



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENGENHARIA QUÍMICA

GUILHERME PEREIRA DE SOUZA BRITO

**AVALIAÇÃO E PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA
UTILIZANDO A GLICERINA INDUSTRIAL**

Recife
2023

GUILHERME PEREIRA DE SOUZA BRITO

**AVALIAÇÃO E PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA
UTILIZANDO A GLICERINA INDUSTRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientador^a: Maria de Los Angeles P.F. Palha

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Brito, Guilherme Pereira De Souza.

Avaliação e produção de hidrogênio por via biológica utilizando a glicerina industrial / Guilherme Pereira De Souza Brito. - Recife, 2023.
53p. : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2023.

1. Biohidrogênio. 2. Enterobacter aerogenes. 3. Fermentação. I. Palha, Maria de Los Angeles Perez Fernandez. (Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)

GUILHERME PEREIRA DE SOUZA BRITO

**AVALIAÇÃO E PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA
UTILIZANDO A GLICERINA INDUSTRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Química da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Bacharel em Engenharia Química.

.

Aprovado em: 28/09/2023.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ

Data: 04/10/2023 20:33:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Maria de Los Angeles Perez F. Palha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Documento assinado digitalmente

SONIA SOUSA MELO CAVALCANTI DE ALBUQUE

Data: 05/10/2023 14:32:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Sônia Melo C. De Albuquerque (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Documento assinado digitalmente

GISELY ALVES DA SILVA

Data: 04/10/2023 19:37:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Doutoranda Gisely Alves da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Josenildo De Souza Brito e Adelma Pereira De Souza, meus maiores incentivadores pela educação que me foi dada.

Aos meus três irmãos Pedro Lucas, Vitor Pereira e Maryanna Melo, por cada momento que passamos juntos.

Aos meus queridos amigos Sérgio Gonzaga, Diego Nogueira, Dayvid Guilherme e Dimas Mendes, por cada momento de distração.

À Dávylle Cordeiro, por todo afeto dado e por sempre ter sido essa pessoa gentil e empática.

Ao meu grande amigo de infância Bruno Couto, um exemplo de pessoa íntegra e muito humilde, que tanto me ajudou emocionalmente nos últimos anos.

Aos meus três irmãos felinos Nino, Marrie e Nami, que foram e são essenciais em minha vida.

À toda minha família, especialmente Elda Lee e Lucas Duarte, por todo suporte emocional dado.

À Neide Maria, pessoa que ajudou a me criar e sempre foi uma segunda mãe para mim, obrigado por todo carinho e café coado.

À Kalyne Alves por toda atenção, presteza e momentos de leveza ao longo dessa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, especialmente aos meus pais Josenildo Brito e Adelma Pereira, por todo suporte dado para que eu pudesse cursar uma Graduação.

Aos meus amigos e colegas da UFPE por trazerem mais leveza à rotina universitária.

Agradeço à Gisely Alves e Maria da Conceição Gomes da Silva Andrade Barros do Laboratório de Microbiologia Industrial, por toda paciência, compreensão e conhecimento ensinado ao longo da pesquisa acadêmica.

Agradeço a Prof^a Dr^a. Maria de Los Angeles pela orientação, paciência, conhecimento transmitido e por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento do presente trabalho.

Agradeço a Kalyne Alves, por todo auxílio dado ao longo da pesquisa.

Aos profissionais do Laboratório de Coleção de Culturas, do Departamento de Antibióticos da UFPEDA, por terem fornecidos a *Enterobacter aerogenes* para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal De Pernambuco, em especial o Departamento De Engenharia Química e à todos professores por terem contribuído com meu desenvolvimento tanto acadêmico quanto profissional.

À Maria de Fátima, Fatinha, por todas conversas e conselhos dados ao longo desses anos de graduação.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços
repetidos dia após dia.”*

(Robert Collier)

RESUMO

As mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global e dos gases de efeito estufa (GEE), além da tendência de esgotamento dos combustíveis fósseis, têm gerado extensas discussões a respeito do desenvolvimento de tecnologias energéticas ambientalmente sustentáveis e economicamente rentáveis. Nesse contexto, a produção de hidrogênio por meio de rotas biológicas surge como uma excelente alternativa para ampliar a matriz energética renovável no Brasil e no mundo. Isso ocorre devido ao seu elevado poder calorífico de 142 kJ/g — sendo três vezes maior quando comparado com o da gasolina — e por esse gás apresentar uma combustão limpa, ou seja, produz apenas vapor d'água. Desta maneira, o presente estudo tem como objetivo avaliar o comportamento e a produção de hidrogênio por meio de rota biológica que utiliza *Enterobacter aerogenes*. O substrato utilizado como fonte de carbono foi a glicerina industrial na concentração de 25 g/L. Os ensaios foram realizados em triplicata, e com variação da temperatura entre 20, 30 e 35 °C. Foi observado que a concentração da glicerina em 25 g/L provocou a inibição do processo fermentativo em todos os ensaios realizados. Também foi produzido um outro reator à 30 °C utilizando a sacarose como fonte de carbono, sendo observado a produção gases e bolhas, além da turvação do meio, indicando o desenvolvimento do micro-organismo. Tais resultados confirmam que a glicerina não se apresenta como um bom substrato a ser consumido pela *Enterobacter aerogenes* no processo fermentativo.

Palavras chaves: Biohidrogênio; *Enterobacter aerogenes*; Fermentação.

ABSTRACT

Climate changes resulting from global warming and greenhouse gases (GHG), in addition to the trend towards depletion of fossil fuels, have generated extensive discussions regarding the development of environmentally sustainable and economically profitable energy Technologies. In this context, the production of hydrogen through biological routes appears as an excellent alternative to expand the renewable energy matrix in Brazil and the world. This is due to its high calorific value of 142 kJ/g — three times higher when compared to gasoline — and because this gas burns cleanly, that is, it only produces water vapor. Therefore, the present study aims to evaluate the behavior and production of hydrogen through a biological route that uses *Enterobacter aerogenes*. The substrate used as a carbon source was industrial glycerin at concentrations of 25 g/L. The tests were carried out in triplicate, and with temperature variations between 20, 30 and 35 °C. Thus, it was observed that the glycerin concentration at 25 g/L caused the inhibition of the fermentation process in all tests carried out. Another reactor was also produced at 30 °C using sucrose as a carbon source, and the production of gases and bubbles was observed, in addition to turbidity in the medium. These results confirm that glycerin is not a good substrate to be consumed by *Enterobacter aerogenes* in the fermentation process.

Keywords: biohydrogen; *Enterobacter aerogenes*; fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matriz energética mundial em 2022.	16
Figura 2 - Matriz energética Brasileira em 2022.....	16
Figura 3 - Princípio de funcionamento da rota eletroquímica.	21
Figura 4 - Etapas metabólicas da digestão anaeróbica.....	27
Figura 5 - Reatores de vidro após esterilização	32
Figura 6 - Envase do meio de cultivo nos reatores.	34
Figura 7 - Reatores da segunda inoculação à 20 °C após 46 dias.	36
Figura 8 - Reatores da terceira inoculação à 20 °C após 32 dias.	36
Figura 9 - Segunda inoculação à 30 °C após 46 dias.	37
Figura 10 - Terceira inoculação à 30 °C após 32 dias.....	38
Figura 11 - Segunda fermentação à 30 °C após 46 dias.....	39
Figura 12 - Terceira inoculação à 35 °C após 32 dias.....	40
Figura 13 - Fermentação da sacarose a 30 °C por 20 dias.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Capacidade calorífica do H ₂ em comparação com outros combustíveis. .	19
Tabela 2 - Composição do meio nutritivo de cultivo.	33
Tabela 3 - Rendimento de H ₂ por diferentes bactérias e com substratos variados. ...	43
Tabela 4 - Rendimento de etanol produzido em diferentes concentrações.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE	Gases do Efeito Estufa
PNH ₂	Programa Nacional de Hidrogênio
IPCC	Instituto de Pesquisa
WGS	Water-Gas Shift
BPNS	Bactérias Púrpuras Não Sulfurosas
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ATP	Adenosina Trifosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVOS	14
1.1.1. Objetivos Específicos	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. FONTES DE ENERGIA	15
2.2. HIDROGÊNIO	18
2.2.1. Rotas de produção do hidrogênio	19
2.2.1.1. <i>Reforma a Vapor do Gás Natural e outros Hidrocarbonetos</i>	19
2.2.1.2. <i>Eletroquímica</i>	20
2.2.1.3. <i>Gaseificação</i>	22
2.2.1.4. <i>Produção Biológica</i>	22
2.2.1.4.1. <i>Biofotólise</i>	23
2.2.1.4.2. <i>Fotofermentação</i>	25
2.2.1.4.3. <i>Fermentação anaeróbica</i>	25
2.3. MICRORGANISMOS	28
2.4. SUBSTRATOS	28
2.5. FATORES ASSOCIADOS	29
2.5.1. Temperatura associada à produção de Hidrogênio	29
2.5.2. pH associado à produção de Hidrogênio	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. COLETA DO MICRO-ORGANISMO E PREPARO DA SUSPENSÃO	31
3.2. ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES	32
3.3. PREPARO DO MEIO NUTRITIVO DE CULTIVO	33
3.4. INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global e dos gases de efeito estufa (GEE) têm gerado extensas discussões, sendo que estas questões estão intimamente relacionadas ao consumo global de energia (Ferreira *et al.*, 2022).

O desenvolvimento tecnológico e as mudanças na estrutura da economia têm sido determinantes para a sucessão de fontes de energia ao longo da história. Antes do período industrial, a humanidade fazia uso de lenha e carvão vegetal como principais recursos energéticos. Com o advento da Revolução Industrial, houve a transição para o uso de carvão mineral, que, posteriormente, foi substituído pelos derivados do petróleo no final do século XIX (Fadigas; Carvalho, 2012).

Nessa perspectiva, a promoção do uso de tecnologias de energia renovável é essencial para mitigar esses impactos ambientais. A utilização do hidrogênio como fonte de energia tem sido amplamente estudada para sua aplicação em geração de energia elétrica, através de células a combustível, bem como em transporte, por meio de motores de combustão interna (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

Um dos principais atrativos para essa abordagem é a notável redução de emissões associadas ao seu uso. Entretanto, ao avaliar os benefícios ambientais efetivos, é necessário levar em consideração a fonte de matéria-prima empregada no processo de produção de hidrogênio, tendo em vista que diferentes fontes, renováveis ou não, podem ser utilizadas (Page; Krumdieck, 2009).

