadas culturas de bactérias puras, porém, estas são mais sensíveis às contaminações, o que demanda, na maioria dos casos, um maior cuidado no processo e aumento de custo global do mesmo.

[026] Já as culturas mistas que foram utilizadas no presente trabalho, possibilitam um custo menor do processo, pois é possível utilizá-las a partir de

fontes naturais, tais como solo, lodo de estação de tratamento de efluentes, excreta de animais e compostos ou através de certos resíduos (SÁ, L. R. V. Produção Biológica de Hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro-Rio de Janeiro, 2011).

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

Problema	Soluções
Resíduos líquidos	Tratamento de dejetos líquidos e geração de produtos com valor agregado (biogás e biofertilizante)
Método construtivo	Simplicidade e materiais de baixo custo.
Operação	Simplicidade operacional, sem necessidade de mão de obra especializada; Baixo custo operacional, caracteriza-se por ser uma energia explorada a baixo custo, com tecnologia simples;
Impacto social	Reduz a demanda por combustíveis fósseis para a produção de energia elétrica; Valoriza financeiramente a palma forrageira (<i>nopalea cochenillifera</i>) devido à sua utilização como fonte de energia renovável ser pouco explorada atualmente, contribuindo com a economia de regiões em sua maioria de baixa renda per capita ocasionada pela escassez de água.
Impactos ambientais	Diminui o descarte incorreto de efluente de suinocultura que possuem alto poder de degradação ambiental); Utiliza um recurso renovável (biomassa lignocelulósica) como fonte para a produção da energia limpa;

	Reduz os impactos ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis para gerar energia.
Economia	Reduz o custo com energia elétrica

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[027] Figura 1- Estrutura dos materiais lignocelulósicos.

[028] Figura 2- Produção acumulada de hidrogênio do reator com a biomassa sem pré-tratamento.

[029] Figura 3- Produção acumulada de hidrogênio do reator 1% (HCl).

[030] Figura 4- Produção acumulada de hidrogênio do reator 0,5% (NaOH).

[031] Figura 5- Produção acumulada de hidrogênio do reator com 2,5 g (1% m/v).

[032] Figura 6- Produção acumulada de hidrogênio do reator 8,5 g (3,4% m/v).

[033] Figura 7- Produção acumulada de hidrogênio do reator 2,5 g (1% m/v).

[034] Figura 8- Produção acumulada de hidrogênio do reator 8,5 g (3,4% m/v).

[035] Figura 9- Produção acumulada de hidrogênio utilizando lodo de efluente de suinocultura 5% (v/v).

[036] Figura 10- Produção acumulada de hidrogênio utilizando lodo de efluente de suinocultura 20% (v/v).

[037] Figura 11- Fluxograma do procedimento experimental do trabalho.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[038] A Figura 11 ilustra o procedimento experimental do trabalho para facilitar o entendimento. Antes de iniciar o processo da digestão anaeróbia para produzir o hidrogênio foram realizados os seguintes procedimentos para montar os reatores:

[039] Coleta, secagem e trituração da biomassa;

[040] Coleta e pré-tratamento térmico dos inóculos de estação de tratamento de esgoto sanitário ETE e efluente de suinocultura.

[041] Preparo das soluções de HCl/NaOH com diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% v/v).

[042] Correção do pH inicial do afluente para 7,0;

[043] Caracterização do afluente;

[044] Borbulhamento de nitrogênio nos reatores;

[045] Incubação no shaker com agitação de 120 rpm;

[046] Cromatografia gasosa;

[047] Caracterização do efluente.

Biomassa lignocelulósica e pré-tratamento

[048] A *nopalea cochenillifera* foi colocada em uma estufa por um período de aproximadamente sete dias sob uma temperatura de 50°C para que fosse possível obter a massa seca da biomassa, e só então, ser triturada e colocada nos reatores. Já para a realização do pré-tratamento da biomassa foram preparadas soluções ácidas e alcalinas em diferentes concentrações para que otimizassem o processo da sacarificação da biomassa, consequentemente, aumentando o acesso aos carboidratos da *nopalea cochenillifera* ocasionado pela quebra da lignina.

[049] As concentrações escolhidas do HCl/NaOH, a agitação de 120 rpm e o pH inicial de 7,0 utilizados na realização desse trabalho foi escolhida de acordo com a metodologia adotada por (CUI, M; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. Science Direct, Beijing, v.37, p. 1120-1124, 2012) que também tinham como objetivo produzir hidrogênio a partir de uma biomassa lignocelulósica.

Inóculo e pré-tratamento

[050] Foi realizado um pré-tratamento térmico nos dois tipos de inóculos que foram utilizados, esse tipo de pré-tratamento foi escolhido devido à eficiência já demonstrada em estudos anteriores (SHARMA, Y; LI, B. Optimizing hydrogen

production from organic wastewater treatment in batch reactors through experimental and kinetic analysis. *Internacional Journal of Hidrogen Energy*, Storrs, v. 34, p. 6171- 6180, 2009).

[051] O pré-tratamento térmico ocorre de forma simples: coloca-se o inóculo em um aquecedor até que se atinja a temperatura de 90°, quando a temperatura é atingida mantém-se por 15 min, em seguida resfria-se o inóculo até que se obtenha a temperatura de 25° (MAINTINGUER, S. I; FERNANDES, B. S; DUARTE, I. C. S; SAAVEDRA, N. K; ADORNO, M. A. T; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, São Carlos, v. 36, p. 13508-13517, 2011).

Biomassa lignocelulósica e pré-tratamento

[052] A proporção inicial de palma utilizada nos reatores foi de 1g de palma forrageira seca para 20 mL de solução aquosa, sendo que foi realizado um ajuste no pH inicial da mistura para 7,0 utilizando diluições de NaOH ou HCl (CUI, M; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. *Science Direct*, Beijing, v.37, p. 1120-1124, 2012).

