



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENGENHARIA QUÍMICA

VITOR PEREIRA DE SOUZA BRITO

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA
UTILIZANDO *ENTEROBACTER AEROGENES* E SACAROSE COMO
SUBSTRATO

RECIFE

2023

VITOR PEREIRA DE SOUZA BRITO

**PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA
UTILIZANDO *ENTEROBACTER AEROGENES* E SACAROSE COMO
SUBSTRATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado do curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química sob orientação da Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha.

RECIFE

2023

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

Brito, Vitor Pereira de Souza .

Produção biológica de hidrogênio por fermentação anaeróbica utilizando
Enterobacter aerogenes e sacarose como substrato / Vitor Pereira de Souza
Brito. - Recife, 2023.

59p. : 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. Enterobacter aerogenes. 2. Fermentação. 3. Hidrogênio. I. Palha, Maria
de Los Angeles Perez Fernandez . (Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)


VITOR PEREIRA DE SOUZA BRITO

**PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA
UTILIZANDO *ENTEROBACTER AEROGENES* E SACAROSE COMO
SUBSTRATO**


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

Aprovado em: 28 / 09 / 2023 .


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ**
Data: 04/10/2023 16:19:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez F. Palha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 **SONIA SOUSA MELO CAVALCANTI DE ALBUQUE**
Data: 03/10/2023 11:12:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Sônia Melo C. De Albuquerque (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 **GEISELY ALVES DA SILVA**
Data: 03/10/2023 10:58:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Dedico este trabalho a Nino Pereira, Nami Maria e Marie Louise, meus três gatos que sempre me acompanharam nas noites de estudo. Especialmente a Nami, por quase ter apagado meu documento várias vezes ao deitar-se em cima do notebook.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Adelma Pereira e Josenildo Brito, por todo cuidado, amor e suporte durante minha trajetória neste plano.

Agradeço ao meu irmão, Guilherme Pereira, pelo companheirismo e por todas as noites de estudo compartilhadas.

Agradeço a minha grande e eterna amiga, Tamaris Martins, por todo apoio, incentivo e carinho ao longo desses anos.

Agradeço a Profa. Dra. Maria de Los Angeles, pela orientação com imensa atenção e dedicação, além de ter disponibilizado seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Gisely Alves e Maria da Conceição, do Laboratório de Microbiologia Industrial, pelo apoio durante a realização das atividades.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Vinicius, pela coorientação, pelos conhecimentos compartilhados e por disponibilizar seu laboratório e toda sua estrutura física para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, especialmente ao Departamento de Engenharia Química (DEQ), e a todos os professores e amigos desta instituição, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia”
Alvo Dumbledore

RESUMO

Atualmente, o cenário energético global é definido pelo aumento exponencial das demandas energéticas, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e os impactos ambientais associados às emissões de CO_2 . Com isso, a busca por um mundo energeticamente sustentável exige a redução da dependência desses combustíveis e a mitigação da poluição acarretada pelas suas queimas. É nesse contexto que o hidrogênio surge como uma alternativa interessante, uma vez que não polui o meio ambiente e produz apenas água durante a sua combustão. Além do mais, esse biocombustível gera cerca de 2,75 vezes mais energia quando comparado aos hidrocarbonetos, o que corrobora para a ampliação da matriz energética renovável do Brasil e do mundo. A utilização de processos biológicos para produzir hidrogênio vem se mostrando uma das metodologias mais promissoras para o futuro. Dentre tais tecnologias, a fermentação anaeróbica se destaca pela flexibilidade em aproveitar diversos materiais residuais como substrato, alta capacidade de produção de hidrogênio, e por produzir metabólitos intermediários de elevado valor agregado. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura na produção de hidrogênio por meio de uma fermentação anaeróbica, utilizando a bactéria *Enterobacter aerogenes* e sacarose como substrato. O estudo utilizou três sistemas com temperaturas controladas, uma incubadora BOD fixada em 20°C, uma estufa de 30°C e uma estufa de 35°C, e analisou a produção de hidrogênio por meio da técnica de cromatografia gasosa. O processo fermentativo apresentou maior eficiência no sistema com a temperatura ótima de 35°C. Todavia, por igualmente estar dentro da faixa de temperatura apropriada para o crescimento de bactérias mesófilas, o sistema com temperatura de 30°C também obteve boa produção de hidrogênio, o que não ocorreu no sistema de 20°C. Em relação a produção do metabólito etanol, constatou-se que a *Enterobacter aerogenes* é menos eficiente do que outros micro-organismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*.

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

ABSTRACT

Currently, the global energy scenario is defined by the exponential increase in energy demands, the depletion of fossil fuel reserves and the environmental impacts associated with CO₂ emissions. Therefore, the search for an energetically sustainable world requires reducing dependence on these fuels and mitigating the pollution caused by their burning. It is in this context that hydrogen emerges as an interesting alternative, as it does not pollute the environment and only produces water during its combustion. Furthermore, this biofuel generates around 2.75 times more energy when compared to hydrocarbons, which contributes to the expansion of the renewable energy matrix in Brazil and the world. The use of biological processes to produce hydrogen has proven to be one of the most promising methodologies for the future. Among such technologies, anaerobic fermentation stands out for its flexibility in using various waste materials as substrate, high hydrogen production capacity, and for producing intermediate metabolites with high added value. Therefore, the present work aimed to evaluate the influence of temperature on hydrogen production through anaerobic fermentation, using the bacteria *Enterobacter aerogenes* and sucrose as substrate. The study used three systems with controlled temperatures, a BOD incubator set at 20°C, a 30°C oven and a 35°C oven, and analyzed hydrogen production using the gas chromatography technique. The fermentation process was more efficient in the system with the optimum temperature of 35°C. However, because it is also within the appropriate temperature range for the growth of mesophilic bacteria, the system with a temperature of 30°C also achieved good hydrogen production, which did not occur in the 20°C system. With regard to the production of the metabolite ethanol, it was found that *Enterobacter aerogenes* is less efficient than other microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*; Fermentation; Hydrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Reportagem sobre o calor excessivo no Rio de Janeiro	19
Figura 2:	Número de publicações sobre hidrogênio por ano, de janeiro de 2010 a setembro de 2021	20
Figura 3:	Esquema simplificado de uma célula a combustível tipo PEMFC	21
Figura 4:	Emissões de CO_2 por fonte de energia, nos anos de 2020 e 2021	22
Figura 5:	Oferta interna de energia total no Brasil – 2021 (%)	23
Figura 6:	Oferta interna de energia no Brasil, de acordo com o tipo de fonte - 2021 (%)	24
Figura 7:	Reforma de vapor para a produção de hidrogênio	28
Figura 8:	Eletrólise da água	30
Figura 9:	Etapas da fermentação anaeróbia	33
Figura 10:	Processo de tamponação para esterilização dos reatores utilizados na fermentação	37
Figura 11:	Seringas acopladas aos reatores durante o processo fermentativo para captação de gás	39
Figura 12:	Cromatógrafo Gasoso utilizado para as análises de biohidrogênio	40
Figura 13:	Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) utilizado para as análises de Etanol	41
Figura 14:	Seringas acopladas aos reatores do sistema de 20°C após 21 dias de fermentação	43
Figura 15:	Seringas retiradas dos reatores do sistema de 30°C após 21 dias de fermentação	44
Figura 16:	Seringas acopladas aos reatores do sistema de 35°C após 21 dias de fermentação	44
Figura 17:	Cromatograma de uma das amostras gasosas	48
Figura 18:	Curva de calibração do etanol	50
Figura 19:	Pico cromatográfico do etanol obtido pela amostra P1 de 30°	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Teor energético de combustíveis, a 20°C e 1 atm	26
Tabela 2:	Composição do meio de cultivo para os ensaios de produção de H_2	37
Tabela 3:	Volume de gás produzido em cada sistema	45
Tabela 4:	Áreas dos picos cromatográficos e concentração de hidrogênio nas amostras gasosas	47
Tabela 5:	Produção de hidrogênio em cada sistema estudado	47
Tabela 6:	Dados para a curva de calibração do etanol	50
Tabela 7:	Áreas cromatográficas e concentrações das amostras de etanol	51

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas: combustíveis fósseis, água e biomassa **27**
- Quadro 2:** Micro-organismos, vantagens e desvantagens para a produção de H_2 **31**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR6	Sexto Relatório de Avaliação
AVG	Ácidos Orgânicos Voláteis
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CG	Cromatografia Gasosa
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
COP	Conferência das Partes
CSTR	Reator de Tanque com Agitação Contínua
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
GEE	Gases do Efeito Estufa
HCC	Hidrocraqueamento Catalítico
HDT	Hidrotratamento
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IEA	Agência Internacional de Energia
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima
MTEP	Milhões de Toneladas de Petróleo Equivalente
OIE	Oferta Interna de Energia
ONU	Organização das Nações Unidas
PEMFC	Membrana Polimérica Trocadora de Prótons
REB	Resenha Energética Brasileira
TCD	Detector de Condutividade Térmica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Fontes renováveis no Brasil e a importância do hidrogênio no contexto atual	22
2.2 Hidrogênio	26
2.2.1 A molécula e suas propriedades	26
2.2.2 Rotas de produção do hidrogênio	27
2.2.2.1 Reforma do gás natural e outros hidrocarbonetos	28
2.2.2.2 Gaseificação	29
2.2.2.3 Eletrólise da água	30
2.2.2.4 Produção microbiológica	31
2.3 Fermentação anaeróbica	33
2.4 Micro-organismos	34
2.4.1 Culturas puras	34
2.4.2 Culturas mistas	35
2.5 Reatores	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Condições operacionais da fermentação	37
3.2 Seleção e esterilização dos reatores	37
3.3 Preparação do meio de cultura	38

3.4 Coleta do micro-organismo e preparação do inóculo	39
3.5 Análises cromatográficas	41
3.5.1 Análise do Hidrogênio	41
3.5.2 Análise do Etanol	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Produção de gases	44
4.2. Análise do hidrogênio	46
4.3 Análise do etanol	49
4.3.1 Curva de calibração	49
4.3.2 Análise quantitativa de etanol nas amostras	50
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

No século XXI, o cenário energético global é definido pelo aumento das demandas energéticas, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e as consequências ambientais negativas associadas ao uso prolongado desses combustíveis. Diante dessa realidade, torna-se imprescindível a adoção de novas políticas que promovam o desenvolvimento de fontes de energia alternativas e sustentáveis (Sá; Livia, 2014).

Com o intuito de garantir um futuro energético mais sustentável, tem ocorrido um aumento na procura por fontes renováveis de energia. Nesse sentido, o hidrogênio vem se destacando como uma alternativa altamente viável, uma vez que não polui o meio ambiente e produz apenas vapor d'água durante a combustão (Luo *et al.*, 2010). Além disso, o hidrogênio apresenta a maior densidade energética por unidade de massa em comparação com outros combustíveis, sendo 2,75 vezes mais energético que os hidrocarbonetos (Mu, Wang e Yu, 2006), o que é um aspecto importante a ser considerado.

De acordo com a Resenha Energética Brasileira (REB) mais recente, as tecnologias renováveis são consideradas uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo e apresentam alto potencial de expansão. No Brasil, a matriz energética é liderada pela fonte hídrica, seguida por fontes fósseis, eólica, biomassa, solar e nuclear. Com isso, há uma crescente ideia de desenvolvimento sustentável e incentivo ao avanço da matriz energética renovável, especialmente por meio do uso de biocombustíveis com baixa emissão de carbono (Resenha Energética Brasileira, 2022).

