



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAFAEL LOURENÇO FREIRE

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Los Angeles P. F. Palha

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA MICROBIANA

Recife

2024

RAFAEL LOURENÇO FREIRE

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA MICROBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Engenharia Química

Recife

2024

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

Freire, Rafael Lourenço.
Produção de hidrogênio por via microbiana . / Rafael
Lourenço Freire. - Recife, 2024.
47 : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Perez Fernandez
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química -
Bacharelado, 2024.

1. Clostridium beijerinckii. 2. Enterobacter aerogenes. 3. Enterobacter
cloacae. 4. Fermentação anaeróbia. 5. Hidrogênio. I. Fernandez, Maria de Los
Angeles Perez . (Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)

RAFAEL LOURENÇO FREIRE

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA MICROBIANA

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: 25/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ
Data: 25/03/2024 22:47:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.a. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO CARLOS DUARTE COELHO
Data: 26/03/2024 14:23:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Antônio Carlos Duarte Coelho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 SARA HORACIO DE OLIVEIRA MACIEL
Data: 26/03/2024 14:00:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial à minha avó Edite Golçalves (*in memoriam*), uma pessoa que me ensinou muito e a quem devo as minhas melhores lembranças.

Dedico este trabalho aos meus colegas de graduação, professores, técnicos, mestrandos e doutorandos que me ajudaram a chegar até esse ponto.

AGRADECIMENTOS

É impossível traçar grandes caminhadas sozinho. Sempre se conhece pessoas ao longo do caminho que se tornam importantes durante a jornada, mesmo que por um curto espaço de tempo. Há pessoas que estão comigo desde o começo da minha vida e sempre estiveram ao meu lado me apoiando e dando suporte. Sou muito grato à minha família por isso.

Durante a minha trajetória escolar fiz muitos amigos e tive oportunidade de realizar o ensino médio no IFPE cursando o técnico em Saneamento Ambiental. Sou muito grato aos professores que tive nesse momento que me encaminharam para a área da engenharia em momentos de incerteza e de indefinições para o futuro.

Na UFPE também conheci várias pessoas, fiz muitos amigos, colegas de estudo que me ensinaram bastante e que me ajudaram a chegar até aqui. Sou muito grato por ter conhecido cada um deles, das noites estudando em bibliotecas desde o primeiro período. Além de estudos, puderam me proporcionar bons momentos na universidade mesmo em momentos de maior tensão, sou muito grato a todos, sem eles a caminhada teria sido mais difícil.

Sou muito grato aos professores que foram bastante pacientes, passaram seus conhecimentos e agregaram ao meu crescimento pessoal e profissional. Sou grato também aos técnicos, mestrandos e doutorandos que conheci durante a graduação, que sempre se mostraram preocupados com o entendimento dos alunos em relação aos ensinamentos passados. Deixo minha gratidão especial à orientadora Profa. Dra. Maria de Los Angeles por ter aceitado ser minha orientadora, ter tido a paciência e disponibilidade de me ajudar na elaboração da tese e por ter sido uma das melhores professoras que tive o prazer de ter ao longo de toda a vida.

“A felicidade está na jornada”

Autor desconhecido

RESUMO

Debates em relação à utilização de fontes renováveis de energia têm ganho força ao longo dos anos devido ao risco de escassez de fontes não-renováveis a longo prazo, como as fontes de combustíveis fósseis para produção de petróleo e gás natural. Estas, além de finitas, causam impactos ambientais negativos diretamente relacionados às mudanças climáticas associadas ao aquecimento global devido à extração, produção e consumo desses tipos de combustíveis. A utilização de fontes renováveis surge como solução para tais problemáticas. Tais fontes são virtualmente inesgotáveis, de forma que não se quantifica o movimento das marés ou a luz solar, por exemplo. Além disso, as fontes de energia renováveis emitem muito menos gases contribuintes ao efeito estufa, destacando-se o dióxido de carbono, quando comparados aos combustíveis fósseis e causam menos impactos negativos à biodiversidade. Neste cenário, a utilização de hidrogênio como fonte de energia renovável limpa tem ganho destaque. O hidrogênio pode ser utilizado como combustível, sendo produzido por micro-organismos através de rotas de fermentação anaeróbias, podendo ser utilizadas diferentes biomassas de forma que, no Brasil destaca-se a o potencial de utilização de fontes provenientes da cana-de-açúcar. Com isso, a produção de hidrogênio através desse caminho classifica-o como biocombustível. Assim, o presente trabalho analisou teses e artigos através de uma revisão da literatura para avaliar a viabilidade da produção de hidrogênio como biocombustível em diferentes cenários, com diferentes micro-organismos, substratos, além de diferentes condições de temperatura e de pH, conferindo que os micro-organismos *Clostridium beijerinckii*, *Enterobacter aerogenes* e a *Enterobacter cloacae* apresentam taxas de conversão semelhantes entre si. O substrato composto por sacarose se mostrou com mais adequado para produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia escura, apresentando maior produção tanto para bactérias do gênero *Clostridium* quanto do *Enterobacter*, com a concentração ideal de sacarose no substrato sendo de 100 g.L⁻¹. A melhor faixa de temperatura para produção do biohidrogênio está no intervalo de 35°C e 40°C e a faixa do pH varia de acordo com os micro-organismos e substratos utilizados de forma que o pH ideal pode ser tanto ácido, quanto neutro ou básico.

Palavras chaves: *Clostridium beijerinckii* ; *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter cloacae*; Fermentação anaeróbia; Hidrogênio.

ABSTRACT

Debates regarding the use of renewable energy sources have gained momentum over the years due to the risk of long-term scarcity of non-renewable sources, such as fossil fuels for oil and natural gas production. Additionally, negative environmental impacts directly related to climate change are associated with global warming resulting from the extraction, production, and consumption of these fuel types. The adoption of renewable energy sources emerges as a solution to address these challenges. Renewable energy sources are virtually inexhaustible; for instance, tidal movement and solar radiation are not quantifiable. Furthermore, renewable energy sources emit significantly fewer greenhouse gases, notably carbon dioxide, compared to fossil fuels. They also cause fewer negative impacts on biodiversity. In this context, the utilization of hydrogen as a clean renewable energy source has gained prominence. Hydrogen can serve as a fuel and is produced by microorganisms through anaerobic fermentation pathways. Different biomass sources can be used, with Brazil highlighting the potential use of sugarcane-derived sources. Consequently, hydrogen production through this pathway classifies it as a biofuel. This study analyzed these articles through a literature review to assess the feasibility of hydrogen production as a biofuel under various scenarios. Different microorganisms, substrates, temperature conditions, and pH levels were considered. Notably, the microorganisms *Clostridium beijerinckii*, *Enterobacter aerogenes*, and *Enterobacter cloacae* exhibited similar conversion rates. The substrate composed of sucrose was found to be most suitable for hydrogen production through dark anaerobic fermentation, presenting greater production for both bacteria of the genus *Clostridium* and *Enterobacter*, with the ideal concentration of sucrose in the substrate being 100 g.L⁻¹. The best temperature range for biohydrogen production is between 35°C and 40°C and the pH range varies according to the microorganisms and substrates used so that the ideal pH can be either acidic, neutral or basic.

Keywords: Anaerobic fermentation; *Clostridium beijerinckii*; *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter cloacae*; Hydrogen.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1:	Demanda energética nas regiões brasileiras.....	16
Figura 2:	Matérias-primas para produção de Hidrogênio.....	22
Figura 3:	Taxa de conversão das matérias-primas em Hidrogênio.....	22
Figura 4:	Estrutura da biomassa lignocelulóstica.....	24
Figura 5:	Etapas do processo de degradação anaeróbico por culturas mistas.....	26
Figura 6:	Relação entre a produção de Hidrogênio e a concentração de sacarose para <i>Enterobacter aerogenes</i>	37
Figura 7:	Produção cumulativa em 48 horas de hidrogênio em diferentes temperaturas utilizando glicose.....	39
Figura 8:	Efeito da temperatura no potencial de produção de H ₂ utilizando <i>Ethanoligenens harbinens</i>	40
Figura 9:	Efeito da temperatura no tempo de atraso utilizando <i>Ethanoligenens harbinens</i>	40
Figura 10:	Efeito da temperatura nos pontos de produção de H ₂	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Consumo de fontes energéticas no Brasil em 2023 segundo o MME.....	18
Tabela 2:	Teor energético de diferentes combustíveis em CNTP.....	21
Tabela 3:	Rendimento de produção de hidrogênio utilizando diferentes micro-organismos.....	30
Tabela 4:	Meio de Cultura para cultivo de bactérias produtoras de Hidrogênio.....	31
Tabela 5:	Produção de biohidrogênio com diferentes concentrações de substrato e variação de pH	33
Tabela 6:	Rendimento de biohidrogênio produzido a partir de diferentes substratos e, concentrações de 2 g.L ⁻¹ e 10 g.L ⁻¹ utilizando <i>Clostridium beijerinckii</i>	34
Tabela 7:	Rendimento de biohidrogênio produzido utilizando celulose como substrato com diferentes concentrações	35
Tabela 8:	Produção de biohidrogênio utilizando glicose como substrato com diferentes concentrações utilizando <i>Enterobacter cloacae</i>	36
Tabela 9:	Produção de biohidrogênio produzido utilizando diferentes substratos com <i>Enterobacter aerogenes</i>	37
Tabela 10:	Produção de biohidrogenio utilizando glicerol em diferentes faixas de temperatura com <i>Enterobacter aerogenes</i>	38

LISTA DE ABREVIACOES

acetil-CoA	Acetil coenzima A
<i>C. beijerinckii</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
g	Gramma
H	Produção cumulativa de hidrogênio
IPEA	Instituto de Pesquisa Econmica Aplicada
L	Litro
mil tep	1000. tonelada equivalente de petróleo (42×10^{12} Joules)
mL	Mililitro
MME	Ministério de Minas e Energia
P	Potencial de produção de hidrogênio
Rm	Taxa mínima de produção de hidrogênio
t	Tempo
x	Tempo de atraso (Fase LAG)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
	1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
	1.1.1 Objetivos específicos.....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	16
	2.1 CONSUMO ENERGÉTICO.....	16
	2.2 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL RELACIONADO À QUESTÃO ENERGÉTICA.....	17
	2.3 FONTES DE ENERGIA.....	19
	2.4 HIDROGÊNIO.....	21
	2.5 BIOMASSA.....	24
	2.5.1 Composição do bagaço da cana-de-açúcar	24
	2.6 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO.....	25
	2.6.1 Fermentação anaeróbia	25
	2.6.2 Biofotólise da água	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	4.1 ANÁLISE DOS MICRO-ORGANISMOS.....	30
	4.2 ANÁLISE DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA.....	32
	4.3 ANÁLISE DA TEMPERATURA E DO pH.....	38
5.	CONCLUSÃO	43
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

As fontes de energia podem ser divididas em dois grandes grupos, sendo eles o das fontes não renováveis e o grupo das fontes renováveis. As fontes de energia não renováveis são aquelas cujo os recursos utilizados para sua geração são finitos e que o tempo de reposição se apresenta numa escala de tempo muito maior que o seu consumo. O maior exemplo de fonte de energia não renovável é o petróleo, um combustível fóssil cujo tempo necessário para reposição das fontes para abastecimento de energia está na escala dos milhões de anos. Já as fontes de energia renováveis não são facilmente esgotadas, sendo reabastecidas na natureza em uma escala de tempo muito menor que as não renováveis, como por exemplo hidrelétricas, energia eólica e biocombustíveis de hidrogênio, produzidos a partir de processos de fermentação utilizando biomassa como insumo (Araújo *et al.* 2022).