[053] Foram avaliadas as influências de pré-tratamentos (ácido e alcalino) para sacarificação da biomassa lignocelulósica e conseqüentemente produção de hidrogênio. É importante citar que o pré-tratamento de resíduos de biomassa verde utilizando ácido (HCl) ou base (NaOH) é um dos métodos mais eficazes para aumentar o rendimento de hidrogênio, o que justificou a escolha dos mesmos para o desenvolvimento do trabalho (CUI, M; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. *Science Direct*, Beijing, v.37, p. 1120-1124, 2012).

[054] Os resultados obtidos após a aplicação dos pré-tratamentos foram comparados aos resultados alcançados sem a aplicação de pré-tratamentos para saber qual concentração de ácido (ou base) é mais eficiente para degradar

a lignina, e consequentemente, extrair a maior quantidade de carboidratos da biomassa lignocelulósica. As soluções de ácido (ou base) utilizadas para tratar a biomassa tiveram as seguintes concentrações: 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% (v/v).

Análises físico-químicas

[055] A Tabela 1 apresenta as análises laboratoriais que foram realizadas no decorrer do trabalho para o controle operacional dos reatores utilizados e as respectivas metodologias que foram adotadas para execução das mesmas. Vale ressaltar que a caracterização das amostras foi realizada antes e depois da aplicação dos pré-tratamentos, com exceção do volume de hidrogênio produzido que foi acompanhado diariamente enquanto estava sendo realizada a cromatografia gasosa.

Tabela 1- Ensaios de caracterização realizados para o controle operacional dos reatores

Análise	Metodologia	Frequência
pH		
DQO		
Sólidos (sólidos totais – ST, sólidos suspensos totais – SST, sólidos suspensos voláteis – SSV)	APHA: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).	Inicial e Final
	Medidor MilliGascounter (Ritter)	2xdia
Hidrogênio	Cromatografia gasosa (MODELO)	
Ácidos Orgânicos Voláteis e Alcoóis	Cromatografia gasosa (MODELO)	Final
Carboidratos	Dubois <i>et al.</i> (1956)	Inicial e Final

Fonte: Silva (2014)

Método analítico

[056] Os componentes do biogás coletados no headspace dos reatores em batelada, CH₄ e também o H₂, foram determinados através da utilização de um cromatógrafo de gás, equipamento esse que possui um detector de

condutividade térmica e uma coluna (Supelco Carboxen 1010 Plot) com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm. Para realizar o processo, é necessário injetar amostras gasosas coletadas no headspace dos reatores utilizando uma seringa de vidro, na coluna cromatográfica.

[057] O Argônio foi utilizado como o gás de transporte a uma taxa de fluxo de 30 mL / min (MAINTINGUER, S. I; FERNANDES, B. S; DUARTE, I. C. S; SAAVEDRA, N. K; ADORNO, M. A. T; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. International Journal of Hydrogen Energy, São Carlos, v. 36, p. 13508-13517, 2011). Em cada intervalo, o volume total de produção de biogás foi medido por um método de deslocamento de êmbolo usando uma seringa de vidro de 100 µL. O volume acumulado de hidrogênio foi calculado pela Equação 1:

Equação 1

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + CH,i(V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_{H,0}(CH,i - CH,i-1) \quad (1)$$

[058] Onde,

[059] $V_{H,i}$ = volume de hidrogênio acumulado no tempo atual;

[060] $V_{H,i-1}$ = volume de hidrogênio acumulado no tempo anterior;

[061] CH,i = volume de hidrogênio acumulado no headspace do recipiente no tempo atual;

[062] $CH,i-1$ = volume de hidrogênio acumulado no headspace do recipiente no tempo anterior;

[063] $V_{G,i}$ = volume total de biogás no tempo atual;

[064] $V_{G,i-1}$ = volume total de biogás no tempo anterior;

[065] $V_{H,0}$ =volume de hidrogênio acumulado no tempo inicial.

[066] A cromatografia foi realizada durante aproximadamente cinco dias para cada etapa do experimento (totalizando aproximadamente cem horas), sendo

que foram injetadas amostras do gás duas vezes por dia devido ao rápido consumo da biomassa e conseqüentemente, rápida produção do H₂.

[067] Durante as cem horas os reatores ficaram em uma câmara incubadora refrigeradora com agitação orbital (shaker) para controlar e manter a agitação a 120 rpm e também a temperatura sob condições mesofílicas, 35°C.

[068] Para que pudessem ser comparados os resultados obtidos das produções de hidrogênio dos reatores durante o experimento, foram calculadas as produções específicas de hidrogênio de cada reator. Essa produção é calculada utilizando-se a Equação 2 e tem o intuito de fornecer a capacidade que uma determinada comunidade microbológica apresenta para converter o substrato em gás, nesse caso, o hidrogênio.

Equação 2

$$PEH = \frac{mLH_2}{gSSVh} \quad (2)$$

[069] Onde:

[070] PEH= Produção específica (mLH₂/gSSVh);

[071] mLH₂/h = Taxa máxima de produção de H₂ por hora;

[072] gSSV = Quantidade inicial de biomassa presente nos reatores em grama.

Modelo não-linear de Boltzmann

[073] No modelo sigmoidal de Boltzmann o valor de “y” em “x0” é a metade da distância entre o volume inicial de H₂ acumulado e o volume máximo acumulado de H₂, denominados respectivamente de A1 e A2. Ao utilizar-se a função $y(x_0) = (A_1 + A_2)/2$, é possível obter a taxa máxima de produção de H₂ em um determinado intervalo de tempo “x”. A magnitude destas variações é aproximadamente dx. (CUNHA, A. R; VOLPE, C. A. Curvas de crescimento do fruto de cafeeiro cv. Obatã IAC 1669-20 em diferentes alinhamentos de plantio. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 1, p. 49-62, 2011).