Diversos métodos convencionais são utilizados para a produção de H_2 , dentre os quais se destacam a reforma a vapor de gás natural (metano) e petróleo, a decomposição catalítica de gás natural, a oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e a gaseificação de carvão ou coque. Entretanto, essas tecnologias requerem altos níveis de energia, uma vez que são aplicadas em temperaturas elevadas. Além disso, conforme relatado por (Guariero *et al.*, 2022), aproximadamente 96% da produção atual de H_2 tem origem em fontes de combustíveis fósseis.

Por outro lado, no que diz respeito às tecnologias destinadas à produção biológica do gás, há várias bactérias, cianobactérias e algas que são capazes de gerá-

lo a partir da água, energia solar e diferentes substratos orgânicos. Destaca-se o método de fermentação anaeróbia, em virtude da maior eficiência na produção de gás quando comparado a outros processos biológicos, além da possibilidade de utilizar inúmeros resíduos como substrato (Matheus; Wang, 2009).

Embora diversos centros de tecnologia venham contribuindo para o desenvolvimento de métodos voltados à produção de hidrogênio, é válido ressaltar que ainda existem poucas pesquisas focadas na produção biológica de H_2 . Outro aspecto relevante é que essa forma de produção ainda representa uma parcela muito pequena da produção total de hidrogênio, correspondendo somente a 1%, conforme apontado por Los (2011).

Sendo assim, o avanço das pesquisas científicas contribuirá para o desenvolvimento de novas técnicas e processos, tornando cada vez mais acessível à implantação do hidrogênio no suprimento das necessidades energéticas da população.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Avaliar a produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbica em reator do tipo batelada, utilizando bactérias do gênero *Enterobacter aerogenes* e sacarose como substrato.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência da temperatura no processo fermentativo.
- Analisar a produção de hidrogênio por cromatografia gasosa.
- Analisar a produção de etanol por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A demanda energética global tem experimentado uma rápida expansão em virtude do aumento populacional e da economia industrializada. Segundo a U.S. Energy Information Administration (2016), o consumo mundial de energia alcançou a marca de 21,6 trilhões de KWh em 2012, prevendo-se um aumento de 70% desse valor até o ano de 2040.

O consumo de energia *per capita* é um dos indicadores utilizados para avaliar o desenvolvimento econômico das nações, visto que os recursos energéticos são considerados fundamentais para a estabilidade e prosperidade de um país (Araújo *et al.*, 2020). Na sociedade moderna, a energia é empregada para atender necessidades básicas como o fornecimento de calor para o preparo de refeições, eletricidade para a iluminação de residências e a refrigeração de alimentos, além de ser essencial para o desenvolvimento das atividades industriais que suprem outras demandas indispensáveis.

Nas últimas décadas, o aumento do consumo de combustíveis fósseis, como gasolina, diesel e metano, acarretou consequências negativas, tais como o aquecimento global, a chuva ácida e a deterioração da camada de ozônio (Das; Veziroglu, 2001). Além do mais, o petróleo é uma fonte não renovável de energia, ou seja, seu consumo supera a sua produção (Santos; Pinto, 2009).

Recentemente, a temperatura global média atingiu um aumento de 1,1 °C. Embora esse valor possa parecer pouco expressivo, já se fazem notar os impactos desse fenômeno sobre a natureza, como o derretimento das calotas polares e o consequente aumento no nível dos oceanos (Serra, 2007).

O Sexto Relatório de Avaliação (AR6) do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (2021) adverte que a continuidade do aquecimento global resultará em mudanças climáticas em todas as regiões do planeta, tais como aumento de temperatura, ampliação das estações quentes, ondas de calor e redução dos extremos de frio. Adicionalmente, o AR6 prevê que caso o limite de elevação de temperatura de 1,5 °C seja ultrapassado em 2050, haverá consequências significativas para a economia e saúde humana, bem como para o meio ambiente

(Masson-Delmotte, 2021). A Figura 1 apresenta uma notícia sobre o calor, emitida em um jornal carioca (O GLOBO), em 1984.

Figura 1 - Reportagem sobre o calor excessivo no Rio de Janeiro



Fonte: Jornal O Globo (1984).

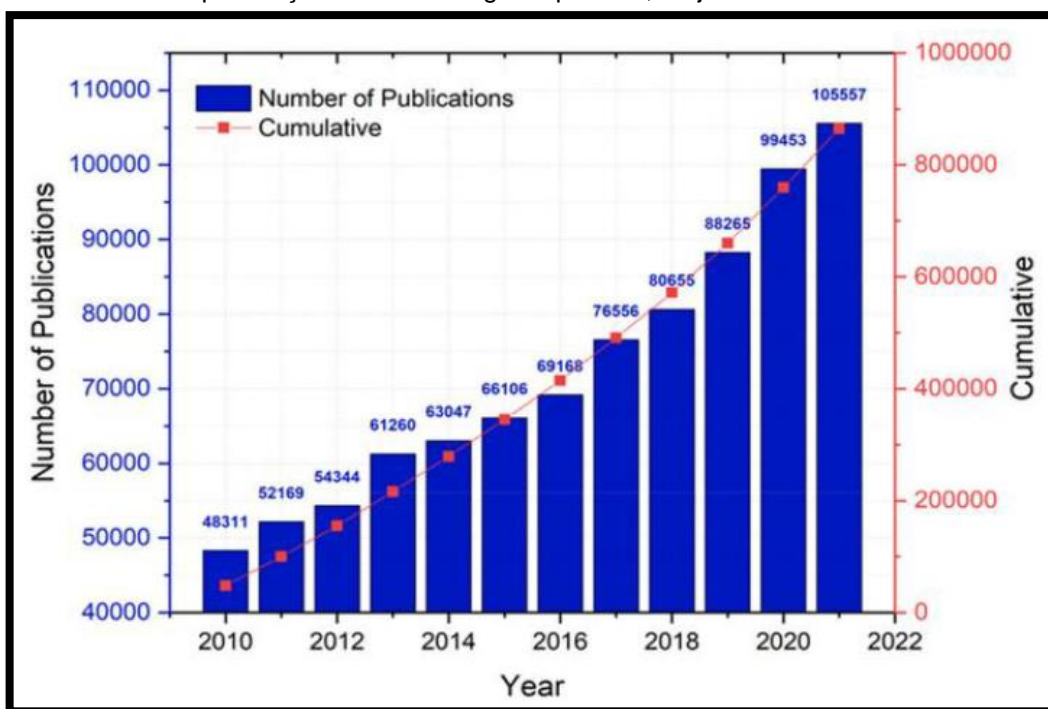
Com o intuito de solucionar essa questão, a Organização das Nações Unidas (ONU) tem promovido conferências desde 1972, ano em que foi realizada a Conferência de Estocolmo. Através desses encontros, foram estabelecidos acordos multilaterais com o objetivo de enfrentar as mudanças climáticas. Dentre os acordos de maior relevância, destacam-se a Agenda 21, firmada em 1992 durante a Eco-92, o Protocolo de Quioto, estabelecido em 1997 durante a COP III, o Acordo de Paris, celebrado em 2016 durante a COP XXI, e o Pacto de Glasgow, firmado em 2021 durante a COP XXVI (ONU, 2021).

Garantir a geração de energia com as devidas medidas de preservação ambiental é um dos maiores desafios nos dias atuais. O aumento da discussão sobre o aquecimento global tem estimulado a pesquisa e o uso de fontes energéticas alternativas, com menor impacto ao meio ambiente (Sá, Lívian, 2014). É nesse contexto que a produção de hidrogênio tem sido apontada como uma alternativa bastante atraente.

O hidrogênio (H_2) tornou-se relevante por ser um combustível livre de carbono, além de ter alto poder calorífico e ser um transportador de energia concentrado, o que pode levar a uma redução significativa das emissões de carbono (Allianz, 2022).

Durante a última década, houve um evidente crescimento no interesse pela pesquisa sobre hidrogênio, visto que o número de estudos publicados sobre esse assunto mais do que duplicou entre 2010 e 2021, conforme visto na Figura 2.

Figura 2 - Número de publicações sobre hidrogênio por ano, de janeiro de 2010 a setembro de 2021.



Fonte: Guarieiro *et al* (2022)

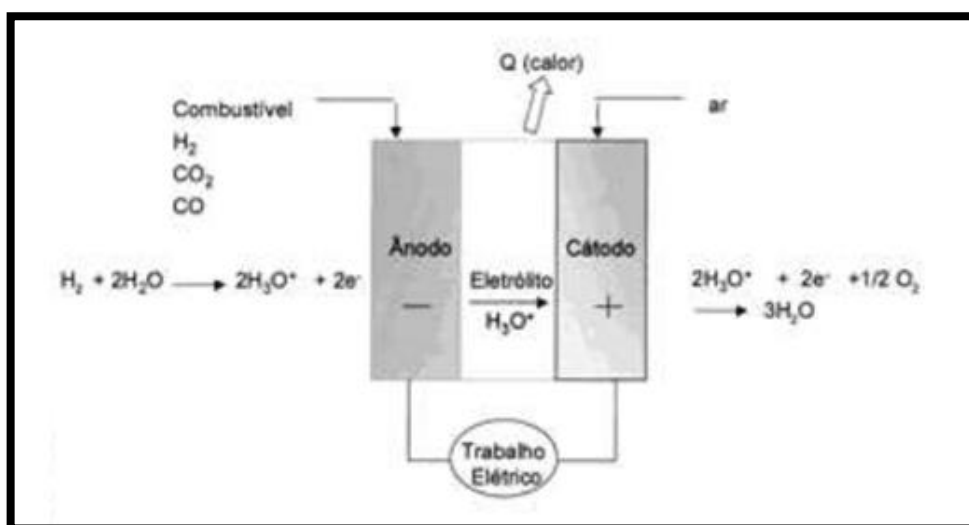
Apesar de já existirem tecnologias para o emprego do hidrogênio em veículos, a disponibilidade do gás como combustível ainda é limitada. A maior parcela do hidrogênio comercializado globalmente é destinada a setores da indústria farmacêutica, química e alimentícia (Souza, 2017).

Na indústria química, o hidrogênio é usado principalmente para fabricar metanol (CH_3OH) e amônia (NH_3), que respondem por 27,0% e 10,0% da demanda mundial, respectivamente. Anualmente, são produzidas mais de 180 milhões de toneladas de amônia para a fabricação de fertilizantes agrícolas, produtos farmacêuticos, têxteis, explosivos e refrigeração. A demanda total da indústria química por hidrogênio é de 48 milhões de toneladas por ano, o que representa 40,0% da demanda global por hidrogênio (AIE, 2019).

No setor petroquímico, o hidrogênio puro é bastante utilizado para a obtenção de frações leves e intermediárias por meio do processo de hidrocrackeamento (HCC) e no hidrotratamento (HDT) de cortes de petróleo (Da Cruz, 2010). Esse setor é responsável por 33% da demanda mundial de hidrogênio, o que equivale a 38 milhões de toneladas por ano (AIE, 2019).

Apenas uma pequena fração do hidrogênio produzido é utilizada como combustível para transporte. No entanto, é possível empregar o hidrogênio como um vetor energético por meio da tecnologia de células de combustível. Esses dispositivos são responsáveis por converter a energia química do hidrogênio em energia elétrica por meio da reação entre o combustível gasoso e uma substância oxidante, como o oxigênio presente no ar (Stambouli; Traversa, 2002). A Figura 3 ilustra um esquema simplificado de uma célula de combustível.

Figura 3 – Esquema simplificado de uma célula a combustível tipo PEMFC.