Uma das preocupações entorno da utilização de combustíveis fósseis está relacionada com a questão da futura escassez das fontes, pois, além do esgotamento das reservas desses recursos, ainda há um crescimento da demanda energética com o passar do tempo devido ao avanço da tecnologia e do aumento da população mundial (Hallenbeck, Patrick; Dipankar, 2009). Somada à preocupação da escassez de recursos, a utilização de combustíveis fósseis causa impactos ambientais negativos, com emissão de gases contribuintes ao efeito estufa, sendo eles o dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e dióxido de enxofre (SO₂), estando os combustíveis fósseis associados às mudanças climáticas (Savla *et al.*, 2020; Oliveira; Cruz; Ferreira, 2021).

Com isso, a utilização de fontes de energia renováveis surge como alternativa tanto à longo prazo quanto para questões ambientais. As crescentes discussões em torno do desenvolvimento sustentável incentivam o uso de fontes renováveis, fazendo com que essa vertente ganhe ainda mais força.

O Hidrogênio (H₂) surge como uma alternativa sustentável e promissora para atender às necessidades energéticas globais, podendo ser produzido a partir de biomassas como resíduos agrícolas ou utilizando-se de algas. Além disso, segundo Sá, Cammarota e Leitão (2014), combustão do Hidrogênio forma água como produto, não havendo a formação de gases que impactam negativamente ao aquecimento global.

O Hidrogênio pode ser obtido tanto através de fontes não renováveis, através da hidrólise de combustíveis fósseis quanto de fontes renováveis, sendo obtido através da biomassa. A obtenção do Hidrogênio através de fontes não renováveis apresenta pontos

negativos. Além da questão da escassez e dos impactos ambientais negativos já mencionados, essa rota exige alta demanda energética (Torres, 2018; Souza, 2017). O Hidrogênio pode ser produzido de diferentes formas utilizando fontes renováveis, destacando-se a biofotólise em que microalgas e cianobactérias, na presença da luz quebram as moléculas de água, produzindo o gás Hidrogênio através do processo de fotossíntese, a eletrólise microbiana em que se utiliza eletricidade como fonte de energia e os micro-organismos agem como catalisadores dentro das células de eletrólise, promovendo na decomposição da água em hidrogênio e oxigênio. Além disso, o Hidrogênio é produzido através de processos de fermentação que podem utilizar ou não luz em que micro-organismos decompõem a biomassa, produzindo Hidrogênio e Dióxido de Carbono.

A fermentação anaeróbica da biomassa promove a conversão de açúcares encontrados na biomassa em Hidrogênio, Dióxido de Carbono e Ácidos Orgânicos na ausência de oxigênio, mediante a ação de micro-organismos. Pode-se utilizar diferentes fontes de carboidrato como biomassa, sendo o bagaço da cana-de-açúcar uma delas. A composição específica do substrato desempenha um papel crucial na otimização da produção de hidrogênio ou na eficiência econômica do método, uma vez que influencia o potencial de geração de hidrogênio, juntamente com considerações relacionadas ao custo e à disponibilidade da matéria-prima (Vasconcelos, 2014).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio como biocombustível através do processo de fermentação anaeróbia utilizando-se de teses e artigos publicados.

1.1.1 Objetivos específicos

Além disso, o trabalho visou atingir os seguintes objetivos específicos:

- Analisar os resultados utilizando diferentes micro-organismos;
- Analisar os resultados utilizando diferentes substratos;
- Analisar os resultados em diferentes condições de temperatura e pH;
- Avaliar a viabilidade da produção de hidrogênio como biocombustível.

2. REVISÃO DA LITERATURA

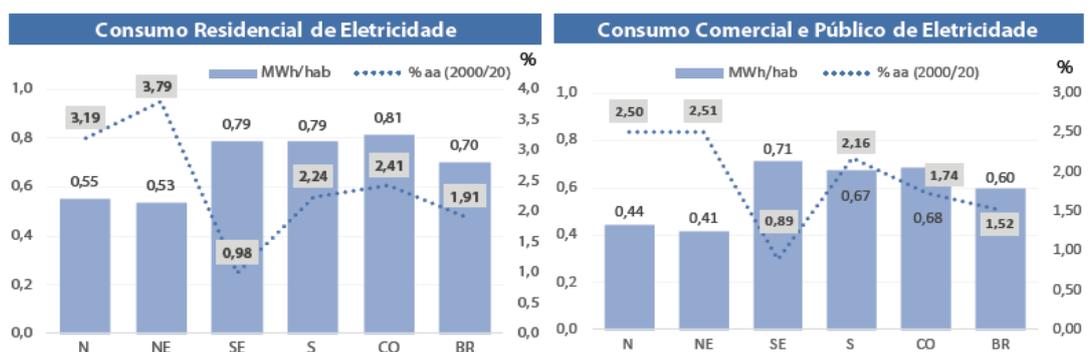
Para a compreensão da utilização do Hidrogênio como combustível no Brasil, deve-se entender o contexto em que ele está inserido tanto em relação à demanda, quanto às motivações, disponibilidade de recursos e desafios para sua produção. A partir disso, elaborou-se a Revisão da Literatura acerca dos dados tópicos.

2.1 CONSUMO ENERGÉTICO

A energia é fundamental para a manutenção e desenvolvimento da sociedade, sendo indispensável em diversos setores, desde de transportes para grandes distâncias em curto espaço de tempo até mesmo para o fornecimento de condições básicas de vida facilitadas, como o armazenamento e preparo de alimentos.

Sendo tão fundamental, a demanda energética cresce ao longo dos anos devido ao avanço da tecnologia, aumento populacional e crescimento econômico mundial. Segundo Tolmasquim (2012), a demanda energética no Brasil aumentou 49% entre os anos de 1990 e 2000. Trazendo para dados mais recentes, de acordo com dados do Ministério de Minas e Energia, a demanda energética no Brasil aumentou em todas as regiões do país em uma análise feita entre os anos de 2000 e 2020, com a Região Nordeste apresentando maior crescimento do consumo residencial e comercial, de 3,79% e 2,51%, respectivamente. A região centro-oeste apresentou o maior consumo residencial médio, de 0,81 MWh/habitante, enquanto a região sudeste apresentou o maior consumo comercial e público de eletricidade, de 0,71 MWh/habitante (Ministério De Minas E Energia, 2021). Os dados podem ser vistos no gráfico da Figura 1.

Figura 1. Consumo energético nas regiões brasileiras



Fonte: Ministério de Minas e Energia (2021).

2.2 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL RELACIONADO À QUESTÃO ENERGÉTICA

Discussões e levantamentos sobre questões ambientais aliados à relatórios e estudos ocorrem a décadas no mundo todo, com as matrizes energéticas sendo parte delas. O Protocolo de Kyoto, assinado por 84 países em 1997, entrando em vigor no ano de 2005, teve como objetivo a diminuição da emissão de CO₂. No entanto o Protocolo de Kyoto se mostra insuficiente a partir do momento que busca a diminuição da emissão do dióxido de carbono a partir de taxas sobre os combustíveis fósseis (Romeiro, 2012). Uma alternativa para a problemática energética é a substituição dos combustíveis fósseis ao invés do seu desincentivo, promovendo a utilização de fontes de energia renováveis que apresentam menor impacto tanto na emissão de gases contribuintes ao efeito estufa quanto na biodiversidade.

Um avanço na questão ambiental foi a introdução do termo “Desenvolvimento Sustentável”. A definição deste termo é complexa, sendo possível encontrar definições diferentes por autores diferentes. No entanto, a maioria dos autores extrai a definição a partir do Relatório de Brundtland, publicado em 1987, que busca “Atender às necessidades presentes sem comprometer as necessidades das gerações futuras”. A partir desta frase, define-se desenvolvimento sustentável como o avanço econômico evitando destruição ecológica através da menor exploração ambiental (Bellen, 2004). Diante do exposto, pode-se definir sustentável como o desenvolvimento econômico e social realizado preservando os recursos naturais, além da preservação ou melhora das condições ambientais, tendo-se o ambiente salubre e propício para as futuras gerações (Moyses Etchezar; Biorchi, 2018).

Neste sentido, a utilização de fontes de energia renováveis estaria ligada ao desenvolvimento sustentável, devido, inicialmente, à preservação dos recursos, diminuição da poluição e otimização da produção. Como pode ser visto na Tabela 1 retirada do Plano Decenal de Expansão de Energia no Brasil, fornecido pelo Ministério de Minas e Energia (MME, 2023) a maior fatia de consumo de energia no país é a partir dos combustíveis fósseis, sendo eles os derivados do petróleo, gás natural e carvão mineral, totalizando 53,2% do consumo total, sendo essas fontes não renováveis.

Sanções e conferências internacionais com participação de dezenas de países pressionam para que se utilize fontes de energia renováveis de forma a diminuir a emissão de gases contribuintes ao efeito estufa e preservação dos recursos naturais (Solomon; Krishna, 2011). Dessa forma. Faz-se necessário o incentivo para o estudo, ampliação e aplicação de fontes de energia renováveis para que o ramo energético esteja alinhado às ideias do

desenvolvimento sustentável.