[074] O modelo sigmoidal de Boltzmann é representado pela Equação (3):

Equação 3

$$Y=A2 + \frac{(A1-A2)}{(1+ e^{\left(\frac{x-x0}{dx}\right)})} \quad (3)$$

[075] Onde,

[076] Y= produção de hidrogênio (mmol);

[077] A1= assíntota inferior (y tende ao $-\infty$) (mmol);

[078] A2= assíntota superior (y tende ao $+\infty$) (mmol);

[079] x_0 = ponto de inflexão da curva (dia);

[080] dx= constante de variação do tempo (dia);

[081] e= 2,718281828.

Análises de ácidos e álcoois pelo método do *headspace*

[082] Nesta etapa, a cromatografia gasosa teve como objetivo identificar e quantificar os subprodutos do processo de digestão anaeróbia, tais como: etanol, ácido acético, butírico, propiônico, valérico, isovalérico e caprótico. Para isso, foi utilizado novamente o cromatógrafo gasoso, dessa vez, foi realizada uma troca na coluna, já que ao invés de analisar-se gases, foram analisados ácidos e álcoois. Para identificar qual composto orgânico foi produzido, verifica-se o tempo de retenção de cada um deles.

RESULTADOS OBTIDOS

Efeito do pré-tratamento ácido (HCl) na produção de hidrogênio

[083] Ao utilizar-se o tratamento ácido (HCl) obteve-se como resultado que a produção máxima de hidrogênio ocorreu com a concentração de 1%, apresentando uma eficiência de produção 42,55% maior do que quando comparada com o reator que continha a biomassa sem pré-tratamento (Figura 2).

[084] A produção específica do reator com a biomassa sem pré-tratamento foi de 123,01 mLH₂/gSSVh, enquanto a produção específica do reator com 1% de

HCl (v/v) foi de 175,35 mLH₂/gSSVh (Figura 3). Verificou-se que as maiores taxas de produção máxima ocorreram nas concentrações mais baixas de ácido (HCl): 0,5% e 1%. Já a partir de 2% de HCl, houve queda na produção de H₂.

[085] Esse fato pode ser explicado porque o aumento nas concentração de ácido clorídrico no reator pode ter provocado um atraso no processo da fermentação anaeróbia, prejudicando a conversão da matéria orgânica e consequentemente, a produção de hidrogênio (INFANTES, D; CAMPO, A. G; VILLASEÑOR, J; FERNÁNDEZ, F. J. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, Ciudad Real, v.36, p. 15595-15601, 2011).

Efeito do pré-tratamento básico (NaOH) na produção de hidrogênio

[086] Ao utilizar-se o tratamento básico obteve-se como melhor resultado para a produção de hidrogênio o reator que utilizou a concentração de 0,5% de NaOH, o que está de acordo com os resultados dos estudos realizados por Cui e Shen (2012) e também por Zhang et al. (2008), para as mesmas concentrações de base utilizadas nesse trabalho.

[087] Obteve-se uma eficiência de 54,54% na produção acumulada de H₂ quando comparada com a produção de H₂ acumulada do reator que não utilizou nenhum tipo de pré-tratamento. A produção específica do reator com 0,5% de NaOH (Figura 4) foi de 190,11 mLH₂/gSSVh.

[088] Houve queda na produção específica de hidrogênio quando as maiores concentrações de NaOH foram utilizadas nos reatores. O que pode ser explicado pelo mesmo motivo ocorrido no pré-tratamento ácido com concentrações mais altas: o aumento da concentração de pré-tratamentos é prejudicial à fermentação anaeróbia, atrasando a conclusão desse processo e causando prejuízo na produção do gás.

[089] Segundo (URBANIEC, K; BAKKER, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation e A review. International Journal of Hydrogen Energy, Plock, v. 40, p. 3648-3658, 2015), o fato do melhor rendimento de H₂ ter sido alcançado com a utilização do hidróxido de sódio ao invés do ácido clorídrico está relacionado com a capacidade da base de promover a quebra da

lignina sem promover uma grande alteração nos carboidratos presente na biomassa utilizada, uma vez que esses carboidratos serão consumidos para promover o crescimento dos microrganismos.

[090] Como o melhor resultado relacionado à produção de H_2 (principal objetivo desse trabalho), foi a concentração de 0,5% de NaOH. A partir da próxima etapa da variação de massa, essa concentração de base foi utilizada em todos os reatores.

Efeito da variação da massa do substrato na produção de hidrogênio utilizando inóculo de efluente de suinocultura

[091] Em relação ao reator que utilizou 5% (m/v), correspondente a 12,5g de substrato em 250mL de solução aquosa, ocorreu uma queda acentuada na produção específica de hidrogênio, caindo de 190,11 mL H_2 /gSSVh para 64,18 mL H_2 /gSSVh (Figura 5). Esse parâmetro demonstra que diminuir a quantidade de massa de substrato para 2,5g não foi eficaz para o objetivo principal desse trabalho.

[092] (ARGUN, H; KARGI, F; KAPDAN, I, K; OZTEKIN, R. Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. International Journal of Hydrogen Energy, Izmir, v.33, p. 6109-6115, 2008) afirmam que a concentração de substrato utilizada nos reatores em batelada está estreitamente relacionada com a eficiência no processo de geração de hidrogênio, de forma que utilizar baixas concentrações provoca taxas de fermentação limitadas. Essa afirmação pode explicar a baixa produção específica de H_2 do reator que utilizou a menor quantidade de substrato.

[093] Utilizou-se também como variação, a razão de 3,4% (m/v), correspondente à 8,5g de substrato no reator com 250 mL de volume reacional (Figura 6). Aqui, verificou-se melhora tanto na produção específica como na taxa de produção máxima em comparação com os resultados obtidos pelos reatores que utilizaram uma menor razão de massa e volume já testados.