Fonte: Wendt, Götz e Linardi (1999)

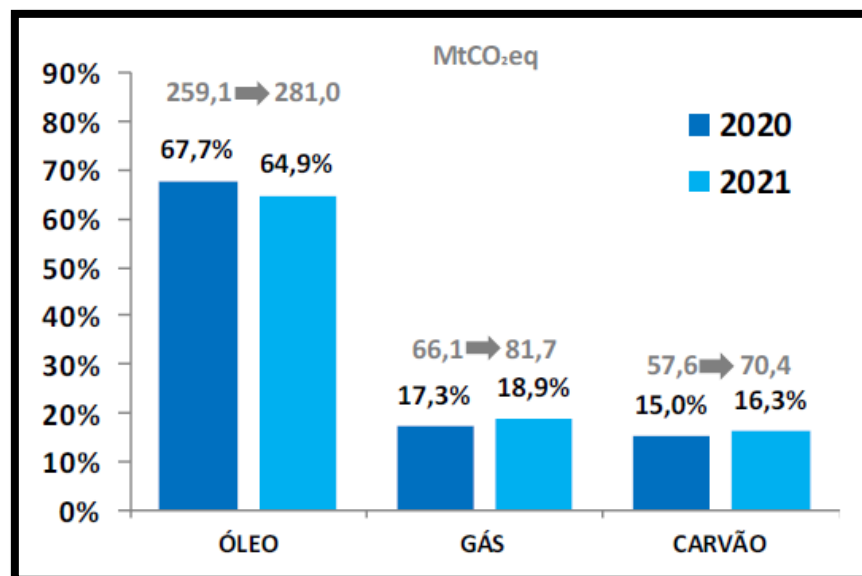
Conforme ilustrado na Figura 3, a célula de combustível consiste em dois eletrodos (ânodo e cátodo) e um eletrólito posicionado entre eles, semelhante ao eletrolisador. Durante a geração de energia elétrica, o hidrogênio (H₂) flui pelo ânodo, onde é oxidado em cátions hidrônios (H⁺) e libera elétrons. Esses cátions H⁺ se deslocam através do eletrólito e reagem com as moléculas de oxigênio (O₂) que entram pelo cátodo da célula, produzindo água (H₂O) (COSTA, 2007).

O hidrogênio passou a ser visto como um objetivo estratégico entre governos e empresas em todo mundo e, por isso, políticas energéticas pós pandemia tem impulsionado o seu mercado com a finalidade de retomar a economia e acelerar a transição energética em diversas nações (EPE, 2021). Com isso, ele é projetado para cobrir 12% da demanda global de energia e diminuir 10% das emissões de CO_2 até 2050 (Obriem, 2022). O tamanho do mercado de hidrogênio será estimado em US\$ 2,5 trilhões, o que corresponde à metade do tamanho do mercado atual de petróleo (Alvarenga, 2021).

2.1 Fontes renováveis no Brasil e a importância do hidrogênio no contexto atual

De acordo com o relatório da Global Energy Review, publicado pela Agência Internacional de Energia (IEA), no ano de 2021, o Brasil apresentou um aumento de 13,2% em suas emissões de gases de efeito estufa (GEE) devido ao consumo de energia, totalizando 433,1 milhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente (MtCO₂ eq) (Resenha Energética Brasileira, 2022). A Figura 4 apresenta um levantamento das emissões de dióxido de carbono (CO_2) nos anos de 2020 e 2021, na qual evidencia a expressiva contribuição das fontes de energia não renováveis, tais como óleo, gás e carvão.

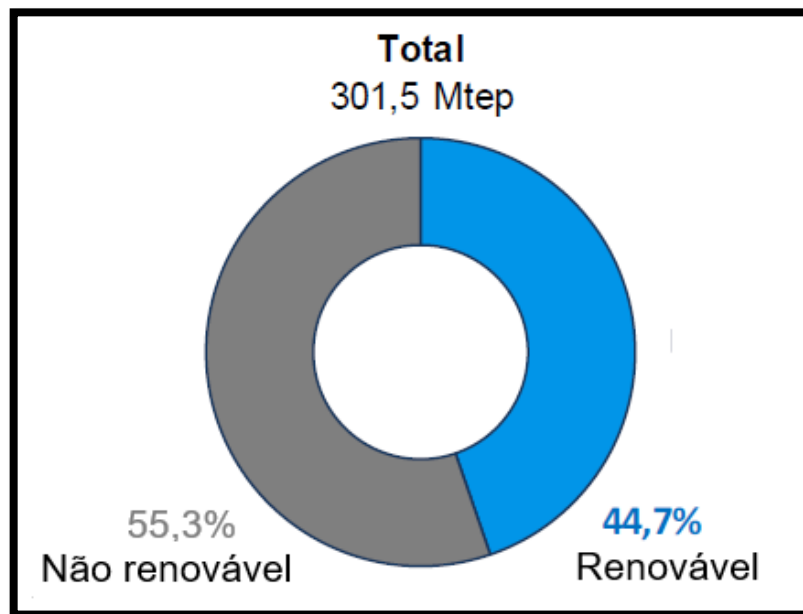
Figura 4 - Emissões de CO₂ por fonte de energia, nos anos de 2020 e 2021



Fonte: Resenha Energética Brasileira (2022)

Por outro lado, o Brasil se destaca pela diversidade de recursos naturais renováveis. Atualmente, possui uma matriz energética composta por 45% de energia renovável, o que contrasta com o percentual de cerca de 14% encontrado em outros países (Dos Santos *et al.*, 2012). Na Figura 5 é possível visualizar a oferta interna de energia total do Brasil.

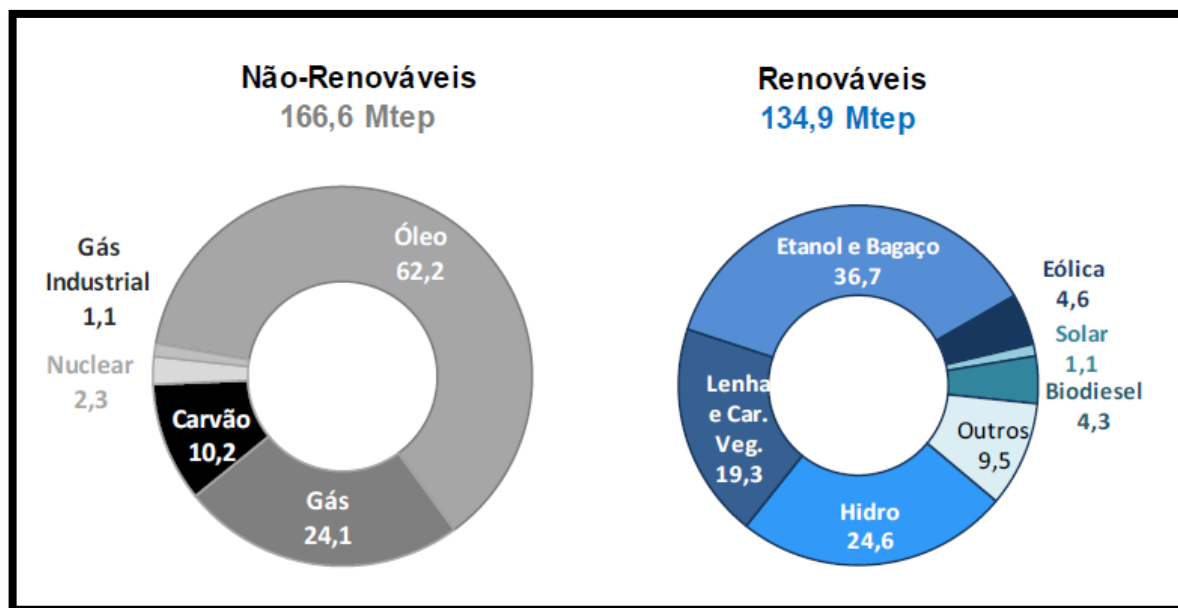
Figura 5 - Oferta interna de energia total no Brasil – 2021 (%)



Fonte: Resenha Energética Brasileira (2022)

As energias renováveis se configuram como fontes energéticas limpas que contribuem para a diversificação da matriz energética, além de serem menos poluentes estão alinhadas à ideia do desenvolvimento sustentável (Farias; Martins; Cândido, 2021). A Figura 6 ilustra a estrutura da oferta interna de energia (OIE) de acordo com o tipo de fonte de energia.

Figura 6 - Oferta interna de energia no Brasil, de acordo com o tipo de fonte – 2021 (%)



Fonte: Resenha Energética Brasileira (2022)

Em relação à matriz não renovável, nota-se que o petróleo é a principal fonte de energia, representando mais de 60% que corresponde a 103,62 Mtep. Em contrapartida, no que se refere à matriz renovável, o etanol e o bagaço são as principais fontes de energia, responsáveis por uma parcela de 36,7% ou 49,51 Mtep.

A respeito da economia brasileira, é possível notar uma variedade na eficácia das cadeias produtivas em função das leis e políticas do país. Um exemplo é o setor sucroenergético, que exerce grande influência na economia desde os tempos coloniais e foi pioneiro na substituição de recursos fósseis por renováveis (Périco; Silva, 2021).

Segundo o balanço energético da Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2022), o volume de energia produzido a partir da cana-de-açúcar alcançou um pico histórico de 54,9 Mtep em 2021. Entre as fontes renováveis que compõem a oferta nacional de energia, a biomassa proveniente da cana contribuiu com 19,1%, destacando o Brasil no cenário mundial com uma participação de 9,1% devido à geração significativa a partir do bagaço da cana e da lixívia.

Contudo, de acordo com a Resenha Energética Brasileira (REB) de 2022, houve uma queda de 3,8% na participação das fontes renováveis na matriz energética do Brasil devido à redução da contribuição do setor hidráulico, na qual foi afetado pelo

baixo regime de chuvas. Além disso, a oferta de derivados da cana também sofreu com condições climáticas adversas, como a estiagem durante o ciclo produtivo das lavouras e as baixas temperaturas em importantes regiões produtoras nos meses de junho e julho de 2021. No entanto, as fontes renováveis não tiveram uma redução ainda maior devido ao aumento na participação de outras fontes renováveis, incluindo eólica e solar, que apresentaram um aumento de 13,2% (EPE, 2022).

Embora as fontes renováveis mencionadas tenham uma contribuição significativa, é imprescindível que sejam estudadas e desenvolvidas novas tecnologias para a produção de energia renovável, a fim de expandir a matriz energética brasileira. Essas novas tecnologias apresentam potencial para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) de maneira sustentável, sendo muitas delas independentes de fatores climáticos (EPE, 2022).

Todos esses recursos disponíveis tornam favorável a introdução gradual do gás hidrogênio como uma possível fonte de energia, o que poderia proporcionar uma significativa participação do Brasil no cenário mundial de energias renováveis. Por isso, esse biocombustível é extremamente estratégico para a economia, tecnologia e meio ambiente (Dos Santos *et al.*, 2012).

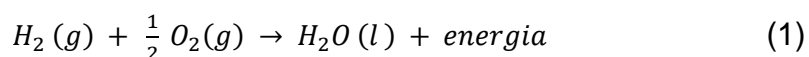
2.2 Hidrogênio

2.2.1 A molécula e suas propriedades

O Hidrogênio é o elemento mais simples da tabela periódica sendo composto por apenas um próton e um elétron. Na Terra, o H é geralmente encontrado em compostos com outros elementos como o oxigênio, carbono e nitrogênio. Normalmente, quando puro, existe sob a sua forma diatômica H_2 , a qual em condições normais de pressão e temperatura (CNTF) é um gás incolor, insípido, inodoro e não venenoso (RSC, 2015).

O gás hidrogênio (H_2) possui 1/14 da densidade do ar e pode ser encontrado na atmosfera em uma concentração de 1:1.000.000 (v/v). A forma liquefeita da molécula possui ponto de ebulição de $-252,88\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um ponto de fusão de $-259,16\text{ }^{\circ}\text{C}$

quando em estado sólido (ABE, 2007). O H_2 foi reconhecido e caracterizado pela primeira vez em 1766 por Henry Cavendish, que posteriormente o queimou e verificou que sua combustão produzia água, segundo a equação (1) (Cruz, 2010).