Tabela 1. Consumo de fontes energéticas no Brasil em 2023 segundo o MME.

Discriminação	Consumo (mil tep)	Participação Relativa (%)
Gás Natural	33.002	9,4
Carvão Mineral e Coque	15.850	4,5
Lenha	14.057	4,0
Carvão Vegetal	6.570	1,9
Bagaço de Cana	40.471	11,5
Eletricidade	67.116	19,1
Etanol	22.189	6,3
Biodiesel	4.602	1,3
Outros	9.296	2,6
Derivados do Petróleo	138.197	39,3
Óleo Diesel	67.618	19,2
Óleo Combustível	5.630	1,6
Gasolina	32.426	9,2
GLP	9.768	2,8
Querosene	5.730	1,6
Outros Derivados do Petróleo	17.024	4,8
Consumo Final Energético	351.350	100,0

Fonte: Adaptado Plano Decenal de Expansão de Energia, 2023

2.3 FONTES DE ENERGIA

Com o crescimento da demanda energética, surge a necessidade do aumento da produção de energia. Tal aumento de produção acarreta em impactos ambientais que, a depender da fonte energética utilizada, prejudicam a qualidade de vida atual, além de comprometerem recursos para gerações futuras e afetarem as condições climáticas, estando tais fontes, desalinhadas aos pensamentos do desenvolvimento ambiental (Hallenbeck, Patrick ; Ipankar, 2009).

O petróleo, o gás natural e o carvão mineral são exemplos de combustíveis fósseis. Tais combustíveis se utilizam de recursos que a natureza necessita de milhões de anos para recompor, ou seja, o consumo do recurso é desproporcionalmente maior que a recomposição

natural, caracterizando essa fonte energética como não renovável (Araújo *et al.* 2022). A utilização de combustíveis fósseis não está associado apenas ao esgotamento dos recursos, mas também a outros impactos ambientais, havendo ocorrências de poluição dos oceanos, com vazamento e derramamento de petróleo sendo alguns dos exemplos, além da poluição atmosférica, com a emissão de gases contribuintes ao efeito estufa, sendo os principais deles o dióxido de carbono, o dióxido de enxofre e o gás metano (Oliveira *et al.* 2021).

O atendimento às demandas energéticas considerando questões ambientais é um desafio. Com isso, buscas por matrizes energéticas alternativas, que causem menor impacto ambiental quando produzidas em larga escala são realizadas e estudadas. Neste cenário, surge a utilização de fontes de energia renováveis (Vasconcelos, 2014).

As fontes de energia renováveis são recursos que não se esgotam facilmente, de forma que o seu consumo ocorre de forma proporcional ou menor à sua reposição natural. Além disso, essas fontes tem a vantagem de não emitir quantidades significativas de gases poluentes na atmosfera, evitando o agravamento do efeito estufa (Araújo *et al.* 2022). Recursos hídricos, a luz solar, o vento, o movimento das marés e a biomassa são exemplos de fonte de energia renovável.

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, produzindo cerca de 633 milhões de toneladas no ano de 2019 (LNBR, 2022). O bagaço da cana é obtido após o processo de moagem. Inicialmente visto como resíduo, o bagaço da cana pode ser utilizado para produção de energia. Dessa forma, o Brasil apresenta um grande potencial de utilização deste recurso. Como pode ser visto na Tabela 1, o bagaço da cana-de-açúcar foi utilizado para produção de 11,5% da demanda energética no ano de 2023 segundo o MME, no entanto, o bagaço da cana é apenas um exemplo de biomassa, podendo ser utilizado ainda o amido, o trigo, a mandioca, soja, arroz ou beterraba, além da utilização da madeira florestal (Nones *et al.* 2017; Torres, 2018).

Segundo Torres (2018), biomassa são matérias orgânicas que podem ter suas massas convertidas em energia elétrica, mecânica ou térmica. É a partir da biomassa que se produzem os biocombustíveis. Os biocombustíveis podem ser divididos em três grupos, denominados gerações. A primeira geração utiliza biomassa rica em açúcares ou triglicerídeos, sendo amplamente produzida e utilizada no Brasil, sendo o principal deles o etanol. A segunda geração utiliza a biomassa lignocelulósica, com a composição rica em lignina, celulose e hemicelulose, sendo o biodiesel o biocombustível desta geração mais produzido (Kucek *et al.* 2007). Por fim, a terceira geração, em que o processo de produção dos biocombustíveis através da biomassa

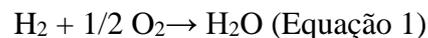
pode ser realizado por microalgas, onde este ainda passa por aprimoramentos (Carneiro *et al.* 2017).

Quando comparados aos combustíveis fósseis, os biocombustíveis apresentam menor emissão de gases contribuintes ao efeito estufa tanto durante a produção, quanto durante o uso (Barbosa, 2013). Neste cenário, surge a oportunidade da produção do biocombustível de hidrogênio através da fermentação anaeróbia da biomassa.

2.4 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é o elemento químico mais abundante do universo, sendo o primeiro elemento da tabela periódica e encontrado na fase gasosa na forma de H₂ nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Apresenta massa atômica de 1,00784 u, possuindo um próton em seu núcleo e um elétron em seu átomo e densidade de 0,084 Kg.m⁻³ (Rodrigues, 2016). Embora seja muito abundante no universo, na Terra o hidrogênio não é encontrado em grande quantidade na atmosfera, estando mais comumente presente na composição de compostos orgânicos, ácidos, bases e da água. Com isso, o Hidrogênio não é considerado uma fonte primária de energia, mas sim uma fonte intermediária, classificando este elemento como um vetor energético (Rodrigues, 2016).

A combustão do Hidrogênio não promove a emissão de gases contribuintes ao efeito estufa, havendo a formação de água no produto de acordo com a Equação 1. O Hidrogênio é um excelente portador de energia química, a sua composição facilita o armazenamento e transporte de energia de maneira estável (Mathews; Wang,2009).



Com isso, o hidrogênio se mostra como solução sustentável para substituir combustíveis fósseis em veículos para transporte. O H₂ pode ser convertido em eletricidade na célula de combustível, apresentando elevada densidade energética (Souza, 2017). Segundo Souza (2018), o rendimento energético do hidrogênio é aproximadamente três vezes maior que a dos combustíveis fósseis em condições normais de temperatura e pressão, como pode ser visto na Tabela 2. Além disso, o hidrogênio apresenta-se como um ótimo potencial combustível pois apresenta o maior teor energético por unidade de massa (Barbosa, 2020).

Tabela 2. Teor energético de diferentes combustíveis em CNTP

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

Fonte: Adaptado de Souza 2018.

O Hidrogênio pode ser armazenado e transportado sem grandes obstáculos, na forma gasosa. Além disso, o hidrogênio pode se apresentar liquefeito sob condições de alta pressão, o que pode ser vantajoso para o transporte desse biocombustível em maiores quantidades, visto que em fase líquida, o hidrogênio consome um espaço cerca de 700 vezes menor que a gasosa (Lara; Ritcher, 2023; Bezerra, 2008). O fácil transporte, o baixo impacto ambiental negativo na combustão e elevado valor energético fazem do hidrogênio objeto de estudo e solução energética viável.

A obtenção do Hidrogênio pode ser realizada utilizando o gás natural, no entanto essa rota emite grande quantidade de CO₂ durante a produção. Segundo o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2022), em 2019 a produção de Hidrogênio utilizando gás natural emitiu mais dióxido de carbono do que todos os veículos somados no país. Dessa forma, a utilização do gás natural para produção do hidrogênio mostra-se em desacordo com o desenvolvimento sustentável. O Hidrogênio produzido a partir do gás natural sem o processo de captura de carbono é conhecido como Hidrogênio Cinza. Pode-se utilizar diversas matérias-primas para a produção do Hidrogênio (Figura 2), destacando-se a biomassa, conhecido como Hidrogênio de Baixo Carbono ou Hidrogênio Verde. Há, ainda, o Hidrogênio azul que se utiliza do gás natural para produção do combustível promovendo a reforma com captura do carbono com intuito de controlar a emissão de CO₂, sendo menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado ao Hidrogênio Cinza. Por fim, o Hidrogênio Marrom é produzido a partir do carvão mineral em processos que emitem alto volume de dióxido de carbono (IPEA, 2022).

2.5 BIOMASSA

Classifica-se como biomassa a matéria orgânica que pode ser convertida em energia mecânica, térmica ou elétrica, com a conversão podendo ocorrer através de processos físicos, químicos e biológicos. Quanto à origem, podem ser florestais, destacando-se a madeira, agrícolas, como cana-de-açúcar, ou até mesmo alguns resíduos sólidos urbanos e industriais (Torres, 2018).

O Brasil destaca-se mundialmente como maior produtor de cana-de-açúcar, conforme dados de 2019 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) sendo responsável pela produção de cerca de 633 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 9 milhões de hectares (LNBR, 2022). A produção da cana-de-açúcar concentra-se nas regiões Nordeste e Sudeste do país, tendo várias aplicações no ramo alimentício (Torres, 2018). Após o processo de moagem para extrair o caldo, ocorre a formação do bagaço de cana-de-açúcar, que pode ser utilizado para produção de energia. É comum que as indústrias que utilizem a cana-de-açúcar aproveitem o bagaço para produção de energia elétrica e térmica em processos de produção da própria indústria. Devido à alta produção de cana-de-açúcar no país, não se deve ignorar o potencial energético desse componente (Hassuani *et al.* 2005).