O gás hidrogênio pode ser gerado através de processos químicos que dependem de combustíveis fósseis, tais como a gaseificação do carvão ou a reforma do metano. No entanto, um problema associado a esses processos é a manutenção da dependência por combustíveis fósseis, outro fator negativo é que, além do hidrogênio, são produzidos gases que contribuem para as mudanças climáticas, tais como o dióxido de carbono (CO₂), além dessas tecnologias demandarem altas condições de temperatura e pressão (Dincer; Acar, 2015).

Com o intuito de mitigar os impactos ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis, o hidrogênio pode ser obtido a partir de fontes renováveis, como a biomassa, por meio da utilização de micro-organismos que degradam resíduos agroindustriais. Nesse aspecto, diversas bactérias e algas são capazes de produzi-lo a partir da água, energia solar e uma variedade de substratos orgânicos.

A produção por fermentação anaeróbia, por sua vez, tem se destacado principalmente devido à maior produção do gás quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (Mathews; Wang, 2009).

A tendência global é utilizar materiais residuais e processá-los por meio de tecnologias de baixa poluição. A crescente preocupação com questões ambientais tem impulsionado o interesse em fontes renováveis, e os resíduos agroindustriais têm se destacado como valiosa fonte para produção de novos materiais, produtos químicos e energia (Rosa *et al.*, 2011).

É de extrema importância o avanço e aplicação de processos industriais sustentáveis que possam transformar biomassa em diversos produtos de alto valor agregado. Essa abordagem torna essencial para aproveitar os resíduos agroindustriais brasileiros de forma eficiente e reduz o impacto ambiental decorrente do descarte inadequado dos mesmos.

1.1 OBJETIVOS

Realizar uma revisão bibliográfica e avaliar a produção de hidrogênio via fermentação anaeróbica utilizando como micro-organismo *Enterobacter aerogenes* e Glicerina como substrato fonte de carbono.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Preparar reatores para a produção de hidrogênio utilizando glicerina como fonte de carbono;
- Analisar a produção de Biohidrogênio por meio da Cromatografia Gasosa;
- Analisar a produção de Etanol por meio da Cromatografia Líquida.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 FONTES DE ENERGIA

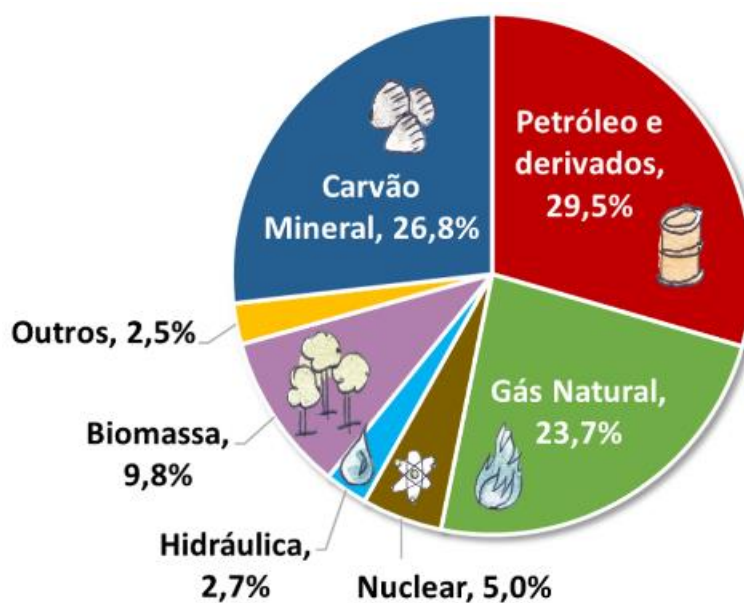
A Revolução Industrial foi um movimento que teve início na Inglaterra durante a segunda metade do século XVIII, e que trouxe mudanças profundas na relação entre o homem e o meio ambiente. Esse processo de industrialização impulsionou a produção em larga escala, o que exigiu o aumento da exploração dos recursos naturais de forma intensiva. Como consequência, ocorreu uma modificação significativa na dinâmica das sociedades, bem como no modo de produção e na organização do trabalho.

Tal transformação implicou em um impacto ambiental de grandes proporções, sendo necessário ressaltar que a corrida pela Revolução Industrial resultou em uma exploração excessiva dos recursos naturais, com efeitos que perduram até os dias atuais. Desse modo, é possível afirmar que a Revolução Industrial foi um momento histórico de grande relevância, mas que também provocou consequências indesejadas e significativas para o meio ambiente e para a humanidade como um todo.

O avanço tecnológico e as transformações estruturais da economia foram responsáveis pela sucessão de fontes energéticas utilizadas ao longo da história. Antes do período industrial, a humanidade utilizava a lenha e o carvão vegetal como recursos energéticos. Com a industrialização, houve a transição para o uso de carvão mineral, que, por sua vez, foi substituído pelos derivados do petróleo no final do século XIX (Fadigas; Carvalho, 2012).

Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2023), a matriz energética mundial é composta principalmente por fontes de energia não renováveis, como o petróleo, carvão e o gás natural, sendo liderado pelo petróleo e seus derivados com 29,5%, seguidos pelo carvão mineral com 26,8% e pelo gás natural com 23,7%. Enquanto que fontes renováveis como a biomassa e hidráulica correspondem a 9,8% e 2,7%, respectivamente, como mostrado na Figura 1:

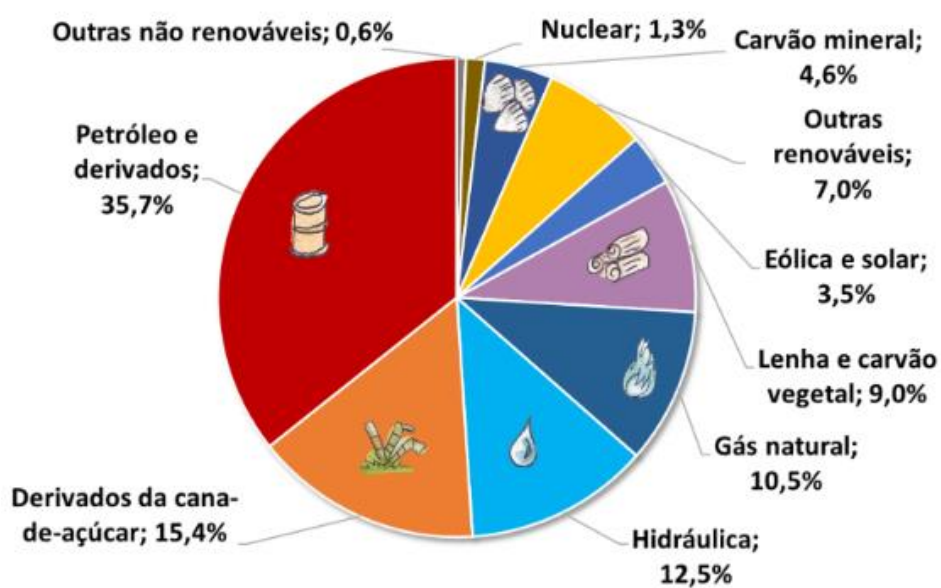
Figura 1 - Matriz energética mundial em 2022.



Fonte: EPE, 2023.

Sendo a matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo, com uma composição aproximada de 47,3% em combustíveis renováveis, 15,4% derivado da cana-de-açúcar, 12,5% hidráulica, 9% de lenha e carvão vegetal, 3,5% eólica e solar, e 7% de outros renováveis, como mostrado na Figura 2 (EPE, 2023).

Figura 2 - Matriz energética Brasileira em 2022.



Fonte: EPE de 2023.

De acordo com Hosseini e Wahid (2016), no ritmo atual de exploração dos combustíveis fósseis, a previsão para o esgotamento deste recurso é de menos de 50 anos. Por isso, o agravamento acelerado dos problemas ambientais, somado à oferta limitada de combustíveis fósseis, tem impulsionado discussões acerca do desenvolvimento de fontes de energia renováveis e ambientalmente sustentáveis (Zhang *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o hidrogênio tem emergido como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, uma vez que apresenta elevado poder calorífico, isto é, pode gerar grande quantidade de energia por unidade de massa. Também é uma molécula que pode ser utilizada como combustível “limpo” e pouco poluente, visto que a sua combustão produz como resíduo apenas água (Wicher *et al.*, 2013).

Assim, o seu uso irá ter como vantagem a capacidade de proporcionar alternativas energéticas, bem como reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (Santos *et al.*, 2012).

O gás hidrogênio pode ser gerado através de processos químicos que dependem de combustíveis fósseis, a exemplo da gaseificação do carvão ou da reforma do metano. Contudo, um problema associado a esses processos é que, além do hidrogênio, são produzidos gases que contribuem para as mudanças climáticas, tais como o dióxido de carbono (CO_2) (Santos *et al.*, 2012).

Uma alternativa adicional para a obtenção de hidrogênio envolve o processo de eletrólise da água, no qual as moléculas de água são decompostas em oxigênio (O_2) e hidrogênio (H_2) mediante a aplicação de uma corrente elétrica. Embora esse processo apresente menor impacto ambiental em comparação aos métodos anteriores, sua implementação requer grande consumo energético, o qual pode ter origem em fontes não renováveis e, portanto, agravar ainda mais os impactos ambientais associados à produção de Hidrogênio.

Com o intuito de mitigar os impactos ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis, o hidrogênio pode ser obtido a partir de fontes renováveis, como a biomassa, por meio da utilização de microrganismos que degradam resíduos agroindustriais.

Assim, a abundância do Brasil em recursos renováveis coloca o país numa posição vantajosa para a implementação gradual de tecnologias relacionadas ao uso do hidrogênio, conferindo ao país um papel significativo no panorama global das energias renováveis (Santos *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a produção de hidrogênio se apresenta como uma alternativa de elevado interesse para impulsionar o desenvolvimento e a expansão da matriz energética sustentável tanto no Brasil quando no mundo.

