



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



LARISSA DESORDI BORTOLI

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FOTOFERMENTAÇÃO
EMPREGANDO DIODOS EMISSORES DE LUZ VISÍVEL E
INFRAVERMELHA PRÓXIMA**

UBERLÂNDIA/MG

2024

LARISSA DESORDI BORTOLI

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FOTOFERMENTAÇÃO
EMPREGANDO DIODOS EMISSORES DE LUZ VISÍVEL E
INFRAVERMELHA PRÓXIMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, atendendo ao requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam Maria de Resende

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vicelma Luiz Cardoso

UBERLÂNDIA/MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B739 2024	Bortoli, Larissa Desordi, 1988- Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando diodos emissores de luz visível e infravermelha próxima [recurso eletrônico] / Larissa Desordi Bortoli. - 2024. Orientadora: Miriam Maria de Resende. Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.610 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Engenharia química. I. Resende, Miriam Maria de, 1971-, (Orient.). II. Cardoso, Vicelma Luiz, 1960-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título. CDU: 66.0
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG,
CEP 38400-902

Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 7/2024, PPGEQ				
Data:	23 de agosto de 2024	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula da Discente:	12023EQU004				
Nome da Discente:	Larissa Desordi Bortoli				
Título do Trabalho:	Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando diodos emissores de luz visível e infravermelha próxima				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Produção de biohidrogênio e de bioóleo				
ODS-ONU:	ODS 7 - Energia Limpa e Acessível				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Diego Andrade Lemos - DEQ/UFSCar, Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim - PPGRHS/UFAL, Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU, Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU, Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU, coorientadora, e Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Prof^a Dr^a Miriam Maria de Resende, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, a presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente

ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Andrade Lemos, Usuário Externo**, em 23/08/2024, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, Usuário Externo**, em 23/08/2024, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/08/2024, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5631842** e o código CRC **4E17D2B6**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Gladis e Claudio, e minha irmã Laura, que, mesmo com a barreira geográfica, sempre se fizeram presentes, com apoio, incentivo, confiança e amor incondicional.

Aos meus familiares, em especial aos meus avós, por todo o apoio, carinho e compreensão pela minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

À Luana, que esteve comigo durante a realização desse trabalho, obrigada pelo carinho, pelo apoio e pela paciência.

Às minhas orientadoras, professora Dr^a. Miriam Maria de Resende que sempre esteve disponível e é um exemplo de dedicação nos laboratórios do NUCBIO, auxiliando e transmitindo o conhecimento sobre o uso dos equipamentos. Agradeço a confiança e paciência. Prof^a. Dr^a. Vicelma Luís Cardoso, por todo apoio, disponibilidade, ensinamentos e conselhos. Levarei comigo sempre, essa sua energia e entusiasmo.

À professora Dr^a. Fabiana Regina Xavier Batista, pela competência, direcionamento e disponibilidade.

Aos colegas do NUCBIO, pelo companheirismo, momentos de descontração, apoio e conhecimentos compartilhados. A jornada foi mais leve com vocês, minha eterna gratidão.

Aos membros da banca examinadora de qualificação por prontamente aceitarem contribuir com o presente trabalho.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial, ao Ulysses.

Ao Técnico em Eletrônica da Faculdade de Engenharia Elétrica da UFU, Hermano, gratidão pelo auxílio.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pela oportunidade de fazer parte dessa instituição.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