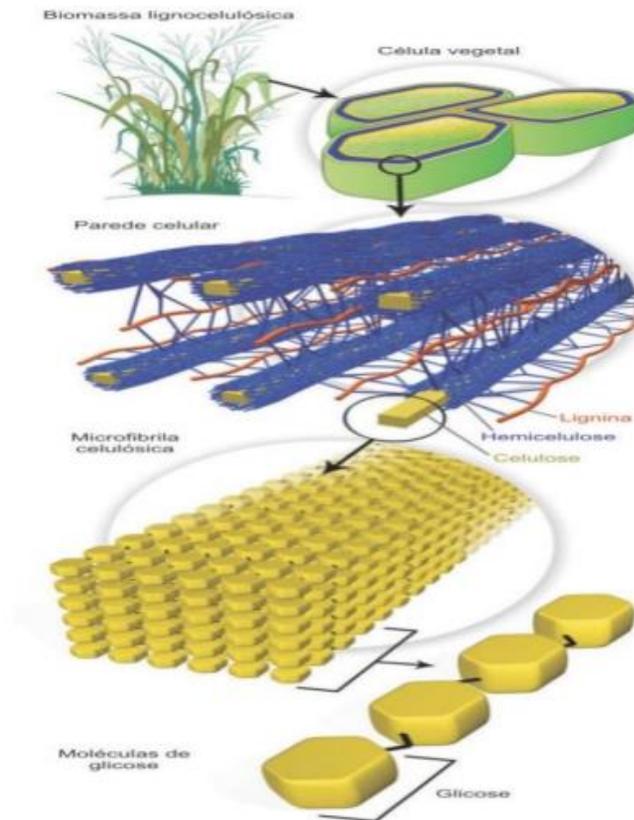
2.5.1 Composição do bagaço da cana-de-açúcar

Após o processo de extração da cana, o bagaço segue rico em quantidade de matéria orgânica, contendo polissacarídeos, sendo a celulose e hemicelulose alguns dos principais, além da lignina (Torres, 2020).

A celulose é formada por cadeias de glicose unidas por ligações intermoleculares responsáveis por formar uma estrutura cristalina que a torna insolúvel e resistente a substâncias químicas. A resistência à hidrólise ocorre devido às ligações de hidrogênio, responsáveis por limitar a solubilidade e reatividade da estrutura (Soares, 2019; Torres, 2018).

A celulose pode ser quebrada por processos de hidrólise química ou enzimática, no entanto, deve-se realizar algumas considerações. A hemicelulose e a lignina envolvem as estruturas da celulose, dessa forma, deve-se promover a remoção desses componentes de forma a facilitar a ação enzimática e o acesso dos reagentes e dos catalisadores (Soares, 2019; Canilha *et al.* 2010). A Estrutura da biomassa está presente na Figura 4. A biomassa lignocelulósica do bagaço da cana de açúcar é composta de (32-48)% de celulose, (23-32) % de lignina e (19-24) % de hemicelulose.

Figura 4. Estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte: Torres (2020)

2.6 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO

Atualmente, a produção biológica de hidrogênio é dividida em processos diferentes, sendo eles a biofotólise direta, biofotólise indireta, fotofermentação ou sistema híbrido e fermentação com bactérias anaeróbias (Rai e Singh., 2016). Ao ser produzido por rotas biológicas, o hidrogênio é denominado como biohidrogênio (Fonseca, 2016).

Dentre os diferentes processos de produção do biohidrogênio, a fermentação anaeróbia se destaca por não depender de iluminação, ter elevada velocidade na reação, baixo custo em relação às outras rotas, além da maior produção. Além disso, a fermentação anaeróbia produz maior quantidade de hidrogênio, os micro-organismos utilizados apresentam vitalidade e reprodução sob condições não-extremas de pressão e temperatura (Fonseca, 2016; Mathews; Wang, 2009). Segundo Rai e Singh (2016), outra vantagem da produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia é a formação de subprodutos na reação que apresentam valor, já a desvantagem é formação de dióxido de carbono, que, mesmo sendo em menor quantidade quando comparada a rota de produção utilizando gás natural, precisa ser tratado.

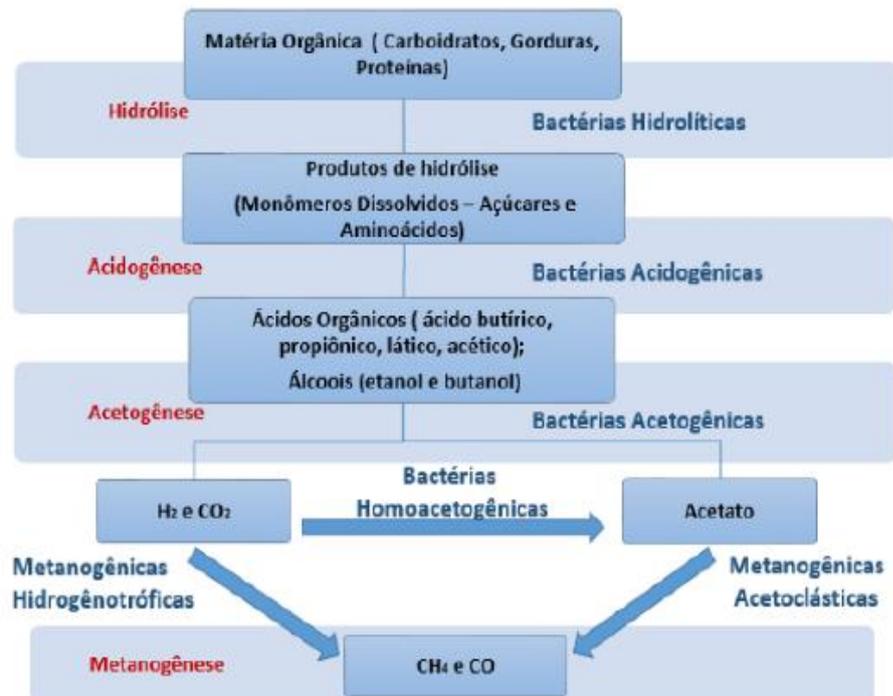
2.6.1 Fermentação Anaeróbia

O processo de fermentação anaeróbia promove o consumo dos carboidratos em situação de ausência do oxigênio presentes nos compostos orgânicos, havendo digestão de tais carboidratos e ocorrendo a conversão em outro componente. No caso da produção de hidrogênio, formam-se o H_2 , CO_2 além de subprodutos, os ácidos orgânicos acético e butírico (Barbosa, 2020; Sa *et al.* 2014).

Segundo Fonseca (2016), o processo de fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio pode ser realizado com culturas mistas ou puras de micro-organismos, onde a utilização de culturas mistas apresenta a vantagem de necessitar de condições mais simples de produção, como a não necessidade de meios de cultura estéreis. No caso das culturas mistas, deve-se atentar à presença de micro-organismos consumidores de hidrogênio, promovendo-se o controle dessas bactérias e criando situações favoráveis aos produtores de Hidrogênio, com o aumento da temperatura até $80^\circ C$, além do controle do pH à depender do meio de cultura utilizado (Fonseca, 2016).

O processo de fermentação anaeróbia com culturas mistas é dividido em 4 etapas principais presentes na Figura 5, sendo elas a hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Sa *et al.* 2014). Na hidrólise, os carboidratos complexos são convertidos em compostos orgânicos solúveis mais simples que compõem membranas dos micro-organismos. Na acidogênese os compostos solúveis formados na hidrólise são convertidos em ácidos orgânicos, álcoois e lactato após serem absorvidos e metabolizados pelas bactérias fermentativas (Sá; Cammarota; Leitão, 2014; Fonseca, 2016; Torres, 2018). Na acetogênese ocorre a oxidação dos ácidos orgânicos, promovendo a formação do ácido acético e de hidrogênio. Após a formação do hidrogênio, ocorre a etapa de metanogênese, onde arqueias metanogênicas iniciam o processo de formação de metano, utilizando o dióxido de carbono, o ácido acético e o hidrogênio para tal formação. Na etapa de metanogênese, pode-se controlar a produção de CO_2 . No entanto, deve-se controlar o consumo de hidrogênio no processo (Fonseca, 2016).

Figura 5. Etapas do processo de degradação anaeróbio por culturas mistas.



Fonte:Fonseca, 2016.

Além das arqueas metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as redutoras de nitrato e sulfato consomem o hidrogênio e também demandam de um tratamento prévio para controle de perdas do produto de interesse (Sem; Suttar, 2012). As bactérias do gênero *Enterobacter* apresentam-se como uma das principais produtoras de hidrogênio devido ao seu baixo custo de manutenção e elevada capacidade de produção. Além delas, as bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Escherichia* também se apresentam como ótimas produtoras de hidrogênio, onde as do gênero *Clostridium* se destacam devido ao rápido metabolismo (Kumar; Das, 2000; Elsharnouby *et al.* 2013; Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

Entre os fatores que influenciam na produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia estão a temperatura, o pH e o substrato. A fermentação pode ocorrer em temperaturas a partir dos 25°C, até temperaturas mais altas, no entanto a faixa ideal se encontra na faixa termofílica ou mesofílica, variando de 25 °C à 65 °C. No entanto, temperaturas abaixo de 10°C limitam a produção do gás, no entanto, a temperatura ideal para a produção dependerá do meio de cultura utilizado (Torres, 2018). Segundo Torres (2018), ao analisar estudos, o pH do sistema que favorece a produção de hidrogênio é de 5,5, com o rendimento caindo conforme o pH diminui. Ainda assim, o controle do pH deve ser de acordo com o substrato e inóculo utilizados, visto que o ponto ideal de pH pode ser tanto em meio ácido quanto em meio neutro e básico (Wang

e Wan, 2009). Por fim, segundo Araújo (2019), substratos com maiores concentrações de sacarose e glicose apresentam maior produção e conversão de hidrogênio quando comparados a outras fontes de carboidrato como lactato, celulose e amido de batata.

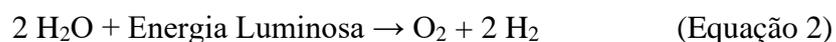
A fermentação pode ocorrer na presença de luz, processo conhecido como fotofermentação ou sistema híbrido, ou na ausência de luz, processo conhecido como fermentação escura.

Segundo Rodrigues (2016), na fermentação escura, a enzima hidrogenase apresenta um papel fundamental na produção do Hidrogênio, pois ela é responsável por manter a neutralidade elétrica durante a degradação do substrato utilizado, promovendo a eliminação do excedente de elétrons. Na fermentação em que se utiliza a glicose como substrato, ocorre a conversão deste carboidrato em piruvato através da via glicolítica, onde esse é oxidado pelo acetil-CoA e convertido em acetil fosfato, produzindo ATP.

Já o sistema híbrido alia a fermentação ocorrida na ausência de oxigênio, produzindo Hidrogênio e ácidos como subproduto, aos micro-organismos fotossintetizantes que consomem os ácidos e também produzem Hidrogênio (Silva, 2009).

