



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA (UNILAB)
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPPG)
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (IEDS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE (PGEA)**

ESTEFÂNIA DE SOUSA MOREIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR *Clostridium butyricum* VIA FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA UTILIZANDO O BAGAÇO DE CAJU COMO MATÉRIA-PRIMA**

REDENÇÃO-CE

2024

ESTEFÂNIA DE SOUSA MOREIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR *Clostridium butyricum* VIA FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA UTILIZANDO O BAGAÇO DE CAJU COMO MATÉRIA-PRIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PGEA da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, como requisitos à aprovação no componente curricular obrigatório código MAEA0005: Dissertação. Área de concentração: Processos Químicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientadora: Dr.^a. Carla Luzia Borges Reis.

REDENÇÃO-CE

2024

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Moreira, Estefânia de Sousa.

M838p

Produção de hidrogênio por *clostridium butyricum* via fermentação anaeróbia utilizando o bagaço de caju como matéria-prima / Estefânia de Sousa Moreira. - Redenção, 2025.
66f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, Programa de Pós-graduação em Energia E Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2025.

Orientadora: Profa. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha.
Coorientadora: Profa. Dr^a. Carla Luzia Borges Reis.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Biohidrogênio. 3. Dark-fermentation. 4. Energia. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 333.9539

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pelas oportunidades que me fizeram chegar até aqui e por nunca me desamparar.

Aos meus pais, Edgar Moreira e Neide Cavalcante, que sempre se esforçaram para me proporcionar um ensino de qualidade durante todo meu período escolar e superior. Por sempre me incentivarem nos momentos difíceis e me apoiarem nas minhas decisões.

As minhas irmãs, Cidimária e Naiara, pelo companheirismo, apoio e cumplicidade que me proporcionaram.

Aos meus amigos de longa data, Gabriele, Raynara, Deusa, Raabe, Marcos e Naiane, que não deixaram a distância se fazer presente e sempre estiveram comigo, de perto ou de longe, obrigada pela amizade, pelo amor e pelo apoio.

Aos amigos que o mestrado me presenteou: Karla, Jucilma, Matheus, André, Gabriel, Larissa, Carlos, Ravena, Emanuel, Eddie, Gabriel, Paulinha, Marcos, Stefanny, Cinthia e Vanessa, meu muito obrigada por todo o companheirismo, pelo apoio, pelas risadas na copa e por toda a ajuda ao longo desses dois anos, a caminhada tornou-se mais leve ao lado de vocês, obrigada por tanto.

Ao Sr. Luis, por ser esse exemplo de humildade e generosidade e pelo excelente trabalho desempenhado no DEQ.

Meu muito obrigada à minha orientadora Dr^a Maria Valdez Rocha, pela orientação, apoio, ensinamentos, por toda paciência e dedicação, por ser esse exemplo de profissional competente que és.

À minha coorientadora, a professora Dr^a Carla Luzia Borges Reis, por toda a ajuda disponibilizada ao longo desses dois anos, por se mostrar sempre disponível para o que precisasse, por sua paciência e dedicação, e pela sua amizade.

As instituições, UNILAB e UFC e todos seus funcionários, que demonstraram estarem comprometidos com a qualidade do ensino e pesquisa, que tanto me ajudou no crescimento desse trabalho e também profissional.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ, em especial a FUNCAP pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

Enfim, obrigada a todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e em todos os meus anos de graduação. Gratidão!

RESUMO

Diante da crescente demanda global por energia e da preocupação com a qualidade do meio ambiente, surge a necessidade por fontes renováveis que reduzam a dependência dos combustíveis fósseis. Nesse contexto, o biohidrogênio (BioH₂) emerge como uma alternativa limpa, renovável e promissora, uma vez que sua combustão resulta apenas em água e energia. Dentre os métodos biológicos para sua produção, a fermentação anaeróbia (ex. fermentação escura) a partir de biomassa como fonte de carbono é considerada uma tecnologia favorável. Um exemplo de biomassa é o bagaço de caju (CAB), considerado um importante resíduo da agroindústria. Por tratar-se de um material lignocelulósico, que pode ser hidrolisado para obter-se carboidratos fermentáveis, ele se destaca como uma matéria-prima alternativa vantajosa para a produção de diversos biocompostos. Assim, o presente estudo teve como objetivo produzir BioH₂ utilizando *Clostridium butyricum* a partir do CAB. Inicialmente, este foi lavado, seco e triturado. Posteriormente, foi submetido a pré-tratamento ácido seguido de alcalino, com subsequente hidrólise enzimática, obtendo um hidrolisado (CAB-HE) com 68 g/L de glicose, sendo diluído até concentrações de 10 g/L e 20 g/L. Então, esses hidrolisados foram utilizados em bioprocessos conduzidos em reator (200 mL) a 35 °C e 100 rpm por 72 h. Foram avaliadas a influência da suplementação do CAB-HE com L-cisteína (0,16 g/L) ou glicerol (1 g/L ou 5 g/L), bem como o pH inicial (6,0 e 7,0). Nos ensaios avaliando a suplementação com L-cisteína, não foi observada uma diferença significativa na produção de BioH₂ ao utilizar o CAB-HE contendo 10 e 20 g/L de glicose em ambos os pHs avaliados, obtendo 304,8 ± 13,7 mL_{H2} e 301,6 ± 7,5 mL_{H2} em pH 7, com e sem L-cisteína, respectivamente. No entanto, a maior produção de H₂ foi obtida no ensaio usando CAB-HE com 20 g/L de glicose suplementado com glicerol (5 g/L) a pH 7, com um rendimento de 3,6 ± 0,9 mol_{H2}/mol_{glicose}, correspondendo 2294,2 litros_{H2}/1000Kg_{CAB}, e os resultados não foram estatisticamente diferentes nas duas concentrações de glicerol avaliadas. Nos bioprocessos foram produzidos subprodutos de agregado valor comercial, tais como ácido butírico (3,1 g/L), ácido láctico (0,7 g/L) e ácido fórmico (1,6 g/L), sendo estas concentrações obtidas no bioprocessos usando 5 g/L de glicerol como fonte de carbono. Com base nos resultados obtidos, essa pesquisa oferece uma solução sustentável para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais na produção de H₂, promovendo a valorização desses resíduos e a geração de energia limpa e renovável, estando de acordo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e o conceito de economia circular.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica; biohidrogênio; *dark-fermentation*; energia

ABSTRACT

In view of the growing global demand for energy and concern for environmental quality, there is a need for renewable sources that reduce dependence on fossil fuels. In this context, biohydrogen (BioH₂) emerges as a clean, renewable and promising alternative, since its combustion results only in water and energy. Among the biological methods for its production, anaerobic fermentation (e.g. dark fermentation) from biomass as a carbon source is considered a favorable technology. An example of biomass is cashew bagasse (CAB), considered an important agroindustry waste. As it is a lignocellulosic material that can be hydrolyzed to obtain fermentable carbohydrates, it stands out as an advantageous alternative raw material for the production of several biocompounds. Thus, the present study aimed to produce BioH₂ using *Clostridium butyricum* from CAB. Initially, it was washed, dried and crushed. Subsequently, it was subjected to acid pretreatment followed by alkaline pretreatment, with subsequent enzymatic hydrolysis, obtaining a hydrolysate (CAB-HE) with 68 g/L of glucose, being diluted to concentrations of 10 g/L and 20 g/L. Then, these hydrolysates were used in prolonged bioprocesses in a reactor (200 mL) at 35 °C and 100 rpm for 72 h. The influence of CAB-HE supplementation with L-cysteine (0.16 g/L) or glycerol (1 g/L or 5 g/L), as well as the initial pH (6.0 and 7.0) were evaluated. In the trials evaluating supplementation with L-cysteine, no significant difference was observed in BioH₂ production when using CAB-HE containing 10 and 20 g/L of glucose at both pHs evaluated, obtaining 304.8 ± 13.7 mLH₂ and 301.6 ± 7.5 mLH₂ at pH 7, with and without L-cysteine, respectively. However, the highest H₂ production was obtained in the assay using CAB-HE with 20 g/L of glucose supplemented with glycerol (5 g/L) at pH 7, with a yield of 3.6 ± 0.9 molH₂/mol_{glucose}, corresponding to 2294.2 litersH₂/1000 kg_{CAB}, and the results were not statistically different at the two glycerol concentrations evaluated. In the bioprocesses, byproducts with added commercial value were produced, such as butyric acid (3.1 g/L), lactic acid (0.7 g/L) and formic acid (1.6 g/L), with these concentrations obtained in the bioprocess using 5 g/L of glycerol as a carbon source. Based on the results obtained, this research offers a sustainable solution for the reuse of agro-industrial waste in the production of H₂, promoting the valorization of this waste and the generation of clean and renewable energy, in accordance with the Sustainable Development Goals (SDGs) and the concept of circular economy.

Keywords: lignocellulosic biomass; biohydrogen; dark fermentation; renewable energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Emissões globais de CO ₂ relacionadas com a energia e sua variação anual, 1900-2023	13
Figura 2 - Emissões totais de CO ₂ associadas à matriz energética brasileira no ano de 2023.....	14
Figura 3 - Participação das renováveis na oferta interna de energia.	15
Figura 4 - Modelo de reações dos principais processos de produção biológica de H ₂	18
Figura 5 - Rota metabólica por fermentação escura.	19
Figura 6 - Estrutura da biomassa lignocelulósica e seus biopolímeros; celulose, hemicelulose e lignina.	25
Figura 7 - Fluxograma do processo de produção de H ₂ e metabólitos a partir do bagaço de caju.....	32
Figura 8 - Espectros de FTIR do bagaço de caju <i>in natura</i> (CAB) e bagaço pré-tratado com ácido (CAB-H) e com ácido seguido de álcali (CAB- OH)	34
Figura 9 - Perfil do crescimento celular (▲) da bactéria <i>C. butyricum</i> em meio <i>Reinforced Clostridial Medium</i> conduzido a 35 °C e 100 rpm.....	36
Figura 10 - Perfil da concentração celular (g/L) da bactéria <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 10 g/ de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína pH inicial 6:(■) CAB-HE pH 6 sem suplementação, (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína.	37
Figura 11 - Perfil do consumo de glicose (g/L) da bactéria <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 10 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, pH inicial 6 :(■) CAB-HE pH 6 sem suplementação, (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína.....	38
Figura 12 - Perfil hidrogênio acumulativo (mmol _{H2} /L _{hidrolisado}) por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, pH inicial 6: (■) CAB-HE pH 6 sem suplementação; (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína.....	39
Figura 13 - Perfil da produção de hidrogênio por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h partindo-se de 1000 Kg de bagaço de caju, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, com pH inicial 6 e sem e com suplementação de L-cisteína.....	40

Figura 14 - Metabólitos produzidos por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, com o pH inicial 6: a) pH 6,0 sem L - cisteína, b) pH 6,0 com L – cisteína. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido lático.....	41
Figura 15 - Perfil da concentração celular (g/L) da bactéria <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 20 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, variando o pH inicial: a) pH inicial 6 e b) pH inicial 7. (■) CAB-HE sem suplementação e (●) CAB-HE suplementado com cisteína.....	42
Figura 16 - Perfil do consumo de glicose (g/L) da bactéria <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 20 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, variando o pH inicial a) pH inicial 6,0 e b) pH inicial 7,0 (■) CAB-HE sem suplementação e (●) CAB-HE suplementado com L-cisteína.....	43
Figura 17 - Perfil hidrogênio acumulativo (mmol _{H2} /L _{hidrolisado}) por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, variando pH inicial: (■) pH 6 sem L-cisteína; (●) pH 6 com L-cisteína; (▲) pH 7 sem L-cisteína; (▼) pH 7 com L-cisteína.....	44
Figura 18 - Perfil da produção de hidrogênio a partir de 1000 Kg de bagaço de caju hidrogênio por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L com pH inicial de 6,0 ou 7,0, sem e com a suplementação de L-cisteína.....	48
Figura 19- Metabólitos produzidos por <i>C. butyricum</i> nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, variando o pH inicial: a) pH 6,0 sem suplementação; b) pH 6,0 com L-cisteína; c) pH 7,0 sem suplementação; d) pH 7,0 com L-cisteína. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido lático.....	49
Figura 20 - Perfil da concentração celular (g/L) e do consumo de glicose (g/L) obtidos durante os bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, usando a bactéria <i>C. butyricum</i> e o hidrolisado CAB-HE (concentração inicial de glicose de 20 g/L e pH 7) a) perfil da concentração celular (g/L): (○) sem suplementação, suplementado com 1 g/L (●) ou 5 g/L (●)	

de glicerol. b) perfil do consumo de glicose (g/L): (□) sem suplementação, suplementado com 1 g/L (■) ou 5 g/L (■) de glicerol.....51

Figura 21 - Perfil de hidrogênio acumulativo (mmol_{H2}/L) por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, a pH 7: Perfil de hidrogênio acumulativo (mmol_{H2}/L): (▲) sem suplementação de glicerol (▲) 1 g/L de glicerol e (▲) 5 g/L de glicerol.....52

Figura 22 - Metabólitos produzidos por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, pH inicial 7:a) sem suplementação de glicerol b) Glicerol a 1 g/L; c) Glicerol 5 g/L. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido láctico.....53

Figura 23 - Perfil do pH e da produção acumulativa do hidrogênio (mol) durante o cultivo do *C butyricum* em hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE - concentração inicial de glicose de 20 g/L a pH 7) conduzido a 35 °C e 100 rpm por 72 h. Perfil de pH: (■) CAB-HE suplementado com 1 g/L glicerol e (■) CAB-HE suplementado com 5 g/L glicerol; Perfil de produção de H₂: (●) CAB-HE suplementado com 1 g/L glicerol e (●) CAB-HE suplementado com 5 g/L glicerol.....54

Figura 24 - Perfil da produção de hidrogênio a partir de 1000 Kg de bagaço de caju hidrogênio por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L a pH 7 sem adição de glicerol e suplementado com glicerol 1 g/L e glicerol 5 g/L.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	16
Tabela 2 - : Produção de hidrogênio a partir de vários carboidratos por cepas de <i>C. butyricum</i>	23
Tabela 3 - Componentes do meio de manutenção RCM.	28
Tabela 4 - Composição química do bagaço de caju <i>in natura</i> (CAB) e do bagaço pré-tratado com ácido (CAB - ácido) e com ácido seguido de álcali (CAB - ácido álcali).....	33
Tabela 5 - Resultados das análises das fases gasosas obtidos dos ensaios de produção de hidrogênio por <i>C. butyricum</i> a 35 °C e 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE), com concentração inicial de glicose (10 g/L) e pH (6,0 e 7,0), avaliando também a suplementação com L-cisteína.....	46
Tabela 6 – Resultados das análises das fases gasosas obtidos dos ensaios de produção de hidrogênio por <i>C. butyricum</i> a 35 °C e 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE), com concentração inicial de glicose (10 e 20 g/L) e pH (6,0 e 7,0), avaliando também a suplementação com L-cisteína.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivo específicos	12
3. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	13
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Matéria-prima – bagaço de caju (CAB).....	27
4.2 Pré-tratamento do bagaço de caju	27
4.3 Caracterização do bagaço de caju	27
4.4 Hidrólise enzimática do bagaço e caju	28
4.5 Microrganismo e condições de cultura	28
4.6 Bioprocesso para avaliar a produção de hidrogênio.....	29
4.7 Métodos analíticos.....	30
4.7.1 Análise do crescimento celular	30
4.7.2 Análise do consumo de glicose e metabólitos... ..	30
4.7.3 Análise da composição gasosa	31
4.8 Análises estatísticas.....	31
4.9 Representação do estudo do processo numa forma ilustrativa ..	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Composição química do bagaço de caju in natura e após pré-tratamentos	33
5.2 Curva de crescimento bactéria <i>Clostridium butyricum</i>	35
5.4 Produção de hidrogênio	36
5.4.1 - Avaliação da suplementação com L-cisteína	36
5.4.2 - Suplementação com glicerol na produção de hidrogênio	51
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis representam cerca de 80% da procura energética global e são em grande parte responsáveis pela intensificação dos gases de efeito estufa (GEEs) e pelas mudanças climáticas (Nortez *et al.*, 2024). Com o crescimento da população humana e a consequente demanda por energia, que até 2030 deverá aumentar em 50% (Shuba *et al.*, 2018), é preciso encontrar soluções energéticas limpas e eficientes. Fontes de energia renováveis, como a eólica, solar, hidroelétrica, geotérmica e bioenergia, são esperadas para atender a uma parcela substancial dessas necessidades (Ramprakash *et al.*, 2022).

Neste contexto, o hidrogênio (H_2) é um vetor energético sustentável importante para a transição energética e vem ganhando crescente interesse para obtenção de um combustível alternativo. A combustão direta de H_2 reduz a dependência de combustíveis fósseis e diminui os impactos ambientais, uma vez que não emite dióxido de carbono (CO_2) e outros gases poluentes (Lepage *et al.*, 2021). O gás H_2 pode ser empregado em diversas cadeias industriais, incluindo o refino de petróleo, produção de aço e fertilizantes, processamento de alimentos e transportes (Capurso *et al.*, 2020; Von Zuben *et al.*, 2022). Com uma capacidade energética 2,75 vezes maior que a do petróleo (Azevedo, 2017), o H_2 surge como uma alternativa atraente em meio ao cenário energético atual.

A produção de biohidrogênio (Bio- H_2) a partir de biomassa pode gerar emissões líquidas nulas, uma vez que a biomassa usa CO_2 para seu crescimento (Parkinson *et al.*, 2019). A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de Bio- H_2 é uma abordagem promissora para enfrentar os problemas energéticos. Biohidrogênio obtido de biomassa renovável de baixo custo e resíduos agrícolas lignocelulósicos contribui para a redução dos resíduos mal gerenciados que também causam emissões de GEEs decorrentes da sua decomposição, esses resíduos são altamente ricos em carboidratos e contribui para a produção de combustível limpo (Keskin *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2018).

Dentre os sistemas biológicos para produção de H_2 , encontram-se a biofotólise da água, fermentação escura, a fotofermentação e sistemas híbridos, que combinam diversas rotas biológicas (Azwar *et al.*, 2014). Amido e celulose são biopolímeros comumente encontrados em resíduos de biomassa (Vendruscolo, 2015). A produção de Bio- H_2 a partir dessas fontes complexas de carbono pode ser realizada pela combinação de processos escuros e de fotofermentação. Bactérias fermentativas escuras, como as dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter*, conseguem produzir H_2 a partir de polímeros de carboidratos, com CO_2 e ácidos graxos voláteis (AGVs) como principais subprodutos (Hallenbeck *et al.*, 2012; Ribeiro, 2022).

A utilização da biomassa lignocelulósica vem sendo avaliada para a produção de diferentes tipos de combustíveis renováveis, como o bioetanol (Correia *et al.*, 2022) e o BioH₂ (Silva *et al.*, 2018; Mabutyana; Pott, 2021).

Nesse cenário, o Nordeste brasileiro se destaca na produção de caju, fruta que gera um alto volume de resíduos de baixo valor comercial após o processamento, os quais podem ser utilizados como matéria-prima potencial para a produção de diversos bioprodutos através de processos biotecnológicos (Serpa *et al.*, 2021; Correia *et al.*, 2022; Girão neto *et al.*, 2023). Estudos têm demonstrado resultados promissores na obtenção de hidrogênio a partir do bagaço de caju (CAB) através do processo de fermentação escura (Silva *et al.*, 2018), no entanto a otimização das condições de produção de H₂ apresenta altos rendimentos, novas configurações precisam ser estudadas para viabilizar o uso de biomassa, auxiliando no processo de transição energética.

Diante desse contexto, o presente trabalho visa estudar a produção de hidrogênio por fermentação escura, utilizando a bactéria *C. butyricum* e o hidrolisado do bagaço de caju como matéria-prima, avaliando parâmetros como pH e suplementação com L-cisteína e glicerol. Este estudo não só reforça a viabilidade do bagaço de caju como uma importante matéria-prima para a produção de hidrogênio, mas também contribui para a sustentabilidade da cadeia produtiva do caju, transformando resíduos em soluções energéticas inovadoras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a produção de hidrogênio pela cepa *Clostridium butyricum*, via processo de fermentação escura, usando como fonte de carbono o hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB).