Em termos de energia, o hidrogênio apresenta uma vantagem em relação aos combustíveis tradicionais. A Tabela 1 exibe o teor energético por unidade de massa de alguns combustíveis.

Tabela 1 - Teor energético de combustíveis, a 25°C e 1 atm

Combustível	Teor de Energia (KJ/g)
Hidrogênio	141,9
Metano	55,5
Gasolina	47,5
Gasóleo	20,0

Fonte: Adaptado de Souza, 2018

A principal diferença entre o gás hidrogênio e a eletricidade reside no fato de que, por ser composto de moléculas e não apenas elétrons, o hidrogênio pode ser utilizado como um portador de energia química, o que facilita no seu armazenamento e transporte (Mathews; Wang, 2009).

2.2.2 Rotas de produção do hidrogênio

Atualmente, os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa (Souza, 2009). Alguns dos processos mais significativos estão citados no Quadro 1.

Quadro 1 - Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa

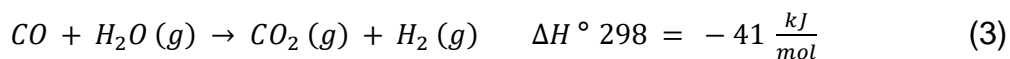
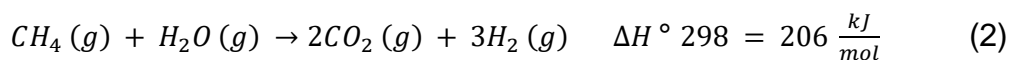
Matérias-primas	Métodos
Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água Processos foto-eletrquímicos Processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos (biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbica) Gaseificação da biomassa Reforma a vapor do etanol Reforma em fase líquida

Fonte: Sá *et al* (2014)

Entre os métodos citados no Quadro 1, acredita-se que a reforma do gás natural seja responsável por aproximadamente 40% da produção de hidrogênio, seguida pela oxidação de hidrocarbonetos pesados com 30%, gaseificação de carvão com 18% e eletrólise da água com 5% (Das; Veziroglu, 2008). No momento, a produção biológica de hidrogênio contribui com apenas 1% da produção total. No entanto, é esperado que essa proporção aumente consideravelmente à medida que novas técnicas e processos forem desenvolvidos (Neves, 2009).

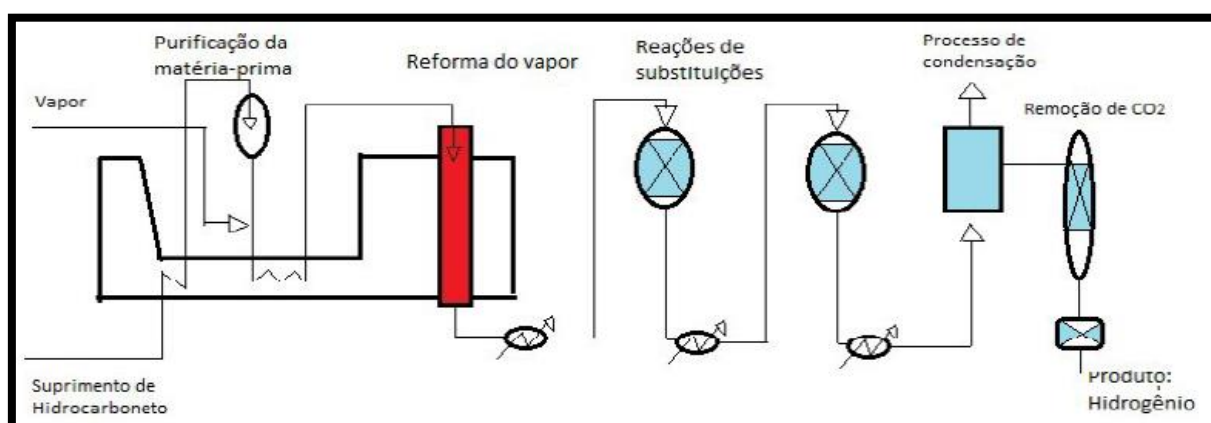
2.2.2.1 Reforma do gás natural e outros hidrocarbonetos

Este método consiste na exposição do gás natural ou outros hidrocarbonetos a vapor d'água a altas temperaturas, na presença de um catalisador, resultando na produção de hidrogênio, monóxido de carbono e dióxido de carbono (Andrade, 2003). Neste processo químico ocorre a ruptura das ligações carbono-hidrogênio com a formação de hidrogênio. Os principais tipos de catalisadores utilizados são platina, ferro, cromo, ródio, rutênio, estanho, molibdênio e gálio, quase sempre na forma de óxidos e suportados em alumina ou zeólitas (Dantas, 2011). As equações (2) e (3) exemplificam o processo de reforma de vapor utilizando metano.



Por ser um processo endotérmico, sua principal desvantagem é a necessidade de alta energia e altas pressões para que a conversão ocorra. Além do mais, essas condições extremas acabam resultando na desativação do catalisador, seja por sinterização, que pode diminuir a atividade catalítica devido à redução da área superficial ativa, ou pela formação de coque, que consiste na deposição de carbono na superfície do catalizador (Trimm, 1999). A Figura 7 apresenta um esquema industrial para a produção de hidrogênio através da reforma de vapor.

Figura 7 - Reforma de vapor para a produção de hidrogênio

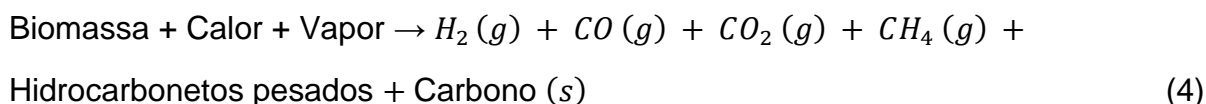


Fonte: Sá, 2011

De acordo com (Marbán; Valdés-solis, 2007), a eficiência de conversão da reforma a vapor do gás natural pode alcançar 65-75% em pequenas unidades descentralizadas e aumenta para 85% em grandes sistemas centralizados. Os custos atuais para a obtenção de hidrogênio a partir de reforma de gás é de 1,0 - 2,0 USD/kg H₂ (Nogueira *et al.*, 2021).

2.2.2.2 Gaseificação

Este processo é realizado numa atmosfera completamente oxidante, seja pela presença de oxigênio puro ou de vapor de água, e em temperaturas superiores a 970K, o que acarreta a produção de hidrogênio e outros gases. Diversas matérias primas orgânicas podem ser gaseificadas, dentre as quais madeira e resíduos agrícolas (Barbosa, 2020). A equação (4) mostra um sistema de gaseificação usando biomassa como matéria prima.

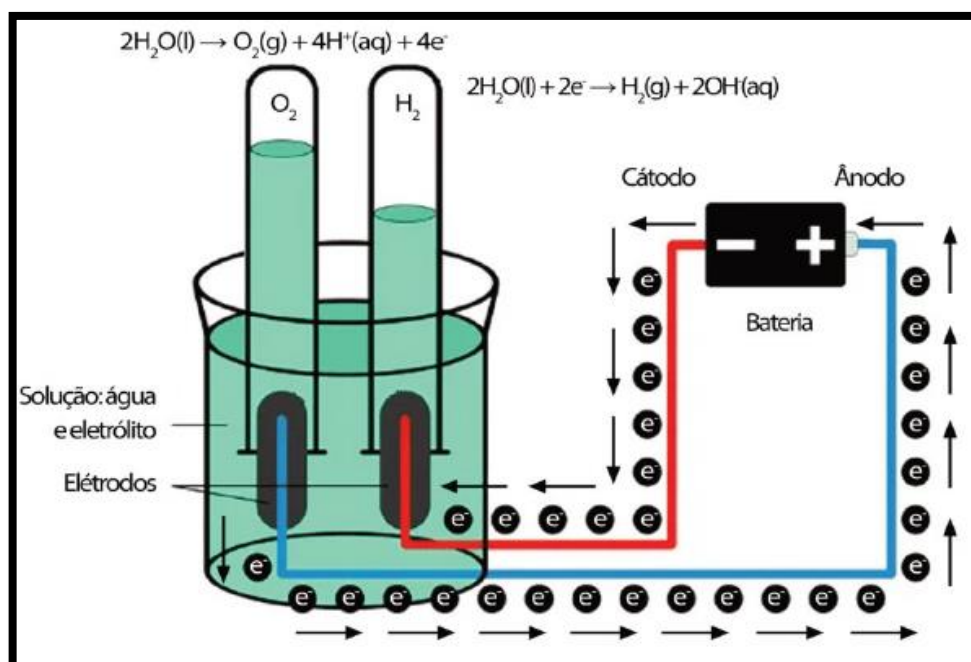


A técnica de gaseificação do carvão, por exemplo, consiste em sua pirólise na presença controlada de oxigênio, vapor de água, ar e dióxido de carbono, ocorrendo a uma temperatura de aproximadamente 700°C. Diversos tipos de gaseificadores são utilizados para esse propósito, como o de leito móvel e fluidizado (Mishra; Gautan; Sharma, 2018).

2.2.2.3 Eletrólise da água

Por definição, a eletrólise da água é a reação química de oxirredução provocada devido à passagem contínua de uma corrente elétrica, na presença de um eletrólito, resultando na dissociação da molécula da água em seus constituintes, hidrogênio e oxigênio. Esse processo tem uma eficiência de aproximadamente 95% (Gomes, 2022). A Figura 8 ilustra um esquema de como funciona o processo de eletrólise da água.

Figura 8 - Eletrólise da água



Fonte: Gomes, 2022

Atualmente, há um maior interesse na utilização da rota eletrolítica para a obtenção de hidrogênio devido à possibilidade de integração com fontes renováveis de energia. Especialmente no contexto brasileiro, o emprego de energia eólica e fotovoltaica para esse fim vem se mostrando bastante promissor. Além do mais, a água utilizada geralmente é proveniente de fontes salinas, previamente submetida a um processo de dessalinização, o que torna a eletrólise ainda mais viável, visto que a água do mar é abundante e os processos de dessalinização já são amplamente utilizados (Mesquita, 2022).

Segundo Nogueira et al. (2021), o custo de produção do hidrogênio via eletrólise é de 3,5-6.5 USD/Kg H_2 , valor considerado alto quando comparado com os outros métodos. Todavia, a Agência Internacional de Energia (IEA, em inglês) divulgou, em seu relatório de 2021, que a aposta mundial de produção do hidrogênio mediante eletrólise está concentrada no Brasil. Este enfoque é motivado pela variedade de fontes renováveis presente no país, em especial as energias eólicas e solares, que prometem reduzir os custos deste processo. Deste modo, o Conselho Global de Energia Eólica considera estas fontes energéticas bastante estratégicas para o barateamento da produção do hidrogênio verde, atraindo empresas de diversos países para investirem em solos brasileiros (Walter, 2021).

2.2.2.4 Produção microbiológica

A geração de hidrogênio por meio de processos biológicos vem se mostrando uma das metodologias mais promissoras para o futuro. Embora ainda não tenham sido implementadas plantas industriais para a produção biológica de hidrogênio, pesquisas nessas áreas apresentaram um notável crescimento (Souza, 2017). Com o aprimoramento das rotas existentes, essas metodologias têm potencial de se tornarem altamente competitivas em termos econômicos, uma vez que podem aproveitar biomassa de resíduos de baixo custo. Além disso, apresentam baixo gasto energético e uma redução significativa nas emissões de gases do efeito estufa, sendo possível operar em condições de temperatura e pressão ambientes (HSU; Lin, 2016).

Nos processos biológicos, bactérias e microalgas têm sido relatadas com alto potencial para a produção de hidrogênio. Esses micro-organismos apresentam rotas metabólicas baseados em processos fotossintéticos ou fermentativos. Atualmente, as principais rotas metabólicas estudadas são as metodologias de biofotólise direta e indireta, fotofermentação, fermentação escura e sistemas híbridos, que envolvem a utilização de mais de uma rota biológica. (Souza, 2017). O quadro 2 apresenta as vantagens e desvantagens de cada uma das metodologias citadas.