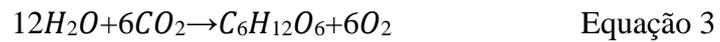
2.6.2 Biofotólise da Água

O método de biofotólise da água pode ser de dois tipos, a direta, em que se utiliza geralmente algas verdes ou indireta, em que se utiliza cianobactérias (Sá; Cammarota; Leitão, 2014). Na biofotólise direta, as algas verdes convertem a energia luminosa em energia química. As algas fotossintetizantes promovem a decomposição da água conforme a Equação 2, havendo a quebra da molécula de água e promovendo a produção de Hidrogênio e oxigênio de forma direta. Na biofotólise indireta, o crescimento das algas é dependente da presença do dióxido de carbono e necessita que o processo ocorra na presença de luz solar (Souza, 2017). Segundo Barbosa (2020), no processo de biofotólise direta é essencial que haja período de adaptação em condições anaeróbicas e ausência de luz. Para ativação e sintetização da enzima hidrogenase. Uma dificuldade em relação à biofotólise direta é a sensibilidade da hidrogenase ao oxigênio, que limita a produção de Hidrogênio no Processo.



Já a biofotólise indireta é um processo que geralmente se utiliza cianobactérias em que a produção de Hidrogênio e oxigênio não ocorrem de maneira simultânea. Dessa maneira,

inicialmente as cianobactérias utilizam a energia luminosa para fixar o dióxido de carbono e utilizam esse composto para produção de carboidratos, de acordo com a Equação 3. Após o acúmulo do carboidrato, se inicia a segunda etapa anaeróbica, na ausência de luz em que os micro-organismos obtêm energia para suas atividades metabólicas, promovendo a quebra dos carboidratos formados anteriormente, realizando a ativação da enzima hidrogenase e promovendo a produção de Hidrogênio de acordo com a Equação 4 (Barbosa, 2020).



3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho trata de uma revisão bibliográfica dos métodos de produção de biohidrogênio através das rotas de fermentação anaeróbia. Nesta revisão, foi estudada a eficiência de produção de hidrogênio. Para isto, realizou-se uma análise comparativa utilizando artigos e teses pertinentes ao tema desta revisão.

Busca-se determinar a eficiência da produção da biohidrogênio utilizando diferentes substratos, com diferentes meios de cultura e variações de temperatura e pH e com isso, avaliando a viabilidade do processo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados discutidos foram retirados de teses e artigos científicos com intuito de avaliar a produção de Hidrogênio utilizando diferentes Micro-organismos, variação do substrato alterando ou o carboidrato ou a concentração do carboidrato no substrato, além de analisar a influência da temperatura e do pH.

4.1 ANÁLISE DOS MICRO-ORGANISMOS

Para análise de micro-organismos, a literatura foi consultada em trabalhos realizados por Fonseca (2016) e Torres (2017), que realizaram estudos para produção de Hidrogênio por fermentação anaeróbia, considerando a fermentação escura, utilizando glicose como substrato. Os micro-organismos estudados foram *Clostridium beijerinckii*, *Enterobacter aerogenes* e a *Enterobacter cloacae*, os resultados estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento de produção de hidrogênio utilizando diferentes micro-organismos.

Micror-organismo	Concentração de substrato (g.L⁻¹)	Rendimento (mol H₂/mol substrato)	Referência
<i>C. beijerinckii</i>	10	1,29	Fonseca (2016)
<i>E. aerogenes</i>	20	0,94	Torres (2017)
<i>E. cloacae</i>	20	1,60	Torres (2017)

Fonte: Adaptado de Fonseca (2016) e Torres(2017)

Os dados obtidos por Fonseca (2017) foram coletados utilizando glicose como substrato. O micro-organismos identificado como produtor de hidrogênio foi *Clostridium beijerinckii*, presentes no lodo de efluentes de usina de açúcar e destilaria de etanol. O lodo passou por um pré-tratamento de forma a favorecer a permanência dos micro-organismos produtores de Hidrogênio. Preparou-se o meio de cultura contendo: glicose 10 g.L⁻¹, NH₄Cl 0,11 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,10 g.L⁻¹ KH₂PO₄ 0,68 g.L⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O 0,09 g.L⁻¹ e oligoelementos 1 mL.L⁻¹ para favorecer o crescimento e reprodução do *Clostridium* presente no lodo. Além disso, realizou-se pré-tratamento para a diminuição ou eliminação de diferentes micro-

organismos não produtores de Hidrogênio. Os micro-organismos metanogênicos foram controlados através de um tratamento térmico a 80°C e controle de pH, submetendo o meio de cultura às condições de pH 3. Após o tratamento, isolou-se as bactérias *Clostridium beijerinckii* utilizando o meio de cultura presente na Tabela 4, descrito por Chen *et al.* (2006). Com a menor concentração do substrato, a bactéria *Clostridium beijerinckii* apresentou o segundo maior rendimento na produção de hidrogênio, de 1,29 mol H₂/mol substrato. No entanto, segundo Foseca (2017), é possível encontrar estudos em que a produção com a mesma concentração de substrato seja de 2,52 mol H₂/mol glicose. O rendimento é calculado através da relação do número de mols de hidrogênio produzidos pelos mols de substrato consumidos durante o processo.

Tabela 4. Meio de Cultura para cultivo de bactérias produtoras de Hidrogênio.

Meio de Cultura	
Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Sacarose	15,00
Extrato de Levedura	1,00
Na ₂ HPO ₄	5,00
KHPO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04
Solução Oligoelementos	2,00 mL.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	2,86
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,17

Fonte: Adaptado de Fonseca (2016)

Já Torres (2017) utilizou bactérias do gênero *Enterobacter*, sendo elas a *E. aerogenes* e a *E. cloacae*, culturas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz. Os inóculos foram mantidos a temperaturas próximas de 4 °C ± 2°C em meio sólido e posteriormente foi preparado o meio de cultura com peptona 10 g.L⁻¹, extrato de carne 3 g.L⁻¹, Fosfato de potássio dibásico 1 g.L⁻¹, cloreto de sódio 5 g.L⁻¹ e ágar 30 g.L⁻¹, sendo mantidos em pH de 6,8. Utilizando glicose como substrato com concentração de 20 g.L⁻¹. O micro-organismo *E. cloacae* apresentou maior rendimento quando comparado ao *E. aerogenes*, sendo os resultados 1,60 mol H₂/mol

substrato e 0,94 mol H₂/mol substrato, respectivamente. No entanto, é possível encontrar na literatura trabalhos em que o rendimento para ambas as bactérias foi de 2,16 mol H₂/mol substrato para 20 g.L⁻¹ de glicose. Dessa forma, nos trabalhos avaliados, nota-se que houve maior rendimento utilizando a bactéria *E. cloacae*.

Nota-se que a conversão do substrato em hidrogênio é equivalente entre as bactérias analisadas. As bactérias *E. cloacae* e *E. aerogenes* sendo utilizadas como culturas puras, necessitaram de condições mais complexas quando comparada ao *C. beijerinckii*, onde este pode ser encontrada em culturas mistas presentes em lodos de efluentes de indústria, ou seja, são facilmente obtidos. No entanto, por estarem em uma cultura mista, a produção do Hidrogênio utilizando *C. beijerinckii* apresenta a desvantagem da necessidade do controle populacional das bactérias metanogênica de forma que o tratamento térmico é suficiente para o controle desses micro-organismos. Com isso, afimar-se que ao utilizar *E. cloacae*, *E. aerogenes* ou *C. beijerinckii* utilizando glicose como substrato, deve-se esperar rendimentos equivalentes, no entanto utilizar esses micro-organismos de uma cultura mista irá reduzir a complexidade do processo.

4.2 ANÁLISE DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Skonieczny e Yargeau (2009) realizaram estudos sobre os efeitos da concentração do substrato e do pH na produção de biohidrogênio por 90 horas utilizando a bactéria *Clostridium beijerinckii*. A análise da produção do biohidrogênio foi realizada até que não houvesse variação da concentração de hidrogênio por 24 horas. O hidrogênio foi coletado utilizando seringas de estanque de 2 mL e analisado por cromatográfica gasosa. Dessa forma, calculou-se o hidrogênio potencial. Neste caso, como a fonte de carboidrato para fermentação não variou, apenas sua concentração (1 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹, 2 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹ e 3 g.L⁻¹), pode-se analisar o efeito da concentração do substrato no potencial de produção de hidrogênio, bem como a variação do pH (5,7 a 6,5) inicial de fermentação, utilizando o micro-organismo *Clostridium beijerinckii*. As condições de produção de hidrogênio desta pesquisa estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Produção de biohidrogênio com diferentes concentrações de substrato e variação de pH.

Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	pH	Potencial de hidrogênio (mL de H ₂)
1	6,1	6,9
1	6,5	5,5
1	5,7	5
1,5	5,9	13
1,5	6,3	12,5
2	5,7	11,6
2	6,5	16
2	6,1	19
2,5	5,9	21,5
2,5	6,3	21,5
3	6,2	31
3	6,5	22
3	5,7	24

Fonte: Adaptado de Skonieczny e Yargeau (2009).

Diante dos resultados encontrados por Skonieczny e Yargeau (2009), nota-se que o potencial de hidrogênio é diretamente proporcional à concentração da glicose, ou seja, a produção de Hidrogênio é maior na concentração de 3 g.L⁻¹ do que para 2,5 g.L⁻¹ e assim sucessivamente, como exposto na Tabela 5.

Resultado semelhante foi encontrado por Fonseca (2017), que utilizou o mesmo micro-organismo e variou a concentração (c) de glicose no substrato em 2 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹, encontrando rendimentos de 0,77 mol H₂/mol glicose e 1,29 mol H₂/mol glicose, respectivamente utilizando *Clostridium beijerinckii* como produtor de hidrogênio. Fonseca (2017) ainda analisou a produção de hidrogênio utilizando substratos como galactose, manose, frutose, xilose, arabinose, sacarose, trealose, glicerol e lactose. Os resultados estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento de biohidrogênio produzido a partir de diferentes substratos em concentrações de 2 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ utilizando *Clostridium beijerinckii*.

Fonte de Carbono	Rendimento (mol H₂/mol substrato) c = 2 g.L⁻¹	Rendimento (mol H₂/mol substrato) c =10 g.L⁻¹
Glicose	0,77	1,29
Galactose	0,36	0,42
Manose	0,25	0,57
Frutose	0,14	0,25
Xilose	0,18	0,25
Arabinose	0,24	0,33
Sacarose	1,38	1,43
Trealose	1,56	0,86
Celobiose	1,35	0,55
Lactose	0,32	0,60
Glicerol	0,24	0,13

Fonte: Adaptado Fonseca (2017).