2.2 Objetivos específicos

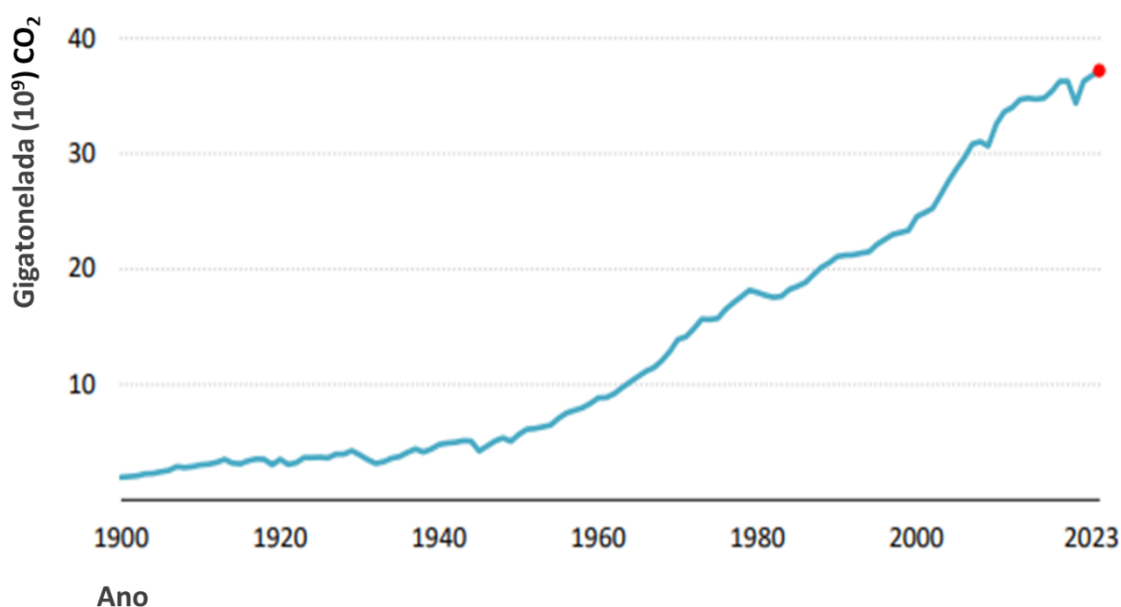
- Obter açúcares fermentáveis (glicose) por hidrólise enzimática do CAB;
- Verificar o efeito da concentração da fonte de carbono (glicose proveniente do hidrolisado enzimático do CAB) na produção de hidrogênio utilizando o microrganismo *C. butyricum*;
- Analisar o efeito do pH inicial do hidrolisado do CAB na produção de hidrogênio;
- Avaliar a influência da suplementação do hidrolisado com L- cisteína na produção de hidrogênio;
- Avaliar a influência da suplementação do hidrolisado com glicerol na produção de hidrogênio;
- Determinar a composição dos metabólitos produzidos durante as fermentações;
- Analisar o efeito dos metabólitos gerados no rendimento de hidrogênio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Transição energética ocasionada devido ao aquecimento global

De acordo com os dados da Agência Internacional de Energia (AIE), as emissões totais de CO₂ relacionadas à energia vêm aumentando de forma exponencial. De acordo com a Figura 1, no ano de 1970 houve um aumento exponencial das emissões globais de CO₂, representando cerca de 37,4 gigatoneladas (Gt CO₂) em 2023, incluindo as emissões de CO₂ de combustão de energia, processos industriais e queima. Distante de cumprir com as metas climáticas globais estabelecidas no Acordo de Paris de 2015, que visa diminuir as temperaturas médias globais "bem abaixo de 2 °C e buscar esforços para limitar o aumento da temperatura a 1,5 °C acima dos níveis pré-industriais" até o final do século (Fccc, 2015).

Figura 1- Emissões globais de CO₂ relacionadas com a energia e sua variação anual, 1900-2023

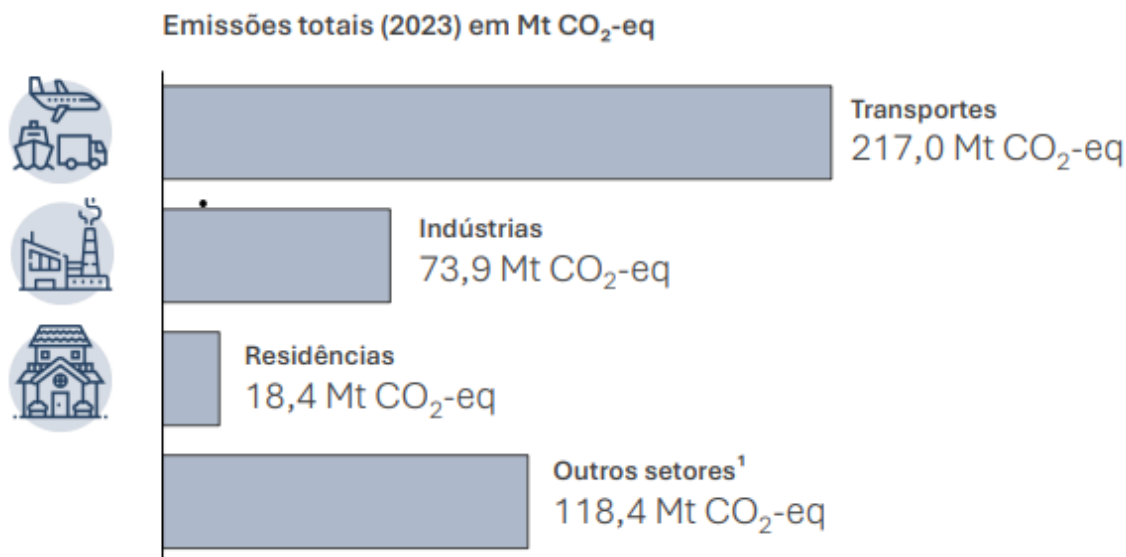


Fonte: Agência Internacional de Energia, (2023).

Em 2023, o total de emissões de CO₂ antrópicas associadas à matriz energética brasileira atingiram 427,8 milhões de toneladas de CO₂, equivalente a um aumento de 0,8% em relação a 2022 (Epe, 2024). De acordo com a Figura 2, foi gerado principalmente pelo setor de transportes (217 Mt CO₂-eq), seguindo das indústrias, residências, e por fim outros setores. Apesar do aumento das emissões de CO₂, elas foram inferiores ao aumento da Oferta Interna de

Energia (+3,6%), justificado na Figura 3 pela participação das fontes de energias renováveis (49,1%) na matriz energética brasileira (Resenha EPE, 2024).

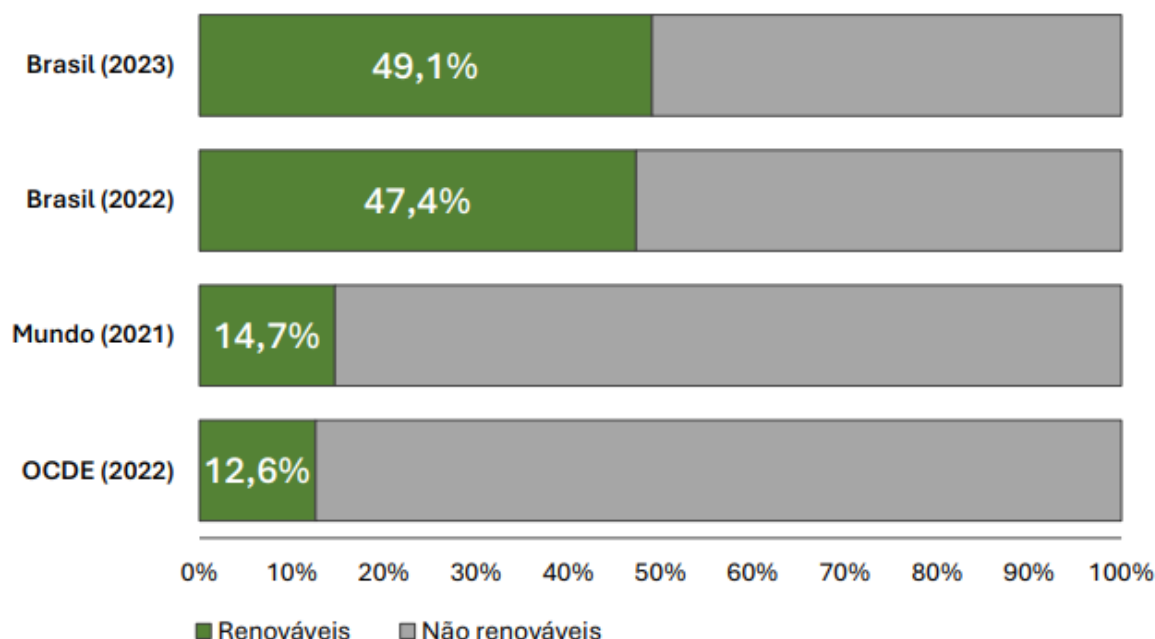
Figura 2 - Emissões totais de CO₂ associadas à matriz energética brasileira no ano de 2023



Fonte: Relatório síntese BEN (2024).

De acordo com a Figura 3 em 2022, a participação das fontes renováveis na oferta interna de energia brasileira representava 47,4% na demanda total, tendo então, uma diminuição na proporção da utilização de energia a partir de fontes não renováveis. De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE), do último relatório de síntese tendo como ano base 2023, dentre as energias renováveis destacam-se a biomassa de cana (16,9%), hidráulica (12,1%), lenha e carvão vegetal (8,6%), licor preto e outras renováveis (7,2 %), eólica (2,6%) e solar com (1,7%). Contudo, a maior parcela corresponde as não renováveis, com petróleo e derivados (35,1%), gás natural (9,6%), carvão mineral (4,4%), urânio (1,2%), e por fim outras não renováveis (0,6%) (Relatório síntese BEN, 2024).

Figura 3 - Participação das energias renováveis na oferta interna de energia



Fonte: BEN (2024).

Reduzir a dependência excessiva dos combustíveis fósseis e investir em fontes de energia sustentáveis é de grande importância para diminuição das mudanças climáticas. O H_2 é uma fonte de energia altamente eficaz, com potencial para substituir os combustíveis de origem fósseis, e desempenha um papel significativo na redução das emissões de gases de efeito estufa (GEEs). A produção do hidrogênio através de processos biológicos surge como uma alternativa promissora para a transição energética, devido às suas menores necessidades energéticas, aproveitando a vasta gama de fontes renováveis disponíveis (Umunawuike *et al.*, 2024).

3.2 Hidrogênio

O H_2 é usado como matéria-prima básica em diversos processos de indústrias como a metalúrgica, petroquímica, química, de manufatura, entre outras (Jin Zhong *et al.*, 2003). Este composto é considerado um portador de energia promissor para geração de energia limpa, que pode ser aplicado em diferentes campos, tais como os setores automotivos, elétrico e industrial, entre outros, nos quais os combustíveis fósseis são usados (Gubta *et al.*, 2008).

O H_2 é considerado o elemento químico mais simples e abundante do planeta, contendo cerca de 90% de todos os átomos (Paiva, 2022). Entretanto, existe muito pouco H_2 livre na Terra, podendo ser encontrado em combinação com outros elementos, tais como oxigênio, nitrogênio e carbono. Na Tabela 1 observar-se que dentre as características do gás H_2 ,

destaca-se a sua capacidade calorífica (141,86 KJ/g), superior a qualquer outro combustível. A quantidade de energia liberada durante a reação do H₂ é cerca de 2,5 vezes do poder de combustão de um hidrocarboneto, metano, propano, gasolina, dentre outros (Santos;Santos, 2005).

Tabela 1 - Poder calorífico de diferentes combustíveis.

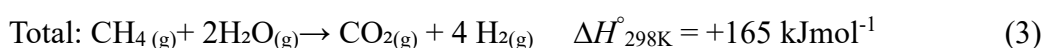
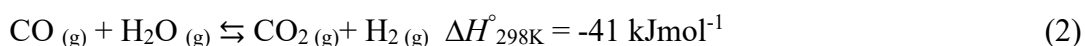
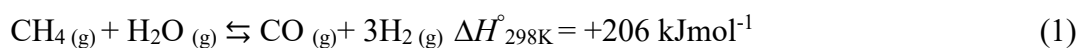
Combustível	Valor do Poder Calorífico Superior a 25 °C e 1 atm (kJ/g)	Valor do Poder Calorífico Inferior a 25 °C e 1 atm (kJ/g)
Hidrogênio	141,86	119,93
Metano	55,53	50,02
Propano	50,36	45,60
Gasolina	47,50	44,50
Gasóleo	44,80	42,59
Metanol	19,96	18,05

Fonte: adaptado de Santos; Santos (2005).

As tecnologias de produção de H₂ necessitam de energia de alguma forma, seja de calor, luz ou eletricidade. Os métodos de produção estão divididos entre processos físico-químicos e biológicos (Wang *et al*, 2013).

3.2.1 Reforma a vapor do metano

A reforma a vapor do metano é o processo industrial mais utilizado, responsável por cerca de 70% da produção mundial, usando o gás natural como insumo (IEA, 2019). Esse processo pode ser representado de forma geral por duas reações químicas (Equações 1 e 2), sendo a equação global apresentada na Equação 3.



A reação para produção de H₂ via reforma a vapor dos hidrocarbonetos (metano) é caracterizada como uma reação endotérmica, necessitando de uma grande quantidade de energia, sendo aplicadas elevadas temperaturas, em torno de 800 a 1000 °C, sob pressão entre 3-25 bar (Paiva, 2022). De acordo com as Equações (1-3), o metano (CH_{4(g)}) reage com o vapor de água, obtendo monóxido de carbono (CO_(g)) e o hidrogênio (H_{2(g)}), em seguida o CO_(g) reage

com a água convertendo em gás carbônico ($\text{CO}_{2(g)}$) e $\text{H}_{2(g)}$. Neste processo há a formação significativa de CO_2 (para cada quilograma de hidrogênio produzido por esse método é gerado 9 Kg de gás carbônico) (Filho, 2022).

3.2.2 Gaseificação do carvão

Outro método bastante usado é a gaseificação do carvão, onde durante o processo o carvão reage com o vapor de água em temperatura superior a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, gerando o CO e H_2 (Equação 4). Em seguida, o CO_2 produzido reage com o vapor de água para produzir mais hidrogênio (AMIN et al., 2022) (Equação 5).



3.2.3 Eletrólise da água

A produção de hidrogênio por eletrólise da água, utiliza eletricidade para quebrar a molécula de água em átomos de hidrogênio e oxigênio, por meio da passagem de uma corrente elétrica (Gomes Neto, 2021) (Equação 6).



Apesar de a eletrólise da água para produção de H_2 ser vista como uma forma limpa, por não emitir CO_2 durante o processo, ela ainda demanda um consumo significativo de energia. No entanto, espera-se que, com investimentos substanciais em fontes renováveis ao longo dos anos, esses custos de produção possam ser reduzidos (Paiva, 2022).

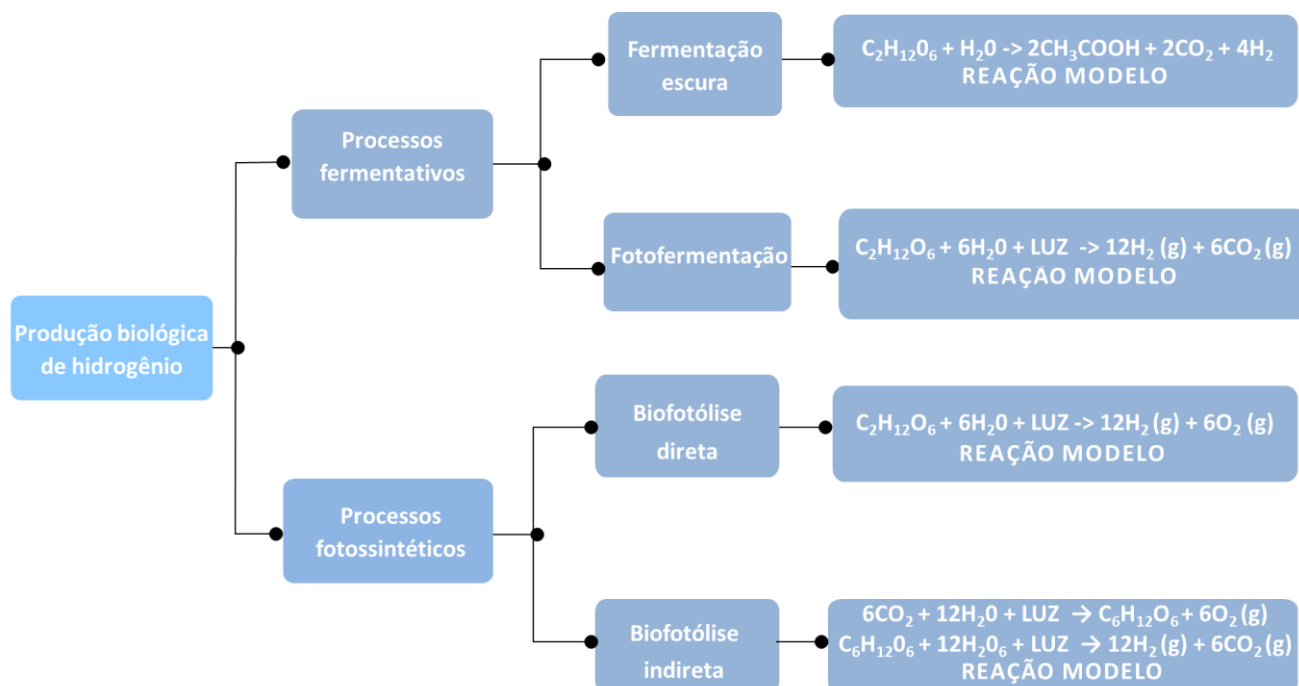
A sustentabilidade do processo para obtenção desse combustível precisa ser verificada, pois para que o hidrogênio seja produzido em larga escala e de forma renovável, reduzindo o uso dos combustíveis fósseis, é necessário avaliar o custo energético dessa alternativa. Uma possível solução para essa questão é a produção do H_2 por meio de processos biológicos, tais como, fermentação no escuro, fotofermentação, biofotólise direta e indireta (Matos, 2024; García, 2016).

3.3 Rotas de produção de hidrogênio por via biológica

A produção de H_2 por via biológica é dividida em quatro tipos de processo, conforme ilustrado na Figura 4. A produção pode ser otimizada por meio da integração entre

dois ou mais processos biológicos, obtendo um aumento significativo no rendimento de BioH₂ (Vasconcelos de Sá; Cammarota; Ferreira-Leitão, 2014).

Figura 4 - Modelo de reações dos principais processos de produção biológica de H₂



Fonte: adaptado de García (2016).

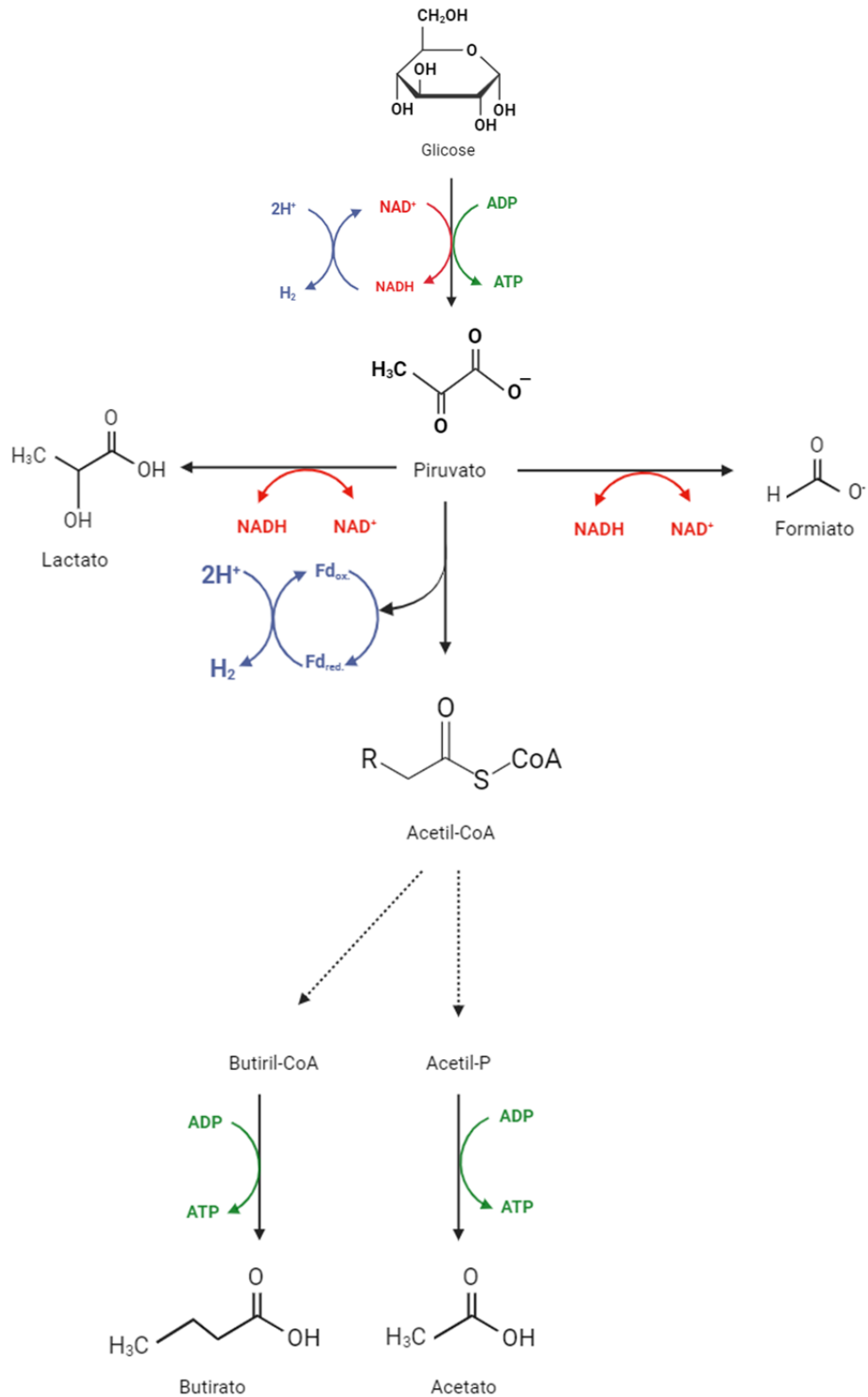
Os processos de fermentação escura e fotofermentação têm se destacado devido às elevadas taxas de produção de hidrogênio, a possibilidade de utilizar ampla gama de matéria orgânica como substrato, junto à economia de energia e ao excelente desempenho em termos de sustentabilidade (Kumar; Kumar; Pal, 2020; Xu; Zhou; Yu, 2022).