Quadro 2 - Microrganismos, vantagens e desvantagens para a produção de H_2

Processo	Microrganismo	Vantagens	Desvantagens
Biofotólise direta	Microalgas	Pode produzir H_2 diretamente a partir da água e luz solar. Alta eficiência na conversão de luz e ciclo isento de carbono.	Requer alta intensidade de luz. Síntese de O_2 que é um inibidor para o sistema.
Biofotólise indireta	Cianobactérias	Pode produzir H_2 a partir de H_2O . Habilidade de fixar N_2 .	Alto gasto de ATP. Síntese de O_2 que é um inibidor para o sistema.
Fotofermentação	Bactéria púrpura não sulfonada	Pode utilizar efluentes ricos em substratos orgânicos.	O_2 é um inibidor. Necessidade de iluminação constante. CO_2 presente no gás.
Fermentação	Bactérias anaeróbicas	Pode produzir hidrogênio na ausência de iluminação. Diversidade de substratos. Produção de metabólitos intermediários de valor agregado.	Necessidade de tratamento do efluente após a fermentação. CO_2 presente no gás.
Sistema híbrido		Aumento do rendimento da produção de H_2 .	Utilização de dois reatores. CO_2 presente no gás.

Fonte: Adaptado de Rai e Singh, 2016

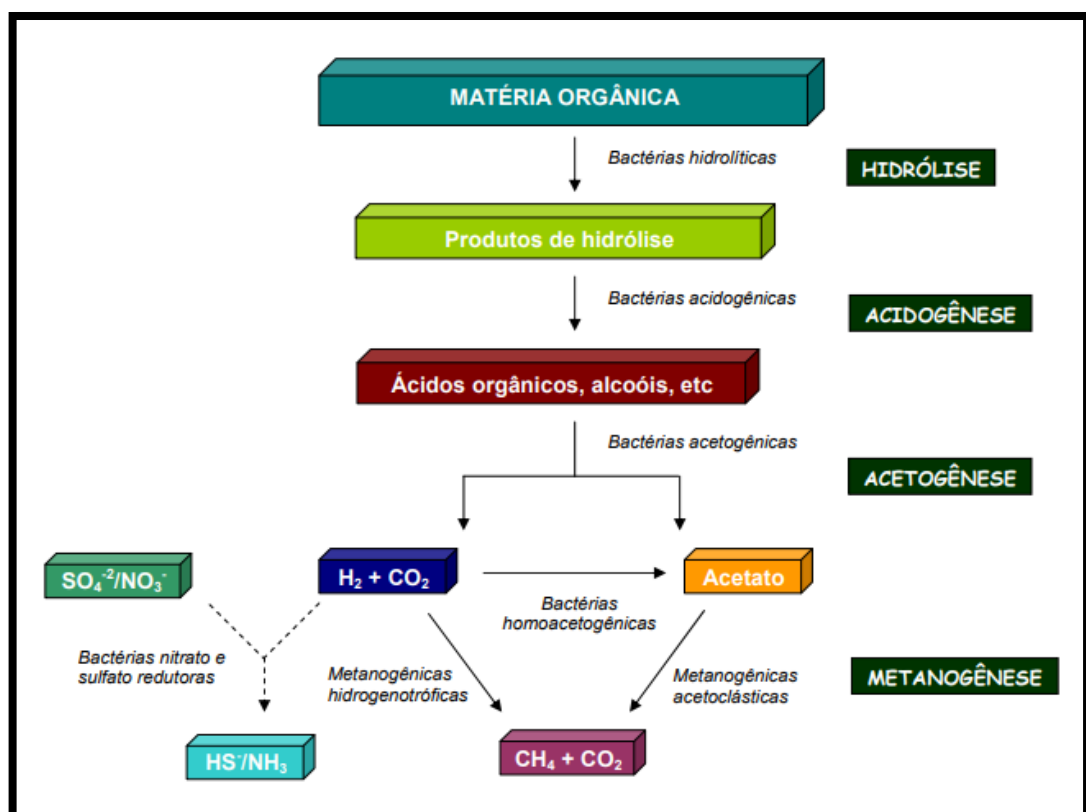
No contexto de tais tecnologias, a fermentação anaeróbica se destaca por apresentar maior capacidade de produção de hidrogênio quando comparada com os demais processos biológicos. Além disso, sua flexibilidade em utilizar diversos materiais residuais, como substrato, viabiliza não apenas a transição de uma matriz não renovável para uma renovável, mas também a geração de resíduos menos perniciosos ao meio ambiente (Mathews; Wang, 2009).

2.3 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

A fermentação anaeróbia para produção de metano é um processo biológico onde um consórcio de diferentes tipos de micro-organismos, na ausência de oxigênio, promove a conversão de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em compostos mais simples, como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, H_2 , CO_2 e CH_4 (Sá et al, 2014).

O processo de fermentação anaeróbia é dividido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A Figura 9 apresenta uma representação esquemática dessas etapas.

Figura 9 - Etapas da fermentação anaeróbia



Fonte: Sá et al. (2014)

Na hidrólise, as bactérias hidrolíticas secretam enzimas extracelulares que desencadeiam a degradação de materiais particulados complexos em substâncias

dissolvidas mais simples, tornando-as permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Na acidogênese, os compostos solúveis resultantes da hidrólise são metabolizados dentro das células bacterianas, onde são transformados em compostos de estrutura mais simples. Entre esses compostos, destacam-se os ácidos orgânicos voláteis (AVG), álcoois, dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio (H_2) e a formação de novas células bacterianas. Na acetogênese, as bactérias acetogênicas oxidam os produtos gerados na etapa anterior em hidrogênio e ácido acético, fornecendo esses compostos às arqueias metanogênicas. Durante essa fase, o hidrogênio produzido também pode ser transformado em ácido acético por meio das bactérias homoacetogênicas. Na etapa final do processo, as arqueias metanogênicas convertem o hidrogênio (H_2) e o ácido acético em metano (CH_4) e monóxido de carbono (CO). Essas arqueias metanogênicas podem ser categorizadas em dois grupos: as metanogênicas acetoclásticas, que utilizam ácido acético como substrato, e as metanogênicas hidrogenotróficas, que utilizam H_2 como substrato (Estevam, 2017).

Ao longo de todo o processo, alguns metabolitos secundários produzidos são imediatamente consumidos, incluindo o hidrogênio (H_2). Portanto, para a produção de H_2 , o processo precisa ser interrompido após a fase da acetogênese (Albanez, 2015).

2.4 MICRO-ORGANISMOS

A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia pode ser realizada por intermédio de culturas microbianas mistas, derivadas de ambientes naturais, ou por culturas puras, selecionadas a partir de bactérias produtoras de H_2 (Sá; Lívan, 2014).

2.4.1 Culturas puras

Diversas linhagens de bactérias têm sido empregadas para produzir hidrogênio a partir dos mais variados substratos. As principais vantagens na utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, à redução de subprodutos indesejados, à melhor manipulação do metabolismo através de alterações nas condições de crescimento e aos elevados rendimentos de H_2 . No entanto, culturas

puras são bastante sensíveis à contaminação, o que geralmente demanda o emprego de condições assépticas mais rigorosas e aumento dos custos globais do processo (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010).

Dentre os micro-organismos utilizados para produção de H_2 via processo fermentativo, destacam-se as espécies dos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Thermoanaerobacterium* (Kraemer e Bagley, 2007). As espécies do gênero *Clostridium* são gram-positivas, em forma de bastão e estritamente anaeróbicas, enquanto as espécies do gênero *Enterobacter* são gram-negativas, em forma de bastão e anaeróbicas facultativas (Li e Fang, 2007).

2.4.2 Culturas mistas

A utilização de culturas mistas é bastante favorável em processos de grande escala, visto que o emprego de meios não estéreis facilita o controle e a operação do processo, reduzindo os custos globais (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010). Além do mais, a redução do custo pode ser ainda maior quando utilizadas culturas mistas provenientes de fontes naturais, tais como lodo de esgoto (Chen, Lin e Lin, 2002), solo (Logan et al., 2002), excreta de animais (Lay et al., 2003) ou resíduos (Antonopoulou et al., 2008).

A principal desvantagem na utilização de culturas mistas, considerando o aspecto financeiro do processo, está relacionada com a provável presença de micro-organismos consumidores de H_2 no meio, tais como as bactérias homoacetogênicas, as arqueias metanogênicas e as bactérias sulfato e nitrato redutoras (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010).

2.5 Reatores

A maioria dos estudos referentes à produção de H_2 por via fermentativa anaeróbia tem sido conduzida em reatores operados em batelada. Tais reatores possuem a vantagem de serem simples, flexíveis e de fácil operação. No entanto, operações em grande escala requerem processos contínuos de produção por razões práticas e econômicas (Guo et al., 2010; Wang e Wan, 2009).

No processo contínuo em escala laboratorial, o reator de tanque agitado contínuo tem sido frequentemente utilizado (Arooj et al., 2008). Outros tipos de reatores também têm sido destacados, tais como o reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (Chang e Lin, 2004), biorreator de leito empacotado (Leite et al., 2008); reator de leito fixo (Li, Zhang e Fang, 2006), biorreator de leito fixo e ascendente (Peixoto, 2008); reator batelada anaeróbio em série (Cheong, Hansen e Stevens, 2007) e reator de leito fluidizado anaeróbio (Zhang *et al.*, 2007), entre outros.

Em alguns estudos, verificou-se que o processo em batelada apresenta maiores rendimentos de H_2 quando comparado ao modo contínuo. Lin e Lay (2004) produziram H_2 utilizando sacarose como substrato e obtiveram como resultado 2,66 mols de H_2 /mol de sacarose para os testes em batelada e 1,73 mols de H_2 /mol de sacarose, para os testes em um reator do tipo CSTR. Lin e Cheng (2006), por sua vez, avaliaram a produção de H_2 a partir de uma cultura mista utilizando xilose como substrato. Os autores também observaram maior rendimento de H_2 para os testes em batelada, 2 mol de H_2 /mol de xilose, do que para os testes em modo de operação contínuo, 0,7 mol de H_2 /mol de xilose. Estes resultados podem ser atribuídos ao microambiente substancialmente diferente no reator em batelada quando comparado aos reatores contínuos (Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste segmento está estruturada a metodologia e os materiais utilizados para os experimentos e análises da produção biológica de hidrogênio, na qual foram realizados no laboratório de microbiologia industrial e no laboratório de cromatografia instrumental do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.1 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA FERMENTAÇÃO

Com o objetivo de investigar a influência da temperatura na fermentação, os experimentos foram conduzidos em três temperaturas distintas. Considerando que a *Enterobacter aerogenes* pertence ao grupo de bactérias mesófilas, cujo crescimento ocorre na faixa de temperatura entre 20°C e 40°C, as temperaturas selecionadas para este estudo foram: 20°C, 30°C e 35°C.

3.2 SELEÇÃO E ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES

Para a condução dos experimentos em batelada, optou-se pela utilização de frascos de penicilina de 60 mL como reatores. A pesquisa foi realizada em triplicata com a finalidade de garantir a validade estatística dos resultados. Com isso, para cada temperatura, foram utilizados três reatores, totalizando nove reatores no estudo. Cada reator foi adequadamente tamponado com algodão hidrófobo, conforme a Figura 10, e, em seguida, submetidos a um processo de esterilização em um forno de Pasteur, mantidos a uma temperatura de 180°C, por um período de duas horas.

Figura 10 - Processo de tamponação para esterilização dos reatores utilizados na fermentação.



Fonte: Autor, 2023

3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultivo foi preparado baseado na composição de (Sá, 2011), conforme a Tabela 2, utilizando sacarose como fonte de carbono.