Nota-se que a glicose apresentou o maior aumento de rendimento com o aumento da concentração no substrato de 2 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹. A galactose, manose, frutose, xilose e arabinose também apresentaram aumento no rendimento, onde todas essas fontes de carbono são monossacarídeos. A lactose e sacarose foram os únicos dissacarídeos que apresentaram aumento no rendimento com o aumento da concentração do substrato. Dessa forma, nota-se que se deve ter um maior controle na concentração do substrato de dissacarídeos, visto que o aumento da concentração acarreta em perda de rendimento. Além disso, a sacarose e a glicose com concentrações de 10 g.L⁻¹ no substrato e a trealose e celobiose, na concentração de 2 g.L⁻¹, apresentaram maior rendimento quando se utilizou a bactéria *Clostridium beijerinckii*. Todas os processos de produção foram realizados em 72 horas.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, incluindo o aumento do rendimento da produção de Hidrogênio com o aumento da concentração de sacarose. Segundo Skonieczny e Yargeau (2009), o rendimento da produção de hidrogênio aumenta com o aumento da concentração da sacarose até um certo ponto. No entanto, como visto no resultado dos outros dissacarídeos por Fonseca (2017), caso a concentração seja muito elevada, pode ocorrer a acidificação do meio que é responsável pela inibição da ação dos micro-organismos. Em contrapartida, concentração baixas do substrato resultam em baixa produção do hidrogênio,

pois os micro-organismos utilizam as fontes de carboidrato para crescimento da biomassa ao invés da produção de hidrogênio.

Lay (2001) realizou a fermentação durante 4 dias com a bactéria *Clostridium sp.* utilizando a celulose como fonte de carboidrato. Por se tratar de uma cultura presente em lodo de um digestor anaeróbio, realizou-se o pré-tratamento térmico de fervura para diminuir ou eliminar as bactérias não produtoras ou consumidoras de hidrogênio presentes no lodo de forma a favorecer a presença apenas das bactérias produtoras de Hidrogênio, mais precisamente, o *Clostridium sp.* Utilizou-se diferentes concentrações de celulose microcristalina da marca Funacel tipo Avicel. O pH inicial do sistema foi indicado em 7. Os resultados encontrados estão presentes na Tabela 7, onde se observa que o aumento da concentração do substrato diminui o rendimento da produção do biohidrogênio, comportamento semelhante ao dos dissacarídeos. Segundo Lay (2001), esse resultado ocorre pois após se atingir uma quantidade de Hidrogênio produzido elevado, o gás age como inibidor de bactérias do gênero *Clostridium* celulolísticos. O aumento da concentração do substrato acarretou, ainda, na acidificação do meio e consequente queda no rendimento da produção de hidrogênio, resultado que concorda com a afirmação de Skonieczny e Yargeau (2009) para a celulose, que se trata de um polissacarídeo

Tabela 7. Rendimento de biohidrogênio produzido utilizando celulose como substrato com diferentes concentrações

Concentração de Celulose (g.L ⁻¹)	Rendimento (mol H ₂ /mol substrato)
12,5	2,18
25	1,60
37,5	1,13
50	0,48

Fonte: Adaptado Lay (2001).

Embora não haja grande variedade de substratos utilizados na produção de hidrogênio para bactérias do gênero *Enterobacter*, pode ser visto na Tabela 3, que a *Enterobacter cloacae* apresenta maior rendimento de produção de hidrogênio em comparação à *Enterobacter aerogenes* ao utilizar glicose como substrato. Nath, Kumar e Das (2006) realizaram o estudo da produção de hidrogênio por 72 horas utilizando glicose em diferentes concentrações e cultura mista contendo bactérias metanogênicas controladas com pré-tratamento térmico e *Enterobacter cloacae* como produtora de hidrogênio. Os resultados indicaram que, assim como para o *Clostridium beijerinckii*, o aumento da concentração da glicose aumentou a produção de

Hidrogênio. No entanto, nota-se na Tabela 8 que na concentração da glicose de 1% (m/v), a produção máxima de hidrogênio foi atingida e que o aumento da concentração do açúcar, acarretou a diminuição da produção de Hidrogênio. Na concentração de 1% (m/v), tem-se a maior produção de gás Hidrogênio, com aproximadamente 957 mL de H₂. A composição do gás produzido pela fermentação foi analisada por cromatografia gasosa.

Tabela 8. Produção de biohidrogênio utilizando glicose como substrato com diferentes concentrações utilizando *Enterobacter cloacae*.

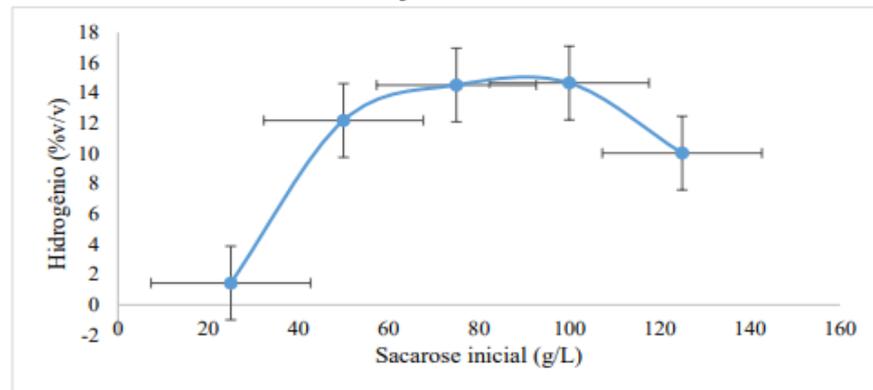
Concentração de glicose %(m/v)	Produção de H ₂ (mL)
0,2	418,5
0,4	462
0,6	579
0,8	714
1,0	956,8
1,2	884,6
1,4	750

Fonte: Adaptado Nath, Kumar e Das (2006)

Teixeira (2023) realizou o estudo da produção de Hidrogênio utilizando culturas puras de *Enterobacter aerogenes* com diferentes concentrações de substratos de sacarose e glicerina por 26 dias, analisando concentração de 25 g.L⁻¹, 50 g.L⁻¹, 75 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹ e 125 g.L⁻¹, obtendo as relações entre as concentrações dos respectivos substratos e a produção de Hidrogênio.

Para o tratamento da Sacarose, encontrou-se que o ponto mais promissor para produção de Hidrogênio foi quando a concentração do substrato utilizado foi de 100 g.L⁻¹, resultado presente no gráfico da Figura 6. Ao aumentar a concentração do substrato para 125 g.L⁻¹, nota-se que há uma queda na relação envolvendo a produção de hidrogênio, indicando que houve uma inibição devido ao excesso de sacarose (Teixeira, 2023).

Figura 6. Relação entre a produção de Hidrogênio e a concentração de sacarose utilizando *Enterobacter aerogenes*



Fonte: Teixeira (2023).

Em relação à glicerina, Teixeira (2023) relatou uma menor produção de Hidrogênio quando comparada à sacarose, indicando a preferência da *Enterobacter aerogenes* pela sacarose em relação à glicerina assim como o micro-organismo *Clostridium beijerinckii* estudado por Fonseca (2017). A variação de concentração de glicerina de 25 à 125 g.L⁻¹ no substrato não alterou significativamente a produção de Hidrogênio, com concentração média de Hidrogênio (%v/v) próximo de 0,5 para todas as concentrações, produção consideravelmente menor do que quando se utilizou sacarose como substrato, em que a concentração média se aproximou de 15 %v/v (Teixeira, 2023).

Paz (2022) realizou a produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia utilizando a *Enterobacter aerogenes* com a cultura pura por 108 horas. Os substratos utilizados foram a glicose, a sacarose, a glicerina (todos com concentração de 25 g.L⁻¹) e o caldo da cana com concentração de 72 g.L⁻¹. Entre os substratos utilizados, a sacarose apresentou maior concentração do gás produzido na fermentação, seguido pela glicerina. O caldo de cana apresentou a menor conversão. Os dados estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9. Produção de biohidrogênio utilizando diferentes substratos com *Enterobacter aerogenes*.

Substrato	Concentração média de H ₂ (%)
Glicose	24,4
Sacarose	48,88
Glicerina	26,32
Caldo de Cana	1,28

Fonte: Adaptado Paz (2022).

Com os resultados dados pela literatura, tanto para as bactérias do gênero *Clostridium* quanto do gênero *Enterobacter* a produção foi maior ao utilizar a sacarose como substrato. A glicose surge como alternativa, apresentando bom rendimento tanto com a utilização de *Clostridium* quanto de *Enterobacter*. Já a glicerina se apresentou como alternativa para bactérias do gênero *Enterobacter* de acordo com o estudo de Paz (2022), em que a variação de concentração da glicerina no substrato não interfere significativamente na concentração de Hidrogênio produzido (2023). Já para *Clostridium beijerinckii* existem alternativas para substratos mais eficientes que a glicerina, como verificado por Fonseca (2017).

4.3 ANÁLISE DA TEMPERATURA E pH

Neves (2009) realizou o estudo variando a temperatura do sistema utilizando cultura pura da bactéria *Enterobacter aerogenes* como produtora de hidrogênio. No estudo, ele promoveu a queda da temperatura do sistema de 37 °C para 30 °C, avaliando a produção de hidrogênio, de etanol que é um subproduto de valor agregado e do CO₂, que é um subproduto indesejado. A biomassa utilizada foi proveniente do resíduo de uma fábrica de biodiesel com concentração de 0,1 g.L⁻¹ da biomassa e 20 g.L⁻¹ de concentração de glicerol. Os resultados estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10. Produção de biohidrogênio utilizando glicerol em diferentes faixas de temperatura com *Enterobacter aerogenes*.