[094] Na etapa de variação de massa do substrato no pré-tratamento básico a 0,5% de NaOH e utilizando-se 10% (v/v) de inóculo de efluente de suinocultura,

obteve-se como melhor conjunto operacional o sistema do reator que utilizou 3,4% (m/v). Pois quando a razão (m/v) aumentou para 4,2% a produção específica diminuiu.

Efeito da variação da massa do substrato na produção de hidrogênio utilizando lodo de estação de tratamento de esgoto sanitário (ETE)

[095] Assim como na etapa anterior, utilizaram-se as mesmas variações de massa do substrato. A primeira variação testada foi a de 1% (m/v), representando 2,5g de substrato em 250 mL de volume reacional do reator, a partir desse sistema obteve-se produção específica de 73,06 mLH₂/gSSVh, taxa máxima de produção de hidrogênio igual a 2,81 mL/h (Figura 7).

[096] Já quando utilizou-se a razão de massa por volume igual a 3,4% (m/v), a produção específica de hidrogênio melhorou em relação às razões de massa por volume de 1% (m/v), 1,8% (m/v) e 2,6% (m/v), sendo igual a 169,28 mLH₂/gSSVh. Esse resultado se deve além de outros fatores ao aumento da taxa de produção máxima de H₂ que foi igual a 6,52 (mL/h), contra 2,81(mL/h), 4,25 (mL/h), e 3,69 (mL/h) dos demais reatores (Figura 8).

[097] Observou-se um fato importante nessa etapa do experimento que diz respeito à produção máxima de H₂ não ter ocorrido a partir da maior quantidade de substrato, 4,2% (m/v), o que deixa claro que aumentar a quantidade de carboidrato disponível para os microrganismos não implica no aumento da produção de H₂, pelo contrário, pode até causar inibição do processo. Logo, percebe-se a importância de estudar-se a quantidade ideal de substrato para otimizar a produção de H₂.

Efeito da variação do volume do inóculo de efluente de suinocultura na produção de hidrogênio

[098] O próximo passo foi estudar os efeitos da variação do volume do inóculo nos reatores na produção de hidrogênio. Segundo (KUSCH, S; OECHSNER, H; JUNGBLUTH, T. Biogas production with horse dung in solid-phase digestion systems. Bioresource Technology, Stuttgart, v. 99, p. 1280-1292, 2008), que

estudaram a produção de biogás utilizando como inóculo o esterco de cavalo, com as seguintes proporções: 10%, 20%, 30%, 40%, 44% e 50% (v/v), a melhor faixa de variação é de 10% a 20% (v/v), portanto, foi a faixa testada nessa etapa do estudo.

[099] A razão de 5%(v/v) de inóculo de efluente de suinocultura foi a primeira variação a ser testada, lembrando que o volume reacional dos reatores continuou sendo o mesmo: 250 mL. A produção específica de hidrogênio obtida nessas condições foi de 286,32 mLH₂/gSSVh, a taxa de produção máxima foi igual a 5,30 mL/h e a fase lag teve duração de 79,01h (Figura 9).

[100] Ao se utilizar a proporção de volume de 20% (v/v) foi verificada a menor produção específica de todas as variações de inóculo dessa etapa, 32,46 mLH₂/gSSVh. Esse resultado deixa claro que aumentar a quantidade de inóculo no reator não foi eficiente para alcançar o objetivo principal desse trabalho: a produção de hidrogênio (Figura 10).

[101] Esse fato é importante por demonstrar que assim como a quantidade de massa do substrato, o volume do inóculo utilizado nos reatores também merecem atenção antes de iniciar esse tipo de experimento, uma vez que, aumentar o volume do mesmo, não indica que haverá aumento na produção do gás, muito pelo contrário, pois aqui vimos que houve inibição da atividade dos microrganismos.

[102] Entre as várias condições operacionais testadas, obteve-se a melhor produção de hidrogênio utilizando-se 5%(v/v) de inóculo de efluente de suinocultura com 5% (m/v) de substrato em solução aquosa com 0,5%(v/v) de NaOH. As menores razões testadas do inóculo (v/v) e do pré-tratamento alcalino (v/v) foram resultados interessantes levando-se em consideração os impactos ambientais causados pelo descarte desse efluente.

[103] Como principais subprodutos gerados durante esse processo encontram-se o ácido acético, etanol, ácido butírico e o ácido propiônico, já o metano não foi detectado.

VANTAGENS DA PATENTE

[104] A patente apresenta como vantagem em relação às técnicas já existentes a utilização de um substrato (*nopalea cochenillifera*) presente em grande quantidade, principalmente na região semiárida nordestina, para a produção do gás hidrogênio como fonte de energia renovável.

[105] Além disso foram estabelecidas condições que otimizaram a produção de hidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera*, uma vez que a mesma ainda não tinha sido utilizada para este fim por outros estudos já realizados. Entre essas condições operacionais estão: melhor tipo (NaOH) e concentração (0,5% v/v) do pré-tratamento para melhorar a sacarificação da biomassa lignocelulósica, razão entre a massa do substrato e o volume operacional dos reatores (5% m/v), além do melhor tipo (efluente de suinocultura) e volume de inóculo (5% v/v) utilizado.

[106] Vale ressaltar que a melhor produção específica de hidrogênio (286,32 mLH₂/gSSVh) foi alcançada utilizando a menor concentração do pré-tratamento alcalino e também o menor volume de inóculo, fatos esses que tornam possível produzir menos impactos ambientais e economizar reagentes.