2.2 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é um elemento químico, o mais simples e leve de todos, composto por um próton e um elétron. Sua descoberta ocorreu em 1766, pelo físico-químico francês Henry Cavendish, que observou a produção de um "ar inflamável" durante a reação ácido-base. Em 1781, Henry notou que a queima deste "ar inflamável" produzia água.

O químico Antoine Lavoisier conferiu-lhe o nome hidrogênio em 1773, derivando o termo do grego hydro e genes, que significa "gerador de água". É o elemento mais abundante no universo, sendo encontrado principalmente na composição de compostos orgânicos e em moléculas de água (Schlapbach; Zuttel, 2001).

Porém, cabe ressaltar que apenas uma ínfima fração do hidrogênio está presente em sua forma molecular ou gasosa. Quando se encontra sob a forma de molécula (H_2), é um gás incolor, inodoro e insípido, insolúvel em água e altamente inflamável. Ademais, é o gás mais leve já conhecido, constituído por dois átomos de hidrogênio unidos por uma ligação covalente (Barbosa, 2020).

Pesquisadores estão considerando o gás hidrogênio como um potencial combustível para o futuro, em razão de sua leveza em comparação com outros combustíveis, o que torna seu uso altamente recomendado em aeronaves e foguetes. Além disso, apresenta facilidade de conversão em eletricidade por meio de células combustíveis, tendo uma combustão limpa, com a liberação apenas de vapor d'água e energia, devido à sua composição não apresentar átomos de carbono (Abdallah *et al.*, 2016).

Conforme apontado por Benemann (1996), o hidrogênio se tornará a "escolha da energia limpa" no futuro e, juntamente com a eletricidade, será a principal fonte de energia, estabelecendo a base para uma sociedade sustentável.

Outro motivo de ser uma alternativa promissora está no fato do hidrogênio apresentar uma excelente densidade energética por unidade de massa, tendo

aproximadamente três vezes o rendimento energético quando comparado com os demais combustíveis fósseis (Souza, Isabela, 2018; Fernandes, 2008).

A Tabela 1 mostra o teor energético do hidrogênio quando comparado com os demais combustíveis.

Tabela 1 - Capacidade calorífica do H₂ em comparação com outros combustíveis.

Combustível	Teor de energia (kJ/g) a 25 °C e 1 atm
Hidrogênio	141,9
Metano	55,5
Gasolina	47,5
Gasóleo	20,0

Fonte: Adaptado de Paz, 2022.

2.2.1 Rotas de produção do Hidrogênio

Segundo Paz (2022), estima-se que aproximadamente 96% de todo hidrogênio produzido advenha dos combustíveis fósseis convencionais, na qual a maior parte da produção aconteça por reações do gás natural ou de frações do óleo com vapor a elevadas temperaturas, ou seja, a tecnologia convencional de produção de hidrogênio exige consumo direto e indireto de combustíveis fósseis, tendo como consequência a emissão de dióxido de carbono e a exaustão da fonte de combustão.

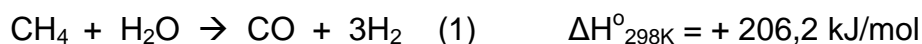
Assim, entre os diversos métodos químicos convencionais de se produzir hidrogênio um que se destaca é a reforma a vapor do metano e de outros hidrocarbonetos, que é responsável por aproximadamente 48% da produção de hidrogênio. Outra técnica bastante utilizada é a reforma da nafta, que representa cerca de 30% da produção, seguidos pela gaseificação do carvão que contribui com 18% da produção de hidrogênio (Agyekum *et al.*, 2022).

2.2.1.1. Reforma a vapor do gás natural e outros hidrocarbonetos

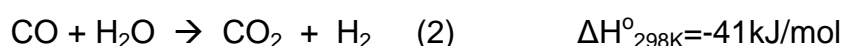
A principal rota de produção do hidrogênio ocorre por meio da reforma catalítica de hidrocarbonetos, sendo a reforma a vapor de gás natural a mais utilizada industrialmente. Nesse processo o gás metano reagirá com o vapor d'água, então irá ocorrer a quebra da molécula do hidrocarboneto formando o gás síntese (CO e H₂), tal gás tem grande utilidade industrial por funcionar como matéria prima no processo de Fischer-Tropsch (Bruno *et al.*; 2017).

Todavia, a reforma catalítica tem um elevado custo de produção devido à operação com elevadas faixas de temperatura e pressão. A alternativa utilizada é a utilização de catalizadores de níquel para permitir a operação em temperaturas mais baixas. Outra desvantagem dessa técnica está na formação do coque durante a operação, tendo como consequência a desativação dos catalizadores do processo (Bruno *et al.*; 2017).

A formação do gás síntese foi descrita conforme a Equação 1 a seguir (Siqueira, 2015).



Para aumentar o rendimento de hidrogênio produzido, é realizado uma reação entre o monóxido de carbono e água, formando o dióxido de carbono e hidrogênio, como mostrado na Equação 2:



Segundo Marban e Valdés-Solis (2007), a reforma a vapor de hidrocarbonetos pode chegar a uma eficiência de 75% para grandes sistemas centralizados. Atualmente o custo para se produzir o hidrogênio via reforma de hidrocarbonetos é de US\$ 1,0 – US\$ 2,0 /kg H₂ (Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

2.2.1.2. Eletroquímica

O principal método de se obter o hidrogênio por meio da água é através da eletrólise, tal rota, ilustrada na Figura 3, representa cerca de 5% da produção de hidrogênio (Sá; Cammarota; Leite, 2014). Gomes (2022) definiu a eletrólise como uma reação de oxirredução que acontece quando uma corrente elétrica contínua

passa por uma molécula de água, rompendo suas ligações e formando íons H^+ e OH^- . O Cátion (H^+) é descarregado no polo negativo formando H_2 por reação de redução, enquanto a hidroxila (OH^-) irá se concentrar no polo positivo, e após uma reação de oxidação irá formar o gás oxigênio (O_2). Tal processo foi mostrado nas Equações 3,4,5 e 6:

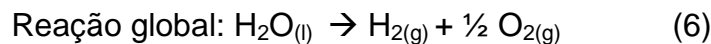
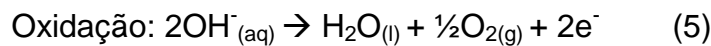
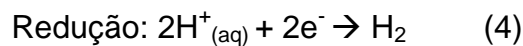
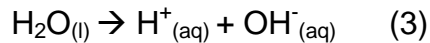
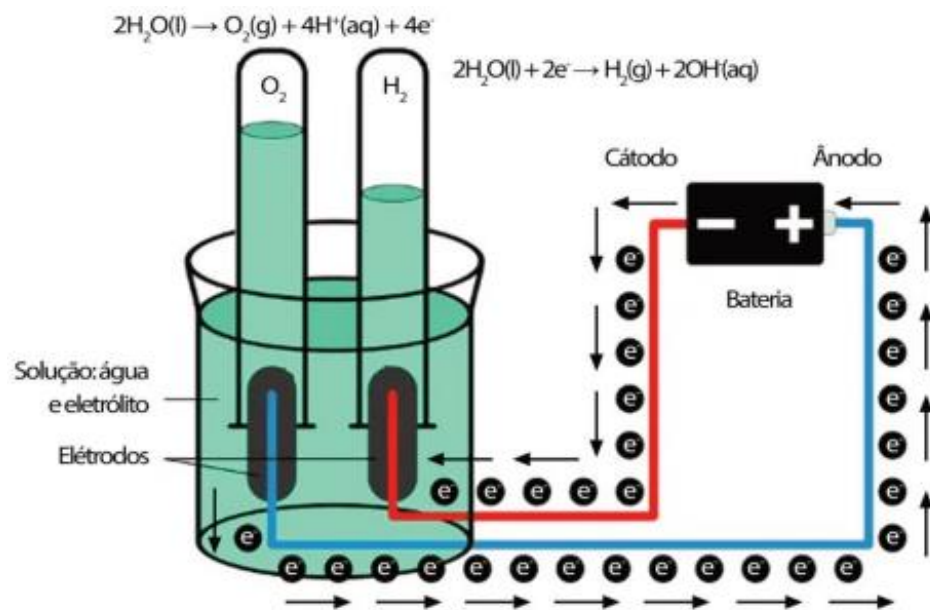


Figura 3 - Princípio de funcionamento da rota eletroquímica.



Fonte: Gomes, 2022.

A produção de H_2 por tal via apresenta aproximadamente 95% de rendimento (Silva, 2016).

A eletrólise da água é um processo simples e rápido, além do mais configura como uma fonte de energia sustentável, visto que utiliza a energia solar, eólica e hídrica para a geração de eletricidade em posterior eletrólise da água, também se

configura como sendo uma tecnologia altamente pura e não poluente, já que tem como único resíduo produzido o vapor d'água (Sorensen, 2004).

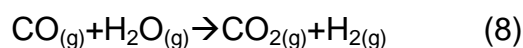
Entretanto têm efeitos negativos, o alto custo de US\$ 3,5 – USD 6,5/kg de H₂ quanto comparado com as outras tecnologias de produção de H₂ dificulta a expansão num mercado tão competitivo, visto que necessita de grande quantidade de energia para processar a eletrólise (Botton, 2007; Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

2.2.1.3 Gaseificação

A produção do hidrogênio a partir do carvão mineral é feita pelo método de gaseificação, que consiste numa reação do carvão sólido com certa quantidade de oxigênio, ar, vapor e dióxido de carbono numa temperatura de 700°C através de um processo chamado de pirólise, na reação típica deste processo o carbono irá produzir o gás de síntese, monóxido de carbono e hidrogênio, conforme a equação 7: (Mishra; Gautam; Sharma, 2018; Paz, 2022).



O gás é melhorado por meio da reação water-gas shift (WGS), conforme a Equação 8. O CO₂ é capturado por adsorção através do uso de Selexol e Rectisol.



Assim, irá obter um hidrogênio com baixo carbono e pureza de 99,8%, também chamado de hidrogênio azul. O custo industrial da produção do hidrogênio azul está entre US\$ 1,6 – US\$ 2,4/kg H₂.