3.3.1 Fermentação anaeróbia ou fermentação escura

A fermentação escura é o processo no qual ocorre a degradação da matéria orgânica rica em carboidratos, na ausência de luz, por microrganismos anaeróbicos estritos ou facultativos, para a produção de H₂ e CO₂ além de subprodutos como, por exemplo, ácidos orgânicos e álcoois (Amorim, 2007; Sa *et al.* 2014; Barbosa, 2020). Esse método de produção apresenta algumas vantagens para a indústria, sendo um processo mais rápido comparado com a biofotólise e a fotofermentação, produção contínua sem a necessidade de luz, e a facilidade das bactérias fermentativas se reproduzirem obtendo um maior rendimento de H₂ (Fonseca, 2018). Nesse processo é possível utilizar diferentes tipos de resíduos como substratos, seja de

natureza lignocelulósica, resíduos alimentícios ou lácteos (Wang, Wan, 2009). Na Figura 5 é apresentada a rota metabólica por fermentação escura, tendo como substrato a glicose.

Figura 5 - Rota metabólica por fermentação escura

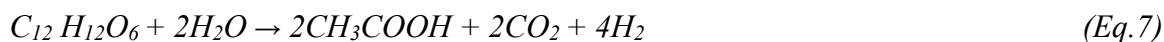


Fonte: Elaborada pela autora (2024).

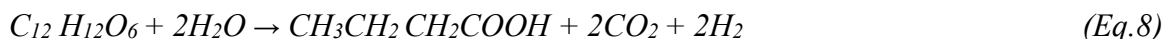
As vias metabólicas para a produção biológica de H_2 por fermentação escura são baseadas no catabolismo dos carboidratos. A glicose é decomposta em piruvato através da via glicolítica, oxidando-os, gerando energia livre usada para produzir ATP, e elétrons, que são usados para formar produtos reduzidos (Hallenbeck, 2005; Hallenbeck, 2011). A quebra da glicose gera como metabólicos o lactato, formiato, acetato e butirato.

O rendimento teórico máximo de H_2 por mol de glicose consumida é 4 mol, tendo como acetato o metabólico final da fermentação (Abo-hashesh, Hallenbeck, 2012). A produção de acetato gera ATP, como é demonstrado na Figura 5 na cor verde, favorecendo a produção de hidrogênio. No entanto, a formação de lactato, formiato e etanol consome NADH, reduzindo o rendimento para 2 mol de hidrogênio por mol de glicose consumida durante a fermentação anaeróbica (Abo-hashesh, Hallenbeck, 2012). Quando a fermentação no escuro é conduzida por microrganismos do gênero *Clostridium*, com ácido acético como produto final, é obtido 4 mol de H_2 porque não acontece nenhum consumo de NADH, e 2 mol de hidrogênio quando o ácido butírico é o produto final. As Equações 7 e 8 representam as equações da reação global para as duas situações reportadas (Yuan *et al.*, 2008).

Via do ácido acético:



Via do ácido butírico:

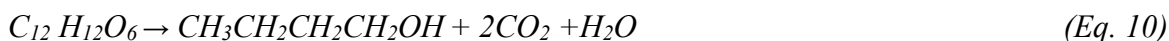


A via do etanol e do butanol (Equações 9 e 10, respectivamente) não produzem hidrogênio. No entanto, na via do ácido propiônico (Equação 11), há um consumo de H_2 para sua obtenção (Wang e Yin, 2021). O rendimento teórico dificilmente vai alcançar os 33% (4 mol H_2 /mol $_{glicose}$) do rendimento máximo de H_2 (12 mol H_2 /mol $_{glicose}$) (Woodward *et al.*, 2000), porque durante o processo o rendimento pode ser afetado pelas condições operacionais, tais como a mudança de pH e o aumento da pressão parcial de H_2 no meio fermentativo (Levin *et al.*, 2004).

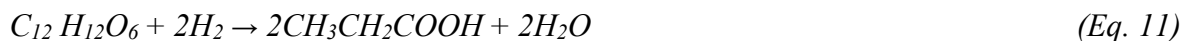
Via do etanol:



Via do butanol:



Via do ácido propiônico:



Para obtenção do maior rendimento de H₂ na fermentação, a produção de ácido butírico e acético estão associadas, enquanto para um rendimento menor de H₂ estão relacionadas à formação de ácido lático e outros solventes (Cai *et al.*, 2010).

3.3.2 *Microrganismos produtores de hidrogênio*

Os rendimentos de H₂ também são influenciados pelo tipo de microrganismo utilizado, podendo ser do tipo de culturas puras ou mistas. As culturas puras compostas por um único microrganismo destacam-se por apresentarem um metabolismo conhecido, sendo fácil de manipulá-lo e controlar as condições de cultivo favoráveis para obter um maior rendimento de H₂ (Ntaikou *et al.*, 2010).

Na literatura são reportados muitos estudos de microrganismos produtores de H₂, usando diversos tipos de substratos via processo fermentativo, dentre eles destacam-se as bactérias do gênero *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Ethanoligenens* (Fonseca, 2016). *Clostridium* é altamente estudada por ser um dos microrganismos mais eficazes na produção de H₂, obtido a partir da oxidação da matéria orgânica, gerando um excesso de elétrons que é dissipado durante o processo da fermentação, causando um equilíbrio redox intracelular (Sinha, Pandey, 2011).

Os microrganismos do gênero *Clostridium* podem ser encontrados no solo, no intestino de animais e na água. Eles apresentam forma de bastões e a grande maioria são cepas gram-positivas e estritamente anaeróbicas, podendo ser do tipo mesofílicas ou termofílicas (Wang, Yin, 2021). Dentre as espécies desse gênero, a *Clostridium butyricum* é uma grande produtora de H₂, alcançando rendimento de até 3,0 mol de H₂, tendo o glicerol como substrato (Kivistö *et al.*, 2013). Essa espécie também é capaz de degradar diferentes biomassas lignocelulósicas, tais como bagaço de cana, palha de arroz, casca de jathofa (Jiang *et al.*, 2016; Lo *et al.*, 2010).

Além dos carboidratos que normalmente são utilizados para a produção de hidrogênio, tais como glicose, xilose, sacarose, entre outros. O gênero *Clostridium* é capaz de degradar compostos orgânicos complexos, diferentes tipos de biomassa e resíduos orgânicos, incluindo frutose, xilose, lactose, maltose, glicerol, celulose e amido (Wang, Yin, 2021). A Tabela 2 apresenta alguns carboidratos utilizados para produção de hidrogênio e os respectivos rendimentos obtidos de H₂.

Tabela 2 - Produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos por cepas de *C. butyricum*

Substrato	Condição operacional	Modo de operação	Volume reacional	Rendimento de H ₂	Referências
Bagaço de cana	35 °C, mantido em pH 6,5	Contínuo	1 L	2,1 mol/mol de açúcar	Jiang <i>et al</i> , 2016
Biomassa do sagu	37 °C, inicial pH 6,0	Batelada	100 mL	2,23 mol/mol de glicose	Jenol <i>et al</i> , 2014
Caldo de cana	30 °C, inicial pH 6,5	Batelada	70 mL	1,0-1,3 mol/mol de hexose	Pattra <i>et al</i> , 2011; Plangklang <i>et al</i> , 2012
Casca de jatropa	35 °C, mantido em pH 6,5	Contínuo	1 L	1,95 mol/mol de açúcar	Jiang <i>et al</i> , 2016
Efluente de fábrica de óleo de palma	36 °C, inicial pH 6,05	Batelada	100 mL	298 mL/g carboidrato	Chong <i>et al</i> , 2009
Glicerol	37 °C, inicial pH 7,4	Batelada	170 mL	3,0 mol/mol de glicerol	Kivistö <i>et al.</i> , 2013
Microalgas	37 °C, mantido em pH 5,5	Batelada	20 mL	1,15 mol/mol de açúcar	Liu <i>et al</i> , 2012
Microalgas	35 °C, mantido em pH 6,8	Batelada	500 mL	2,59 mol/mol de açúcar	Ortigueira <i>et al</i> , 2015
Palha de arroz	37 °C, mantido em pH 7,5	Batelada	100 mL	0,76 mol/mol de xilose	Lo <i>et al</i> , 2010
Resíduo de alimentos	37 °C, mantido em pH 5,5	Batelada	500 mL	234,6 mL/g de açúcar	Ortigueira <i>et al</i> , 2019

Fonte: adaptado de Yang, Yin, (2021).

3.3.3 Fatores que influenciam a produção de hidrogênio

No processo fermentativo, diversos fatores podem influenciar no rendimento do H₂, seja o tipo do inóculo, a concentração do substrato, o pH do meio, a temperatura (García, 2016). Com o controle desses fatores, a produção do H₂ pode ser melhorada significativamente a partir do estudo desses parâmetros.

O pH do meio fermentativo é relatado como um dos principais fatores sobre o processo de obtenção do H₂ via fermentação escura, dependendo da sua faixa, o metabolismo dos microrganismos é afetado. Valores de pH inferiores a 4,5 reduzem o potencial de produção de H₂, por causar estresse ácido, e esse aumento de estresse nos microrganismos ocasiona mecanismo de defesa visando manter o número de prótons H⁺, no meio intra e extracelular, ocasionando favorecimento de vários metabólitos da célula (Chong *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014).

Outro fator com destaque é a adição de macro e micronutrientes no meio fermentativo, sendo relevância para o desenvolvimento dos microrganismos, pois participam dos processos metabólicos das células, no crescimento celular, como cofatores de enzimas. Entre os nutrientes, destacam-se nitrogênio, ferro, magnésio, fósforo e sódio (Ghimire *et al.*, 2015). Além da suplementação com macro e micronutrientes, as bactérias estritamente anaeróbias necessitam da suplementação do meio de agentes redutores, para evitar a inibição em presença de oxigênio, dentre os agentes redutores a adição de L-cisteína pode ser usada neste processo (Romão, 2015).

3.4 Substratos utilizados para produção de H₂

Carboidratos, proteínas e lipídios podem ser utilizados para a produção de H₂ pela via biológica. Segundo Guo e colaboradores (2010), entre estes materiais, os carboidratos apresentam a fonte preferida de carbono para o processo fermentativo como, por exemplo, glicose e sacarose por serem facilmente biodegradáveis. Porém, fontes puras de sacarídeos para essa produção representam um alto custo em escala industrial, sendo um dos principais critérios avaliados, além da sua biodegradabilidade e disponibilidade (Ntaikou *et al.*, 2010; Das, Veziroglu, 2008).

Nesse contexto, os resíduos agroindustriais se destacam como potenciais substratos para produção de BioH₂. Os principais resíduos avaliados são biomassas lignocelulósicas, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Rocha *et al.*, 2009). O

aproveitamento dessa biomassa é considerado bastante promissor na questão ambiental e econômica, gerando uma energia renovável, na recuperação de recursos e gestão de resíduos.

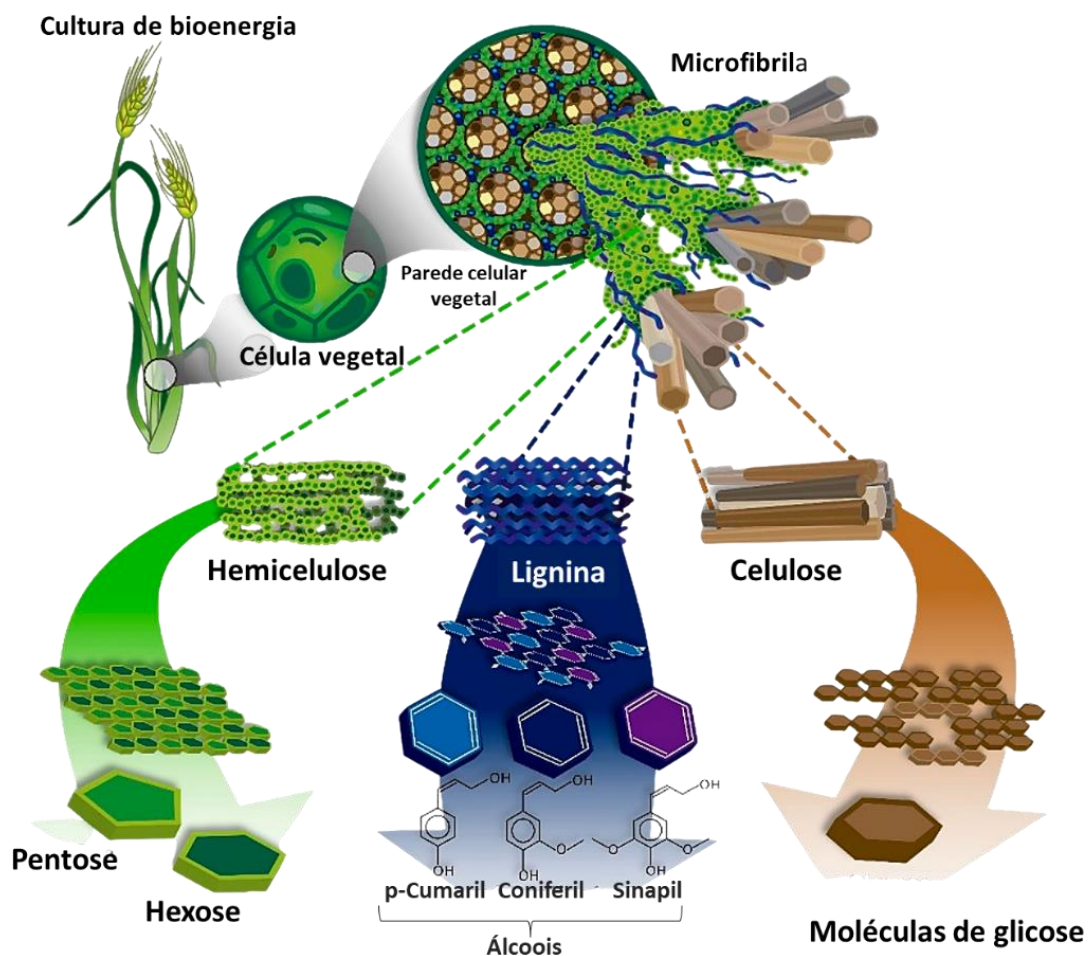
3.4.1 *Biomassa lignocelulósica*

A biomassa lignocelulósica é uma matéria orgânica derivada de plantas, sendo resultado do processo de fotossíntese, onde a energia solar é capturada e armazenada em ligações químicas (Singh *et al.*, 2022). Essa biomassa é considerada uma matéria-prima versátil, que pode ser usada em diversos processos biotecnológicos capazes de gerar vários produtos de valor agregado, como por exemplo biocombustíveis, biomoléculas e bioenergia (Marques, 2023). De acordo com a Figura 6, essa biomassa é constituída principalmente por três tipos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (Fengel; Wegener, 1984). Por meio do processo de hidrólise, os polímeros celulose e hemicelulose podem ser usados nos processos fermentescíveis (Marques; Rocha, 2021). A celulose é o principal componente da estrutura da célula vegetal, representando cerca de 35-50% em massa (Aristidou; Penttilä, 2000). A celulose é um homopolímero constituído por unidade de D-pirano glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, que compõe as regiões cristalinas e amorfas no arranjo celular, sendo responsável por conferir rigidez e estabilidade a planta (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019).

A hemicelulose representa aproximadamente de 20-35% da composição e é um biopolímero composto por açúcares de cinco a seis carbonos, tendo como subunidades D-xilose, manose, L-arabinose, galactose e ácido glicurônico (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019). Esse heteropolímero é facilmente degradável em monossacarídeos e, portanto, é comumente usado em fins industriais, como no revestimento no setor de medicamentos (Singh *et al.*, 2022).

A lignina é responsável pela rigidez e hidrofobicidade das plantas, constitui cerca de 15-40% da célula vegetal e apresenta uma estrutura formada por polímero heterogêneo tridimensional e amorfos (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019).

Figura 6 - Estrutura da biomassa lignocelulósica e seus principais componentes; celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: adaptado de Hernández-Beltrán *et al.* (2019).

3.4.2 Caju

O cajueiro tem como nome científico *Anacardium occidentale L.*, pertencendo, desta maneira, a família das *Anacardiaceae*. O fruto proveniente do cajueiro corresponde a parte mais dura, conhecida como a castanha de caju e para ser consumida deve ser assada para conseguir retirar a casca. O pseudofruto, que representa a parte carnosa, representa 90% do caju e é considerado um produto rico tanto em vitaminas quanto em sais minerais (Rocha *et al.*, 2009).

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de castanha do caju. Segundo dados divulgados pelo Instituto de Geografia e Estatística (IBGE), em 2023 a safra do caju teve um total de 127.931 Toneladas produzida. Os estados com maior produção de castanha estão localizados no Nordeste, Ceará ocupando o primeiro lugar, Piauí em segundo e Rio Grande do Norte em terceiro (IBGE, 2024).

A cajucultura do Nordeste possui importância significativa na geração de emprego e renda, bem como na oferta variada de uma gama de produtos alimentícios. Contudo, na indústria, o bagaço de caju não é devidamente aproveitado, gerando assim uma elevada quantidade de resíduo orgânico.

Após a retirada do suco, tem-se que 40% (m/m) do pedúnculo corresponde ao bagaço, um subproduto da indústria que apresenta baixo valor significativo e desta forma acaba sendo descartado pela indústria, muitas vezes de forma inadequada (Rocha *et al.*, 2011). Dentre os diversos tipos de materiais lignocelulósicos, o bagaço de caju (CAB) vem destacando-se para a produção de etanol, adoçantes, ácidos, biocatalisadores, ésteres terpênicos e biocombustíveis (Silva *et al.*, 2018; Serpa *et al.*, 2021; Correia *et al.*, 2022; Girão Neto *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2024).

Desta forma, é de grande importância estudos voltados para a produção de BioH₂, visto a necessidade de combustíveis renováveis para a melhoria da qualidade do meio ambiente e redução das mudanças climáticas. Silva e colaboradores (2018) observaram o uso promissor do CAB para produção de H₂. Neste contexto, no presente estudo foi avaliada a produção de BioH₂ utilizando o hidrolisado enzimático do CAB como substrato para fermentação por *C. butyricum*, avaliando diferentes o efeito do pH e suplementações com bioativos celulares, visando aumentar o rendimento de produção. A parte experimental empregada neste estudo é apresentada no próximo capítulo.

4 METODOLOGIA

4.1 Matéria-prima – bagaço de caju (CAB)

O CAB foi adquirido da Cooperativa Agroindustrial do Caju do Ceará - Brasil. Para utilização, o CAB foi lavado com água e seco em estufa Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 60 °C por 24 h. Posteriormente, o CAB foi triturado e peneirado para padronizar o tamanho da partícula entre 0,177-0,841 mm. Após essas etapas, o material padronizado foi armazenado a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

4.2 Pré-tratamento do bagaço de caju

O CAB foi pré-tratado de acordo com as melhores condições obtidas nos estudos realizados por Rocha e colaboradores (Rocha *et al.*, 2011). O pré-tratamento ácido foi realizado utilizando ácido sulfúrico diluído a 0,6 mol/L e 20% (m/v) de CAB em autoclave a 121 °C por 30 min. Depois, a fração sólida, denominada CAB-H, foi prensada para extrair a fração líquida e lavada com água destilada. Em seguida, a fração sólida foi tratada com hidróxido de sódio (1 mol/L NaOH) a 121 °C por 30 min e usando uma carga de sólido de 20% (m/v) CAB-H. Após isso, a fração sólida foi lavada até atingir neutralidade, seca em estufa a 60 °C por 24 h, triturada e padronizada com tamanho de partícula compreendido entre 0,25-0,84 mm. O sólido resultante deste pré-tratamento foi denominado CAB-OH e foi utilizado na hidrólise enzimática.