REIVINDICAÇÕES

01. Produção de biohidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) em reatores anaeróbios descontínuos **caracterizado por** seguir as seguintes etapas:

- a) Lavagem com água e secagem da biomassa da *nopalea cochenillifera* em estufa a 50°C durante um período de 7 dias até a obtenção da massa seca;
- b) Trituração da massa seca obtida após secagem até que seja obtida uma consistência de farinha;
- c) Pré-tratamento térmico dos inóculos aquecendo até atingir 90°C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos, e em seguida resfriando até atingir temperatura de 25°C;
- d) Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com NaOH ou HCl para otimizar o processo da sacarificação e consequentemente obtenção de açúcares redutores totais a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira);
- e) Controle do pH inicial igual a 7,0 e utilização de temperatura de 35°C durante o período de incubação;
- f) Razão entre massa (m) do substrato e volume (v) reacional do reator de 1,0%, 1,8%, 2,6%, 3,6%, 4,2% e 5,0% (m/v);
- g) Utilização de dois tipos de inóculo: lodo de estação de tratamento de esgoto sanitário (ETE) e efluente de suinocultura;
- h) Razão volume dos inóculos (estação de tratamento de esgoto sanitário (ETE) e efluente de suinocultura) de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v);
- i) Adição de cada inóculo ao substrato obtido em “b”, ambos pré-tratados e incubados à temperatura de 35°C, pH de 7,0 e submetidos à 120 rotações por minuto.

02. Produção de biohidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) em reatores anaeróbios descontínuos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a etapa (d) compreende os

seguintes passos: utilização das seguintes concentrações para os dois tipos de pré-tratamentos: 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% (v/v).

03. Produção de biohidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) em reatores anaeróbios descontínuos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a etapa (f) compreende os seguintes passos: utilização das variações de massa do substrato: 1%, 1,8%, 2,6%, 3,6%, 4,2% e 5% (m/v).

04. Produção de biohidrogênio a partir da *nopalea cochenillifera* (palma forrageira) em reatores anaeróbios descontínuos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a etapa (h) compreende os seguintes passos: utilização das variações dos volumes de inóculo: 5%, 10%, 15% e 20% (v/v).