2.2.1.4 Produção biológica

As formas convencionais de produção de hidrogênio ou são poluentes, por utilizarem combustíveis fósseis que irão gerar resíduos, ou apresentam um elevado custo de operação. Por outro lado, o hidrogênio pode ser produzido por rotas biológica, que se apresentam como uma das metodologias mais promissoras para o

futuro. Malgrado plantas industriais dedicadas à produção de hidrogênio ainda não tenham se tornado realidade, o número de pesquisas nessa área tem aumentado consistentemente (Souza, Isadora, 2017).

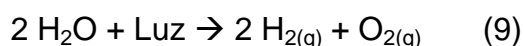
Com o estabelecimento de rotas mais eficientes, essas metodologias têm o potencial de se tornarem mais competitivas em termos de custo, uma vez que podem aproveitar a biomassa de resíduos de baixo custo. Além disso, oferecem vantagens como a baixa emissão de gases de efeito estufa (GEE), e baixo consumo energético, sendo executado em temperaturas e pressões ambientais (Hsu; Lin, 2016). A produção biológica pode ocorrer através de quatro vias: biofotólise direta (algas), biofotólise indireta (cianobactérias), fotofermentação (bactérias púrpuras) e a via fermentativa (bactérias) (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

2.2.1.4.1 Biofotólise

O processo de biofotólise da água se caracteriza pela decomposição da água sob a ação de organismos biológicos com o auxílio da incidência de energia luminosa. Assim, irá haver a conversão de energia solar em energia química armazenada, útil para a célula. Tal método pode ser subdividido em biofotólise direta e biofotólise indireta (Fonseca, 2016).

No caso da biofotólise direta da água acontece geralmente em condições de anaerobiose e está relacionada à ação luminosa incidindo sobre os sistemas biológicos, resultando assim na separação da água e, conseqüentemente, na produção de hidrogênio. Dentre os principais micro-organismos que realizam este tipo de processo biológico estão *Chlamydomonas reinhardtii* e *Platymonas subcodiformis* (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

A biofotólise indireta ocorre normalmente por cianobactérias que irão utilizar a energia armazenada em carboidratos na fotossíntese para conseguir produzir o gás hidrogênio a partir da água, ou seja, são capazes de formar hidrogênio e oxigênio a partir da água e energia solar (Sá; Cammarota; Leitão, 2014). Sua fórmula geral é dada pela equação 9:



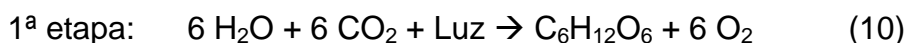
No processo de biofotólise direta as algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* e *Scenedesmus obliquus*) produzem o gás hidrogênio após um longo tempo de adaptação em condições de anaerobiose, isso acontece porque nesse período ocorre a produção e ativação da hidrogenase que é uma enzima responsável por catalisar a oxidação reversível do hidrogênio molecular. Essa rota se destaca principalmente pela ausência de carbono orgânico como substrato. Assim, o crescimento fotossintético depende de CO₂ e água (Nagarajan *et al.*, 2017).

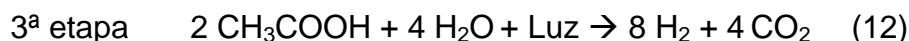
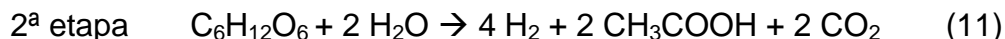
Conforme dito por Longo, Lazzarin e Miguez (2008), a hidrogenase irá associar o próton (H⁺) com o elétron (e⁻), resultando na produção e liberação de H₂ (2H⁺ + 2e⁻ → H₂). Todavia, em condições habituais o oxigênio é um subproduto da fotossíntese, e tal gás funciona como um inibidor da Fe-hidrogenase, que é responsável por catalisar o processo de formação do H₂. Então, com a inativação da enzima, a produção de hidrogênio fica limitada à poucos minutos (Longo; Lazzarin; Miguez, 2008).

Apesar da vantagem do fácil cultivo dos organismos associados, tal método apresenta como desvantagem o fato de ter a necessidade constante de energia luminosa para que a reação ocorra, além de produzir o gás oxigênio, fazendo com que a mistura gasosa (H₂ + O₂) seja altamente explosiva.

Na biofotólise indireta as cianobactérias, exemplificadas por Sá, Cammarota e Leitão (2014) como *Anabaena siamensis*, *Anabaena variabilis*, *Plectonema boryanum*, *Synechocytis sp.*, *Nostoc sp.*, *Cyanothece sp.*, irão ter como vantagem o fato de aproveitarem o nitrogênio (N₂) e o dióxido de carbono (CO₂) presentes no ar atmosférico, além da água (H₂O) como provedora de elétrons e a luz solar como fonte de energia (Amorim, 2009).

Nessa técnica a produção de H₂ e O₂ ocorrem em etapas distintas, e há reações intermediárias até a produção de H₂. Na primeira reação, as cianobactérias irão realizar a fotossíntese convertendo o CO₂ e H₂O em compostos orgânicos e O₂. Na etapa seguinte ocorre a degradação da substância orgânica tendo como consequência a produção de H₂ e outras substâncias. Tais reações foram descritas pelas equações 10, 11, 12 e 13:





2.2.1.4.2 Fotofermentação

A fotofermentação, também conhecido como fotodecomposição, é um processo de produção de hidrogênio utilizando a presença constante de luminosidade. Para isso são utilizadas bactérias púrpuras não sulfurosas (BPNS) que aproveitam a energia luminosa para converter completamente ácidos orgânicos em hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2) (Das; Veziroglu, 2008).

Bactérias fermentativas quando digerem um substrato somente conseguem realizar a degradação em H_2 e ácidos orgânicos, já as fotofermentativas aproveitam a energia luminosa para degradar todo composto orgânico e produzir ainda mais H_2 . Além de grande quantidade de energia, as bactérias fotossintetizantes requerem também a atividade da enzima nitrogenase no seu processo fermentativo (Longo; Lazzarin; Miguez, 2008; Rodrigues, 2016).

A produção de hidrogênio por via fotofermentativa foi evidenciada na Equação 14 (Longo; Lazzarin; Miguez, 2008).



Entre os exemplos de bactérias fotossintetizantes não sulfurosas estão as do gênero *Rhodobacter*, *Rhodobium* e *Rhodopseudomonas*.

2.2.1.4.3 Fermentação anaeróbica

A fermentação anaeróbia, também chamada de fermentação escura, é descrita como qualquer reação em que ocorre a quebra de açúcares. Assim, na produção de hidrogênio por via fermentativa bactérias anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas irão oxidar um tipo de substrato rico em matéria orgânica em compostos

mais simples como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, metano, dióxido de carbono e hidrogênio (Argun; Kargi, 2011).

Entre métodos biológicos de produção de hidrogênio, a via fermentativa anaeróbia é a que tem se destacado por ter um maior rendimento na produção de hidrogênio quando comparado com os outros processos biológicos, além disso, existe uma maior variabilidade do substrato utilizado (Sá; Cammarota; Ferreira-Leitão, 2014).

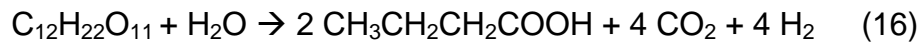
Este processo também pode ser chamado de “dark fermentation”, pois ocorre em completa ausência de energia luminosa, isso acaba sendo uma vantagem pois permite uma produção contínua e em ritmo sustentado a partir de resíduos opacos tais como a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos uma vez que não há a inibição pela ausência de luminosidade.

Ademais, os micro-organismos fermentativos apresentam uma melhor eficiência de produção de hidrogênio em um curto intervalo de tempo quando comparados com os micro-organismos que produzem hidrogênio por via fotobiológica (Mathews; Wang, 2009).

Outra vantagem do método fermentativo na produção de hidrogênio é que ele permite a utilização de uma grande variedade de substratos como resíduos alimentares e lácteos, glicerina, lignocelulósicos, dentre outros. Dessa forma, a produção de hidrogênio via fermentação escura se apresenta como uma excelente alternativa do ponto de vista ambiental (Chong *et al.*, 2009).

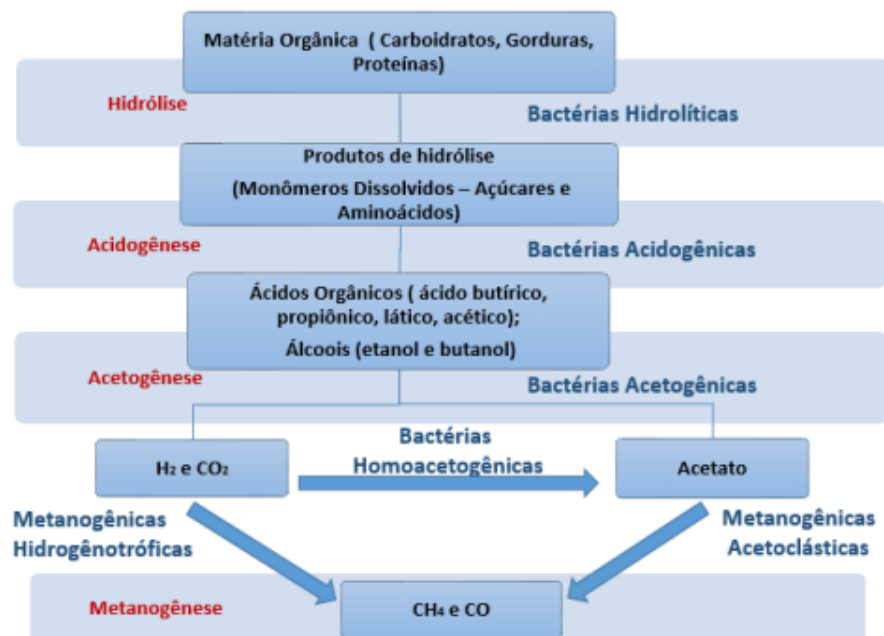
2.2.2 Etapas da Fermentação anaeróbica

A biodigestão anaeróbica ocorre com as bactérias fermentativas realizando a conversão de compostos orgânicos complexos em metano, CO₂, H₂O, gás sulfídrico e amônia, como mostrado nas Equações 15 e 16. As etapas da digestão são: Hidrólise, Acidogênese, Acetogênese e Metanogênese e foram esquematizadas na Figura 4 (Lettinga, 1996).