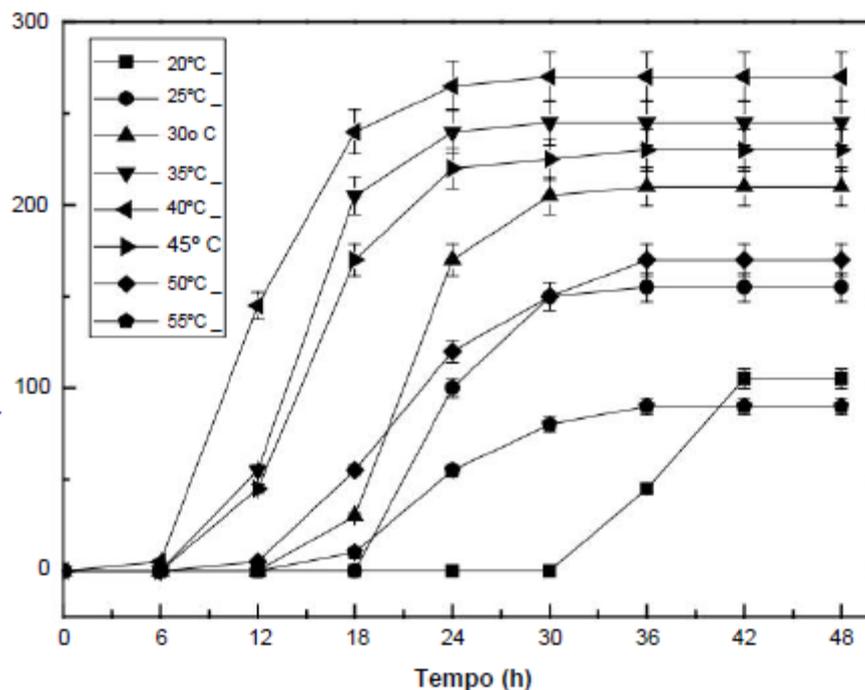
Temperatura (°C)	Produção de H ₂ (mL)	Produção de CO ₂ (mL)	Concentração de Etanol (g.L ⁻¹)
30	714	372	3,7
37	710	345	5,1

Fonte: Adaptado Neves (2009).

Nota-se que o aumento da temperatura ocasionou uma leve diminuição na produção do hidrogênio, no entanto, houve uma queda maior na produção do dióxido de carbono e maior concentração de etanol. Embora seja produzido menos hidrogênio à 37 °C, para uma produção em larga escala, é válido cogitar a utilização desta faixa de temperatura devido à economia no tratamento do CO₂ e maior obtenção de etanol. Em contra partida, foi relatado por Neves (2009) que nas duas primeiras horas de operação, o sistema à 37 °C não produziu hidrogênio, enquanto o sistema à 30 °C produziu 200 mL. Dessa forma, em escala industrial, é mais vantajoso utilizar a temperatura mais baixa caso se deseje realizar mais operações em menos tempo.

Wang e Wan (2008) também estudaram os efeitos da temperatura na produção do Hidrogênio, promovendo variações da temperatura de 20 °C até 55 °C ao longo do processo por 48 horas. Os resultados obtidos estão presentes na Figura 7. Foi utilizado uma cultura mista, onde se realizou um pré-tratamento térmico para diminuição ou eliminação das bactérias metanogênicas. A cultura estava presente em um lodo coletado de uma estação de tratamento de efluentes de sementes. O micro-organismo produtor de Hidrogênio presente na cultura mista foi *Ethanoligenens harbinense* e promoveu-se pré-tratamento do lodo para diminuição ou eliminação dos micro-organismos metanogênicos. O substrato utilizado foi glicose com concentração de 10 g.L⁻¹.

Figura 7. Produção cumulativa em 48 horas de hidrogênio em diferentes temperaturas utilizando glicose.

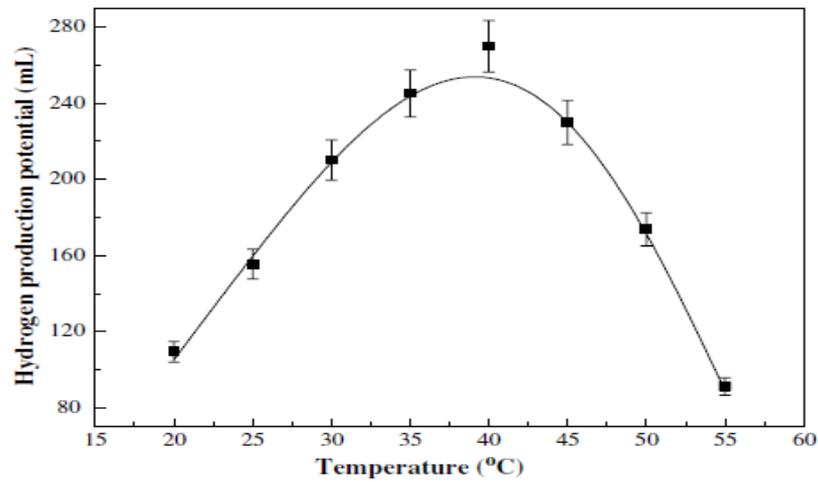


Fonte: Adaptado Wang e Wan (2008).

Com a produção cumulativa, os autores calcularam o progresso da produção de hidrogênio utilizando a Equação 5, onde 'H' é a produção cumulativa de hidrogênio em mL no tempo 't' em horas, 'P' é o potencial de produção de hidrogênio em mL, 'x' é o tempo de atraso em horas e Rm é a taxa máxima de produção de hidrogênio. O modelo utilizado apresentou R = 0,99, demonstrando a precisão do método. O efeito da temperatura no potencial de produção está presente na Figura 8 e o efeito da temperatura no tempo de atraso x na Figura 9.

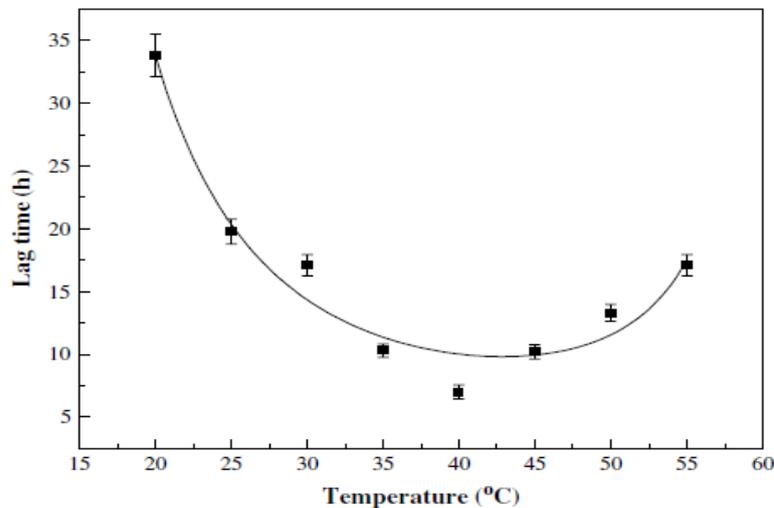
Equação 5

Figura 8. Efeito da temperatura no potencial de produção de H₂ utilizando *Ethanoligenens harbinensis*.



Fonte: Wang e Wan (2008).

Figura 9. Efeito da temperatura no tempo de atraso utilizando *Ethanoligenens harbinensis*.



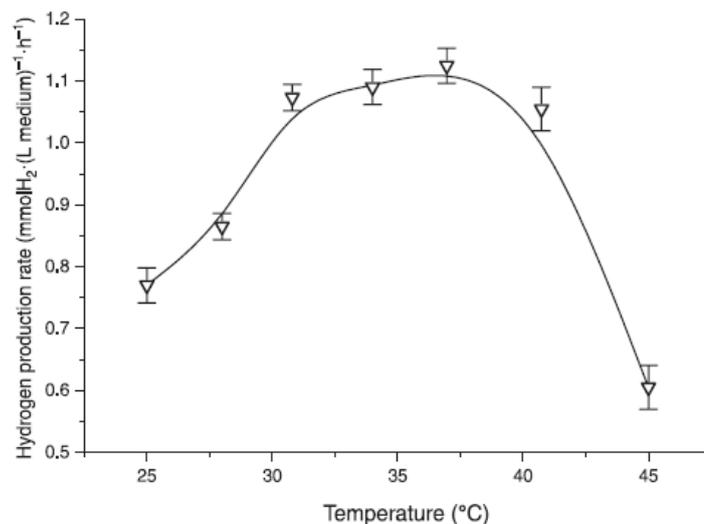
Fonte: Wang e Wan (2008).

De acordo com o trabalho de Wang e Wan (2008), a melhor faixa de temperatura para produção de hidrogênio está entre 35 °C e 40 °C, podendo ser visto na Figura 6. Ao aumentar a temperatura para valores acima de 40°C, o potencial diminui gradativamente até atingir o menor ponto à 55 °C. Esses dados que não discordam do encontrado por Neves (2009). No entanto, na Figura 7, nota-se que o menor tempo de atraso com o aumento da temperatura de 20 °C à 45 °C, dado que destoava do encontrado por Neves.

Nath, Kumar e Das (2006) também realizaram testes com variação de temperatura. As temperaturas variaram de 25 °C a 45 °C, e os resultados encontrados para a produção de

hidrogênio estão presentes na Figura 10 e indicam que o ponto de maior produção de hidrogênio está entre 35 °C e 40 °C utilizando o micro-organismo *Enterobacter Cloacae* concordando com Neves (2009). Dessa forma, de acordo com a literatura, a melhor faixa de temperatura para produção de hidrogênio e de subprodutos de interesse está entre 35 °C e 40 °C tanto para bactérias do gênero *Enterobacter*, quanto para *Ethanoligenens harbinense*.

Figura 10. Efeito da temperatura nos pontos de produção de H₂.



Fonte: Nath, Kumar e Das (2006).

Skonieczny e Yargeau (2009) encontraram a faixa de pH com maior potencial de produção de hidrogênio próximo a 6 utilizando o micro-organismo *Clostridium beijerinckii* (resultados na Tabela 5). Além disso, o pH mais baixos que 6 tendem a inibir mais a produção que pH superiores a 6, dessa forma, deve-se controlar a acidificação do meio de fermentação. No entanto, a faixa do pH ideal, assim como da temperatura, irá depender do inóculo e do substrato utilizados (Wang; Wan, 2009).

Sung *et al.* (2003), utilizando também sacarose como substrato e micro-organismos do gênero *Clostridium* retirados de compostos gerados após processo de compostagem, encontraram o potencial máximo de produção de hidrogênio em meio ácido de pH 4,5, enquanto Lee, Miyahara e Noike (2002) realizaram a variação de pH em um sistema que utilizou sacarose como substrato à 37 °C e micro-organismos *Clostridium beijerinckii*, onde o ponto de pH que apresentou maior produção de hidrogênio foi 9, produzindo 126,9 mL H₂/g_{Substrato} com R= 0,938 e pH de 10, produzindo 125,4 mL H₂/g_{Substrato}. Em contrapartida, com pH de 6, a produção foi de 32,4 mL H₂/g_{Substrato}. Dessa forma, os resultados obtidos nos três diferentes estudos apontam para concordância da afirmação de Wang e Wan, (2009).