4.3 Caracterização da biomassa

A caracterização do CAB *in natura*, CAB pré-tratado com ácido (CAB-H) e pré-tratado por ácido seguido de álcali (CAB-OH), foram realizadas de acordo com os protocolos desenvolvidos por NREL, a fim de quantificar celulose, hemicelulose e lignina (TP-510- 42618) (SLUITER *et al.*, 2012), assim como determinar os sólidos totais extraíveis e cinzas (TP-510-42619) (SLUITER *et al.*, 2008) e NREL (TP-510-4262) (SLUITER *et al.*, 2008).

A biomassa *in natura*, e a biomassa obtida a cada etapa de pré-tratamento também foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), sendo as análises realizadas em um espectrômetro Cary 630 da marca Agilent Technologies. Os espectros de transmitância foram coletados no comprimento de onda na faixa de 650-4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 1 cm^{-1} e 32 scans.

4.4 Hidrólise enzimática do bagaço de caju

A hidrólise enzimática do CAB pré-tratado por (CAB-OH) foi realizada de acordo com a metodologia de Meyabadi *et al.* (2014), com algumas modificações.

A hidrólise enzimática do CAB-OH foi realizada em tampão citrato de sódio 100 mM (pH = 4,8) a 45 °C e 150 rpm por 72 h utilizando 8% (m/v) CAB-OH e a enzima celulolítica comercial de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma Aldrich, Brasil) com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{celulose} β -glicosidade NS 50010 (Novozymes, Paraná) com carga enzimática de 30 FPU/g_{celulose}. Finalizada a hidrólise, o material foi aquecido a 100 °C por 10 min, visando a desnaturação da enzima e centrifugado a 5.000 rpm por 20 min a 4 °C. A fração líquida foi denominada hidrolisado enzimático de bagaço de caju (CAB-HE), filtrada e ajustada para pH 7.0 para utilização como meio de cultura.

4.5 Microrganismo e condições de cultura

O microrganismo utilizado neste estudo foi a bactéria *C. butyricum*, adquirida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia – André Tosello. Para a preparação do inóculo, as células foram cultivadas em um meio sintético RCM (*Reinforced Clostridial Medium*), apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes do meio RCM

Reagente	Concentração (g/L)
Acetato de sódio	3,0
Ágar (na produção do meio sólido)	0,5
Amido solúvel	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Cloridrato de L-cisteína	0,5
Extrato de carne	10,0
Extrato de levedura	3,0
Glicose	5,0
Peptona	10,0

Fonte: Gibbs, B.M. and Freame, B. (1965).

O meio de cultivo foi preparado dissolvendo-se os reagentes em água destilada, sendo o pH ajustado para $6,8 \pm 2$, com hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de 5

mol/L ou ácido clorídrico (HCl) 6 mol/L. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min, o inóculo foi preparado transferido três alças de microrganismo para o frasco contendo 100 mL do meio de cultura RCM líquido, a 35 °C sob forte restrição de luz, por 16 h.

Posteriormente, o microrganismo foi transferido para tubos criogênicos de 1 mL contendo 80% de inóculo e 20% de glicerina (glicerol) P.A. (v/v) e armazenados sob refrigeração (- 20 °C).

Para reativação da *C. butyricum*, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um frasco contendo 100 mL do meio de cultura RCM líquido, a 35 °C sob forte restrição de luz, por 16 h. Em seguida, foi medida a absorbância ($\lambda = 600$ nm), em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S22), e a concentração celular determinada a partir da curva padrão em base de massa seca.

4.6 Bioprocessos para avaliar a produção de hidrogênio

A fermentação no escuro do CAB-HE por *C. butyricum* foi realizada em reator batelada de 250 mL (Marca Schott Duran®), usando um volume operacional de 200 mL. A concentração inicial de glicose do CAB-HE foi de 68 g/L de glicose, sendo diluída para 10 ± 2 g/L e 20 ± 2 g/L de glicose para os bioprocessos, e o pH inicial foi ajustado para 6,0 e 7,0. Inicialmente, foi avaliado a influência concentração inicial de glicose (10 e 20 g/L) e investigada a suplementação do CAB-HE com L-cisteína (0,16 g/L) a pH inicial 6,0 e 7,0. Posteriormente, foi avaliada a suplementação do CAB-HE com glicerol (1 g/L e 5 g/L) a pH 7,0. O hidrolisado CAB-HE foi inoculado com 10% v/v de inóculo com concentração celular de 0,5 g/L. As condições anaeróbicas foram criadas a partir da purga do gás nitrogênio, filtrado por membranas, com uma vazão de 0,5 L/min por 5 min em cada frasco. Os sistemas foram mantidos em agitação constante de 100 rpm a 35 °C por 72 h.

O gás produzido foi coletado em recipiente apropriado, sob nome comercial de *Folha multilaminada inerte Supel™*, de volume de 1 L, com o volume gasoso sendo mensurado em seringa e analisado por cromatografia gasosa (CG). Também, em horários pré-definidos, alíquotas líquidas foram retiradas e analisadas para determinar a concentração celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. O sobrenadante coletado foi filtrado com filtros de 0,2 μ m e a partir dele realizou-se a quantificação de ácidos orgânicos, etanol e glicose via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito no tópico 4.7.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Análise do crescimento celular

Para se determinar o crescimento celular microbiano, utilizou-se a turbidez por densidade ótica determinada no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S22). A concentração celular em base mássica foi determinada por uma curva de calibração em função da concentração celular e da densidade ótica.

Para a realização da curva da *C. butyricum*, foi realizado seu cultivo em frascos Erlenmeyer contendo o meio líquido sintético RCM, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 15 min, em agitador orbital a 35 °C e 100 rpm por 24 h. Após o cultivo, centrifugou-se os meios de cultura a 3500 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 20 mL de água ao pellet de células, sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Em seguida, centrifugou-se novamente nas mesmas condições e em seguida lavado, com este processo repetido duas vezes para remover todo resquício de meio de cultura presente nas células.

Posteriormente, retirou-se 5 mL da solução concentrada de células e adicionou-se em cadinhos previamente tarados e incubou-se em estufa Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 90 °C durante 24 h. O experimento foi realizado em triplicata. Com essa massa seca obtida, determinou-se a concentração da suspensão. Por fim, realizou-se diluições a partir da suspensão de células, as quais tiveram sua absorbância medida, para elaborar um gráfico determinando-se a relação entre a massa seca (g/L) e a absorbância a 600 nm. A concentração celular foi acompanhada ao longo das fermentações utilizando a curva padrão realizada.

4.7.2 Análise do consumo de glicose e metabólitos

As amostras líquidas foram analisadas para determinar o consumo de glicose e a formação metabólica utilizando um sistema WatersTM equipado com um detector de índice de refração e com uma coluna Aminex® HPX-87H, de 300 mm x 7,8 mm (Bio-Rad, Califórnia, USA). Uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5 mM preparada com Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizada como fase móvel com vazão de 0,5 mL/min. O volume de injeção das amostras foi padronizado em 20 µL e o tempo de retenção dos compostos foram determinados usando compostos padrões.

4.7.3 Análise da composição gasosa

A composição da fração gasosa foi determinada por cromatografia gasosa (CG) utilizando um sistema Shimadzu, modelo GC-2010 ProAF, com detector de condutividade térmica. As análises foram realizadas na coluna capilar Carboxen 1010, com comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,53 milímetros. Durante as análises, as temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram mantidas em 200 °C, 30 °C e 230 °C, respectivamente. Argônio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 6 mL/min. Os valores obtidos de H₂ foram quantificados com auxílio utilizando uma curva de calibração. O tempo de retenção do H₂ foi 4 min.

O rendimento em mol de H₂ por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação (12).

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{mol H}_2}{\text{mol de substrato consumido}} \quad (12)$$

A produtividade em mol de hidrogênio foi calculada conforme a Equação (13).

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{mol H}_2}{\text{volume reacional} \cdot \text{tempo de fermentação}} \quad (13)$$

O cálculo da produção volumétrica, em relação ao hidrogênio produzido por volume reacional, foi calculado utilizando-se a Equação (14).

$$\text{Produção volumétrica} = \frac{\text{mL H}_2}{\text{volume reacional}} \quad (14)$$

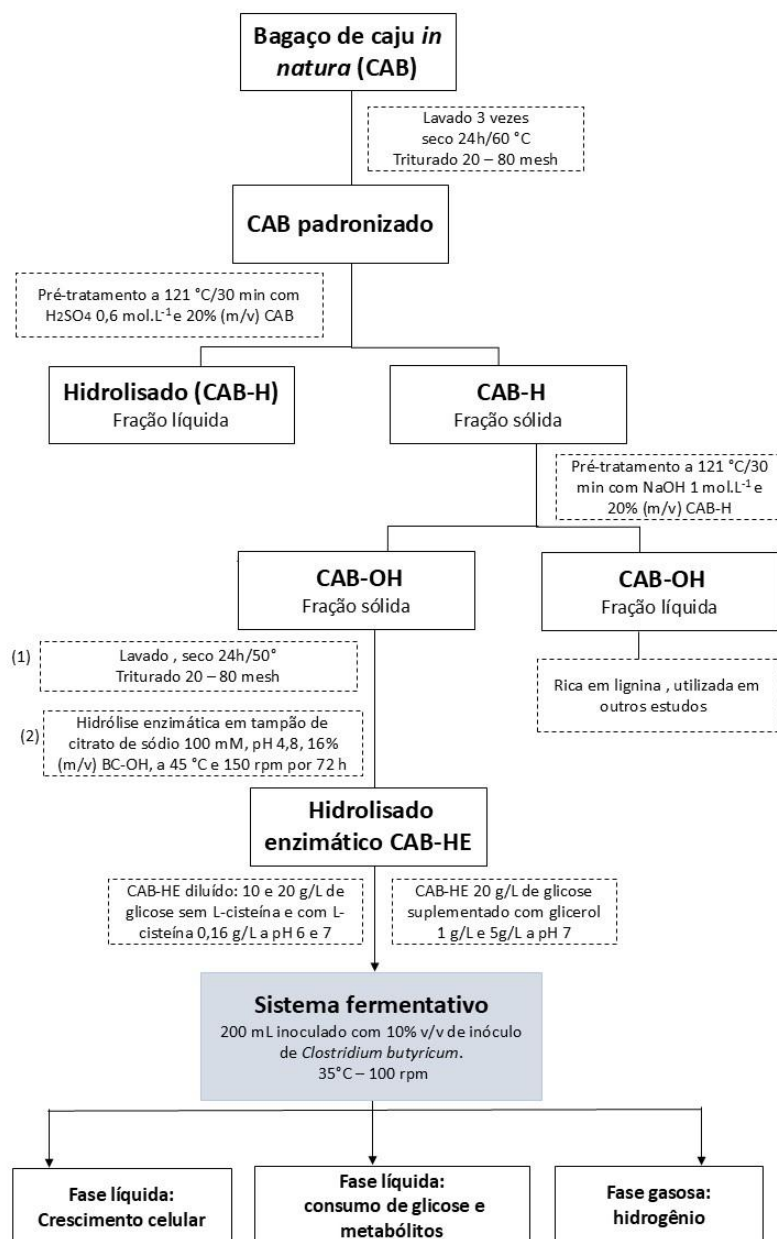
4.8 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de *Tukey*, com intervalos mínimos de diferença de significância julgados de acordo com o valor de p, determinado em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Testes de *Tukey* foram utilizados para avaliar o rendimento em mol de hidrogênio por mol de glicose consumida, o mL e % de hidrogênio produzido, com nível de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Microcal Origin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA).

4.9 Representação do estudo do processo numa forma ilustrativa

A Figura 7 ilustra o fluxograma de todo o processo realizado em etapas, desde a padronização da biomassa até o momento da obtenção do BioH₂ e metabólitos, produzidos durante o processo fermentativo.

Figura 7 – Fluxograma do processo de produção de H₂ e metabólitos a partir do bagaço de caju



Fonte: Própria autora (2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química do bagaço de caju *in natura* e após pré-tratamentos

As composições centesimais do CAB *in natura*, CAB pré-tratado com ácido (CAB-H) e pré-tratado por ácido seguido de álcali (CAB-OH), para maior disponibilização de celulose e remoção da lignina, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química do bagaço de caju *in natura* (CAB) e do bagaço pré-tratado com ácido (CAB-H) e com ácido seguido de álcali (CAB-OH)

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extraíveis (%)	Cinzas (%)
CAB	27,0 ± 1,2	16,4 ± 1,8	42,1 ± 0,3	8,0 ± 0,2	4,2 ± 2,4
CAB – H	33,2 ± 4,7	10,5 ± 0,2	74,4 ± 7,0	15,3 ± 0,1	3,7 ± 0,6
CAB – OH	53,4 ± 8,4	12,8 ± 0,6	6,4 ± 0,3	3,5 ± 0,0	1,1 ± 0,2

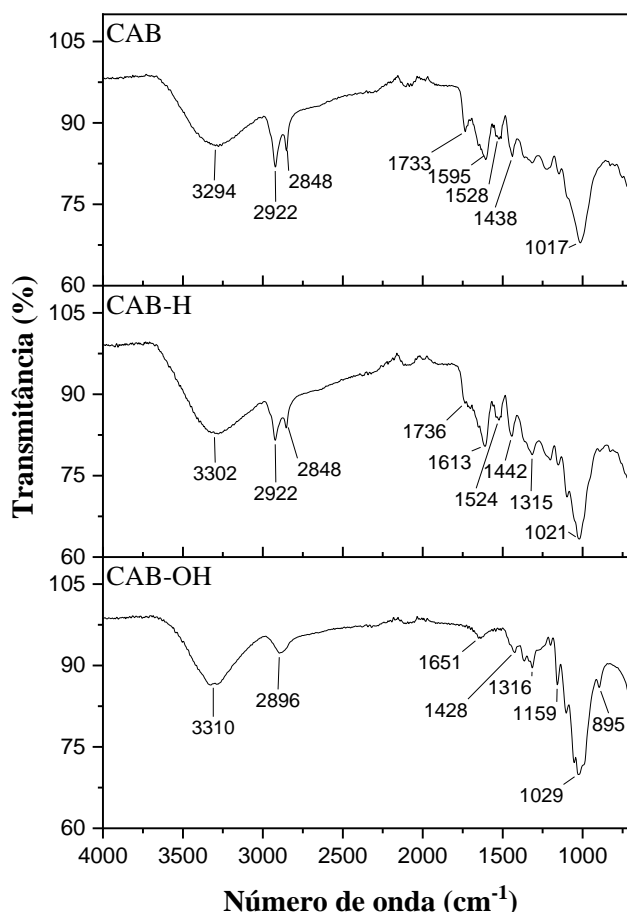
Fonte: própria autora (2024).

Observou-se que após o pré-tratamento com ácido, a celulose do CAB ficou mais disponível, contudo, o pré-tratamento ácido seguido de álcali proporcionou o aumento do percentual de celulose na biomassa ao comparar com o CAB *in natura* e CAB - H. O teor de celulose foi 27 % m/m, 33,2 % m/m e 53,4 % m/m para o CAB *in natura*, CAB - H e CAB-OH, respectivamente. Essa composição está de acordo com outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa, nos quais foram feitas também a caracterização do bagaço de caju. Por exemplo, Araújo (2022) reportou que o bagaço de caju resultante do tratamento ácido-álcali continha celulose, hemicelulose e lignina + cinzas nas porcentagens de 58,8 % m/m, 5,6 % m/m e 12,0 % m/m, respectivamente.

O teor de lignina reduziu em 85% após pré-tratamento ácido álcali, comparado com o CAB. De acordo com Jung *et al.* (2020), a deslignificação que ocorre durante o pré-tratamento com NaOH é ocasionada pela ruptura das ligações cruzadas de ésteres entre a lignina e os carboidratos estruturais (que dão forma e mantêm a estrutura da planta), especialmente as hemiceluloses, como a arabinoxilana.

A Figura 8 mostra a biomassa *in natura* e pré-tratada caracterizada por FT-IR na região de 650–4000 cm⁻¹.

Figura 8 - Espectros de FTIR do bagaço de caju *in natura* (CAB) e bagaço pré-tratado com ácido (CAB-H) e com ácido seguido de álcali (CAB-OH).



Fonte: própria autora (2024).

Foram observadas bandas correspondentes ao estiramento C-O em celulose e hemicelulose em 1017 cm^{-1} (CAB *in natura*), 1021 cm^{-1} (CAB-H) e 1029 cm^{-1} (CAB-OH).

A banda em torno de 1733 cm^{-1} é atribuída à esteres ligados a grupos acetil, feruloil e p-cumaroil entre hemicelulose e lignina (Mund *et al.* 2017), cuja intensidade dessa banda é observada no CAB *in natura*, mas não detectável na biomassa CAB-OH, fornecendo indícios da remoção da porção da lignina após pré-tratamento. Bandas características de lignina em 1438 cm^{-1} referente as deformações CH e CH₂ em anéis de fenólicos no CAB *in natura*, como também em 1595 cm^{-1} , é atribuída a vibração esquelética aromática (Rawat *et al.* 2013), mas não foram detectados no bagaço de caju após pré-tratamento ácido-álcali (CAB-OH). Entretanto, no bagaço de caju pré-tratado apenas com ácido sulfúrico foi possível observar bandas nessa região. Rawat *et al.* (2013) citam que a redução ou mudança na posição da banda

em 1595 cm^{-1} é atribuída a reações de condensação e divisão da cadeia lateral alifática da lignina.

De acordo com Lima *et al.* (2024), bandas em torno de $1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a trechos C=O de cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres não conjugados, que são grupos que fazem parte do bagaço de caju. Essas bandas foram modificadas após ambos os pré-tratamentos. As bandas em 2922 cm^{-1} e 2844 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento C-H assimétrico e simétrico de grupos alquil da estrutura da lignina (de França Serpa *et al.*, 2020) que estavam presentes no CAB-H, mas sofreram variação no CAB-OH, apresentando uma banda única em 2896 cm^{-1} (Figura 7).

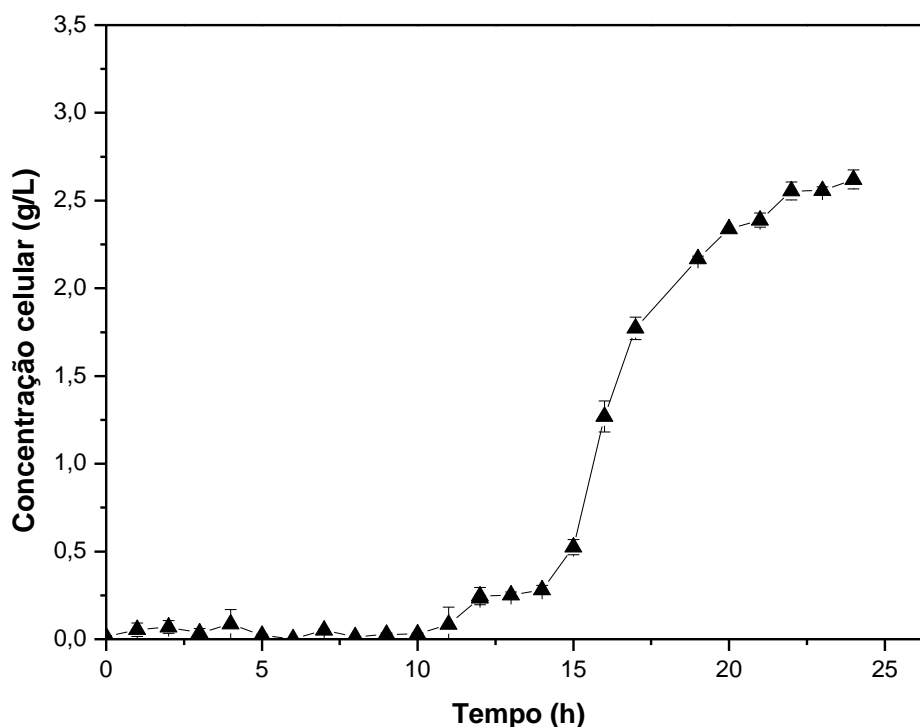
Através da análise de FT-IR do CAB *in natura* e do CAB após pré-tratamentos, foi possível observar diferenças significativas nos grupos funcionais em diversas regiões, sugerindo a deformação química da biomassa durante o pré-tratamento, corroborando com a caracterização química em que também se observou a diminuição da lignina após pré-tratamento ácido-álcali.