A obtenção de hidrogênio a partir de biomassa vem se mostrando um excelente caminho para aplicação em larga escala, apresentando um custo de produção de 2,0 – 4,0 USD/kg de H₂, sem apresentar o mesmo impacto ambiental quando comparado com os métodos químicos (Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

Figura 4 - Etapas metabólicas da digestão anaeróbica.



Fonte: Sá, Cammarota e Leite, 2014.

2.3 MICRO-ORGANISMOS

Segundo Fernandes (2008), existe uma grande variedade de micro-organismos capazes de produzir hidrogênio, eles podem variar enquanto a temperatura de atuação metabólica sendo classificados como mesofílicas ou termofílicas, também irão se diferenciar em relação ao consumo de oxigênio: aeróbios, anaeróbios ou facultativos.

O principal fator para que o organismo seja produtor de hidrogênio está na presença de enzimas como hidrogenase e nitrogenase. Entre os diversos tipos estão: *Pyrococcus furiosus*; *Anaerocellum*, *Caldicellulosiruptor*; *Dictyoglomus*; *Fervidobacterium*; *Spirocheta*; *Thermotoga*; *Thermoanaerobacter*; *Enterobacter*; *Escheicchia. Coli*; *Citrobacter*; *Alcaligenes*; *Bacillus*; Arquéias: *Methanosarcina barkeri* (Fernandes, 2008).

Como analisado por Fernandes (2008), o gênero *Clostridium* é o que apresenta mais espécies produtoras de hidrogênio. Isso porquê apresenta um rápido metabolismo, além de serem capazes de produzirem esporos em situações adversas. Outros gêneros também vêm ganhando bastantes destaques por apresentarem bons resultados experimentais na produção de hidrogênio, como *Enterobacter*, *Bacillus* e *Thermoanaerobacterium* (Sá; Cammarota; Leite , 2014).

2.4 SUBSTRATOS

Segundo Boodhun *et al* (2017), a utilização de diversos tipos de substratos irá acarretar em variações significativas na produção do biohidrogênio. A literatura descreve amplamente a glicose, isômeros de hexoses ou polímeros, amido e celulose, como potenciais matérias primas para síntese de hidrogênio.

Assim, os principais substratos utilizados por bactérias são a sacarose e a glicose, que embora tenham bons resultados, a eficiência econômica dessas fontes de carbono está ameaçada devido ao investimento na matéria prima. Entretanto, há a possibilidade de utilização de matérias primas abundantes e de baixo custo, através do aproveitamento de resíduos orgânicos presentes na indústria de alimentos, papel e biocombustíveis. Além de reduzir os custos, essa aplicação tem um excelente impacto ambiental por contribuir para o tratamento de efluentes industriais, como no caso do soro do leite na produção de queijos.

Segundo Souza, Isadora (2017), os resíduos de soro do leite são uma potencial matéria prima por conter lactose em sua composição. Outro substrato é a celulose, que é considerada uma fonte abundante e renovável, sendo o principal produto gerado pela fotossíntese em ambientes terrestres (Guo *et al.*, 2010). Além disso, ela está presente em grande quantidade em resíduos agrícolas e efluentes industriais, como aqueles originados na indústria de produção de papel (Kapdan; Kargi, 2006). No entanto, a complexa estrutura da celulose e hemicelulose presente nesses resíduos afeta sua biodegradabilidade, exigindo um pré-tratamento por hidrólise ácida ou enzimática antes do uso em processos de fermentação para produção de hidrogênio biológico (Lakshmidevi; Muthukumar, 2010). A hidrólise é responsável por quebrar essas estruturas complexas, permitindo que as bactérias produtoras de hidrogênio possam fermentar esses resíduos com mais facilidade (Kapdan; Kargi, 2006).

Nos últimos anos, o glicerol tem se destacado como uma das fontes de carbono mais abundantes e de baixo custo da atualidade, tendo em vista que é o principal resíduo da produção do biodiesel em nível mundial (Souza, Isabela, 2018). Os resíduos de glicerol provenientes da indústria combustível têm se tornado matéria prima para diversos setores industriais na fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos, cremes dentais, tintas e itens comerciais. Além disso, é utilizada como matéria prima na produção de produtos de alto valor agregado, como lipídios, 1,3-propanodiol e pigmentos.

2.5 FATORES ASSOCIADOS

2.5.1 Temperatura associada à produção do Hidrogênio

A temperatura é um dos parâmetros operacionais que exerce maior influência sobre o processo de fermentação para a produção de bioH_2 , uma vez que afeta os processos biológicos em níveis de crescimento celular e enzimático. Estudos têm demonstrado que, dentro de uma faixa apropriada, o aumento da temperatura pode levar a um aumento na produção de H_2 (Souza, Isadora, 2017).

Nesse sentido, os micro-organismos responsáveis pela produção de H_2 podem desenvolver seu metabolismo em diferentes faixas de temperatura, sendo,

portanto, classificados como mesófilos (25 a 40°C), termófilos (40 a 65°C) e extremófilos (> 80°C) (Singh *et al.*, 2010).

De acordo com Li e Fang (2007), temperatura próxima de 37 °C é a ideal para que as bactérias mesófilas realizem seu processo fermentativo, e de 55 °C para as bactérias termófilas. Já Neves (2009), analisou o impacto da redução da temperatura no rendimento do processo, para isso foram feito ensaios a 30 °C e 37 °C, utilizando resíduos de purificação do biodiesel. Em relação aos resultados não houve uma mudança significativa da taxa de produção de BioH₂.

2.5.2 pH associado à produção de Hidrogênio

O pH é um fator de grande importância no processo de produção de H₂ por fermentação biológica, uma vez que afeta a atividade da enzima hidrogenase e os percursos metabólicos das bactérias produtoras de H₂, podendo levar à diminuição da sua concentração (Wang; Wan, 2008).

Vários estudos demonstram que valores de pH entre 6-7 levam a rendimentos mais elevados na produção de H₂ (Wang; Wan, 2008). Entretanto, segundo Pachapur *et al.* (2015), o pH ótimo para a produção de H₂ em culturas isoladas situa-se em torno de 6,5. Valores inferiores a 5 e superiores a 7 podem reduzir significativamente a produção de H₂ devido à influência negativa sobre a atividade da enzima hidrogenase.

Além disso, pH baixo pode facilitar a formação de ácidos graxos voláteis (AGV), os quais desestabilizam a capacidade das células de manter o pH interno, resultando em uma redução significativa do nível de ATP intracelular e na inibição do consumo de substrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um trabalho cuja metodologia empregada baseou-se inicialmente na revisão da literatura relacionada ao tema em artigos provenientes de dissertações e periódicos na base Scielo, e periódico Capes CAFE, que serviram como alicerce para a realização deste projeto experimental sobre a análise da viabilidade da produção de biohidrogênio por meio de micro-organismos pertencentes a espécie *Enterobacter aerogenes*. Para esse fim, o substrato utilizado como fonte de carbono foi a Glicerina.

Em seguida, o experimento e as análises foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial e no Laboratório de Cromatografia Instrumental, ambos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal De Pernambuco (UFPE), desse modo, a metodologia foi dividida nas seguintes etapas:

- Coleta do micro-organismo e preparação da suspensão bacteriana;
- Esterilização dos reatores;
- Preparação e esterilização do Meio de cultivo;
- Inoculação do micro-organismo;
- Análise da produção do Hidrogênio, Dióxido de carbono e Etanol.

3.1 COLETA DO MICRO-ORGANISMO E PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

O micro-organismo utilizado foi a bactéria *Enterobacter aerogenes* de código UFPEDA 348 anos 08/2023, fornecida pelo Laboratório de Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da UFPE. Em seguida foi realizado o repique microbiano para um tubo de ensaio contendo meio de ágar nutritivo para que fosse realizado o crescimento bacteriano. Após um período de 48 horas, com o micro-organismo já crescido, foi preparado o inóculo. Para isso, utilizou-se uma alça de platina que foi previamente flambada, e após o resfriamento da mesma foi realizado a raspagem do micro-organismo para um Erlenmeyer de 500 mL contendo água estéril. Então, com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland, foi adicionado água estéril para ajustar a turbidez até que a suspensão microbiana atingisse a

padronização de 1,0 na escala, o que corresponde a 300 milhões de bactérias por mL de meio.

3.2 ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES

Os reatores utilizados foram frascos de vidro de penicilina com capacidade para 60 mL e volume útil de 48 mL. O experimento consistiu na análise em triplicata da fermentação anaeróbica da Glicerina, variando a temperatura entre 20 °C, 30 °C e 35 °C, o que totalizou o uso de 9 reatores. Para evitar qualquer tipo de contaminação, os 9 frascos foram tamponados com algodão hidrófobo e submetidos a um tratamento térmico em um Forno de Pasteur, a numa temperatura de 180 °C por 2 horas, resultando na esterilização dos recipientes, conforme ilustrado na Figura 5:

Figura 5- Reatores de vidro após esterilização



Fonte: Autor, 2023.

3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO NUTRIENTE DE CULTIVO

Na preparação do meio nutriente de cultivo foi utilizada como substrato a Glicerina industrial. Ademais, a composição do meio de cultivo foi proposta por Sá (2011), conforme a Tabela 2:

Tabela 2- Composição do meio nutritivo de cultivo.