Nota-se que há a viabilidade para produção de Hidrogênio através da fermentação anaeróbia. Neste caso, bactérias *Enterobacter cloacae* e *Clostridium beijerincki* surgem como alternativas que apresentam produções semelhantes. Em relação ao substrato, a sacarose se apresentou como o mais adequado para ambos micro-organismos, devendo-se manter a concentração da sacarose controlada na faixa entre 80 g.L⁻¹ e 100 g.L⁻¹ para evitar inibições. Notou-se, ainda, que a faixa de temperatura mesofílica se apresenta como a ideal para a produção de Hidrogênio, segundo a literatura. Quanto ao pH deve ser testado a fim de avaliar qual o ideal para o sistema testado, onde o pH próximo a 6 durante o processo de fermentação se apresenta como mais adequado em grande parte dos processos.

5. CONCLUSÃO

Ao analisar a literatura, pôde-se determinar que o inóculo, o substrato, a temperatura e o pH são fatores que influenciam diretamente na produção do hidrogênio por fermentação anaeróbia.

Não há grande diferença no rendimento da produção de hidrogênio ao utilizar a bactéria *Clostridium beijerinckii*, *Enterobacter aerogenes* ou *Enterobacter cloacae*. As culturas mistas precisam condições de menor complexidade para obtenção da bactéria produtora de hidrogênio em relação à cultura pura, no entanto, para ter maior rendimento na obtenção do biocombustível, deve-se realizar o pré-tratamento dessas culturas mistas. O substrato contendo sacarose como fonte de carboidrato se apresentou como o melhor para bactérias do gênero *Clostridium* e *Enterobacter*, sendo a glicose uma alternativa para ambos gêneros. A temperatura e o pH devem ser monitorados e controlados para evitar a inibição da produção de hidrogênio, no entanto, o ponto ideal de ambos dependerá do substrato utilizado e do inóculo, com a temperatura ideal variando de 35 °C a 40 °C, e o pH ideal do processo estando, na maioria das ocasiões, próximos a 6. Entretanto, deve-se realizar testes no processo, pois o pH ideal poderá variar de acordo com o sistema utilizado.

A produção de hidrogênio se apresenta como viável, visto que existem várias alternativas disponíveis pela literatura de substrato e micro-organismos. No entanto, para que a produção seja eficiente, deve monitorar os parâmetros citados. Ao selecionar o micro-organismo, deve-se criar condições favoráveis para o seu crescimento e reprodução e, em caso de culturas mistas e lodo, deve-se realizar o pré-tratamento para diminuição ou eliminação dos micro-organismos metanogênicos. A concentração do substrato é algo relevante, deve-se realizar testes para encontrar a concentração ideal para o processo. No caso da sacarose, a concentração ideal se encontra próximo de 100 g.L⁻¹, de forma que o aumento da concentração promove a inibição devido ao excesso de substrato. Por fim, o controle da temperatura e do pH no sistema estão diretamente relacionados a ação dos micro-organismos e devem ser monitorados e controlados para que não haja inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R. S; SOUSA, F. L. N de; VANDERLEY, P. S; BENTES, S. O. da SILVA; GOMES, L. M; FERREIRA, F. C. L. Fontes de Energia Renováveis: Pesquisas, Tendências E Perspectivas Sobre As Práticas Sustentáveis. **Research and Society Development**, v. 11, n.11, ago 2022. <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33893>

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

BARBOSA, L. G. B. Biocombustíveis: Vantagens e Desvantagens. Revista Eletrônica de Energia. V.3, n.1, p. 16-33, dez 2013. Disponível em <<https://revistas.unifacs.br/index.php/ree/article/view/2891>>. Acesso em 22/12/2023 às 16:32.

BELLE,, HANS MICHAEL VAN. Indicadores de sustentabilidade: um levantamento dos principais sistemas de avaliação. **Cadernos EBAPE.BR**, v.2, n1, mar 2004. <https://doi.org/10.1590/S1679-39512004000100002>

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S; FELIPE , M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO, W. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol; **Rev anal**. v.44 n48, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

CARNEIRO, M. L. N. M.; PRADELLE, F.; BRAGA, S. L.; GOMES, M. S. P.; MARTINS, A. R. F. A.; TURKOVICS, F.; PRADELLE, R. N. C. Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 632–653, jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.152>

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR. M.H.E. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38 p 4945-4966, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>

FONSECA, Bruna Constante. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii***. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, SP: USP, 2016

HALLENBECK, PATRICK C.; DIPANKAR G. ‘Advances in Fermentative Biohydrogen Production: The Way Forward?’ **Trends in Biotechnology**, vol 27, no. 5, May 2009, pp. 287–97. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Panorama Do Hidrogênio No Brasil**, 2022. Disponível em <<https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/11291>> . Acesso em 02/12/2023.

KUCEK, K. T.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 385–392, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1048-2>

LARA, D.M; RITCHER M.F. Hidrogênio Verde: A Fonte de Energia do Futuro. **Novos Cadernos NAEA**, v. 26, n. 1, Abril 2023 <http://dx.doi.org/10.18542/ncn.v26i1.12746>

Lay JJ. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. **Biotechnol Bioeng.** v. 74 n. 20, p 280-287 ,2001. Doi: 10.1002/bit.1118. PMID: 11410852.

LEE, Y.J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 694-698, 2002. Doi: [10.1002/jctb.623](https://doi.org/10.1002/jctb.623)

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Plano Decenal de Expansão de Energia**, 2023. Disponível em <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/sntep/publicacoes/plano-decenal-de-expansao-de-energia/pde-2029-a-2021/pde-2023/plano-decenal-de-expansao-de-energia-pde-2023.pdf/view>> . Acesso em 30/11/2023 às 16:32.

MOYSÉS ETCHEZAR, J. W.; CHECHI BIORCHI, B. Desenvolvimento Sustentável: Uma Análise Da Perspectiva De Garantia Para Gerações Futuras. **Revista Digital Constituição e Garantia de Direitos**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 142–156, 2018. DOI: 10.21680/1982-310X.2018v11n1ID15369.

NATH Kaushik.; KUMAR Anish.; DAS Debabrata. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. **Can J Microbiol.** v. 52, n. 6, junho doi: 10.1139/w06-005. PMID: 16788720.

NEVES, L.M.V.das, **Produção de Biohidrogênio por Bactérias a Partir de Resíduos Fermentescíveis**. Lisboa-POR Trabalho de Conclusão de curso de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa, 2009.

NONES, Daniela Letícia; BRAND, Martha Andreia; AMPESSAN, Camilla Gabriela Melo; FRIEDERICHS, Gustavo. Biomassa residual agrícola e florestal na produção de compactados para geração de energia. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 16, n. 2, p. 155–164, 2017.. DOI: 10.5965/223811711622017155.

OLIVEIRA, M. G. N.; CRUZ, M. A. L; FERREIRA, T. **Impactos Causados Pelo Uso Dos Combustíveis Fósseis E O Uso Do Biocombustível Como Solução Viável**. Dissertação. Escola Tecnica Estadual Benedito Storani Jundiá- SP, 2021

PAZ, A. R. **Produção de Hidrogênio por Via Biológica Utilizando Micro-organismo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Recife, PE: Uiversidade Federal de Pernambuco, 2022.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>

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

ROMEIRO, A. R.. Desenvolvimento Sustentável: Uma perspectiva economico-ecológica (Vol. 26, No. 74). Sao Paulo: EstudosAvancados, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142012000100006>.

RODRIGUES, THAYANYA. **AValiação DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná, Paraná, 2019.

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, Junho 2014, pp. 857–67. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>

SAVLA, N.; SHINDE, A.; SONAWANE, K. MEKUTO. L; CHOWDLHARY, P; PANDIT, S. Microbial Hydrogen Production: Fundamentals To Application. In **Microorganisms For Sustainable Environment And Health**. Elsevier, 2020. p 343-365, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00017-6>

SEM, B.; SUTTAR, R.R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch-processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** . v.37 n 20, p 15588 – 15597, 2012. DOI:[10.1016/j.ijhydene.2012.04.027](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.027)

SKONIECZNY, M.T; YARGEAU, V.; Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34 n. 8, p. 3288-3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.044>

SOARES, J. F. **Produção de Hidrogênio A Partir da Fermentação Anaeróbia de Hidrolisados de Resíduos Agroindustriais**. Dissertação Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

SOLOMON, B. D.; KRISHNA, K. The coming sustainable energy transition: History, strategies, and outlook. **Energy Policy**, v. 39, n. 11, p. 7422–7431, nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.09.009>

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: Universidade Federal de Ouro Preto, 2018.

SOUZA, I. T. **Produção De Hidrogênio Por Fermentação Anaeróbia: Enriquecimento Nutricional E Influência Da Luminosidade**. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

TEIXEIRA, K.A.C.; **PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA: análise da influência da concentração de diferentes substratos**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 2023.

TOLMASQUIM, MAURÍCIO TIOMNO. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Revista da USP**, v. 26 n. 74, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142012000100017>

TORRES, I. S. **Produção De Hidrogênio Por Fermentação Anaeróbia: Enriquecimento Nutricional E Influência Da Luminosidade**. Dissertação de Pós-Graduação. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 2017.

TORRES, J. N. M. **Produção De Hidrogênio A Partir Do Bagaço Da Cana-De-Açúcar Por Via Fermentativa Anaeróbia**. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 2018.

VASCONCELOS, Lívian R. de Sá, ‘Produção De Hidrogênio Via Fermentação Anaeróbia - Aspectos Gerais E Possibilidade De Utilização De Resíduos Agroindustriais Brasileiros’. **Química Nova**, vol. 37, June 2014, pp. 857–67. SciELO, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>.

WANG, JIANLONG, and WEIN WAN. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. vol. 33, n. 20, Oct 2008. p 5392-5397. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.010>

WANG, JIANLONG, and WEIN WAN. ‘Factors Influencing Fermentative Hydrogen Production: A Review’. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 34, no. 2, Jan. 2009, pp. 799–811. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>.