Desta forma, foi escolhido o bagaço que apresentou maior quantidade de celulose disponível (CAB-OH) para ser hidrolisado enzimaticamente para produção de hidrogênio. O CAB-OH submetido a hidrólise enzimática apresentou 68 g/L de glicose e esse hidrolisado foi utilizado para os ensaios de fermentação, em que foram realizadas diluições do mesmo, com concentrações finais de 10 e 20 g/L de glicose.

5.2 Curva de crescimento bactéria *C. butyricum*

Realizou-se o estudo do crescimento celular da bactéria *C. butyricum* para avaliar as fases do crescimento da bactéria e definir o tempo de inóculo para as fermentações. O perfil de crescimento está apresentado na Figura 9:

Figura 9 - Perfil do crescimento celular (▲) da bactéria *C. butyricum* em meio *Reinforced Clostridial Medium* conduzido a 35 °C e 100 rpm



Fonte: própria autora (2024).

A cepa *C. butyricum* apresenta fase lag com duração de 10 h (Figura 9). Após a fase lag, é observada a fase log, que dura até às 20 h, e em seguida é observada a fase estacionária, que durou no intervalo de 21 h a 24 h. O meio RCM é composto por vários reagentes, que o torna mais complexo que o hidrolisado enzimático (CAB-HE), que será utilizado como meio de cultivo para produção de H₂. Desta forma, foi importante analisar em qual fase as células estavam ao serem inoculadas no CAB-HE. A partir da curva de crescimento, foi padronizado o tempo de crescimento do inóculo para 16 h, em que a bactéria se encontra na fase exponencial de crescimento.

5.3 Produção de hidrogênio

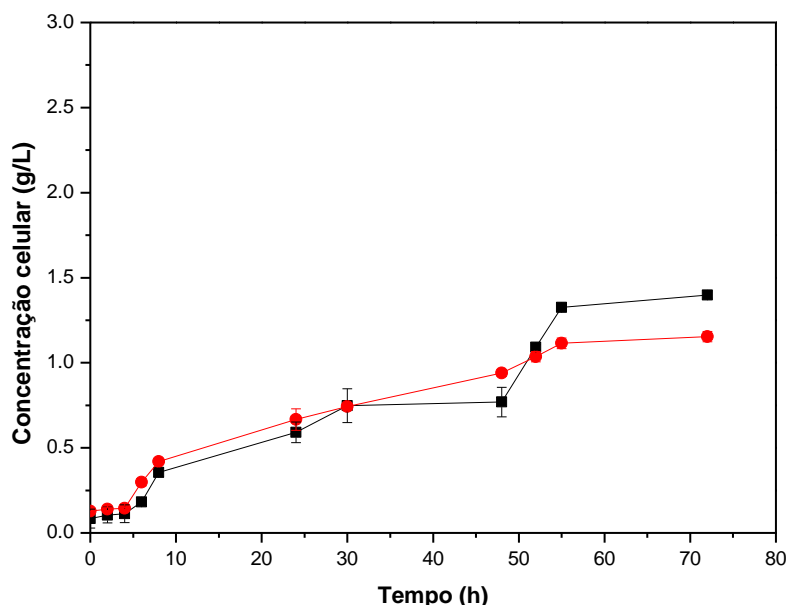
5.3.1 Avaliação da suplementação com L-cisteína

O hidrolisado enzimático obtido do CAB – OH (descrito no tópico 5.2) foi utilizado como substrato para a produção fermentativa em batelada de H₂ por *C. butyricum*, suplementado com L-cisteína por apresentar potencial para ser usada como agente redutor (Yuan, *et al.*, 2008). A bactéria *C. butyricum* foi utilizada por ser relatada na literatura como um microrganismo anaeróbico formador de esporos, capaz de converter vários substratos de

carboidratos e produzir hidrogênio com eficiência (Beckers *et al.*, 2010; Tai *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2016; Ortigueira *et al.*, 2019).

Avaliou-se a influência da adição de L-cisteína, e o pH inicial 6,0 na concentração de glicose (10 g/L), para produção de Bio-H₂. Na Figura 10 estão apresentados os perfis de concentração celular de *C. butyricum* durante a fermentação conduzida usando o CAB-HE sem e com suplementação de L- cisteína, avaliando também a influência da variação de pH.

Figura 10 - Perfil da concentração celular (g/L) da bactéria *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 10 g/ de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína pH inicial 6:(■) CAB-HE pH 6 sem suplementação, (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína.

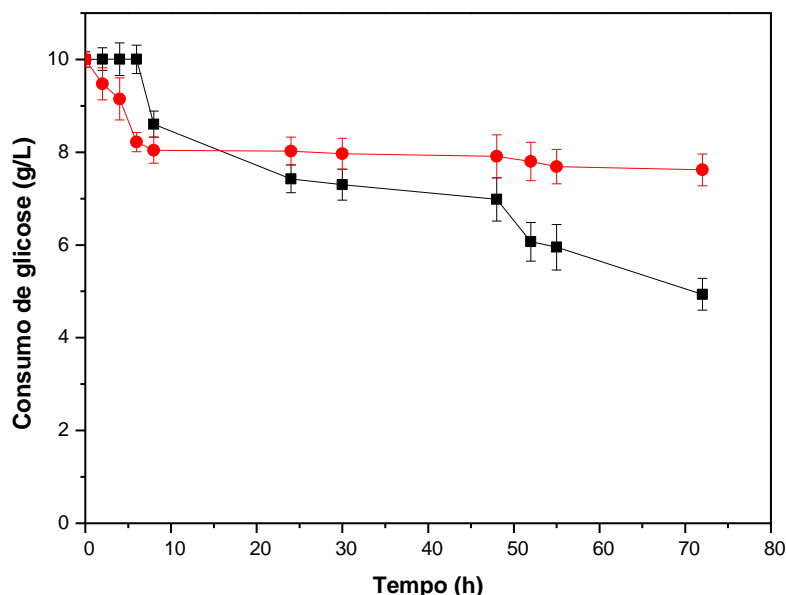


Fonte: própria autora (2024).

Ao suplementar o CAB-HE com L-cisteína houve, um crescimento celular (1,1 g/L) durante o bioprocesso, comparando com o processo usando o CAB-HE sem suplementação com L- cisteína (1,3 g/L) ao final das 72 h, obtendo concentrações celulares semelhantes. Observou-se também que a adição de L- cisteína não proporcionou efeito positivo no crescimento celular da *C. butyricum*.

Na Figura 11 estão apresentados os perfis de consumo de glicose por *C. butyricum* durante a bioprocesso conduzido usando o CAB-HE (10 g/L glicose) com pH inicial 6 avaliando a suplementação com L-cisteína.

Figura 11 - Perfil do consumo de glicose (g/L) da bactéria *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 10 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, pH inicial 6 : (■) CAB-HE pH 6 sem suplementação, (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína



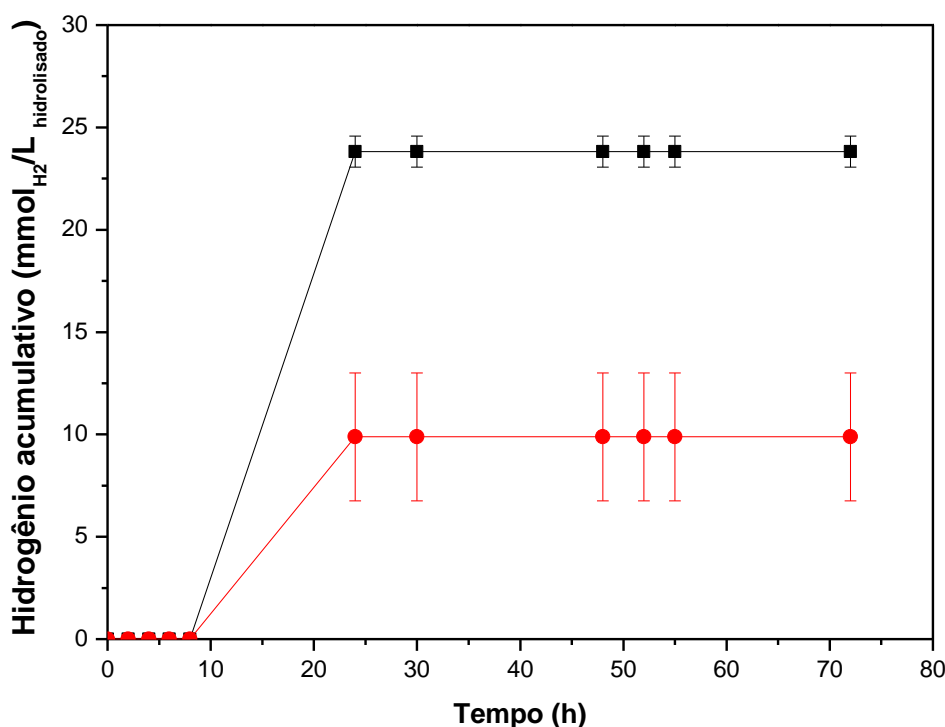
Fonte: própria autora (2024).

A L- cisteína é relatada como sendo um agente redutor no potencial de oxidação-redução do sistema de fermentação e aumenta a taxa de crescimento de algumas bactérias, sendo considerada como um mediador entre bactérias e substrato (Yuan *et al.*, 2008). No entanto, o mecanismo desse fenômeno ainda não é claro e precisa ser investigado mais profundamente (Yuan *et al.*, 2008).

No bioprocesso conduzido com o CAB-HE a pH 6, ao final de 72 h, a bactéria consumiu apenas 23,8 % da glicose no hidrolisado suplementado com L-cisteína, enquanto usando o meio sem L-cisteína, observou-se um consumo de 50,7 % da glicose. No bioprocesso usando CAB-HE, não houve mudança na bioatividade celular quando o meio foi suplementado com L-cisteína.

Na Figura 12 estão apresentados o perfil da produção de hidrogênio acumulativo ($\text{mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$) produzidos durante as fermentações conduzidas usando CAB-HE na concentração de glicose (10 g/L), sem e com suplementação de L-cisteína.

Figura 12 - Perfil hidrogênio acumulativo ($\text{mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$) por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, pH inicial 6: (■) CAB-HE pH 6 sem suplementação; (●) CAB-HE pH 6 suplementado com L-cisteína.



Fonte: própria autora

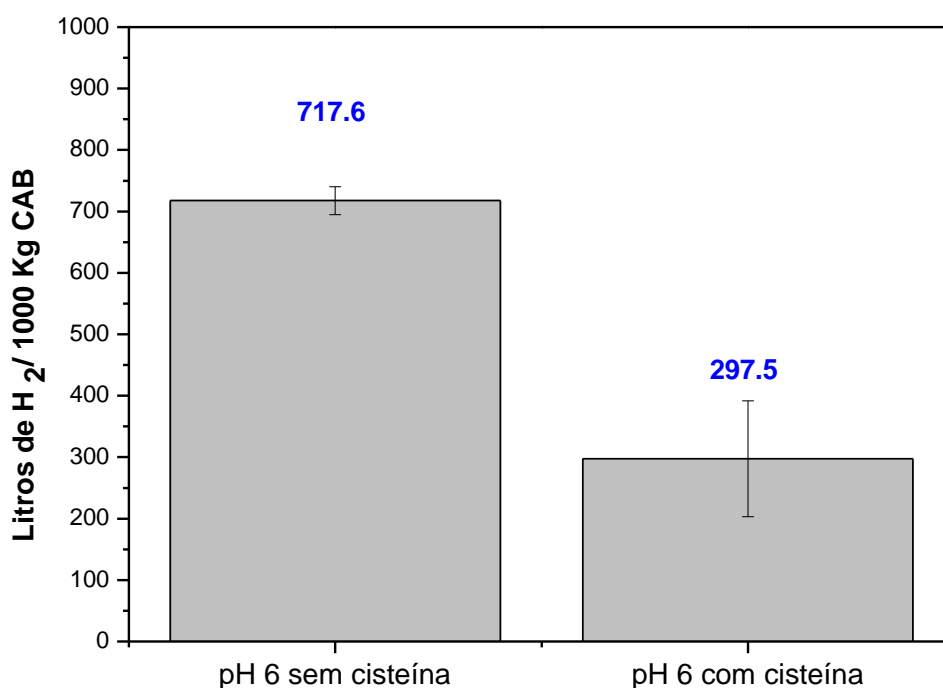
Na Figura 12 observou-se que após 24 h, não houve mais produção de hidrogênio, e o hidrogênio acumulativo foi de $23,8 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$ no hidrolisado sem adição de L-cisteína e $9,8 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$ com L-cisteína. Adiante, na Tabela 5 observa-se que em relação a produção volumétrica $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}$, houve uma produção de $582,2 \pm 18,5$ e $241,6 \pm 76,3 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}$ sem e com L-cisteína, respectivamente. Nota-se, pelos dados apresentados na Tabela 5, que a produtividade alcançada foi $24,3 \pm 0,8 \text{ mL}_{\text{H}_2}/(\text{L.h})$ no ensaio sem adição de L-cisteína, e de $10,1 \pm 3,28 \text{ mL}_{\text{H}_2}/(\text{L.h})$ no ensaio com adição de L-cisteína.

Yuan *et al.* (2008) avaliaram a produção de hidrogênio suplementado o meio com L-cisteína, utilizando sacarose como substrato, a faixa estudada em duas temperaturas mesofílicas (30 e 35 °C). Os autores relatam um aumento na produção de hidrogênio de 15,2% (35 °C) e 70% (30 °C), em comparação aos testes sem a suplementação da L-cisteína, alcançando rendimentos de $3,10 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{sacarose}}$ a 35 °C, e de $3,28 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{sacarose}}$ a 30 °, tendo um maior efeito na suplementação quando conduzido a temperatura de 30 °C, obtendo-

se produtividade máxima de 11.7 mLH₂/(L.h). No entanto, ao suplementar o CAB-HE a pH 6 com L-cisteína a 35 °C, não foi observando uma diferença significativa em relação no volume de hidrogênio em mL.

Na Figura 13 estão apresentados os perfis da produção de hidrogênio que podem ser obtidos a partir de 1000 Kg de bagaço de caju, durante os bioprocessos conduzidos com o CAB-HE (10g/L de glicose), sem e com suplementação com L-cisteína, a pH 6.

Figura 13 - Perfil da produção de hidrogênio por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h partindo-se de 1000 Kg de bagaço de caju, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, com pH inicial 6 e sem e com suplementação de L-cisteína

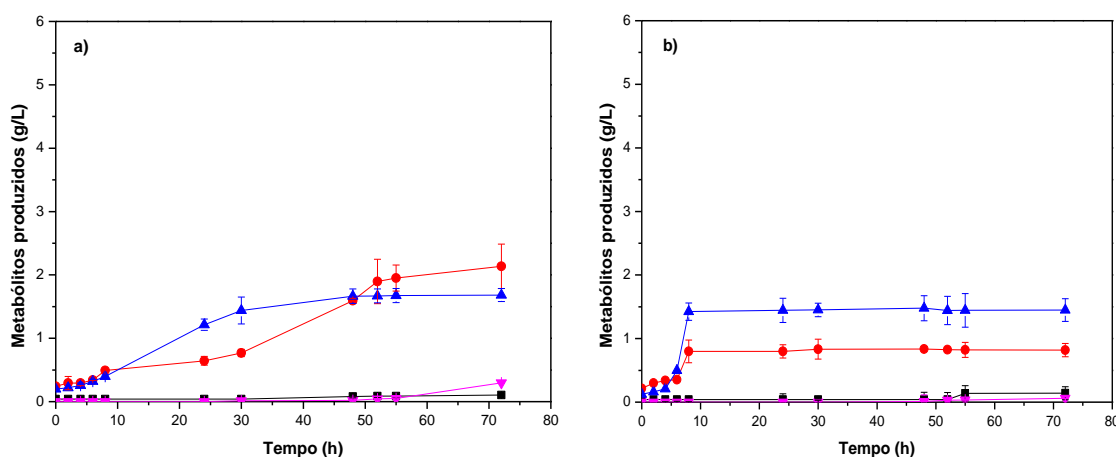


Fonte: própria autora (2024).

Nas condições operacionais avaliadas, a produção de hidrogênio obtida no bioprocessamento sem adição de L-cisteína a pH 6 a partir de 1000 kg de bagaço de caju descartado pela agroindústria resultam na produção de 717,6 ± 22,6 L de hidrogênio. Nos experimentos, também utilizando 1000 kg de bagaço de caju no processo, o volume de hidrogênio seria, com adição de L – cisteína em pH 6 de 297,5 ± 94,1 L, não havendo diferenças significativas em ambos os experimentos.

Na Figura 14 estão apresentados os perfis dos metabólitos produzidos durante os bioprocessos conduzidos com o CAB-HE (10g/L de glicose), sem e com suplementação com L-cisteína, a pH 6.

Figura 14 - Metabólitos produzidos por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 10 g/L, com o pH inicial 6: a) pH 6,0 sem L - cisteína, b) pH 6,0 com L – cisteína. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido láctico



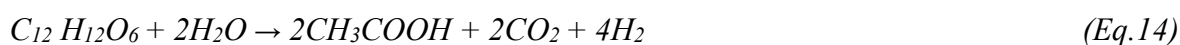
Fonte: própria autora (2024).

Os metabólitos obtidos durante a fermentação foram o ácido acético, butírico, fórmico e láctico. A produção destes compostos está concordantes com a via metabólica da bactéria *C. butyricum* demonstrada por Lin *et al.*, (2004), o qual reportam que essa espécie microbiana é capaz de metabolizar a glicose e produzir estes metabólitos.

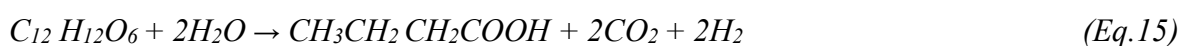
O ácido butírico foi produzido de forma crescente até o tempo de 50 h, mantendo-se constante até o final da fermentação com concentração 1,7 g/L no ensaio sem adição de L-cisteína em pH 6, de 2,1 g/L de ácido fórmico, 0,3 g/L de ácido láctico e ácido acético 0,1 g/L (Figura 14.a). No ensaio em pH 6 com adição de L-cisteína, houve formação dos ácidos butírico, fórmico e acético, 1,4 g/L, 0,8, g/L e 0,1 g/L, respectivamente (Figura 14.b).

Em geral, a formação de ácido butírico e acético favorece a produção de hidrogênio, já a formação do propiônico resulta em menor produção, de acordo com as Equações 14 e 15 (Yuan *et al.*, 2008).

Produção de acetato:



Produção de butirato:

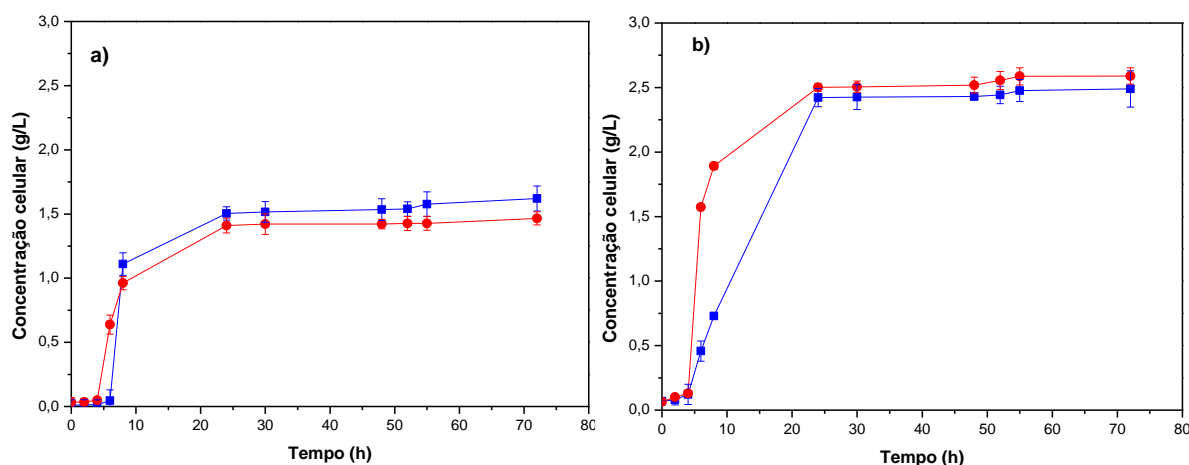


No geral, em ambos os ensaios obteve-se a formação dos ácidos butírico e acético, no entanto a produção de ácido acético apresentou uma baixa concentração. A distribuição desses metabólitos indica que as bactérias acidogênicas contribuíram para a maior produção de hidrogênio (Yuan *et al.*, 2008). Quando suplementado com L-cisteína, não foi observado um aumento nas concentrações dos ácidos em relação aos sem a suplementação L-cisteína.

Objetivando estudar a influência do aumento da concentração de glicose do hidrolisado enzimático do bagaço de caju, no crescimento celular da *C. butyricum*, na produção de metabólitos e hidrogênio e o efeito da adição de L-cisteína, foram realizados experimentos com 20 g/L de glicose no hidrolisado do CAB.