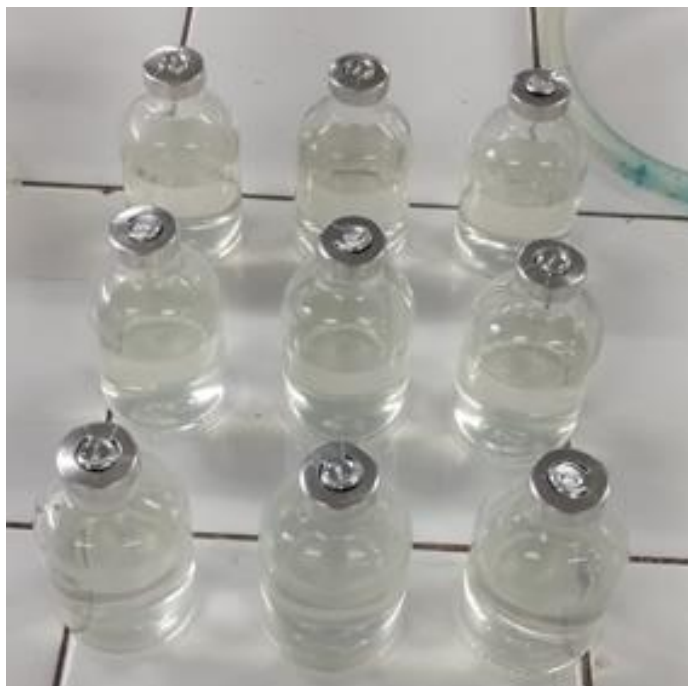
Componente	Concentração (g.L ⁻¹)	Finalidade
Glicerina	25	Substrato
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,8	Tampão
NH ₄ HCO ₃	2,025	Macronutriente
ZnCl ₂	0,005	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025	
CuCl ₂ .2 H ₂ O	0,005	
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,005	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O	0,015	Micronutriente
CaCl ₂	0,05	
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,005	
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,1	
NaCl	0,01	
NiCl ₂ .6 H ₂ O	0,05	
H ₃ BO ₃	0,05	

Fonte: Adaptado de Sá, 2011.

Todos os componentes foram preparados para um volume de 0,5 L de água estéril. Após a pesagem, foi feita diluição de cada componente do meio nutritivo de cultivo juntamente com 12,5 g de Glicerina num béquer de 600 mL, em seguida foi feita a homogeneização do meio com um bastão de vidro.

Assim, cada um dos nove reatores de 60 mL foi preenchidos com 43,2 mL de meio nutritivo de cultivo. Em seguida, foram fechados com tampa de borracha e, com a utilização de um alicate recravador, foi realizado a vedação com o lacre de alumínio. Isso ocorreu para impedir que o aumento da pressão ocasionado pelo processo fermentativo viesse a destampar os reatores, causando vazamento dos gases produzidos. Então os frascos contendo meio foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos, para que fosse feita a esterilização do meio. A Figura 6 mostra os reatores após o processo de vedação:

Figura 6 – Envase do meio de cultivo nos reatores.



Fonte: Autor, 2023.

3.4 INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA NO MEIO DE CULTIVO

Após a esterelização dos 9 frascos, realizou-se a inoculação da suspensão bacteriana com o auxílio de uma seringa descartável. Considerando uma proporção de inóculo de 10 % volume/volume, foram inoculado aproximadamente 4,8 mL de suspensão em cada um dos nove frascos. Em seguida, , acoplou-se uma seringa para que fosse analisado o avanço da fermentação, através da análise da produção gasosa, por meio do deslocamento do êmbolo. Logo depois, os reatores foram destinados às suas respectivas estufas. Desta forma, três reatores foram para uma incubadora B.O.D. SL – 200 de marca SOLAB que estava regulada na temperatura de 20 °C, três reatores foram destinados para a estufa da marca LEEC, regulada na temperatura de 30 °C, e, os três reatores restantes para uma estufa de 35 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo fermentativo foi avaliado ao longo de um período de 27 dias, não sendo observado qualquer crescimento nos nove reatores analisados. Isso levou à suposição de que ocorreu a inativação dos micro-organismos inoculados. Em decorrência disso os reatores contendo o meio de cultivo foram reutilizados, sendo feita uma reinoculação de aproximadamente 4,2 mL da suspensão bacteriana.

Dessa maneira, os meios de cultivo restante nos nove frascos puderam ser reaproveitados em uma segunda tentativa de fermentação. Assim, uma segunda inoculação foi realizada nos mesmos reatores da primeira tentativa. À medida que os dias avançaram, foram observados deslocamentos nos êmbolos das seringas dos reatores a 30 e 35 °C, no entanto, esses deslocamentos foram muito pequenos.

Diante da incerteza quanto ao sucesso da segunda inoculação, foi conduzida uma terceira tentativa de fermentação, simultânea à segunda. Assim, o meio de cultivo foi adicionado à 9 frascos estéreis, que foram hermeticamente fechados e destinados a uma autoclave para esterilização do meio. Por último foi realizada a inoculação da suspensão bacteriana. Dessa forma, segunda tentativa de fermentação se processou por 46 dias, enquanto a terceira prosseguiu ao longo de 32 dias.

Na incubadora a 20 °C, tanto a segunda inoculação quanto a terceira não apresentaram quaisquer evidências de produção gasosa, indicando que não houve fermentação e, por conseguinte, não produziu hidrogênio ou gás carbônico. Dessa forma, todos os seis reatores condicionados nesta faixa de temperatura não registraram movimento no êmbolo de suas seringas, conforme ilustrado nas Figuras 7 e 8:

Figura 7 - Reatores da segunda inoculação à 20 °C após 46 dias.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 8 - Reatores da terceira inoculação à 20 °C após 32 dias.



Fonte: Autor, 2023.

A não fermentação prosseguiu conforme o indicado na literatura, pois a *Enterobacter aerogenes* é um micro-organismo mesófilo, ou seja, tem como temperatura metabólica ideal entre 30 °C e 40 °C. Segundo Li e Fang (2007), temperaturas próximas de 37 °C são ideais para esse tipo de micro-organismo, pois favorecem seu processo metabólico.

Em seguida, procedeu-se à análise dos reatores que permaneceram na estufa mantida na temperatura de 30 °C. Dado que essa temperatura se encontrava dentro da faixa ideal para ativação metabólica desse tipo de bactéria, havia a expectativa de um significativo aumento na produção.

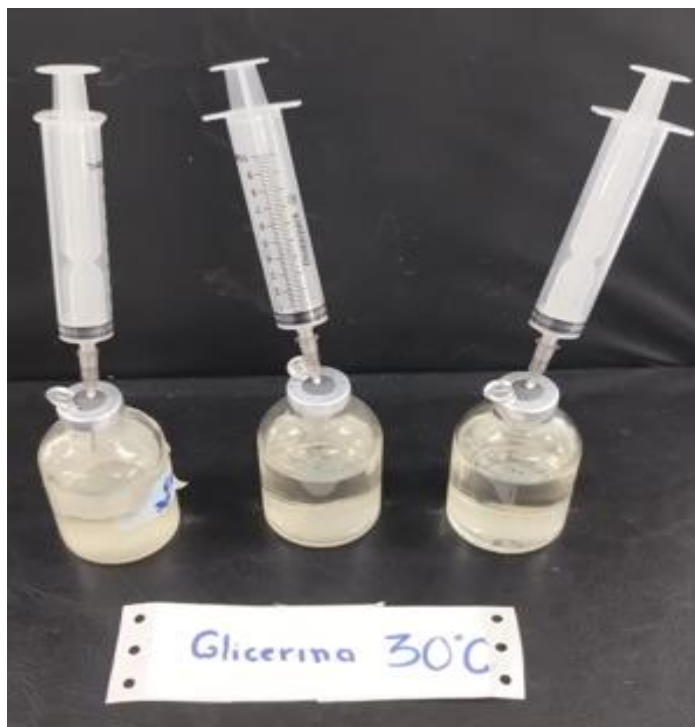
Figura 9 - Segunda inoculação à 30 °C após 46 dias.



Fonte: Autor, 2023.

Essa expectativa não se concretizou. Na Figura 9 foi observada a segunda fermentação, ocorrida por 46 dias, na qual os dois primeiros frascos não apresentaram produção gasosa, enquanto o terceiro, apesar de ter produzido pouco menos de 1 mL de gás, esse valor é insuficiente para que fosse possível realizar uma análise cromatográfica gasosa.

Figura 10 - Terceira inoculação à 30 °C após 32 dias.



Fonte: Autor, 2023.

No que diz respeito à terceira inoculação ocorrida por 32 dias, como ilustrado na Figura 10 acima, nenhum dos três reatores apresentou quaisquer resultados na produção gasosa, o que indica que a *Enterobacter aerogenes* não apresenta capacidade para metabolizar a glicerina, e a sua utilização inibiu o processo fermentativo.

Dado que o parâmetro utilizado na pesquisa foi a influência da variação da temperatura na fermentação utilizando glicerina como fonte de carbono, também foi analisado a fermentação em outra temperatura dentro da faixa de operação metabólica do microrganismo. Isso possibilitou a compreensão da temperatura ideal a ser empregada por esse tipo de bactéria. Dessa forma, a Figura 11 apresenta os resultados obtidos na segunda fermentação realizada na temperatura de 35 °C, após um período de 46 dias:

Figura 11 - Segunda fermentação à 30 °C após 46 dias.



Fonte: Autor, 2023.

A imagem deixa evidente que no caso do reator 2, a fermentação não ocorreu, enquanto nos reatores 1 e 3, houve uma produção de aproximadamente 1 mL. Embora a quantidade seja insuficiente para a realização de uma análise cromatográfica gasosa, ela é significativa ao demonstrar que, mesmo com um substrato inadequado, apesar da temperatura entre 30 e 35 °C ser a ótima para o micro-organismo em estudo, de acordo com a literatura, o mesmo não metabolizou a glicerina.

Figura 12 - Terceira inoculação à 35 °C após 32 dias.



Fonte: Autor, 2023.

Na Figura 12 está a terceira tentativa de inoculação, que durou 32 dias e foi condicionada a 35 °C, não foi observado nenhum indício de que a fermentação tenha ocorrido, o que reforça a incapacidade da *Enterobacter aerogenes* em produzir H₂ utilizando Glicerina, mesmo que se tenha a variação da temperatura.

Nesse sentido, em nível de enriquecimento do trabalho, foi preparado um novo reator empregando um tipo diferente de substrato. Essa abordagem permitiu uma comparação visual do impacto que a mudança na fonte de carbono causa na afinidade de fermentação do micro-organismo. Então, foi utilizado como substrato a Sacarose, sendo mantida a mesma concentração de 25 g/L utilizada para a Glicerina. Assim, a fermentação da sacarose ocorreu por 20 dias, numa estufa regulada para 30 °C, como mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Fermentação da sacarose a 30 °C por 20 dias.



Fonte: Autor, 2023.

Os resultados obtidos na fermentação da sacarose foram bastante significativos, evidenciados pelo considerável deslocamento dos êmbolos dos reatores 2 e 3, bem como pela necessidade de adição de uma nova seringa no reator 2. Outra análise interessante foi a mudança na turbidez do líquido, além da presença de bolhas dentro do reator, isso explicita a ocorrência da fermentação e configura a sacarose como substrato consideravelmente mais eficaz para o processo metabólico da *Enterobacter aerogenes*, quando comparado com a Glicerina.