Inicialmente, pesou-se todos os nutrientes com o auxílio de uma balança analítica de precisão. Para preparação da solução nutritiva, 500 mL de água destilada foram adicionados a uma proveta e, gradualmente, os recipientes contendo os nutrientes foram lavados a fim de transferir seus conteúdos para um béquer. Com o auxílio de um bastão de vidro, a solução presente no béquer foi agitada cuidadosamente até que se atingisse uma completa homogeneização. Em seguida, foram adicionados 43,2 mL do meio de cultivo preparado em cada um dos reatores. Por fim, os reatores foram lacrados com borracha e selo flip off e seguiram para serem esterilizados em autoclave a 121°C por 13 minutos.

Tabela 2 – Composição do meio de cultivo para os ensaios de produção de H_2

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

Fonte: Adaptado de Sá, 2011

3.4 COLETA DO MICRO-ORGANISMO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Nesse estudo foi utilizada uma cultura pura da bactéria *Enterobacter aerogenes* (UFPEDA 348) proveniente do laboratório de coleção microbiana do departamento de antibióticos da UFPE. Inicialmente, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi realizado o repique das células do micro-organismo em um meio sólido inclinado contendo ágar nutritivo, utilizando a técnica de estria sinuosa, em zig-zag, da base até a extremidade do tubo de ensaio. Após dois dias de incubação, foi constatado o crescimento microbiano sem nenhum indício de contaminação. Em seguida, a massa de micro-organismo foi suspensa em água destilada e transferida para um erlenmeyer estéril, onde uma suspensão microbiana de 50 mL foi preparada. Com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland, a concentração da suspensão foi ajustada para aproximadamente 3×10^8 UFC/mL, por meio de uma comparação visual da turbidez

com o tubo 1 de referência. Por fim, foram adicionados 4,8 mL da suspensão em cada um dos reatores e acoplou-se seringas estéreis, conforme a Figura 11, com o objetivo de captar e armazenar os gases produzidos durante a fermentação.

Figura 11 - Seringas acopladas aos reatores durante o processo fermentativo para captação de gás



Fonte: Autor, 2023

Após a inoculação, os reatores foram distribuídos em 3 sistemas com temperaturas controladas, uma incubadora BOD fixada em 20°C, uma estufa de 30°C e uma estufa de 35°C. A fim de monitorar o processo, os reatores foram inspecionados em intervalos de três dias e, sempre que necessário, seringas adicionais foram inseridas para expandir o volume de captação dos gases. Após 3 semanas de fermentação, todos os sistemas que apresentaram resultados expressivos na produção gasosa foram selecionados para serem analisados no laboratório de cromatografia instrumental.

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

3.5.1 Análise do hidrogênio

As seringas contendo as amostras gasosas foram retiradas dos reatores, colocadas em um suporte para facilitar o transporte e levadas cuidadosamente até o cromatógrafo. O equipamento utilizado foi da Thermo Scientific, modelo HP-5890 SERIES II da HEWLETT PACKARD, mostrado na Figura 12, com detector de condutividade térmica (TCD) e temperatura do forno em torno de 80°C. A coluna cromatográfica empregada foi uma PORAPAK-M com 6 metros de comprimento, 3/8 polegadas de diâmetro e partículas com 40-60 Mesh de espessura na fase estacionária. A fase móvel consistiu em nitrogênio com vazão de 30 mL/minuto.

Figura 12 - Cromatógrafo Gasoso utilizado para as análises de biohidrogênio.



Fonte: Autor, 2023

Com o auxílio de uma seringa microinjetora de 1 mL, as amostras gasosas foram injetadas no equipamento com um volume padronizado de 200µL (microlitros). Em seguida, o botão "Start" do software foi pressionado para dar início às análises e gerar os cromatogramas. Cada análise durou cerca de 5 minutos.

A fim de analisar quantitativamente a produção de hidrogênio em cada amostra, foi necessário inicialmente realizar uma calibração. Para isso, foram injetados 200 μ L (microlitros) de H₂ 100% puro, as quais foram analisadas em duplicata pelo equipamento.

3.5.2 Análise do etanol

As amostras líquidas foram filtradas com o auxílio de um funil e papel de filtro e, em seguida, encaminhadas para serem analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi o CIOLA & GREGORY modelo CG 410-B, indicado na Figura 13, com detector de índice de refração. A coluna cromatográfica empregada foi uma HPX-87H da BIO-RAD, com fluxo de 0,65 mL/min e volume de injeção de 20 microlitros. A fase móvel consistiu em uma solução de 0,5 mmol de ácido sulfúrico por litro de água.

Figura 13 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) utilizado para as análises de Etanol.



Fonte: Autor, 2023

Inicialmente, a válvula de injeção foi posicionada em “Load” para retirar o loop da linha cromatográfica. Utilizando uma seringa analítica com cuidado para evitar a introdução de bolhas de ar no equipamento, foi injetada uma quantidade apropriada de amostra suficiente para preencher completamente o loop, cuja capacidade volumétrica é de 200 microlitros. O excesso de amostra escoou pela linha de descarte. Em seguida, a válvula foi deixada na posição "Inject", permitindo que a fase móvel arrastasse a amostra para dentro da coluna cromatográfica. Por fim, o botão "Start" do software foi pressionado para dar início à análise e gerar os cromatogramas.

A fim de analisar quantitativamente a produção de etanol em cada amostra, foi necessário inicialmente construir uma curva de calibração. Para isso, prepararam-se seis soluções com diferentes concentrações de etanol, as quais foram analisadas em triplicata pelo equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE GASES

Conforme os procedimentos realizados, a estimativa do volume de gases gerados em cada sistema foi obtida por meio do deslocamento dos êmbolos das seringas. Desta forma, os reatores acondicionados na incubadora BOD não apresentaram produção significativa de gás, como ilustrado na Figura 14. Tal resultado pode ser atribuído ao fato de que a temperatura de 20°C encontra-se no limite inferior da faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento das bactérias mesófilas, a exemplo da *Enterobacter aerogenes*.

Figura 14 – Seringas acopladas aos reatores do sistema de 20°C após 21 dias de fermentação



Fonte: Autor, 2023

Em contrapartida, todos os reatores acondicionados nas estufas de 30°C e 35°C tiveram resultados consideráveis na produção gasosa, indicando que houve

crescimento microbiano ao longo dos 21 dias. Nas Figuras 15 e 16 é possível observar o deslocamento dos êmbolos das seringas acopladas nos reatores dos dois sistemas.

Figura 15 – Seringas retiradas dos reatores do sistema de 30°C após 21 dias de fermentação



Fonte: Autor, 2023

Figura 16 – Seringas acopladas aos reatores do sistema de 35°C após 21 dias de fermentação



Fonte: Autor, 2023

Os volumes de gás produzidos em cada um dos sistemas estudados estão expressos na Tabela 3.

Tabela3 – Volume de gás produzido em cada sistema

Sistemas	Reatores	Volume (mL)	Volume total (mL)
20°C	A1	0,0	0
	A2	0,0	
	A3	0,0	
30°C	A1	18,8	47,4
	A2	9,8	
	A3	18,8	
35°C	A1	6,6	33,2
	A2	6,8	
	A3	19,8	

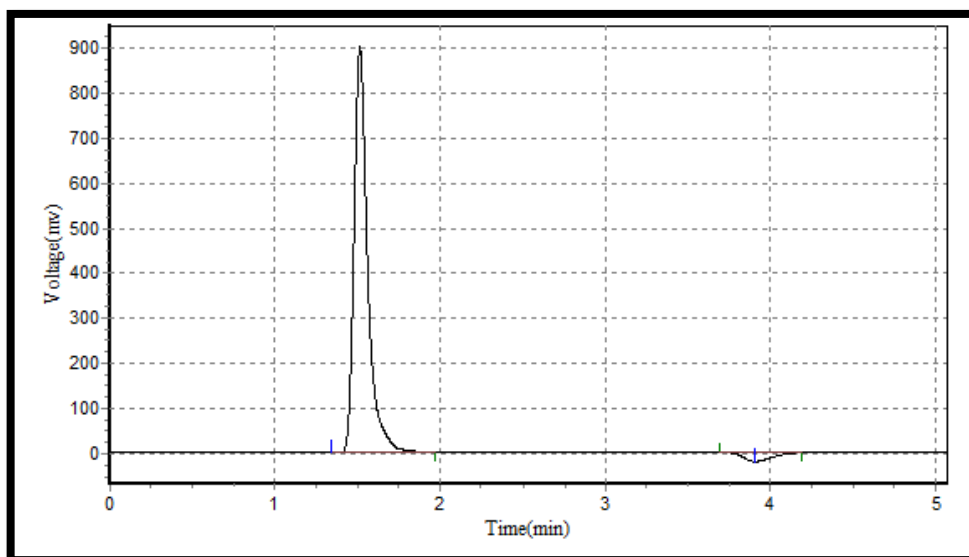
Fonte: Autor, 2023

Nota-se que os reatores acondicionados na estufa de 30°C apresentavam maior volume total de gases produzidos com 47,4 mL. Entretanto, o reator que mais gerou gás de forma individual foi o A3 da estufa de 35°C. Considerando apenas os reatores que produziram gás, o que apresentou menor resultado foi o A1, também da estufa de 35°C. Essa discrepância em reatores acondicionados no mesmo sistema pode ser explicada pela possível infiltração de ar durante o processo, uma vez que a presença do oxigênio interfere na eficiência da fermentação anaeróbica.

4.2 ANÁLISE DO HIDROGÊNIO

O pico cromatográfico da amostra padrão de hidrogênio apresentou tempo de retenção de aproximadamente 1,603 minutos e uma área de 10.927.529, correspondendo à 100% da concentração. Desta forma, essa área foi utilizada para determinar as concentrações de hidrogênio biológico presentes nas amostras gasosas analisadas. Na Figura 17, está ilustrado o cromatograma de uma das amostras, obtidas por meio do software N2000.

Figura 17 – Cromatograma de uma das amostras gasosas



Fonte: Autor, 2023

No cromatograma é possível observar o pico do hidrogênio, com tempo de retenção em torno de 1,5 minutos, e o pico invertido do dióxido de carbono, próximo a marca de 4 minutos. Os resultados das áreas dos picos cromatográficos do hidrogênio estão indicados na Tabela 4, bem como suas respectivas concentrações.

Tabela4 – Áreas dos picos cromatográficos e percentual de hidrogênio nas amostras gasosas

Sistema	Amostra	Área	H ₂ (%)
30°C	A1	451821,38	4,13
	A2	2092482,00	19,15
	A3	6447673,00	59,00
35°C	A1	5162869,00	47,25
	A2	6006947,00	54,97
	A3	8053556,00	73,70

Fonte: Autor, 2023

Na preparação do meio de cultivo utilizou-se 25 g/L de sacarose. Como os reatores receberam 43,2 mL de meio de cultivo, cada reator continha cerca de 1,08 g de sacarose. Os sistemas acomodaram 3 biorreatores, logo, 3,24g de substrato.

Sabendo que massa molar da sacarose é 342,3 g/mol, a conversão resulta em $9,46 \times 10^{-3}$ mols de substrato em cada sistema.

O percentual médio obtido para o sistema de 30° C foi de 27,42% de hidrogênio presente no gás analisado. Considerando que o volume total de gás produzido nesse sistema foi de 47,4 mL, obtêm-se 13mL de hidrogênio. Sabendo que, nas CNTP, o volume ocupado por 1 mol de qualquer gás sempre será 22,4L, conclui-se que a quantidade hidrogênio produzida foi de $5,8 \times 10^{-4}$ mols.