Na Figura 15 estão apresentados os perfis de consumo de glicose de *C. butyricum* durante a fermentação conduzida com e sem L-cisteína, à pH 6 e pH 7, e concentração inicial de glicose de 20 g/L.

Figura 15 - Perfil da concentração celular (g/L) da bactéria *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 20 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, variando o pH inicial: a) pH inicial 6 e b) pH inicial 7. (■) CAB-HE sem suplementação e (●) CAB-HE suplementado com cisteína



Fonte: própria autora (2024).

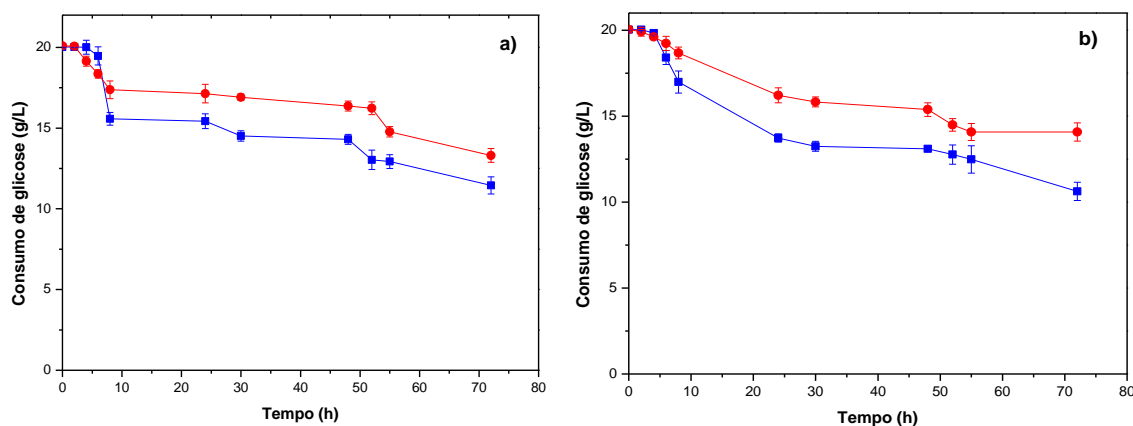
Nos bioprocessos conduzidos com CAB-HE a pH 6 com concentração de glicose de 20 g/L, sem e com suplementação de L-cisteína, a bactéria *C. butyricum* apresentou uma fase lag semelhante, com duração inferior a 8 h. A concentração celular máxima de 1,60 g/L no experimento conduzido sem adição de L-cisteína, já no hidrolisado com adição de L-cisteína, à pH 6, a concentração celular foi de 1,46 g/L ao final do processo fermentativo. Observa-se que, mesmo fornecendo uma quantidade maior de açúcar, o crescimento do microrganismo foi

inferior quando suplementado com cisteína (Figura 15. a), mostrando perfil semelhante aos dos experimentos conduzido com 10 g/L de glicose.

Na Figura 15.b são mostrados os perfis do crescimento celular obtido no bioprocesso usando CAB-HE a pH 7 com concentração de glicose de 20 g/L, sem e com suplementação de L-cisteína. A fase de latência apresenta duração de 4 h, a fase log em condição a pH 7 aumentou o crescimento celular ao comparar com as fermentações em condição a pH 6, na qual o crescimento celular máximo ao final do processo foi de 2,5 g/L e 2,4 g/L usando o CAB-HE sem e com suplementação de L-cisteína, respectivamente. O valor ótimo de pH, depende do tipo de sistema que está sendo operado, o tipo de substrato utilizado e a faixa de pH estudada (Romão, 2015). Resultados da literatura destaca-se que a faixa de pH ótima para produção de hidrogênio em batelada, é em torno da neutralidade (pH 7 a 7,5), devido ao acúmulo de acetato e butirato, no meio fermentativo que promove uma diminuição do pH durante o processo (Li e Chen., 2007).

Na Figura 16 estão apresentados os perfis de consumo de glicose durante a esses ensaios usando o CAB-HE com concentração de glicose de 20 g/L.

Figura 16 - Perfil do consumo de glicose (g/L) da bactéria *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h usando o hidrolisado CAB-HE com 20 g/L de glicose, sem e com suplementação com L-cisteína, variando o pH inicial a) pH inicial 6,0 e b) pH inicial 7,0 (■) CAB-HE sem suplementação e (●) CAB-HE suplementado com L-cisteína



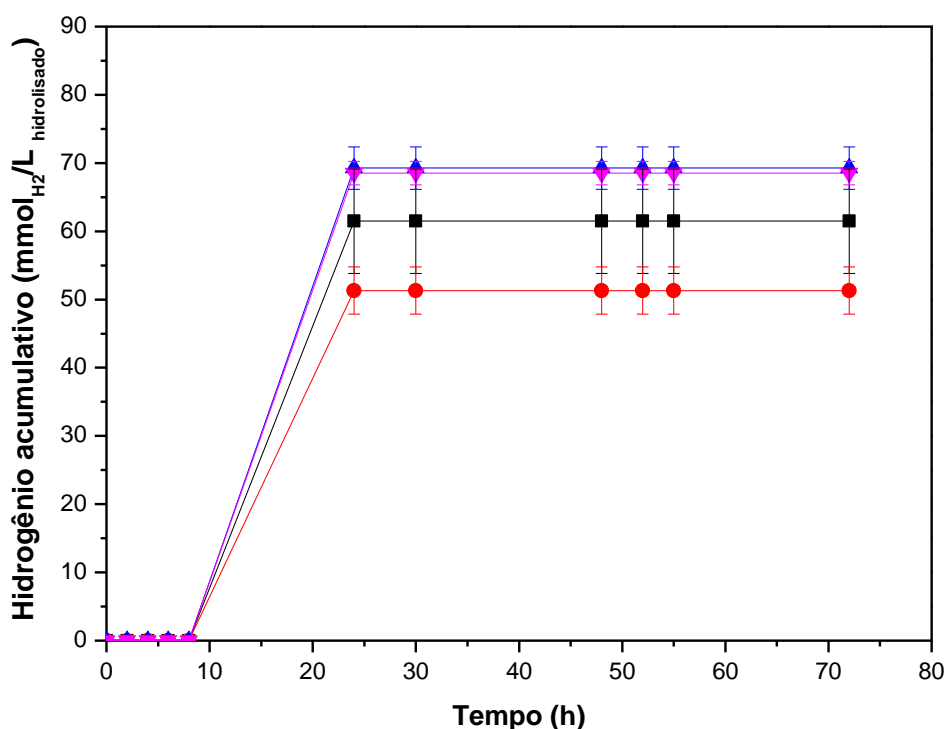
Fonte: própria autora (2024).

Na Figura 16.a, observa-se que no processo usando CAB-HE a pH 6, sem adição de L-cisteína, o microrganismo consumiu mais glicose, aproximadamente 42,7% de glicose ao final do processo fermentativo, comparando com o processo conduzido no mesmo pH com adição de L-cisteína, no qual ocorreu um consumo de 33,5 %. Já na Figura 16.b é mostrado o

consumo de glicose à pH 7, com e sem adição de L-cisteína, sendo observado o mesmo perfil de consumo de glicose, ocorrendo um maior consumo de glicose 46,9 % no ensaio sem adição de L-cisteína, e apenas um consumo de 29,6 % com adição deste composto. Observa-se que ao suplementar ambos hidrolisados, houve um menor consumo de glicose, podendo a L-cisteína ter combinando-se com o elemento nutriente no meio para formar um composto indisponível para a bactéria, o que resultaria na diminuição da bioatividade e na produção de hidrogênio (Yu *et al.*, 2007).

Na Figura 17 estão apresentados os perfis da produção de hidrogênio acumulativo ($\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$) produzidos durante as fermentações conduzidas usando CAB-HE com concentração inicial de glicose (20 g/L), sem e com suplementação de L-cisteína, e diferentes pHs (6,0 e 7,0)

Figura 17 - Perfil hidrogênio acumulativo ($\text{mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$) por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, variando pH inicial: (■) pH 6 sem L-cisteína; (●) pH 6 com L-cisteína; (▲) pH 7 sem L-cisteína; (▼) pH 7 com L-cisteína



Fonte: própria autora (2024).

em pH 6 com adição L-cisteína (Figura 17). Conforme apresentado na Tabela 6, em termos de volume de hidrogênio por volume de meio fermentativo ($\text{mL H}_2/\text{L}$), a produção foi de $1503,4 \pm 187,1 \text{ mL H}_2/\text{L}$ e $1254,5 \pm 85,1 \text{ mL H}_2/\text{L}$ sem e com adição de L-cisteína, respectivamente, ambos os processos a pH 6,0. A produtividade de H_2 foi de $62,6 \pm 7,8 \text{ mL H}_2/(\text{L}\cdot\text{h})$ em pH 6 com adição L-cisteína. Contudo não foi observado diferença significativa na porcentagem de H_2 e no volume de hidrogênio em mL, tendo uma diferença significativa no rendimento de $2,1 \pm 0,2$ pH 6 sem adição de L-cisteína e de $2,8 \pm 0,2$ pH 6 com adição L-cisteína, justificado pelo menor consumo de glicose com adição de L-cisteína.

Nos processos conduzidos a pH 7 usando o CAB-HE com 20 g/L de glicose, a produção de hidrogênio teve início entre 8-24 h de fermentação e, após 72 h, os resultados para o hidrogênio acumulativo foram de $69,2 \pm 3,1 \text{ mmolH}_2/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$ e $68,5 \pm 1,7 \text{ mmolH}_2/\text{L}_{\text{hidrolisado}}$ no ensaio sem e com L-cisteína, respectivamente (Figura 17), correspondendo a uma produção em relação ao volume de meio fermentativo de $1693,4 \pm 76,0 \text{ mLH}_2/\text{L}$ e $1675,3 \pm 41,6 \text{ mLH}_2/\text{L}$. Esses resultados demonstram que o pH inicial do meio de cultura influencia a produção de BioH_2 , em que um ajuste do pH para 7,0 obteve uma melhoria na produtividade da fase gasosa de CAB-HE em relação ao pH 6,0.

Esses resultados demonstram que não houve diferença significativa na porcentagem de H_2 e no volume de hidrogênio em mL em ambos ensaios a pH 6 e pH 7 sem e com adição de L-cisteína. Contudo, ocorreu uma melhoria no rendimento $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{glicose}}$, apresentando uma diferença significativa quando suplementado com L-cisteína, justificando pelo menor consumo de glicose com adição de L-cisteína.

Silva e colaboradores (2018) obtiveram máxima produção de hidrogênio de 420 mL de H_2/L de hidrolisado no bioprocesso usando a bactéria *Clostridium roseum* e o hidrolisado ácido do bagaço de caju, que continha uma concentração inicial de glicose de 10,2 g/L. Esses valores foram inferiores aos encontrados nesse estudo, em que a produção máxima de hidrogênio alcançada foi de $1693,4 \pm 76,0 \text{ mL de H}_2/\text{L}$ de hidrolisado no experimento conduzido com 20 g/L de glicose, pH 7 e sem adição de L-cisteína.

Tabela 5 – Resultados das análises das fases gasosas obtidos dos ensaios de produção de hidrogênio por *C. butyricum* a 35 °C e 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE), com concentração inicial de glicose (10 e 20 g/L) e pH (6,0 e 7,0), avaliando também a suplementação com L-cisteína

pH inicial	Cisteína	Concentração de glicose (g/L)	Volume de biogás (mL)	Porcentagem de H ₂ (%)	Volume de H ₂ (mL)	Produção volumétrica (mLH ₂ /L)	Rendimento de H ₂ (molH ₂ /mol _{glicose})	Produtividade (mLH ₂ /(L.h))
6	Sem	10	346,0 ± 14,0	30,4 ± 2,2 ^a	104,8 ± 3,3 ^a	582,2 ± 18,5 ^c	1,2 ± 0,1 ^a	24,3 ± 0,8 ^c
	Com		255,0 ± 43,0	18,5 ± 8,5 ^a	43,5 ± 13,7 ^b	241,6 ± 76,3 ^c	0,6 ± 0,2 ^a	10,1 ± 3,2 ^d
6	Sem	20	530,7 ± 43,4	50,8 ± 2,1 ^a	270,6 ± 33,7 ^a	1503,4 ± 187,1 ^{a, b}	2,1 ± 0,2 ^b	62,6 ± 7,8 ^b
	Com		451,0 ± 43,0	50,2 ± 1,4 ^a	225,8 ± 15,3 ^a	1254,5 ± 85,1 ^b	2,8 ± 0,2 ^a	52,3 ± 3,5 ^b
7	Sem		601,3 ± 30,2	50,7 ± 1,5 ^a	304,8 ± 13,7 ^a	1693,4 ± 76,0 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	70,6 ± 3,2 ^a
	Com		606,0 ± 36,0	49,9 ± 1,7 ^a	301,6 ± 7,5 ^a	1675,3 ± 41,6 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	69,8 ± 1,7 ^a

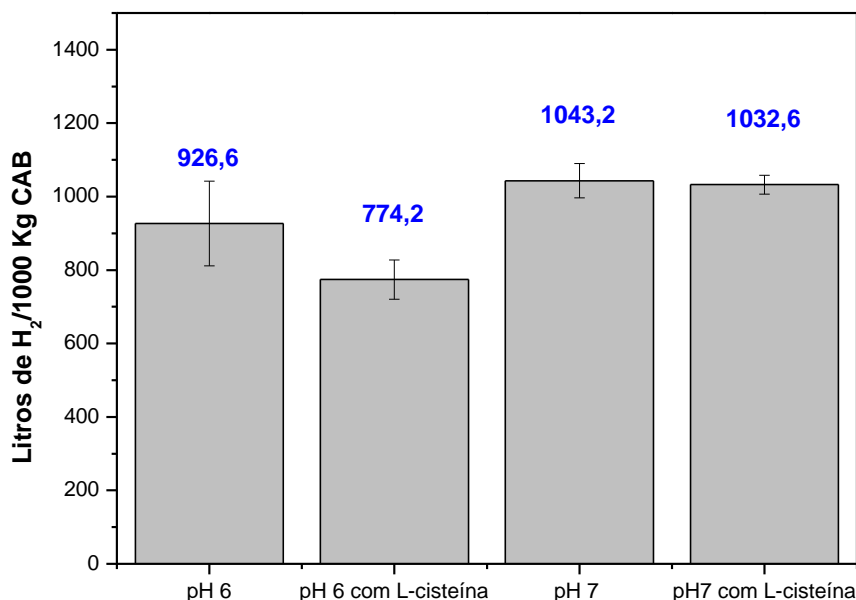
*Letras diferentes representam diferenças estatísticas com um nível de confiança de 95 % (p < 0,05)

Com base nos resultados, segundo o estudo estatístico por ANOVA, para um nível de significância de 95%, os resultados de rendimentos de mol de hidrogênio por mol de glicose consumida no tempo de 24h não apresentaram diferença significativa entre o hidrolisado do CAB-HE com concentração inicial de 10 g/L de glicose, em pH 6 sem adição de L – cisteína e com adição de L - cisteína em pH 6, em que apresentou um rendimento de $1,2 \pm 0,1$ mol_{H2}/mol_{glicose}, $0,6 \pm 0,2$ mol_{H2}/mol_{glicose}, respectivamente. Em relação ao volume de hidrogênio em mL, no CAB – HE em pH 6 sem adição de L – cisteína promoveu uma diferença significativa, apresentando um maior volume de $104,8 \pm 3,3$ mL de hidrogênio.

De forma sucinta, para a concentração de glicose inicial de 20 g/L, com base no estudo estatístico por ANOVA, os resultados de rendimentos de mol de hidrogênio por mol de glicose consumida no tempo de 24h não apresentaram diferença significativa entre o hidrolisado do CAB-HE com concentração inicial de 20 g/L de glicose, em pH 6 sem adição de L – cisteína e em pH 7 sem adição de L – cisteína, em que apresentou um rendimento de $2,1 \pm 0,1$ mol_{H2}/mol_{glicose}, $1,8 \pm 0,2$ mol_{H2}/mol_{glicose}, respectivamente (Tabela 5). Em relação a adição de L - cisteína no CAB – HE em pH 6 e 7 contendo 20 g/L de glicose não promoveu uma diferença significativa, apresentando um rendimento de $2,8 \pm 0,2$ mol_{H2}/mol_{glicose} em pH 6 com a adição de L – cisteína e $2,9 \pm 0,1$ mol_{H2}/mol_{glicose} em pH 7 com a adição de L – cisteína.

Na Figura 18 estão apresentados os perfis da produção de hidrogênio que podem ser obtidos a partir de 1000 Kg de bagaço de caju, durante os bioprocessos conduzidos com o CAB-HE (20 g/L de glicose) com pH inicial de 6,0 ou 7,0, sem e com suplementação com L-cisteína.

Figura 18 - Perfil da produção de hidrogênio a partir de 1000 Kg de bagaço de caju hidrogênio por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L com pH inicial de 6,0 ou 7,0, sem e com a suplementação de L-cisteína

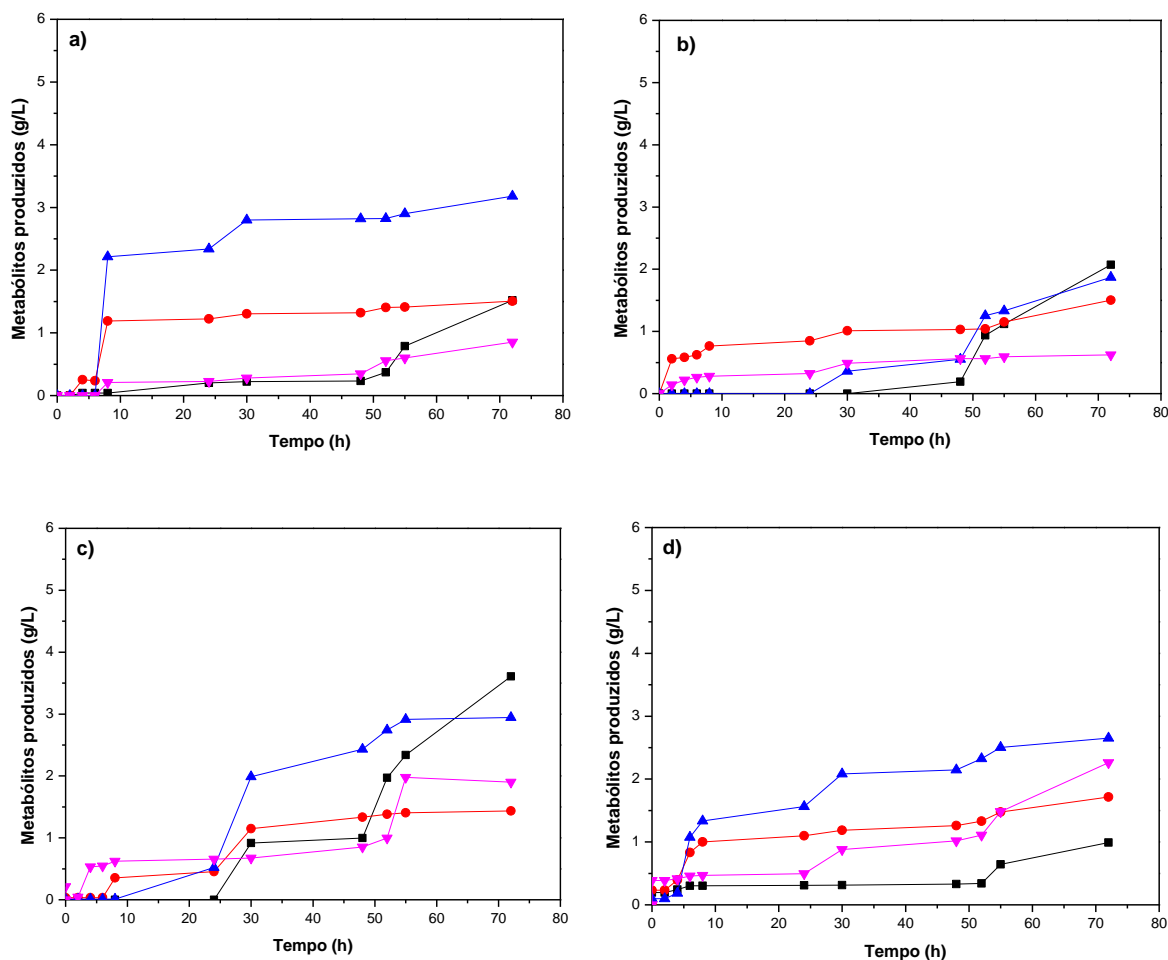


Fonte: própria autora (2024).