Existem poucos trabalhos na literatura referente à produção de hidrogênio através da *Enterobacter aerogenes*. Contudo, Ito *et al.* (2005) avaliaram a produção de H_2 a partir de glicerol residual descartado do processo de fabricação do biodiesel. Para isso, utilizaram a cepa *Enterobacter aerogenes* HU-101 e também conduziram análises de produção H_2 com a utilização de glicerol puro como substrato.

O glicerol residual possuía uma concentração de 1,7 g/L e obteve uma taxa de produção de H_2 de 1,12 (mol H_2 /mol substrato). Em relação ao Glicerol puro, que possuía uma concentração de substrato de 5 g/L, a taxa de produção foi de 1,05 mol H_2 / mol substrato. Foi observada uma diminuição no rendimento de produção de H_2 à medida que a concentração do substrato aumentou. Isso se deve principalmente ao fato de que o excesso de substrato disponível leva a morte celular das bactérias (Ito *et al.*, 2005). Tal motivo justifica a completa inibição da produção de hidrogênio

ocorrida no presente trabalho, quando utilizado uma concentração de 25 g/L de glicerol a ser consumido pela *Enterobacter aerogenes*.

Lo *et al.*, (2013) também investigaram o potencial do glicerol em produzir hidrogênio, examinando a glicerina bruta, proveniente de resíduos da indústria de produção do diesel, e a glicerina pura, ambos substratos com concentração de 10 g/L. Para obter uma maior variedade de resultados, várias cepas bacterianas produtoras de H₂ foram utilizadas, como a *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum* e a *Klebsiella sp.* Dentre as bactérias analisadas, a *Clostridium pasteurianum* obteve os melhores resultados. Em relação à glicerina pura, essa cepa alcançou um rendimento de hidrogênio de aproximadamente 0,50 mol de H₂/ mol de substrato. No caso da glicerina residual, o rendimento obtido foi de 0,77 mol de H₂/ mol de substrato. Esses resultados são intrigantes, pois apontam que a glicerina residual pode ter um potencial superior ao da glicerina pura, a depender do micro-organismo utilizado.

Ngo, Kim e Sim (2011) utilizaram a cepa DSM 4359 da bactéria hipertermófila *Thermotoga neapolitana* para comparar a produção de H₂ entre o Glicerol puro e o residual. Para isso, consideraram uma concentração de 5 g/L de substrato, e assim foi verificado que o glicerol puro conseguiu atingir um rendimento 1,55 vezes maior. Além disso, realizaram a injeção de N₂ para controlar o pH e avaliar seu impacto no rendimento. O glicerol puro, sem tratamento adicional, alcançou um rendimento de 1,97 (mol H₂/ mol de substrato), enquanto que o glicerol residual atingiu 1,27 (mol de H₂/ mol de substrato). Já o rendimento do glicerol residual com a adição de N₂ para ajuste do pH, atingiu 2,73 (mol H₂/ mol de substrato), demonstrando ser uma técnica bastante eficaz.

Sá, Cammarota e Leitão (2014) conduziram uma análise da produção de H₂ através da *Clostridium sp.* Para isso, foram testados diversos tipos de substratos. Dentre todos, os que apresentaram os melhores resultados foram a Frutose e a Sacarose, com rendimentos de 2,09 e 4,0 (mol de H₂/ mol de substrato) respectivamente.

Dessa forma, com o objetivo de encontrar a melhor condição para produção do hidrogênio, foi montada a Tabela 3 a qual compila diferentes estudos encontrados na literatura, abordando a produção de hidrogênio por meio de diferentes micro-organismos e uma variedade de substratos.

Tabela 3- Rendimento de H₂ por diferentes bactérias e com substratos variados.

Micro-organismo	Substrato	(g/L)	(mol H ₂ /mol Subs.)	Referência
<i>E. aegorenes HU-101</i>	Glicerol Residual	1,7	1,12	Ito <i>et al.</i> , (2005)
<i>E. aegorenes HU-101</i>	Glicerol Puro	5	1,05	Ito <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. pasteurianum CH4</i>	Glicerol Residual	10	0,77	Lo <i>et al.</i> , (2013)
<i>C. pasteurianum CH4</i>	Glicerol Puro	10	0,5	Lo <i>et al.</i> , (2013)
<i>T. neapolitana DSM 4359</i>	Glicerol Residual	5	1,97	Ngo <i>et al.</i> , (2011)
<i>T. neapolitana DSM 4359</i>	Glicerol Puro	5	1,27	Ngo <i>et al.</i> , (2011)
<i>T. neapolitana DSM 4359</i>	Glicerol Res. com N ₂	5	2,73	Ngo <i>et al.</i> , (2011)
<i>Clostridium sp.</i>	Frutose	10	2,09	Sá <i>et al.</i> , (2014)
<i>Clostridium sp.</i>	Sacarose	10	4,62	Sá <i>et al.</i> , (2014)

Fonte: Autor, 2023.

Os resultados apresentados na Tabela 3 evidenciam os desafios enfrentados na produção de H₂ quando empregado o Glicerol como substrato. Ito *et al.* (2005) verificaram que a *Enterobacter aerogenes HU-101* apresentou uma melhoria no rendimento quando reduzida a concentração do substrato. Uma possível explicação é que o excesso de substrato provavelmente favorece rota de produção de outros subprodutos, entre eles o 1,3-propanodiol.

Lo *et al.* (2013) empregaram a *Clostridium pasteurianum CH4* com uma concentração de 10 g/L de glicerol, obtendo rendimentos de 0,77 (mol H₂/mol de substrato) para o glicerol residual, e 0,55 para o glicerol puro. Isso indica que esta cepa sofre inibição quando exposta a concentrações elevadas de substratos.

Ngo, Kim e Sim (2011) conduziram experimentos com um tipo de bactéria hipertermofílica, obtendo os melhores resultados na produção de H₂. A técnica de injeção de N₂ se mostrou bastante eficaz, visto que controla o pH do processo e, consequentemente, favorece a rota metabólica de produção do H₂. Assim, foi possível alcançar um rendimento de 2,73 mol de H₂/mol de substrato, apresentando assim ser uma técnica promissora a ser aplicada no processo de fermentação do H₂.

Sá, Cammarota e Leitão (2014) conduziram uma pesquisa comparativa na qual empregaram a *Clostridium sp* como bactéria produtora de H₂ e, como

substratos, a Sacarose e Frutose. Os resultados obtidos foram consideravelmente mais elevados, com a Sacarose alcançando um rendimento de 4,62 (mol H₂/mol substrato). Isso sugere que a *Enterobacter aerogenes* tem dificuldades na produção de H₂ por meio do Glicerol. A sensibilidade da bactéria a fatores como temperatura, pH e concentração induz a formação de outros metabólitos, entre eles é o ácido acético e o 1,3-propanodiol.

Ito *et al.* (2005) também analisaram o potencial da *Enterobacter aerogenes* HU-101 em produzir etanol através do consumo da glicerina, tanto pura quanto residual, variando a concentração de 1,7 g/L até 25 g/L. Assim, foi preparada a Tabela 4 relacionando a variação da concentração do substrato em relação ao rendimento de etanol produzido em mol Etanol/ mol Substrato.

Tabela 4 - Rendimento de etanol produzido em diferentes concentrações.

Micro-organismo		Enterobacter aerogenes HU-101						
Substrato		Glicerol Residual				Glicerol Puro		
g/L		1,7	3,3	10	25	5,0	10	25
mol etanol/mol substrato		0,96	0,83	0,67	0,56	1,0	0,86	0,8

Fonte: Adaptada, Ito *et al.* (2005).

Assim, para o glicerol residual, um pequeno aumento de concentração do substrato de 1,7 g/L para 3,3 g/L causou uma redução na taxa de etanol produzido de 0,96 para 0,83 mol etanol/mol substrato, o que representa uma queda de 13,54% no rendimento. Já quando a concentração utilizada foi de 25 g/L, igual a concentração do presente trabalho, quando comparado com a concentração de 1,7 g/L, houve uma redução significativa da taxa de etanol produzido para 0,56 mol etanol/mol substrato, o que representa uma queda de aproximadamente 42 %.

Em relação ao glicerol puro, esta tendência se manteve, com uma queda de 20% no rendimento do etanol produzido, de 1 para 0,8 mol etanol/mol substrato, quando a concentração de substrato tivera um aumento de 5 g/L para 25 g/L. Desse modo, fica evidente o impacto que o excesso de substrato causa no processo fermentativo, com uma queda significativa no rendimento do etanol produzido.

Quando realizado a comparação entre o glicerol residual e o puro em mesmas concentrações, verificou-se uma tendência de aumento no rendimento de produção do etanol quando utilizado o substrato de maior pureza. As concentrações de 10 g/L

o glicerol residual apresentou um rendimento de 0,67 mol etanol/mol substrato, enquanto que este valor cresceu para 0,86 mol etanol/mol substrato quando utilizado o glicerol puro, apresentando uma variação de 22%. Isso indica que os sais dissolvidos no glicerol residual inibem o processo fermentativo e consequentemente abaixam o rendimento de etanol produzido.

Com base nos resultados obtidos ao longo do experimento e na revisão da literatura, é possível inferir que o uso em excesso de substrato inibe o desenvolvimento do micro-organismo, e consequentemente, a produção de H_2 e etanol. Portanto, torna-se necessário a realização de novos experimentos empregando concentrações mais baixas de glicerina.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos foram interessantes e forneceram evidência de que a *Enterobacter aerogenes* sofre inibição pela glicerina, na concentração de 25 g/L utilizada no experimento, sequer houve crescimento. O efeito da inibição da glicerina foi de tal forma que não foi possível analisar o impacto da temperatura na produção de biohidrogênio.

Ademais, foram realizados testes com outro substrato, a sacarose, com o desígnio de analisar o impacto da mudança da fonte de carbono no processo metabólico da bactéria à temperatura de 30 °C. Assim, a sacarose mostrou ter uma maior potencialidade para esta finalidade, revelando assim um potencial significativo a ser explorado em futuras pesquisas para que seja viabilizada a produção em escala industrial.