DESENHOS

FIGURA 01

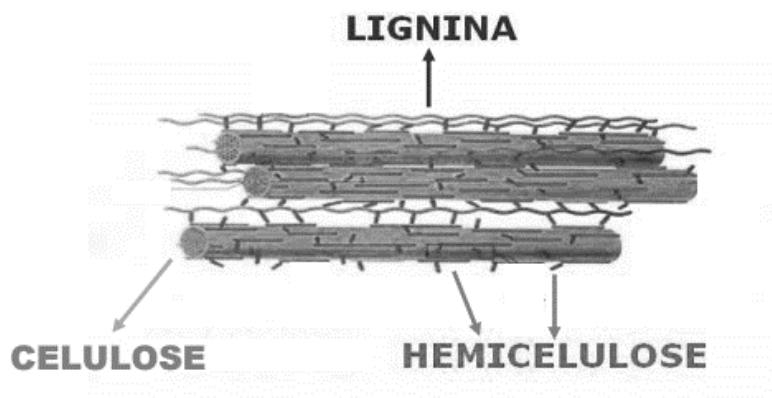


FIGURA 02

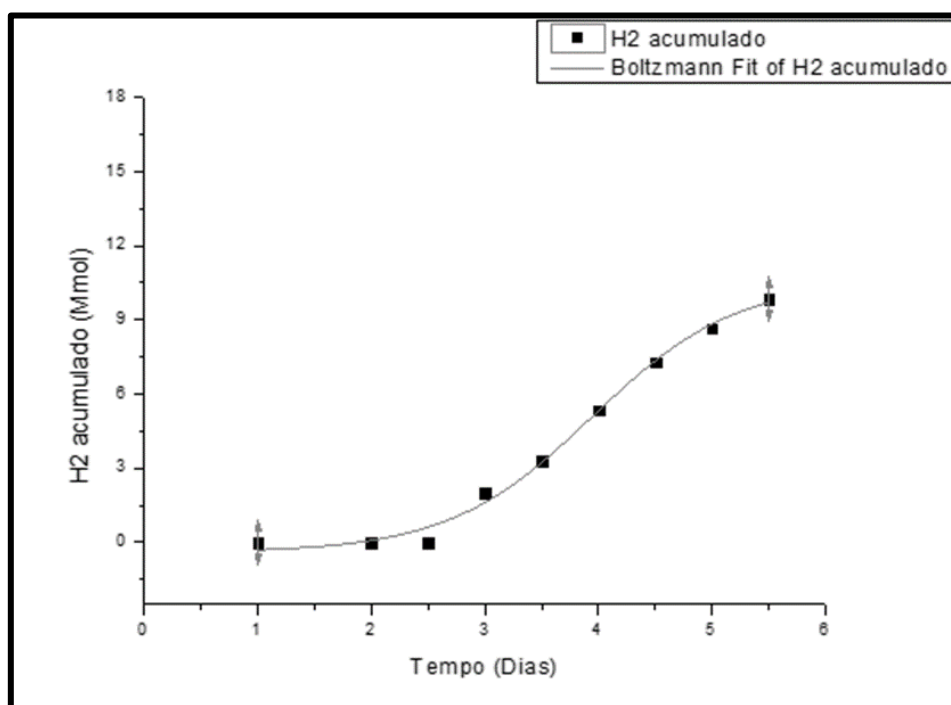


FIGURA 03

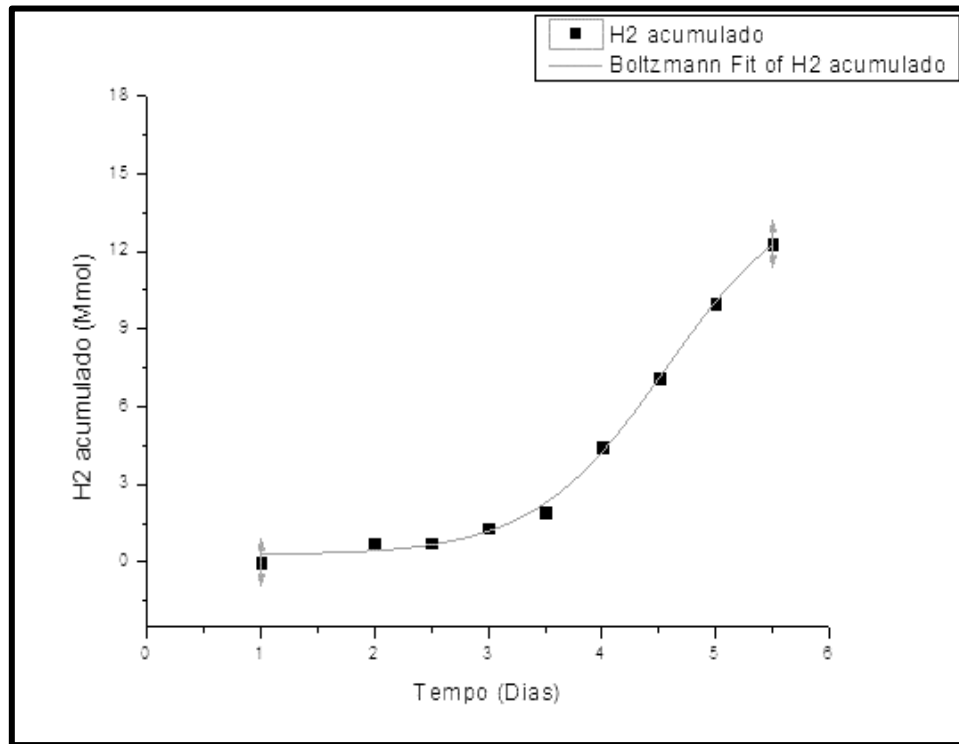


FIGURA 04