Com essa configuração, 1000 kg de bagaço de caju descartado pela agroindústria resultam na produção de $1043,7 \pm 46,9$ L de hidrogênio no experimento em pH 7 sem adição de L – cisteína, e $1032,7 \pm 25,5$ L de hidrogênio em pH 7 com adição de L – cisteína no CAB-HE a 20 g/L de glicose. Nos experimentos, também utilizando 1000 kg de bagaço de caju no processo, os volumes de hidrogênio seriam, sem adição de L – cisteína em pH 6 seria $926,6 \pm 115,3$ L, com adição de L – cisteína em pH 6 seria $773,2 \pm 53,4$ L. Não havendo diferença significativa para ambos experimentos.

Na Figura 19 estão apresentados os perfis dos metabólitos produzidos durante as fermentações conduzidas com CAB-HE (20 g/L glicose) a pH 6,0 e 7,0, sem e com suplementação de L-cisteína.

Figura 19- Metabólitos produzidos por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, variando o pH inicial: a) pH 6,0 sem suplementação; b) pH 6,0 com L-cisteína; c) pH 7,0 sem suplementação; d) pH 7,0 com L-cisteína. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido láctico



Fonte: própria autora (2024).

O ácido butírico e ácido acético foram produzidos pela bactéria estudada durante o processo fermentativo, como demonstrado por Jauregui M. *et al.* (2017), Zhang H. *et al.* (2009) e Beckers L. *et al.* (2010). Ao longo do processo, observando-se a formação dos ácidos acético, butírico, fórmico e láctico (Figura 19). A concentração de ácido butírico foi aumentando durante o processo até 72 h, obtendo 3,1 g/L e ocorreu a produção de 1,5 g/L de ácido acético no processo conduzido a pH 6 sem L-cisteína (Figura 19.a).

Em pH 6 com L-cisteína, ocorreu a formação de ácido butírico, mas numa menor concentração (1,8 g/L). A partir de 30 h, iniciou-se a formação de ácido acético, alcançando 2,0 g/L ao final das 72 h (Figura 19.b). Já em pH 7, também foi observada a formação dos ácidos acético (3,6 g/L), butírico (2,9 g/L) e fórmico (1,4 g/L) em pH 7 sem L-cisteína (Figura 19.c).

Na fase acidogênica da bactéria *Clostridium*, durante a qual são produzidos o ácido acético e ácido butírico, ocorreu à diminuição do pH, nessa condição a cepa pode sofrer uma mudança metabólica da formação de acetato/butirato para a formação de lactato/etanol sob condições estressantes com um pH baixo ou uma alta concentração de produto final ácido (Yang *et al.*, 2007). As vias metabólicas se alteram com a mudança das condições de reação, substrato disponível e espécies microbianas ativas. Assim, o rendimento de hidrogênio pode ser afetado pelo controle das condições de fermentação, como controle de pH e descarga do espaço livre (Wang e Yin, 2021).

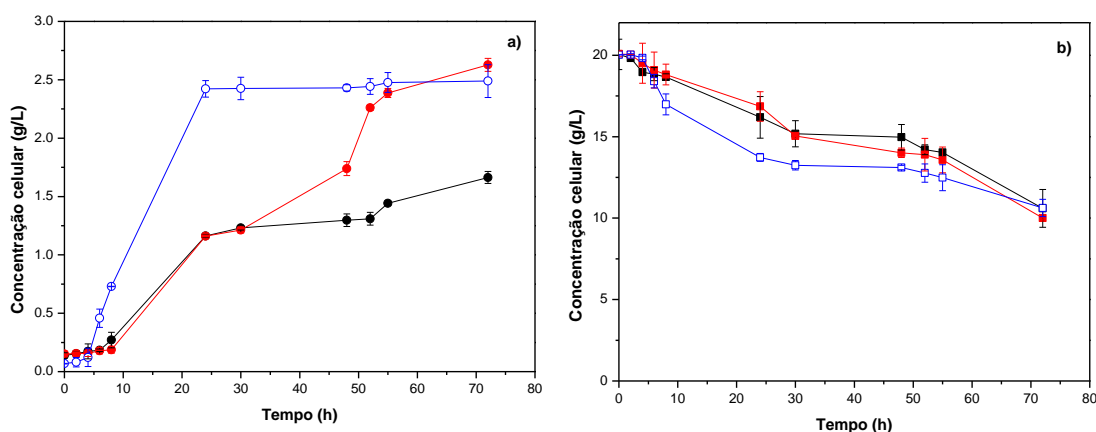
A L-cisteína apresenta efeito positivo na produção de hidrogênio (Pattraa *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008), contudo, a concentração estudada nesse trabalho não apresentou efeito significativo na produção de hidrogênio quando comparado com a fermentação conduzida sem suplementação de L-cisteína. Possivelmente por a L-cisteína apresentar dois grupos carboxílicos, dois grupos amido e dois átomos de enxofre em uma molécula, o excesso de L-cisteína pode se combinar com o elemento nutriente no meio para formar um composto indisponível para bactérias, o que resultaria na diminuição da bioatividade das bactérias e do rendimento de hidrogênio (Yu *et al.*, 2007). O que foi observado também no trabalho de Yuan *et al.* (2008), em que ao adicionar 0,17 g/L o rendimento de hidrogênio diminuiu, quando comparado com a condição com 10 vezes menos L-cisteína. De acordo ainda com Yuan *et al.* (2008), o efeito desse fenômeno ainda não está muito claro e precisa ser estudado mais profundamente.

5.4 Suplementação com glicerol na produção de hidrogênio

Neste tópico, com o intuito de melhorar o rendimento de hidrogênio, avaliou-se a influência da suplementação com glicerol como agente bioativo na oxidação-redução celular nas concentrações de 1 g/L e 5 g/L sem adição de L-cisteína. Tendo em vista que o glicerol é o principal subproduto da produção de biodiesel e representa um substrato potencial para processos fermentativos.

Na Figura 20 estão apresentados os perfis de concentração celular de *C. butyricum* e consumo de glicose, respectivamente, obtidos durante os bioprocessos conduzidos usando o CAB-HE (concentração inicial de glicose de 20 g/L e pH 7) suplementado com 1 g/L ou 5 g/L de glicerol.

Figura 20 - Perfil da concentração celular (g/L) e do consumo de glicose (g/L) obtidos durante os bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, usando a bactéria *C. butyricum* e o hidrolisado CAB-HE (concentração inicial de glicose de 20 g/L e pH 7) a) perfil da concentração celular (g/L): (○) sem suplementação, suplementado com 1 g/L (●) ou 5 g/L (●) de glicerol. b) perfil do consumo de glicose (g/L): (□) sem suplementação, suplementado com 1 g/L (■) ou 5 g/L (■) de glicerol.



Fonte: própria autora (2024).

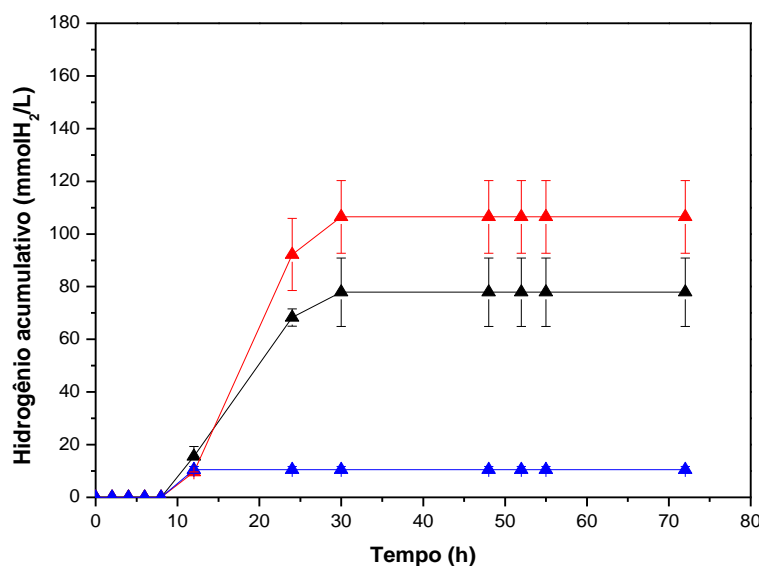
A figura 20.a) ilustra perfis semelhantes no crescimento celular da bactéria *C. butyricum* durante a fase de latência (0 - 7 h) e a fase exponencial (8 - 72 h). Porém, a concentração celular foi maior com a suplementação de 5 g/L de glicerol no hidrolisado

enzimático do CAB (2,6 g/L). Na Figura 20.b) estão apresentados os perfis de consumo de glicose, observou-se que sem adição do glicerol teve um consumo de consumo de glicose 46,9 %, e com adição de 1 g/L e 5 g/L de glicerol, teve um consumo de 47 % e 50 % da concentração inicial de glicose, respectivamente.

Alguns autores relatam que o rendimento de hidrogênio pode diminuir com o aumento da concentração de substrato, a possível razão é que mais energia seria utilizada para o crescimento microbiano em vez da produção de hidrogênio (Yin *et al.* 2017). Contudo, isso não foi observado no referido trabalho, pois possivelmente a quantidade de substrato analisada não foi tão elevada a ponto de impactar de forma negativa na produção de hidrogênio (como observado posteriormente na Figura 20.b).

Na Figura 21 estão apresentados os perfis de produção de hidrogênio acumulativo (mmolH_2/L) de H_2 por *C. butyricum* durante esta etapa do estudo.

Figura 21 – Perfil de hidrogênio acumulativo (mmolH_2/L) por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, a pH 7: Perfil de hidrogênio acumulativo (mmolH_2/L): (▲) sem suplementação de glicerol (▲) 1 g/L de glicerol e (▲) 5 g/L de glicerol.



Fonte: própria autora (2024).

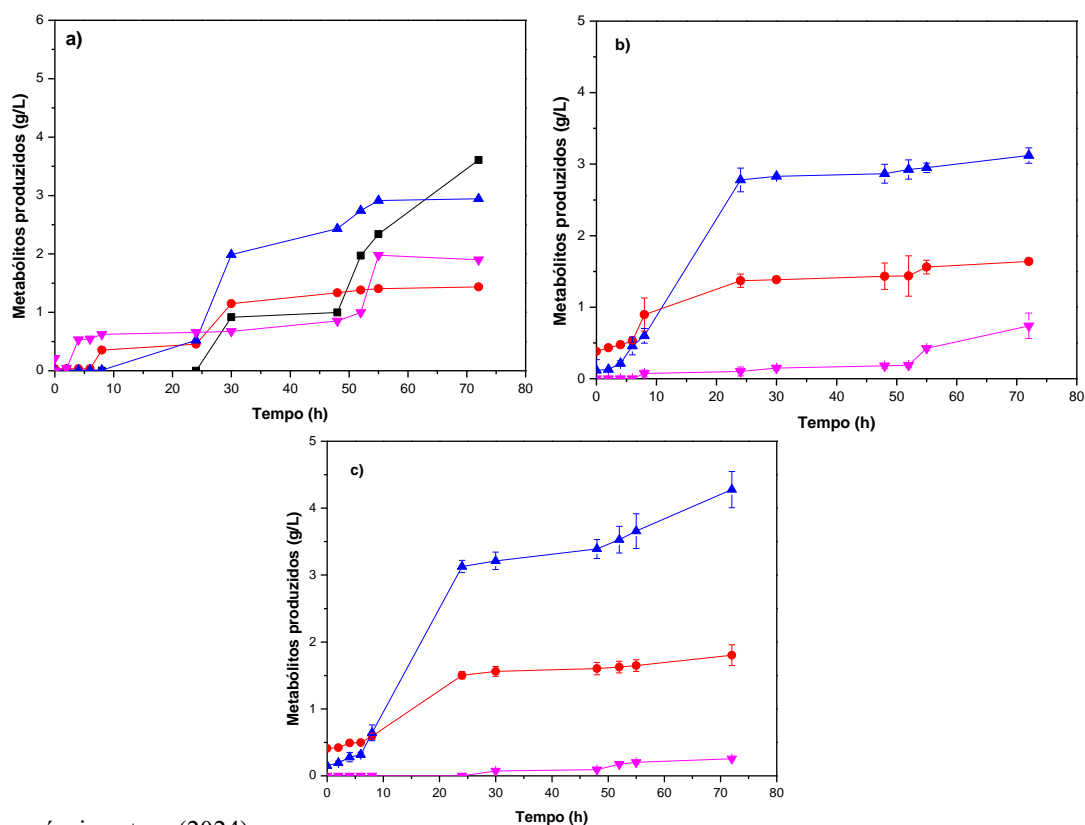
A produção de hidrogênio teve início após 8 h de fermentação, obtendo $15.5 \pm 3,8$ mmolH_2/L em 12 h e $68,3 \pm 3,3$ mmolH_2/L em 24 h no ensaio usando CAB-HE suplementado com 1 g/L glicerol, cessando sua produção pelo decréscimo do pH do meio ocorrido devido a

acidificação na produção dos metabólitos (Figura 21). No bioprocesso usando CAB-HE suplementado com 5 g/L de glicerol, observou-se, que foram produzidos $9,6 \pm 0,1$ mmolH₂/L e $92,2 \pm 13,7$ mmolH₂/L em 12 h e 24 h, respectivamente, totalizando $106,5 \pm 13,8$ mmolH₂/L ao final do processo. Já sem a suplementação do glicerol foi observando uma produção inferior, obtendo $10,4 \pm 1,2$ mmolH₂/L em 24 h. Lo e colaboradores (2013) reportaram em seu trabalho que o rendimento de hidrogênio obtido a partir do meio contendo apenas glicerol aumentou quando a concentração de glicerol foi de 1 g/L para 10 g/L, enquanto diminuiu ligeiramente quando a concentração de glicerol foi de 20 g/L para 40 g/L.

Com base nos resultados, segundo o estudo estatístico por ANOVA, para um nível de significância de 95%, os resultados de rendimentos de mol de hidrogênio por mol de glicose consumida no tempo de 24h não apresentaram diferença significativa entre o CAB-HE suplementado com 1 g/L ou 5 g/L de glicerol.

Na Figura 22 estão apresentados os perfis dos metabólitos produzidos durante os ensaios de avaliação da suplementação com glicerol nas concentrações de 1 g/L e 5 g/L.

Figura 22 – Metabólitos produzidos por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L, pH inicial 7: a) sem suplementação de glicerol b) Glicerol a 1 g/L; c) Glicerol 5 g/L. Metabólitos: (■) Ácido acético; (●) Ácido fórmico; (▲) Ácido butírico; (▼) Ácido láctico



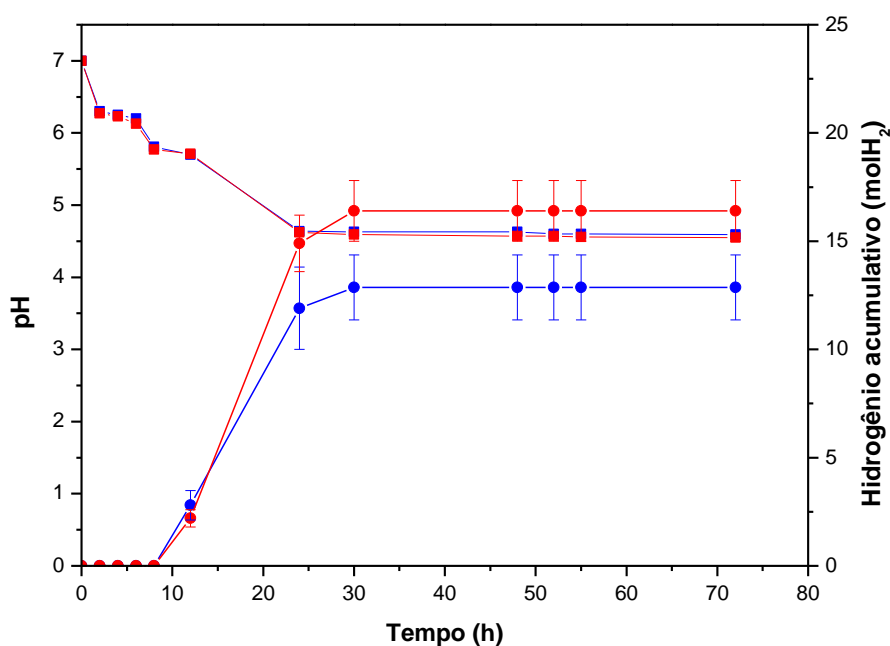
Fonte: própria autora (2024).

Durante os bioprocessos foram produzidos os ácidos butírico, acético fórmico e lático. No ensaio sem adição de glicerol, foi observada a formação dos ácidos acético (3,6 g/L), butírico (2,9 g/L) e fórmico (1,4 g/L) (Figura 22.a). O ácido butírico foi aumentando ao longo das 72 h, obtendo 3,1 g/L deste ácido. Também ocorreu a produção de ácido fórmico (1,6 g/L) e ácido lático (0,7 g/L) usando como meio de cultivo o CAB-HE suplementado com 1 g/L de glicerol (Figura 22.b). No entanto, nos bioprocessos usando o CAB-HE suplementado com 5 g/L de glicerol, obteve-se uma maior concentração dos ácidos, obtendo 4,2 g/L e 1,8 g/L de ácido butírico e fórmico, respectivamente (Figura 22.c).

A formação desses ácidos, que é vinculado com a rota metabólica da *C. butyricum*, acontece esse decréscimo no pH, que interfere na produção de hidrogênio, criando um ambiente desfavorável para as enzimas que catalisam as reações metabólicas.

Na Figura 23 estão apresentados os perfis de pH e hidrogênio acumulativo (mol) produzidos por *C. butyricum* durante os ensaios usando CAB-HE (concentração inicial de glicose de 20 g/L a pH 7) suplementado com 1 g/L ou 5 g/L de glicerol.

Figura 23 – Perfil do pH e da produção acumulativa do hidrogênio (mol) durante o cultivo do *C. butyricum* em hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE - concentração inicial de glicose de 20 g/L a pH 7) conduzido a 35 °C e 100 rpm por 72 h. Perfil de pH: (■) CAB-HE suplementado com 1 g/L glicerol e (■) CAB-HE suplementado com 5 g/L glicerol; Perfil de produção de H₂: (●) CAB-HE suplementado com 1 g/L glicerol e (●) CAB-HE suplementado com 5 g/L glicerol



Fonte: própria autora (2024).

Com a diminuição do pH causada pela produção dos ácidos (Figura 23), a bactéria *C. butyricum* começou a cessar a produção de hidrogênio após 24 h de fermentação. Durante esse período, a produção de hidrogênio acumulativo alcançou $1747,7 \pm 341,7$ mLH₂/L do hidrolisado suplementado com glicerol (1 g/L), e $2226,0 \pm 601,0$ mLH₂/L no hidrolisado com glicerol (5 g/L) (Tabela 6).

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das análises das fases gasosas obtidos dos ensaios da produção de hidrogênio.

Tabela 6 - Resultados da análise das fases gasosas obtidos dos ensaios de produção de hidrogênio por *C. butyricum* a 35 °C e 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o hidrolisado enzimático do bagaço de caju (CAB-HE), com 20 g/L de glicose a pH 7,0, avaliando a suplementação com glicerol

Concentração de glicerol (g/L)	Volume de Biogás (mL)	Porcentagem de H ₂ (%)	Volume de H ₂ (mL)	Rendimento de H ₂ (molH ₂ /mol _{glicose})	Produtividade (mLH ₂ /L.h)
Sem adição	601,3 ± 30,2 ^b	50,7 ± 1,5 ^b	304,8 ± 13,7	1,8 ± 0,1 ^b	70,6 ± 3,0
1	566,0 ± 52,6 ^{a, b}	52,0 ± 11,3 ^{a, b}	343,0 ± 57,0	2,1 ± 0,4 ^{a, b}	72,8 ± 14,2
5	670,0 ± 60,0 ^a	52,4 ± 11,9 ^a	468,7 ± 60,5	3,6 ± 0,9 ^a	92,7 ± 25,0

* Letras diferentes representam diferenças estatísticas com um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$)

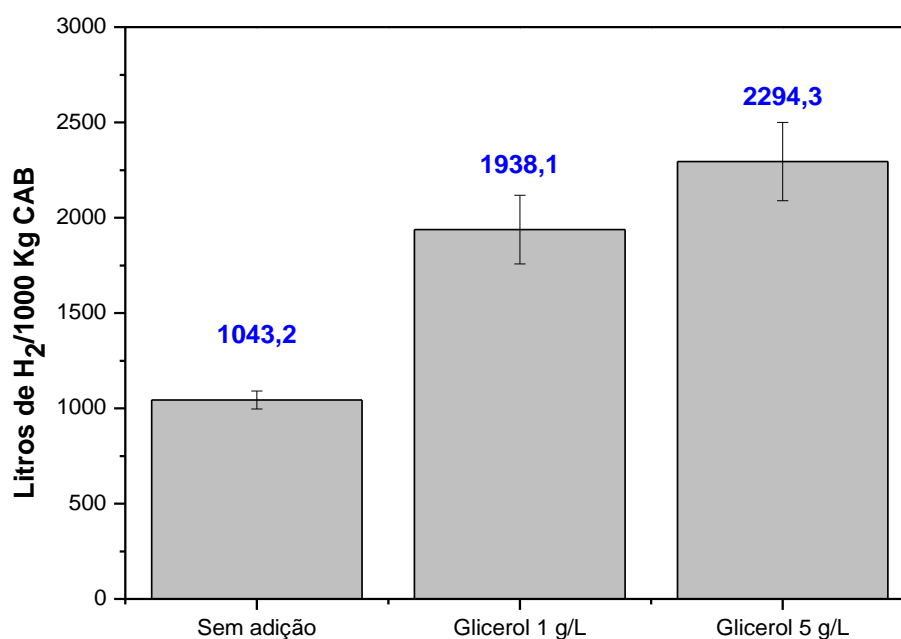
Fonte: própria autora (2024).