No sistema de 35°C, por sua vez, o percentual médio de hidrogênio presente nos gases foi de 58,64%. Sabendo que o volume total de gás gerado nesse sistema foi de 33,2 mL, calculou-se que houve produção de 19,47 mL de hidrogênio. Considerando que, nas CNTP, um mol de qualquer gás ocupa o volume de 22,4L, pode-se concluir que a quantidade hidrogênio produzida foi de $8,69 \times 10^{-4}$ mols.

Relacionando a quantidade de hidrogênio gerada com a quantidade de substrato utilizada, obtêm-se os valores da produção de hidrogênio em cada sistema, na qual estão expressos na Tabela 5.

Tabela5 – Produção de hidrogênio em cada sistema estudado

Sistema	Produção (mol de H_2 / mol de sacarose)
30°C	0,0613
35°C	0,0918

Fonte: Autor, 2023

Com base nesses dados, é evidente que ambos os sistemas obtiveram resultados consideráveis na produção de hidrogênio. No entanto, os reatores acomodados na estufa de 35°C apresentaram uma eficiência superior. Este resultado está em conformidade com a literatura, segundo (Wang, Mu e Yu, 2005), que indicam que 35°C é a temperatura ótima de fermentação na faixa mesofílica quando se utiliza sacarose como substrato.

Existem poucos estudos publicados referentes à fermentação anaeróbica para produção de hidrogênio utilizando o micro-organismo e o substrato avaliados nesse trabalho. Entretanto, Souza (2017) estudou o potencial produtor de hidrogênio da

bactéria *Enterobacter aerogenes*, utilizando glicose e permeado do soro do leite como fonte de carbono, em um reator de 50 mL funcionando em batelada. As concentrações iniciais dos substratos foram de 10 g/L, e os ensaios duraram cerca de 108 horas. Ao fim do processo fermentativo, constatou-se que a produtividade da bactéria foi superior ao utilizar a glicose como substrato, tendo como resultado 1,51 mols de H_2 /mol de hexose, enquanto o ensaio utilizando o soro do leite alcançou 0,23 mols de H_2 /mol de lactose.

Sá (2014), por outro lado, avaliou a produção de hidrogênio utilizando lodo de tratamento de esgoto e diversos tipos de substratos nas condições ótimas de 35°C e pH inicial 5,5. A após cerca de 72 horas de fermentação e realizando um pré-tratamento térmico nos inóculos, constatou-se que os meios contendo sacarose como substrato apresentaram os maiores rendimentos, com média de 4,2 mol de H_2 /mol de sacarose. Enquanto isso, os meios que utilizaram glicose e frutose tiveram rendimentos de 2,19 e 2,09 mols de H_2 /mol de substrato, respectivamente. Aproximadamente metade do valor obtido quando se utiliza sacarose. A xilose, por sua vez, teve o rendimento de 1,88 mol de H_2 / mol de substrato. Por fim, o menor rendimento obtido foi da glicerina, com 0,8 mols de H_2 / mol de substrato.

Com base nesses resultados, entende-se que a bactéria *Enterobacter aerogenes* pode ser utilizada com a finalidade de produzir hidrogênio biológico. Além disso, a sacarose apresentou-se como um substrato bastante eficiente para este processo fermentativo.

4.3 ANÁLISE DO ETANOL

4.3.1 Curva de Calibração

A partir dos dados obtidos pelos cromatogramas das soluções de etanol, relacionaram-se as áreas dos picos cromatográficos com as respectivas concentrações, conforme indicado na Tabela 6.

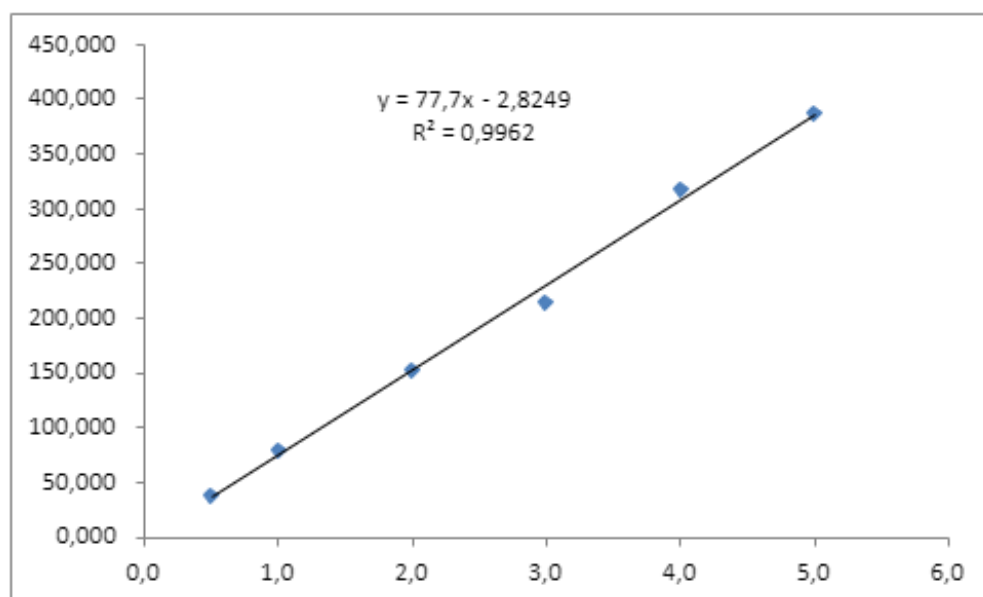
Tabela6 – Dados para a curva de calibração do etanol

C (g/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área média
0,5	37,930	40,010	36,990	38,310
1,0	79,690	76,685	80,275	78,883
2,0	149,01	151,58	153,34	151,308
3,0	223,65	214,15	206,06	214,620
4,0	317,96	316,95	315,40	316,770
5,0	389,12	387,89	385,52	387,508

Fonte: Autor, 2023.

Com o auxílio do software Excel, realizou-se uma regressão linear para construir a curva de calibração de equação $y = 77,7x - 2,8249$ e $R^2 = 0,9962$, conforme mostrado na Figura 18. Como o valor do coeficiente de determinação ficou próximo de 1, indica que o modelo linear se ajusta bem às amostras.

Figura 18 – Curva de calibração do etanol



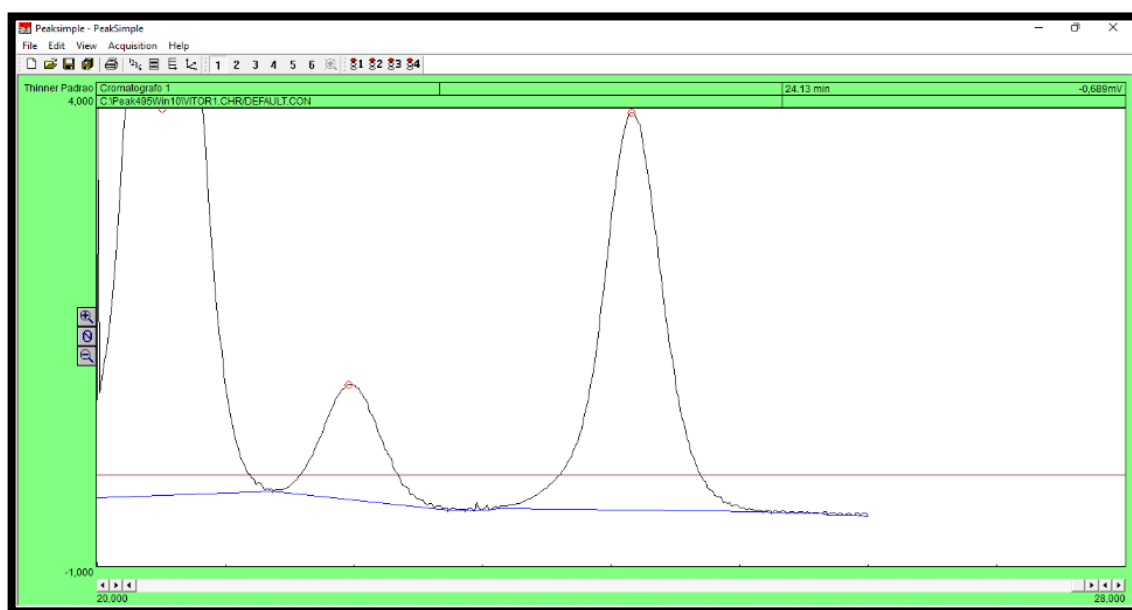
Fonte: Autor, 2023.

4.3.2 Análise quantitativa de etanol nas amostras

A partir dos cromatogramas gerados pelas análises das amostras líquidas, identificaram-se os picos cromatográficos do etanol com tempo de retenção de

aproximadamente 24,13 minutos. Com o auxílio do software PeakSimple, é possível visualizar o pico cromatográfico do etanol de uma das amostras analisadas, conforme ilustrado na Figura 19.

Figura 19 – Pico cromatográfico do etanol obtido pela amostra P1 de 30°C



Fonte: Autor, 2023.

Realizando uma integração dos picos de etanol foram obtidas as suas respectivas áreas cromatográficas. Por fim, utilizando a curva de calibração, quantificou-se a concentração de etanol presente em cada uma das amostras analisadas. Na Tabela7 é possível visualizar os resultados encontrados para as seis amostras líquidas.

Tabela7 – Áreas cromatográficas e concentrações das amostras de etanol

Sistema	Amostras	Área	C (g/L)
30°C	P1	148,760	1,95
	P2	28,740	0,41
	P3	20,448	0,30
35°C	P1	59,290	0,80
	P2	11,427	0,18
	P3	46,400	0,63

Fonte: Autor, 2023.

Nota-se que a amostra P1, retirada de um dos reatores acondicionados na estufa a 30°C, apresentou maior produção de etanol, com 1,95 g/L, seguida pela amostra P1 da estufa a 35°C, com 0,8 g/L. Enquanto isso, a amostra que teve o pior resultado foi a P2 da estufa a 35°C, com 0,18 g/L de etanol produzido.

Souza (2017) também constatou a produção deste metabólito utilizando *Enterobacter aerogenes*, e os resultados encontrados foram de 1,18 g/L de etanol nos meios que utilizaram glicose como fonte de carbono e 0,41 g/L de etanol nos meios que utilizaram permeado do soro do leite.

Silva (2018), por sua vez, investigou a produção de etanol utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. Este estudo foi conduzido em dois tipos de meio: um meio sintético com adição de glicose em concentrações de 40g/L e 60g/L, e um meio contendo hidrolisado de sabugo de milho em concentrações de 20g/L, 40g/L e 60g/L. Além disso, Silva avaliou o efeito de diferentes velocidades de agitação durante o processo de fermentação.

No meio sintético contendo glicose, a maior produção de etanol foi registrada após 18 horas de fermentação a 50 rpm, resultando em 17g/L e 26 g/L de etanol para as concentrações de 40g/L e 60g/L de AR, respectivamente. Em contrapartida, a produção de etanol pela levedura utilizando o meio hidrolisado de sabugo de milho alcançou seu ponto máximo na concentração de 40 g/L de açúcares redutores, com 8,11 g/L de etanol obtidos após 36 horas de fermentação a 100 rpm.

A partir dos resultados obtidos, constatou-se que a *Enterobacter aerogenes* é capaz de sintetizar etanol utilizando diversos tipos de substratos, como a glicose, sacarose e o permeado do soro do leite. Entretanto, nota-se que sua eficiência é muito inferior quando comparada a outros micro-organismos já consolidados no mercado produtor de etanol, como a *Saccharomyces cerevisiae*, indicando que ela não é apropriada para uma produção em escala industrial.

Diante do exposto, infere-se que o trabalho se mostrou bastante esclarecedor para os objetivos propostos. Todavia, os resultados quantitativos para a produção de hidrogênio destoaram um pouco da literatura. Para estudos futuros, seria interessante avaliar a cinética do microrganismo para diferentes concentrações iniciais de substrato.