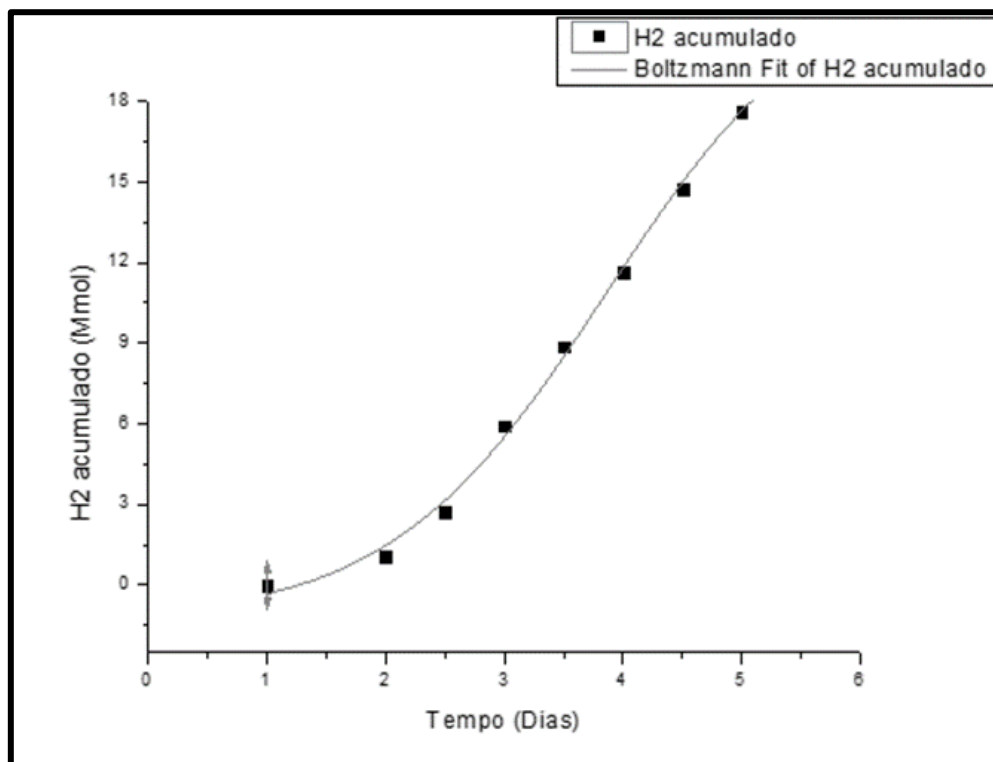


FIGURA 05

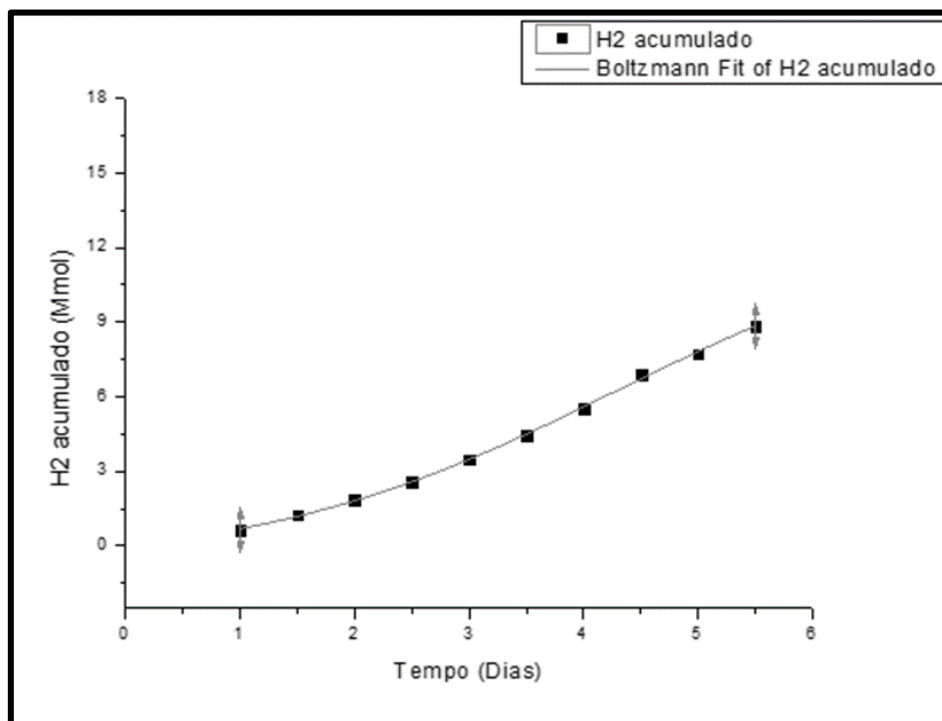


FIGURA 06

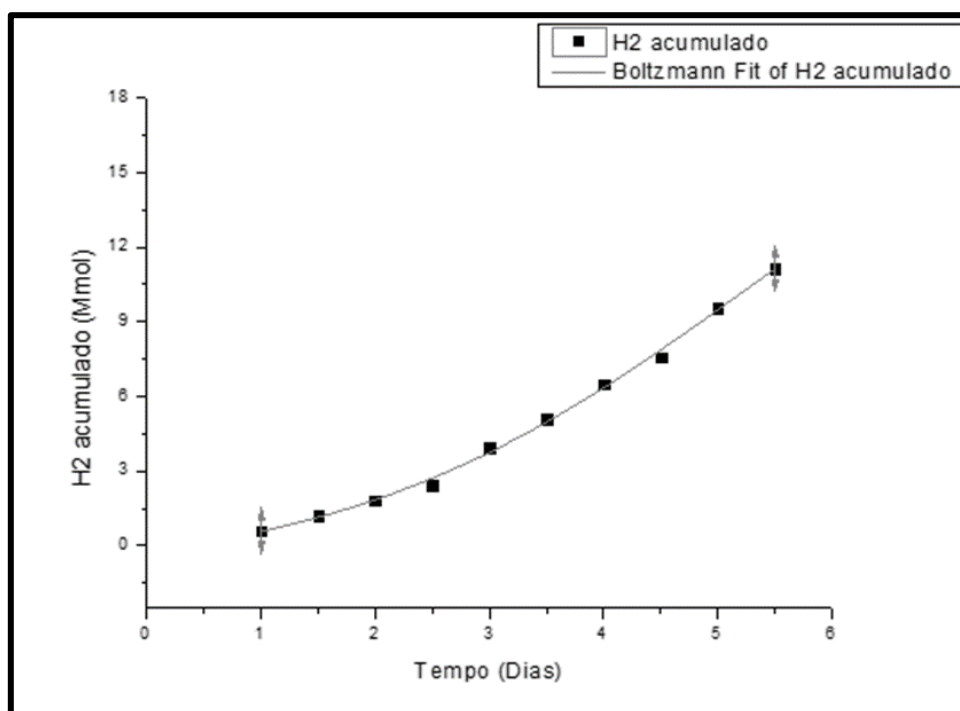


FIGURA 07

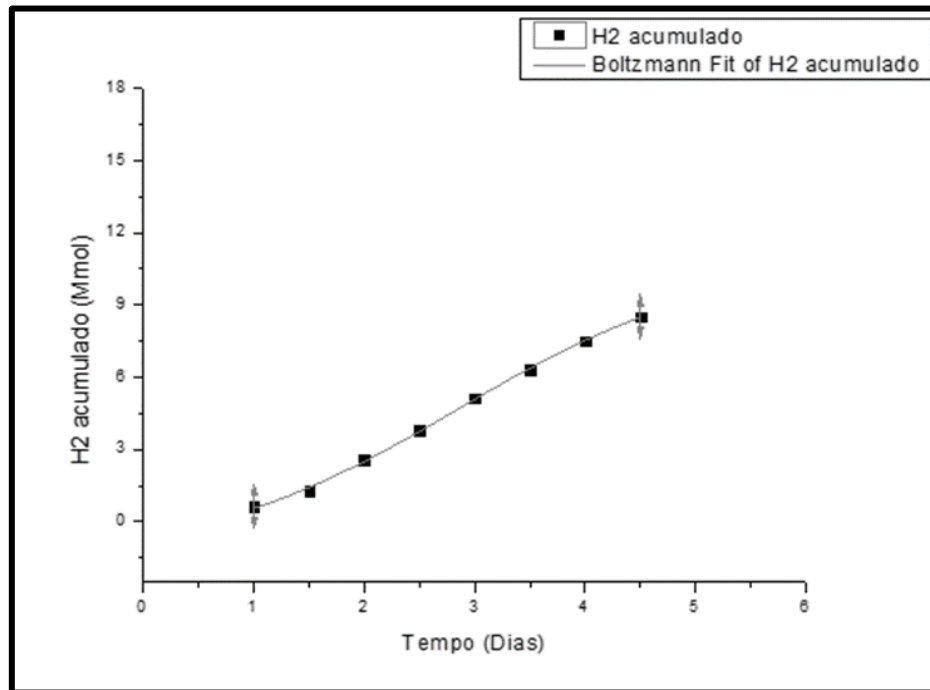