O rendimento molar de hidrogênio em 24 h foi de $1,8 \pm 0,1$ molH₂/mol_{glicose}, no hidrolisado a pH 7 sem suplementação, o hidrolisado quando foi suplementado com glicerol (1 g/L) obteve-se $2,1 \pm 0,4$ molH₂/mol_{glicose}, não apresentando diferença significativa. Ao comparar com o hidrolisado suplementado com glicerol (1 e 5 g/L) não teve diferença significativa no rendimento molar de hidrogênio, para o hidrolisado suplementado com glicerol a 1 g/L foi de $2,1 \pm 0,4$ molH₂/mol_{glicose}, e de $3,6 \pm 0,9$ molH₂/mol_{glicose} em CAB-HE suplementado com glicerol 5 g/L, estando de acordo com rendimento máximo teórico relatado na literatura (Chong *et al.*, 2009). Nesse processo pode-se observar que o glicerol atuou como um bioativo no processo para manter o equilíbrio de oxi-redução da célula (Gomes, 2023), fazendo com que a bactéria fique mais viável, suportando o estresse causado pela produção dos ácidos, acético, butírico e lático durante o processo fermentativo.

Na Figura 24 estão apresentados os perfis da produção de hidrogênio que podem ser obtidos a partir de 1000 Kg de bagaço de caju, durante os bioprocessos conduzidos com o

CAB-HE (20g/L de glicose), sem adição de glicerol e suplementado com glicerol nas concentrações de 1 g/L e 5 g/L, a pH 7.

Figura 24 - Perfil da produção de hidrogênio a partir de 1000 Kg de bagaço de caju hidrogênio por *C. butyricum* nos bioprocessos conduzidos a 35 °C, 100 rpm por 72 h, utilizando como meio de cultivo o CAB-HE com concentração inicial de glicose de 20 g/L a pH 7 sem adição de glicerol e suplementado com glicerol 1 g/L e glicerol 5 g/L.



própria autora (2024).

Nas condições operacionais avaliadas, a produção máxima de hidrogênio por L foi obtida no bioprocesso suplementado com glicerol a 5 g/L. Com essa configuração, 1000 kg de CAB resultam na produção de 2294,2 L de hidrogênio, e de 1938,1 L de hidrogênio seria a CAB-HE suplementado com glicerol a 1 g/L e apenas 1043,2 L sem adição de glicerol.

Como base nos resultados obtidos, o glicerol demonstrou ser um bioativo positivo no CAB-HE, favorecendo a produção de biohidrogênio. Em contraste, a L-cisteína que não apresentou um efeito significativo na produção de H₂.

A utilização do glicerol residual proveniente da produção de biodiesel para produzir um vetor energético sustentável, como o hidrogênio e permitindo a possibilidade de aproveitamento energético da biomassa, se apresenta como uma alternativa interessante, pois pode aumentar de forma substancial os ganhos econômicos dos processos e promover a sustentabilidade (Rodrigues, 2016; Sarma *et al* 2012).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o microrganismo *C. butyricum* foi capaz de produzir hidrogênio a partir do hidrolisado enzimático do bagaço de caju, pelo processo fermentativo no escuro em frasco agitado. Dentre as condições avaliadas, nos ensaios avaliando a suplementação com L-cisteína, não foi observada uma diferença significativa na produção de BioH₂ ao utilizar o CAB-HE contendo 10 e 20 g/L de glicose em ambos os pHs avaliados, obtendo $304,8 \pm 13,7$ mL_{H₂} e $301,6 \pm 7,5$ mL_{H₂} em pH 7, com e sem L-cisteína, respectivamente, possivelmente devido à alta concentração avaliada.

No entanto, a maior produção de hidrogênio foi obtida no ensaio usando CAB-HE com 20 g/L de glicose suplementado com glicerol (1 e 5 g/L) a pH 7, obtendo $468,7 \pm 60,5$ mL/L e $343,0 \pm 57,0$ de hidrogênio, correspondendo a um rendimento de $3,6 \pm 0,9$ mol_{H₂}/mol_{glicose} e $2,1 \pm 0,4$ mol_{H₂}/mol_{glicose}, gerando de 2294,2 e 1938,1 Litros de H₂/1000Kg de CAB respectivamente, não apresentando diferença significativa na concentração de glicerol. Além do que, foram produzidos subprodutos de agregado valor comercial como, por exemplo, ácido butílico, que pode ser empregado na indústria alimentícia, ácido acético indústria química, ácido láctico no setor alimentício e farmacêutico e ácido fórmico na indústria têxtil e química.

Essa pesquisa propõe uma estratégia inovadora para implementar a produção de hidrogênio, a partir de biomassa, sendo uma rota de baixo carbono, bastante promissora para o Brasil que é um país com grande potencial agroindustrial, ao mesmo tempo em que oferece uma solução sustentável para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Promovendo a valorização de resíduos e a geração de energia limpa e renovável, estando de acordo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e o conceito de economia circular.

REFERÊNCIAS

- ABO-HASHESH, Mona; HALLENBECK, Patrick C.. Fermentative Hydrogen Production. **Microbial Technologies In Advanced Biofuels Production**, [S.L.], p. 77-92, 12 nov. 2011. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3_5.
- AMORIM, Eduardo Lucena Cavalcante de. **Desempenho de reator anaeróbio de leito fluidificado operado sob condições de aumento progressivo da carga orgânica no tratamento de fenol**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-03052007-114731/>. Acesso em: 05 ago. 2024.
- ARAÚJO, L. G. S. **Produção, caracterização e aplicação de nanocelulose do bagaço de caju**. 2022. 121 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/70047>. Acesso em: 02 ago. 2024.
- ARISTIDOU, Aristos; PENTTILÄ, Merja. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 187-198, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00085-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00085-9).
- AZEVEDO, Luís Henrique Morgado da Cruz. **Síntese e Caracterização de Catalisadores de Pd-Ni Suportados Aplicados na Reforma Oxidativa do Etanol**. 2017. 56 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11422/20440>. Acesso em: 10 jun. 2024.
- AZWAR, M.y.; HUSSAIN, M.A.; ABDUL-WAHAB, A.K.. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 31, p. 158-173, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>.
- BECKERS, Laurent; HILIGSMANN, Serge; HAMILTON, Christopher; MASSET, Julien; THONART, Philippe. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, [S. l.], v. 14, n. S2, p. 541-548, 2010. Disponível em: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6170..> Acesso em: 12 jun. 2024.
- BOUSSARSAR, Houda; ROGÉ, Barbara; MATHLOUTHI, Mohamed. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 100, n. 24, p. 6537-6542, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.019>.
- CAPURSO, T.; STEFANIZZI, M.; TORRESI, M.; CAMPOREALE, S.M.. Perspective of the role of hydrogen in the 21st century energy transition. **Energy Conversion And Management**, [S.L.], v. 251, p. 114898, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114898>.

CHONG, M; RAHIM, R; SHIRAI, Y; HASSAN, M. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 764-771, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.095>.

CHONG, Mei-Ling; SABARATNAM, Vikineswary; SHIRAI, Yoshihito; HASSAN, Mohd Ali. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 3277-3287, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>.

CO 2 Emissions in 2023. [s.l.: s.n.]: IEA, 2023. Disponível em: <<https://iea.blob.core.windows.net/assets/33e2badc-b839-4c18-84ce-f6387b3c008f/CO2Emissionsin2023.pdf>>.

DAS, D; VEZIROGLU, T. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 33, n. 21, p. 6046-6057, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.09>

UNITED NATIONS. *Adoption of the Paris Agreement*. FCCC/CP/2015/L.9/Rev.1, 2015. Disponível em: <<https://undocs.org/Home/Mobile?FinalSymbol=FCCC%2FCP%2F2015%2FL.9%2FRev.1&Language=E&DeviceType=Desktop&LangRequested=False>>. Acesso em: 31 jul. 2024.

FONSECA, Bruna Constante. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de Clostridium beijerinckii**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-01062016-101030/>. Acesso em: 10 jul. 2024.

GOMES NETO, E. H. G. **Fontes de Hidrogênio**. 2021. Disponível em: https://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/celula_combustivel/fontes_de_hidrogenio.html. Acesso em: 30 jun. 2024.

GOMES, F. D. O. A influência da concentração do teor de açúcar na qualidade do mosto cervejeiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil - Volume 3**, p. 13–27, 2023.

GOMES, Fabio de Oliveira. **A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCAR NA QUALIDADE DO MOSTO CERVEJEIRO**. São José do Rio Preto, São Paulo: Científica, 2023.

GIRÃO NETO, Carlos Alberto Chaves; PRASILDE, Isabel Cristina Medeiros; SILVA, Amanda Santos da; SILVA, Lorena Mara Alexandre e; CANUTO, Kirley Marques; FONTENELLE, Raquel Oliveira dos Santos; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; ROCHA, Maria Valdez Ponte. Enzymatic synthesis of citronellyl butyrate by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic cashew apple bagasse lignin. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 131, p. 244-255, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2023.06.025>.

GUPTA, R.B. (Ed.). (2008). *Hydrogen Fuel: Production, Transport, and Storage* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420045772>.

GUO, Xin Mei; TRABLY, Eric; LATRILLE, Eric; CARRÈRE, Hélène; STEYER, Jean-Philippe. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 35, n. 19, p. 10660-10673, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>.

HALLENBECK, P. C. Microbial technologies in advanced biofuels production. In: SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC, NEW YORK. [S. l.: s. n.], 2012

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, Javier Ulises; LIRA, Inty Omar Hernández-De; CRUZ-SANTOS, Mónica María; SAUCEDO-LUEVANOS, Alexia; HERNÁNDEZ-TERÁN, Fernando; BALAGURUSAMY, Nagamani. Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: current state, challenges, and opportunities. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 18, p. 3721, 6 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/app9183721>.

Indicadores IBGE Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola outubro 2023. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2023/estProdAgri_202310.pdf>.

JENOL, Mohd Azwan; IBRAHIM, Mohamad Faizal; YEE, Phang Lai; SALLEH, Madihah Md; ABD-AZIZ, Suraini. Sago Biomass as a Sustainable Source for Biohydrogen Production by *Clostridium butyricum* A1. **Bioresources**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1007-1026, 23 dez. 2013. BioResources. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.9.1.1007-1026>.

JIANG, Dan; FANG, Zhen; CHIN, Siew-Xian; TIAN, Xiao-Fei; SU, Tong-Chao. Biohydrogen Production from Hydrolysates of Selected Tropical Biomass Wastes with *Clostridium Butyricum*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 27205, 2 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27205>.

JUNG, Woonchul; SAVITHRI, Dhanalekshmi; SHARMA-SHIVAPPA, Ratna; KOLAR, Praveen. Effect of Sodium Hydroxide Pretreatment on Lignin Monomeric Components of *Miscanthus × giganteus* and Enzymatic Hydrolysis. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 5891-5900, 28 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-019-00859-8>.

KESKIN, Tugba; ABO-HASHESH, Mona; HALLENBECK, Patrick C.. Photofermentative hydrogen production from wastes. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 18, p. 8557-8568, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.004>.

KIVISTÖ, Anniina; SANTALA, Ville; KARP, Matti. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 38, n. 27, p. 11749-11755, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.06.119>.

LEPAGE, Thibaut; KAMMOUN, Maroua; SCHMETZ, Quentin; RICHEL, Aurore. Biomass-to-hydrogen: a review of main routes production, processes evaluation and techno-economical assessment. **Biomass And Bioenergy**, [S.L.], v. 144, p. 105920, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105920>.

LEVIN, D. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 173-185, fev. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199\(03\)00094-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199(03)00094-6).

LIN, C. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 41-45, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199\(03\)00083-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199(03)00083-1).

LIU, Chien-Hung; CHANG, Chin-Yen; CHENG, Chieh-Lun; LEE, Duu-Jong; CHANG, Jo-Shu. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 37, n. 20, p. 15458-15464, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.076>

LO, Yung-Chung; LU, Wei-Chung; CHEN, Chun-Yen; CHANG, Jo-Shu. Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum* CGS5. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 101, n. 15, p. 5885-5891, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.085>.

LO, Yung-Chung; CHEN, Xue-Jiao; HUANG, Chi-Yu; YUAN, Ying-Jin; CHANG, Jo-Shu. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 38, n. 35, p. 15815-15822, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.083>.

MABUTYANA, Luntu; POTT, Robert Wm.. Photo-fermentative hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 in the presence of inhibitory compounds. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 46, n. 57, p. 29088-29099, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.12.189>.

MARQUES JÚNIOR, José Edvan; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Development of a purification process via crystallization of xylitol produced for bioprocess using a hemicellulosic hydrolysate from the cashew apple bagasse as feedstock. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 713-725, 2 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02480-9>.

MARQUES JUNIOR, José Edvan. **PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE BAGAÇO DE CAJU E SUA UTILIZAÇÃO PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÁCIDO POLILÁTICO**. Tese (Doutorado em engenharia química). Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2023. Acesso em: 20 jun. 2024.

MEYABADI, Tayebbeh Fattahi; DADASHIAN, Fatemeh; SADEGHI, Gity Mir Mohamad; ASL, Hamid Ebrahimi Zanjani. Spherical cellulose nanoparticles preparation from waste cotton using a green method. **Powder Technology**, [S.L.], v. 261, p. 232-240, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.04.039>.

NORTEZ, Kendrick B.; MOVILLON, Jovita L.; ALFAFARA, Catalino G.; SEVILLANASTOR, Janice B.; VENTURA, Ruby Lynn G.; VENTURA, Jey-R S.. Optimization of photofermentative biohydrogen production in a mixed volatile fatty acid medium by

Rhodobacter sp. MAY2: a response surface methodology (rsm) approach. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 56, p. 844-852, fev. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.12.270>.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G.. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: a review. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 21-39, 4 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>.

ORTIGUEIRA, Joana; MARTINS, Luís; PACHECO, Marta; SILVA, Carla; MOURA, Patrícia. Improving the non-sterile food waste bioconversion to hydrogen by microwave pretreatment and bioaugmentation with *Clostridium butyricum*. **Waste Management**, [S.L.], v. 88, p. 226-235, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.021>.

ORTIGUEIRA, Joana; PINTO, Tiago; GOUVEIA, Luísa; MOURA, Patrícia. Production and storage of biohydrogen during sequential batch fermentation of *Spirogyra* hydrolyzate by *Clostridium butyricum*. **Energy**, [S.L.], v. 88, p. 528-536, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2015.05.070>.

PATTRA, Sakchai; LAY, Chyi-How; LIN, Chiu-Yue; O-THONG, Sompong; REUNGSANG, Alissara. Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 36, n. 14, p. 8697-8703, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.120>.

PATTRA, Sakchai; SANGYOKA, Suksaman; BOONMEE, Mallika; REUNGSANG, Alissara. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 33, n. 19, p. 5256-5265, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.008>.

PLANGKLANG, Pensri; REUNGSANG, Alissara; PATTRA, Sakchai. Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 37, n. 20, p. 15525-15532, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.186>.

RAMPRAKASH, Balasubramani; LINDBLAD, Peter; EATON-RYE, Julian J.; INCHAROENSAKDI, Aran. Current strategies and future perspectives in biological hydrogen production: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 168, p. 112773, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2022.112773>.

RIBEIRO, Jaqueline Cardoso. **Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum**. 2022. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-06092022-154559/en.php>. Acesso em: 05 out. 2024.

RIBEIRO FILHO, Sérgio da Silva. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da produção de hidrogênio verde com ênfase no processo de fermentação anaeróbia**. 2022. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de

Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022. Acesso em: 02 out. 2024.

ROCHA, Maria Valderez Ponte; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; MELO, Vania M. M.; GONÇALVES, Luciana R. B.; MACEDO, Gorete Ribeiro de. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 1099-1107, 30 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0889-0>.

RODRIGUES, Caroline Varella. **Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, 2016. Acesso em: 20 out. 2024.

ROMÃO, Betânia Braz. Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio por fermentação escura. 2015. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2015.62>. Acesso em: 12 out. 2024.

SÁ, Lívian R. Vasconcelos de; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S.. HYDROGEN PRODUCTION BY ANAEROBIC FERMENTATION - GENERAL ASPECTS AND POSSIBILITY OF USING BRAZILIAN AGRO-INDUSTRIAL WASTES. **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>.

SANTOS, Fernando Miguel Soares Mamede dos; SANTOS, Fernando António Castilho Mamede dos. Quot. **Millenium - Journal of Education, Technologies, and Health**, n. 31, p. 252-270, fev. 2016. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/millenium/article/view/8428>. Acesso em: 26 maio 2025.

SARMA, Saurabh Jyoti; BRAR, Satinder Kaur; SYDNEY, Eduardo Bittencourt; BIHAN, Yann Le; BUELNA, Gerardo; SOCCOL, Carlos Ricardo. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 6473-6490, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.050>.

SERPA, Juliana de França; MATIAS, Gabriel Ab; FECHINE, Pierre Ba; COSTA, Victor M da; FREIRE, Rafael M; DENARDIN, Juliano C; GONÇALVES, Luciana Rb; MACEDO, André C de; ROCHA, Maria Vp. New nanocomposite made of cashew apple bagasse lignin and Fe₃O₄ for immobilizing of lipase B from *Candida antarctica* aiming at esterification. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.L.], v. 96, n. 9, p. 2472-2487, 5 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.6770>.

SHUBA, Eyasu Shumbulo; KIFLE, Demeke. Microalgae to biofuels: “promising” alternative and renewable energy, review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 81, p. 743-755, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042>.

SILVA, J.s.; MENDES, J.s.; CORREIA, J.A.C.; ROCHA, M.V.P.; MICOLI, L.. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 286, p. 71-78, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.004>.

SINGH, Renu; POOJA, L. R.; TOMER, Ritu; SHUKLA, Ashish. Current State of the Art of Lignocellulosic Biomass: future biofuels. **Clean Energy Production Technologies**, [S.L.], p. 1-17, 2022. Springer Nature Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-16-4509-9_1.

SINHA, Pallavi; PANDEY, Anjana. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 36, n. 13, p. 7460-7478, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>.

TAI, Jung; ADAV, Sunil S.; SU, Ay; LEE, Duu-Jong. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 35, n. 24, p. 13345-13349, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.111>.

UMUNNAWUIKE, Chika; MAHAT, Siti Qurratu' Aini; NWAICHI, Peter Ikechukwu; MONEY, Barima; AGI, Augustine. Biohydrogen production for sustainable energy transition: a bibliometric and systematic review of the reaction mechanisms, challenges, knowledge gaps and emerging trends. **Biomass And Bioenergy**, [S.L.], v. 188, p. 107345, set. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107345>

WANG, Bing; LI, Yongfeng; REN, Nanqi. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 4361-4367, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.120>.

VENDRUSCOLO, Francielo. Starch: a potential substrate for biohydrogen production. **International Journal Of Energy Research**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 293-302, 5 jul. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1002/er.3224>.

VON ZUBEN, Theodora; MOREIRA, Daniel; GERMSCHIEDT, Rafael; YOSHIMURA, Rafael; DORRETTO, Daniel; ARAUJO, Ana de; SALLES JUNIOR, Airton; BONACIN, Juliano. Is Hydrogen Indispensable for a Sustainable World? A Review of H₂ Applications and Perspectives for the Next Years. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 824-843, 2022. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20220026>.

WANG, Jianlong; YIN, Yanan. *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: an overview. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 46, n. 70, p. 34599-34625, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052>.

WOODWARD, Jonathan; ORR, Mark; CORDRAY, Kimberley; GREENBAUM, Elias. Enzymatic production of biohydrogen. **Nature**, [S.L.], v. 405, n. 6790, p. 1014-1015, jun. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35016633>.

YIN, Yanan; WANG, Jianlong. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 42, n. 17, p. 12173-12180, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.083>.

YUAN, Zhuliang; YANG, Haijun; ZHI, Xiaohua; SHEN, Jianquan. Enhancement effect of l-cysteine on dark fermentative hydrogen production. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [S.L.], v. 33, n. 22, p. 6535-6540, nov. 2008. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.065>.