5 CONCLUSÃO

A temperatura é um dos principais fatores que interferem na produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia. Com isso, constatou-se que o processo fermentativo, utilizando a bactéria *Enterobacter aerogenes* e sacarose como substrato, apresentou maior produção no sistema com a temperatura ótima de 35°C. Todavia, por igualmente estar dentro da faixa de temperatura apropriada para o crescimento de bactérias mesófilas, o sistema com temperatura de 30°C também obteve boa produção de hidrogênio, o que não ocorreu no sistema de 20°C.

Além disso, concluiu-se que a *Enterobacter aerogenes* pode ser utilizada com a finalidade de produzir hidrogênio biológico, tendo como resultado 1,51 mols de H₂/mol de glicose. A sacarose, por sua vez, mostrou-se um substrato ainda mais promissor neste processo fermentativo, superando em eficiência outros dissacarídeos e monossacarídeos.

Por fim, verificou-se que a *Enterobacter aerogenes* é capaz de sintetizar etanol a partir de diversos substratos. Contudo, apresenta eficiência muito inferior a outros micro-organismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, não sendo apropriada para produção em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- ABE, I. **Physical and Chemical Properties of Hydrogen**. Energy Carriers and Conversion Systems, v.1, 2007.
- AIE: AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA. **The Future of Hydrogen**. International Energy Agency. [S. l], jun. 2019.
- Albarez, R. **Codigestão de vinhaça e melão em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio**. Tese de Doutorado. EECS – USP, Brasil. (2015).
- Allianz. **A emergente indústria do hidrogênio pode ajudar a enfrentar mudanças climáticas, mas seus riscos complexos precisam ser gerenciados**. March, 2022.
- Alvarenga, P. **O hidrogênio verde e a transição de baixo carbono**. Maio, 2021.
- Andrade, J. C; Vasconcelos, I. **Continuous cultures of Clostridium acetobutylicum: culture stability and low-grade glycerol utilisation**; Biotechnol; Lett. 2003, 25, 121.
- Antonopoulou, G.; Stamatelatou, K.; Venetsaneas, N.; Kornaros, M.; Lyberatos, G.; **Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process**. Ind. Eng. Chem. Res. 2008, 47, 5227.
- Araújo; E; Silva, M; Ribeiro, R. **Sustentabilidade e descarbonização: desafios práticos: Territórios e comunidades**. Braga: Cecs – Centro de Estudos de Comunicação e Sociedade Universidade do Minho Braga. Portugal, 2020. 148 p.
- Arooj, M.F.; HAN, S.K.; KIM, S.H.; SHIN, H.S. **Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 3289-3294, 2008;
- Barbosa, H. A. **Processos de produção e estocagem de hidrogênio: Uma revisão da literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso. Natal, RN: UFRN, 2020.
- Campos, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. PROSAB/ABES, Rio de Janeiro, 1999.
- Chang, F.Y.; Lin, C.Y.; **Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor**. Int. J. Hydrogen Energy. 2004, 29, 33.
- Chen, C-C.; Lin, C-Y.; Lin, M-C.; **Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 58, 224.
- Cheong, D-Y.; Hansen, C.L.; Stevens, D.K.; **Production of bio-hydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor**. Biotechnol. Bioeng. 2007, 96, 421.

Costa, D. **Células Combustíveis: Uma Abordagem Contemporânea**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Católica de Brasília, Brasil, nov. 2007. Disponível em: <https://docplayer.com.br/9180276-Daniel-alves-costa-celulascombustiveis-uma-abordagem-contemporanea.html> . Acesso em: 01 abril. 2023.

Cruz, F. E. da. **Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo: avaliação exergética e custo de produção**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica de Energia de Fluidos) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Da Cruz. **Produção de Hidrogênio em Refinarias de Petróleo: Avaliação Exergética e Custo de Produção**. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

Dantas, S. C. **Produção de hidrogênio a partir da reforma de metano e etanol em catalisadores de níquel com suportes à base de CeO₂ e CeZrO₂**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- Mg, 2011.

Das, D.; Veziroglu, N. **Hydrogen production by biological processes: a survey of literature**. Int. J. Hydrogen Energy, v.26, p.13-28, 2001.

Dos Santos, K.G. et al. **Fermentação anaeróbia: uma alternativa para a produção de hidrogênio**. Rev. Bras. Energias Renováveis, v.1, p.1-12, 2012.

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

EIA - U.S. Energy Information Administration. **Annual Energy Outlook 2016 Early Release: Annotated Summary of Two Cases**. May 17, 2016.

EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2022. Balanço Energético Nacional 2022, ano base 2021, 7-10 p.

Estevam, Andressa. **Obtenção de BIOH₂ a partir da fermentação anaeróbia de efluente de cervejaria utilizando cultura pura isolada do ambiente**. 2017.81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

Fang, H.H.P.; **Environmental Anaerobic Technology: applications and new developments**, Imperial College Press: London, 2010.

Farias, D. C. A. E. M.; MARTINS, F.D.M.; CÂNDIDO, A.G. **Agenda 2030 e Energias Renováveis: sinergias e desafios para alcance do desenvolvimento sustentável**. Dez, 2021

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.

Guarieiro, L; Anjos, J; Silva, L; Santos, A; Calixto, E; Pessoa, F; Almeida, J; Andrade Filho, M; Marinho, F; Rocha, G; Andrade, J. **Technological Perspectives and Economic Aspects of Green Hydrogen in the Energetic Transition: Challenges for Chemistry**. Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 33, June 2022, pp. 844–69.

Guo, X.M.; Trably, E.; Latrille, E.; Carrère, H.; Steyer, J-P.; **Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review**. Int. J. Hydrogen Energy 2010, 35, 10660.

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, 23 fev. 2016.

IPCC - intergovernmental panel on climate change. IPCC. IPCC. [S. l.], 2022.

Jornal o globo (Rio de Janeiro) (ed.). **Cientistas alertam para efeito estufa nos anos 80 e fazem conferência mundial**. 1984.

Kotay, M. K; Das, D.; **Biohydrogen as a renewable energy resource—prospects and potentials**. Int. J. Hydrogen Energy. 2008, 33, 258.

Kramer, J.T.; Bagley, D.M.; **Improving the yield from fermentative hydrogen production**. Biotechnol. Lett.. 2007, 29, 685.

Lay, J-J.; Fan, K-S.; Chang, I.J.; Ku, C-H.; **Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge**. Int. J. Hydrogen Energy. 2003, 28, 1361.

Leite, J.A.C.; Fernandes, B.S.; Pozzi, E.; Barboza, M.; Zaiat, M.; **Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids**. Int. J. Hydrogen Energy 2008, 33, 579.

Lin, C.Y.; Cheng, C.H.; **Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora**. Int. J. Hydrogen Energy 2006, 31, 832.

Lin, C.Y.; Lay, C.H.; **Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora**. Int. J. Hydrogen Energy 2004, 29, 275.

Li, C.; Zhang, T.; Fang, H.H.P.; **Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors**. Water Sci. Technol. 2006, 54, 95.

Li, Chenlin; Fang, H. H.P; **Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures**. Environ. Sci. Technol. 2007, 37, 1.

Logan, B.E.; Oh, S.E.; Kim, I.S.; Van Ginkel, S.; **Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers**. Environ. Sci. Technol. 2002, 36, 2530.

Los, R.A. (2011) **Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos UFSC, Florianópolis: SC

Luo, G.; Xie, L.; Zou, Z.; Wang, W.; Zhou, Q. (2010) **Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage**. Bioresource Technology, 101, 959-964

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

Masson-delmotte, V. **Summary for Policymakers Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. 2021.

Mathews, Juanita; Guangyi; Wang. **Metabolic Pathway Engineering for Enhanced Biohydrogen Production**. International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 17, Sept. 2009, pp. 7404–16. ScienceDirect,

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

Mesquita, C. **Hidrogênio verde, uma alternativa promissora em solos brasileiros: Uma revisão bibliográfica**. João Pessoa, Paraíba. UFPB, 2022.

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

Morimoto, M.; Atsuko, M.; Atif, A.A.Y.; Ngan, M.A.; Fakhrulrazi, A.; Iyuke, S.E.; Bakir, A.M.; **Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora** Int. J. Hydrogen Energy 2004, 29, 709.

Mu, Y; Wang, G.; Yu, H.Q. (2006) **Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures**. Bioresource Technology, 97, 1302–1307.

Neves, L.M.V.; **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. Dissertação de mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2009.

Nogueira, L; Capaz, R; Lora, E. **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.

Ntaikou, I.; Antonopoulou, G.; Lyberatos, G.; Waste Biomass Valorization 2010, **Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review**. 1, 21.

Obriem, E. **ENERGIA HOJE: Hidrogênio pode cobrir 12% da Demanda Global Energética**. Editora Brasil Energia, Jul, 2022.

ONU. **Conferências ambientais: quais foram as principais da história?**. Estadão. Brasil, 27 dez. 2021.

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

Peixoto, G.; **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

Périco, E. A.; Silva, G. M. C. D. **Eficiência e sustentabilidade: uma análise econômica, social, ambiental e sustentável das usinas paulistas de cana-de-açúcar**. Revista de Economia e Sociologia Rural, vol. 60, setembro. 2021

Rai, P. K.; Singh, S. P. **Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 44, p. 19957–19971, 26 nov. 2016.

REB - RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA 2022: ano base 2021/ Ministério de Minas e Energia- Distrito Federal, Brasília.

RSC - ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Hydrogen. Royal Society of Chemistry. [S. l.], 2015.

Sá, V. R. L.; Cammarota, C. M.; Leitão, F. S. V. **‘Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros’**. Química Nova, vol. 37 pp. 857–67, 2014.

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: UFRJ, Mai 2011.

Santos, A.P.B.; Pinto, A.C. **Biodiesel: uma alternativa de combustíveis limpos**. Química Nova na Escola, v.31, n.1, 2009.

Serra, M. **Aquecimento Global: evidências e preocupações**. Revista Economia e Tecnologia. Curitiba-PR. Editora da Universidade Federal do Paraná, v.9, n.3,1 abr 2007.Trimestral

Silva, M. **Produção de etanol de segunda geração por Saccharomyces cerevisiae ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (Zea mays L.)**. Dissertação de Mestrado, São José do Rio Preto: Unesp, 2018.

Souza, M.M.V.M.; **Tecnologia do hidrogênio**. Rio de Janeiro: Synergia Editora, 2009.

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

Souza, D. M. I. **Avaliação da produção de bio-hidrogênio e da expressão do Gene *glpF* durante a fermentação de Glicerol por *Enterobacter sp.*** Dissertação de Mestrado. Ouro Preto, Minas Gerais: UFOP, 2018.

Stambouli, A.B.; Traversa, E. **Solid oxide fuel cells (SOFCs): a review of na environmentally clean and efficient source of energy.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.6, p.433-455, 2002.

Trimm, D.L. **Catalysts for the control of coking during steam reforming.** Catalysis Today, 1999, v49, p3-10.

Walter, A. **Emissões de gases de efeito estufa no setor de energia, no brasil.** Revista Brasileira de Energia, Campinas, v. 27, n. 3, p. 1-9, 1 jan. 2021. Trimestral.

Wang, J.; Wan, W.; **Factors influencing fermentative hydrogen production: a review.** Int. J. Hydrogen Energy 2009, 34, 799.

Wang, G.; Mu, Y.; Yu, H.Q. **Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater.** Biochemical Engineering Journal, v. 23, p. 175-184, 2005

Wendt, H; Götz, M; Linardi, M. **Tecnologia de células a combustível.** 1999.

Zhang, Z-P.; Tay, J-H.; Show, K-Y.; Yan, R.; Liang, D.T.; Lee, D-J.; Jiang, W-J.; **Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor.** Int. J. Hydrogen Energy 2007, 32, 185.