Ao se comparar diversos trabalhos da literatura, variando-se os micro-organismos, substratos e concentrações do mesmo, identificou-se outras bactérias com resultados mais vantajosos quando comparadas com a *Enterobacter aerogenes*, como *Clostridium sp.* que obteve uma taxa de produção de hidrogênio de 4,62 mol de H₂/mol de substrato, quando utilizado uma concentração de 10 g/L de Sacarose, e a *Thermatoga neapolitana*, que alcançou um rendimento de aproximadamente 2,73 mol de H₂/mol de substrato quando utilizados uma concentração de 5 g/L de glicerina residual.

Ainda nesse estudo da literatura, verificou-se que o aumento da concentração do substrato reduziu o rendimento de formação do H₂, indicando inibição pelo substrato.

Assim, dado o interesse em melhorar o rendimento de produção do Biohidrogênio, as sugestões propostas para futuros estudos são:

- Refazer os experimentos utilizando a glicerina em concentrações mais baixas a temperatura ótima de 35 °C.
- Substituir o micro-organismo por outros mais eficientes como *Clostridium sp.* e *Thermotoga neapolitana* DSM 4359;
- Utilizar diferentes substratos em concentrações adequadas que, segundo a literatura, apresentam melhores resultados, como a Sacarose e a Frutose;
- Realizar a técnica de injeção de N₂, para verificar o efeito do mesmo na produção de H₂.

- Realizar experimentos em diversas temperaturas para encontrar a condição ótima de operação dos micro-organismos estudados.

6 REFERÊNCIAS

Abdallah, R.; Djelal, H.; Amrane, A.; Sayed, W.; Fourcade, F.; Labasque, T.; Genester, F.; Taha, S.; Floner, D. Dark fermentative hydrogen production by anaerobic sludge growing on glucose and ammonium resulting from nitrate electroreduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 5445-5455, 2016.

Agyekum, E. B.; Nutakor, C.; Agwa, M. A.; Kamel, S. A Critical Review of Renewable Hydrogen Production Methods: Factors Affecting Their Scale-Up and Its Role in Future Energy Generation'. **Membranes**, vol. 12, no. 2, p. 173, 2022.

Amorim, Eduardo Lucena Cavalcante de.; **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. São Carlos-SP, Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

Argun, H.; Kargi, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7443- 7459, 2011.

Barbosa, H. A. **Processos de produção e estocagem de hidrogênio: Uma revisão da literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso. Natal, RN: UFRN, 2020

Benemann JR. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. **Nat. Biotechnol.**, v.14, p.1101-1103, 1996.

Boodhun, B. S. F.; Mudhoo, A.; Kumar, G.; Kim, S.-H.; Lin, C.-Y. Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2017.

Botton, J.P. **Líquidos iônicos como eletrólitos para reações eletroquímicas**. Tese de Doutorado – Porto Alegre. RS: UFRGS, 2007.

Bruno F.O.; Dutra J.C.S; Bittencourt R.C.P; Pinto J.C.; Simulação e Controle da Reforma a Vapor de Controle de Temperatura de Gás Natural Utilizando Gás Residual. **Revista Industrial & Engineering Chemistry Research**, 56, 1-21, 2017.

Chong, M-L.; Sabaratnam, V.; Shirai, Y.; Hassan, A.; Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **Int. J. Hydrogen Energy**, v.34, 3277-3287, 2009.

Das, D.; Veziroglu, T.N.; Advances in biological hydrogen production processes. **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046, 2008.

Dincer, I.; Acar, C. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 34, p. 11094–11111, 2015.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2023: Ano base 2022**, Rio de Janeiro, 2022.

Fadigas, E. A. A.; Reis, L. B.; Carvalho, C. E. Energia, recursos naturais e a prática do desenvolvimento sustentável. 2 ed. rev. e atual. Barueri: **Manole**, 2012.

Fernandes, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Tese de Doutorado, São Carlos, SP: USP, p. 116, 2008.

Ferreira, F.L.; Santana, R.J.; Rapini, M. S.; Moura, R.F. Financiamento à Pesquisa em energia renovável no Brasil: uma análise a partir do Fundo Setorial de Energia. **Nova Economia**, v.32, n.02 p.505-537, 2022.

Fonseca, B. C. **“Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*”**. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, SP: USP, 2016.

Gomes, J. Eletrólise da água na obtenção de hidrogênio: o ressurgimento de uma tecnologia. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 10, n. 2, p. 1-3, 15 jun. 2022.

Guo, Y., Fan, S., Fan, Y., Pan, C., Hou, H. “The preparation and application of crude cellulase for cellulose-hydrogen production by anaerobic fermentation.” **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 459-468, 2010.

Hosseini, S. E.; Wahid, M. A. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 850-866, 2016.

Hsu, C.-W.; Lin, C.-Y. Commercialization model of hydrogen production technology in Taiwan: Dark fermentation technology applications. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4489–4497, 2016.

Ito, T.; Nakashimada, Y.; Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japan, v. 100, n. 3, p. 260–265, 2005.

Kapdan, I.K.; Kargi, F. “Bio-hydrogen production from waste materials.” **Enzyme and Microbial Technology**, p. 569-582, 2006.

Lakshmidēvi, R., Muthukumar, K. “Enzymatic saccharification and fermentation of paper and pulp industry effluent for biohydrogen production.” **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3389-3400, 2010.

Lettinga, G. **Sustainable integrated biological wastewater treatment**. Water Science and Technology, v. 33, p. 85-98, 1996.

Li, C.; Fang, H.H.P.; Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 39, 2007.

Lo, Y.; Chen, X.; Huang, C.; Yuan, Y.; Chang, J. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal Of Hydrogen Energy**, Vol 38, Taiwan, pp. 15815-15822, 2013.

Longo, M. A. V.; Lazzarin, N.; Miguez, T. A.; **Produção Biológica de Hidrogênio**. Florianópolis. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Florianópolis, SC: UFSC, 2008.

Marbán, G; Valdés-Solis, T; “Towards the hydrogen economy?” **Int. J. Hydrogen Energy**, Vol. 32, pp. 1625-1637, 2007.

Mathews, J.; Wang, G. ‘Metabolic Pathway Engineering for Enhanced Biohydrogen Production’. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, vol. 34, no. 17, pp. 7404–16, 2009.

Mishra, A., Gautam, S.; Sharma, T. Effect of operating parameters on coal gasification. **Int J Coal Sci Technol**. v. 5, pag. 113–125, Mar. 2018.

Nagarajan, D.; Lee, D.-J.; Kondo, A.; Chang, J.-S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 373–387, mar. 2017.

Neves, L.M.V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. Dissertação de Engenharia Química e Bioquímica. Lisboa- PT: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova, 2009.

Ngo, T. A.; Kim, M. S.; Sim, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal Of Hydrogen Energy**, Seoul - South Korea, p. 01-07, 2011.

Nogueira, L. A. H.; Capaz, R. S.; Lora, E. S. Bioenergia no Brasil: onde estamos e quais nossos horizontes. **Revista Brasileira de Energia**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 1-10, 1 jan. 2021. Trimestral.

Pachapur V.L.; Sarma S.J.; Brar S.K.; Le Bihan Y.; Buelna G.; M. V. Biological hydrogen production using co-culture versus mono-culture system. **Environmental Technology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 55–70, 2015. <https://doi.org/10.1021/es001979r>

Page, S.; Krumdieck, S.; System-level energy efficiency is the greatest barrier to development of the hydrogen. **Energy Policy**, 37, 3325, 2009.

Paz, A. R. Da. **Produção de Hidrogênio por Via Biológica Utilizando Micro-organismo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Recife, PE: UFPE, 2022.

Rodrigues, T. **Avaliação da produção de hidrogênio a partir da microalga *Chlamydomonas reinhardtii***. Dissertação de Mestrado. Toledo, PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2016.

Rosa, M.F.; Souza Filho, M. S. M.; Figueiredo, M. C.; Morais, J. P. S.; Santaella, S. T., Leitão, R. C.; **Resumos do II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais - II SIGERA**, Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

Sá, D. V. R. L. **Produção Biológica de Hidrogênio Por Bactérias Fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou Glicerina como Substrato**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2011.

Sá, L. R. V.; Cammarota, M.C.; Leitão, V. S. F. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 05, p. 857-867, 2014.

Santos, K. G dos., Rossi E., Kugelmeier, C. L., Tietz, C. M., Alves, H. J. Fermentação anaeróbica: Uma alternativa para a produção de Hidrogênio. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.1, p. 1-12, 2012.

Schlapbach, L., Züttel, A. Hydrogen-storage materials for mobile applications. **Nature**, v. 414, p. 353-358, 2001.

Silva, I. A.; Hidrogênio: Combustível do Futuro. **Ensaio e Ciência: Ciências biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 20, num. 2, p. 122-126, 2016.

Singh, S., Sudhakaran, A., Sarma, P., Subudhi, S., Mandal, A., Lal, G. “Dark fermentative biohydrogen production by mesophilic bacterial consortia isolated from riverbed sediments.” **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10645-10652, 2010.

Siqueira, M. R. **Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por fermentação**. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto-SP: Universidade de São Paulo – FFCLRP. 59p, 2015.

Soresen, B. **Total life cycle assessment of PEM fuel cell car. Report, Energy and Environment Group**, Roskilde University Denmark, 2004.

Souza, Isabela Morato de. **Avaliação da produção de bio-hidrogênio e da expressão do gene glpF durante a fermentação de glicerol por Enterobacter sp.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Ouro Preto, Minas Gerais: UFOP, 2018.

Souza, Isadora Torres. **Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia: Enriquecimento nutricional e influência da luminosidade**. Dissertação de 54 Mestrado, Uberlândia, Minas Gerais: UFU, 2017.

Wang, J.L., e Wan, W. “Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures.” **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 5392-93, 2008.

Wicher, E.; Seifert, K.; Zagrodnik, R.; Pietrzyk, M.; Laniecki, M. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 7767-7773, 2013.

Zhang, Z.; Wang, Yi.; Hu, Jianjun.; Wu, Qinglin.; Zhang, Quanguo. Influence of mixing method and hydraulic retention time on hydrogen production through photofermentation with mixed strains. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 6521- 6529, 2015.