FIGURA 08

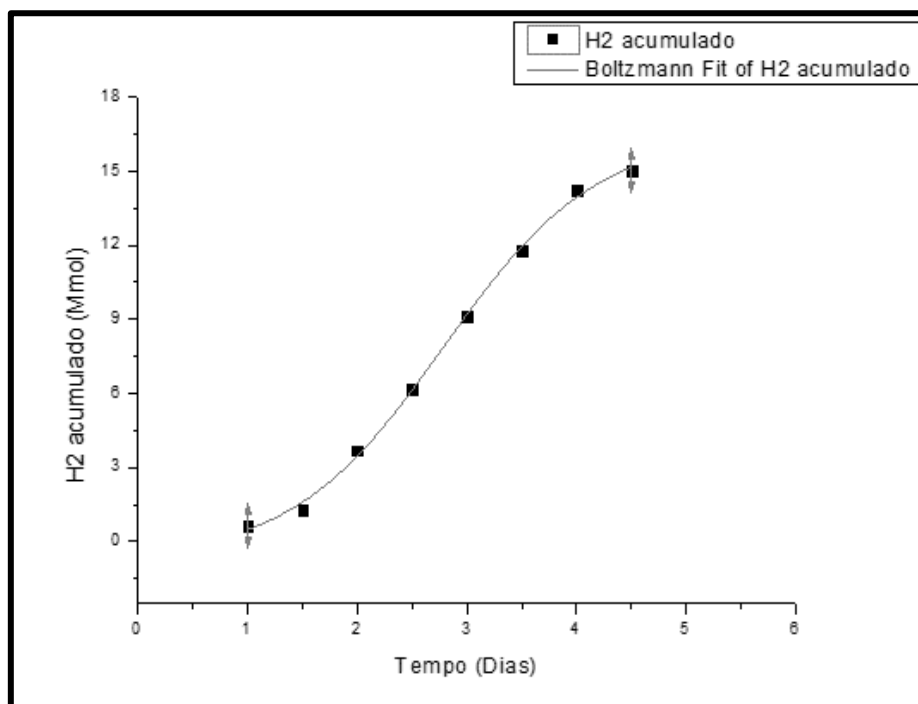


FIGURA 09

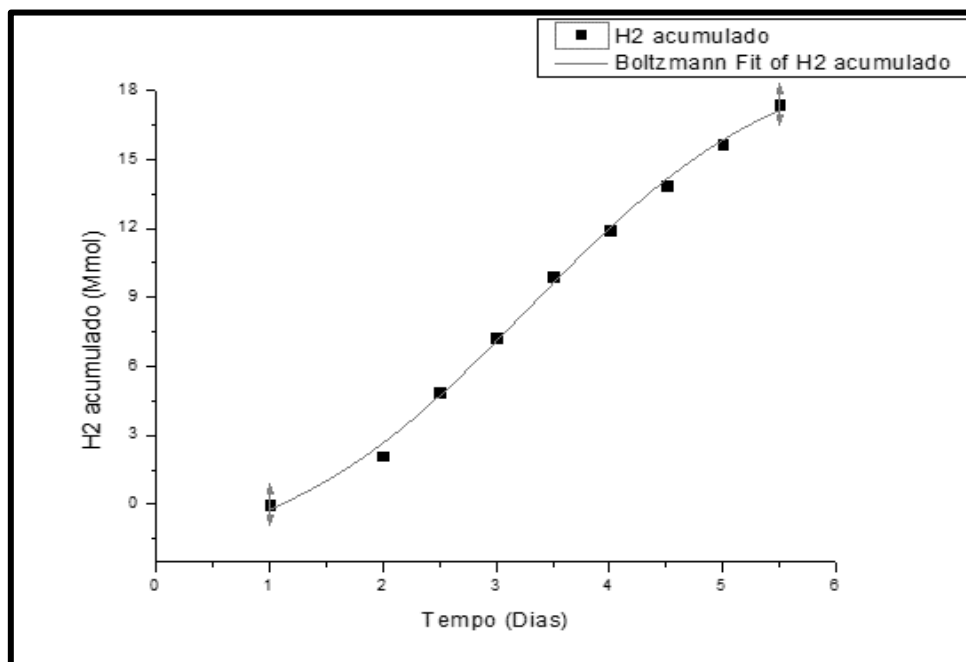


FIGURA 10

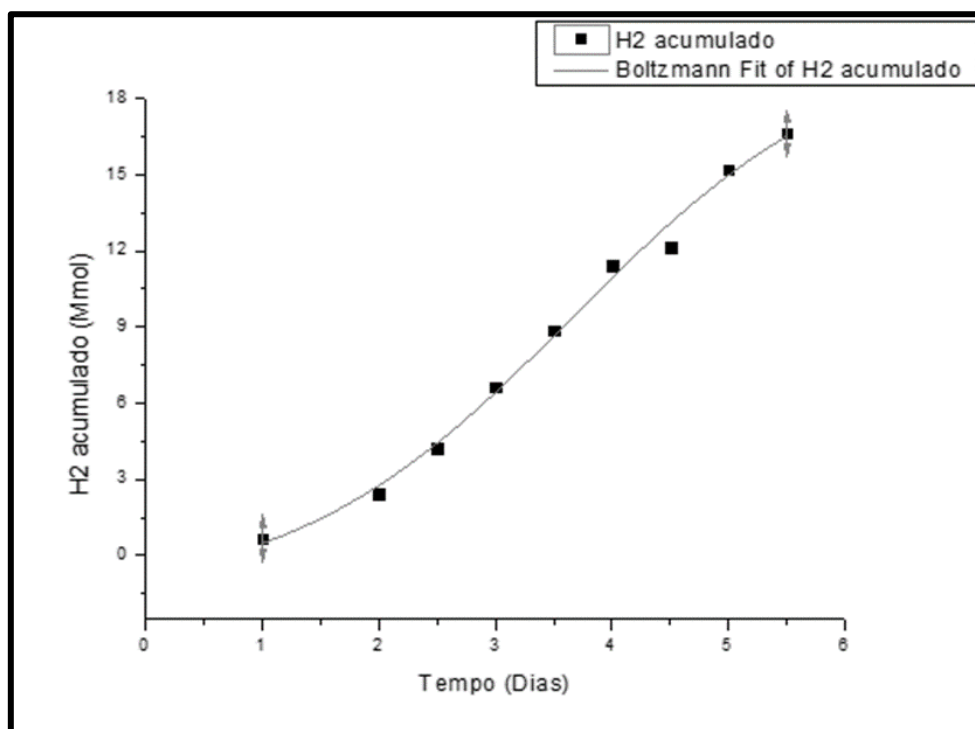


FIGURA 11