O biohidrogênio é considerado o combustível versátil do futuro, com a capacidade de substituir os combustíveis fósseis em diversos setores industriais e comerciais. Entre as várias opções disponíveis para a geração de biohidrogênio, a fotofermentação destaca-se como uma das abordagens mais atraentes devido à versatilidade no uso de matérias-primas, que incluem resíduos industriais e agrícolas, à economia de custos e aos baixos impactos ambientais. No entanto, uma utilização eficiente da luz na produção de hidrogênio fotofermentativo continua sendo o principal desafio para tornar esse processo biológico promissor uma tecnologia industrial viável. Neste estudo, foi avaliada a produção de biohidrogênio por fotofermentação com diodos emissores de luz (LEDs) em diferentes faixas do espectro eletromagnético (visível e infravermelho próximo), empregando as bactérias fotossintetizantes *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*. As fontes de carbono utilizadas foram glicose e glicerol de padrão analítico, ambas na concentração de 10 g/L. A iluminação no espectro visível foi fornecida por LEDs de luz branca fria e no espectro infravermelho próximo (NIR) por LEDs no comprimento de onda de 850 nm. Os ensaios foram conduzidos em reatores de 50 mL (escala reduzida) e em reator de tanque agitado de 1,5 L (escala ampliada). Em escala reduzida, o experimento com a bactéria PNS *R. rubrum* inoculada em meio contendo glicose como substrato e sob iluminação simultânea do Sistema LED – Luz branca fria e NIR, mostrou-se o mais promissor. Os valores máximos de produtividade e conversão obtidos foram de 39,67 mmol H₂/L.dia e 9,46 mol H₂/mol de glicose consumida, respectivamente. A produtividade aumentou em mais de 3000% quando comparada à iluminação fornecida exclusivamente pelo LED NIR. Além disso, a conversão obtida foi de alto rendimento, correspondente a aproximadamente 80% da conversão teórica máxima. Em comparação a glicose como substrato, os resultados obtidos quando o glicerol foi empregado apresentaram uma queda substancial. No entanto, a produção de biohidrogênio se demonstrou possível e, em particular, destacou-se quando conduzida com a cepa *R. rubrum* sob iluminação NIR. A produtividade máxima obtida foi de 5,71 ± 0,3 mmol H₂/L.dia e a conversão de 3,14 ± 0,08 mol H₂/mol de glicerol consumido. Em escala ampliada, foi avaliado o efeito da concentração celular inicial (1 e 0,5 g/L), replicando as condições de iluminação e substrato do ensaio que apresentou melhor desempenho em escala reduzida. Nesta configuração, a maior produção de hidrogênio foi promovida pela bactéria *R. rubrum* na concentração de 1 g/L, atingindo um valor máximo de produtividade de 78,36 mmol H₂/L.dia. Com a concentração inicial de 0,5 g/L, as produtividades máximas obtidas foram de 4,17 e 31,8 mmol H₂/L.dia para as bactérias *R. rubrum* e *R. capsulatus*, respectivamente.

Palavras-chave: Biohidrogênio. Fotofermentação. *Rhodobacter capsulatus*. *Rhodospirillum rubrum*. LEDs. Infravermelho próximo. Glicerol.

ABSTRACT

Biohydrogen is considered the versatile fuel of the future, with the potential to replace fossil fuels in several industrial and commercial sectors. Among the options available for biohydrogen generation, photofermentation is one of the most attractive approaches due to its versatility in using raw materials, including industrial and agricultural residues, cost-effectiveness, and low environmental impact. However, efficient use of light in photofermentative hydrogen production remains a significant challenge to make this promising biological process a viable industrial technology. In the current work, biohydrogen production was evaluated through photofermentation using light-emitting diodes (LEDs) in different ranges of the electromagnetic spectrum (visible and near-infrared), employing the photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodospirillum rubrum*. The carbon sources used were glucose and glycerol of analytical grade, both at a concentration of 10 g/L. Illumination in the visible spectrum was provided by cold white LEDs and in the near-infrared spectrum (NIR) by LEDs at a wavelength of 850 nm. The experiments were conducted in 50 mL reactors (small-scale) and a 1.5 L stirred-tank reactor (large-scale). In the small-scale experiments, promising results were obtained with the photosynthetic bacterium *R. rubrum* inoculated in a medium containing glucose as a substrate and under simultaneous illumination of the LED system - cool white and NIR light. The maximum values for productivity and conversion were 39.67 mmol H₂/L.d and 9.46 mol H₂/mol of glucose consumed, respectively. Productivity increased by over 3,000% compared to the illumination provided exclusively by NIR LED. Furthermore, the obtained conversion was highly efficient, corresponding to approximately 80% of the theoretical maximum conversion. When glycerol was used as a substrate, there was a substantial drop in results. However, biohydrogen production proved feasible, particularly standing out when conducted with the *R. rubrum* strain under NIR illumination. The maximum productivity obtained was 5.71 ± 0,3 mmol H₂/L.d, with a conversion of 3.14 ± 0,08 mol H₂/mol of glycerol consumed. On an enlarged scale, the effect of the initial cell concentration (1 and 0.5 g/L) was evaluated, replicating the lighting and substrate conditions of the assay that showed the best performance on a reduced scale. In this configuration, the highest hydrogen production was promoted by the bacterium *R. rubrum* at a concentration of 1 g/L, reaching a maximum productivity value of 78.36 mmol H₂/L.d. With an initial concentration of 0.5 g/L, the maximum productivities obtained were 4.17 and 31.8 mmol H₂/L.d for the bacteria *R. rubrum* and *R. capsulatus*, respectively.

Keywords: Biohydrogen. Photofermentation. *Rhodobacter capsulatus*. *Rhodospirillum rubrum*. LEDs. Near-Infrared. Glycerol.

Lista de Abreviaturas

Acetil-CoA	Acetilcoenzima
AGV	Ácidos graxos voláteis
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BChls	Bacterioclorofilas
BEN	Balanço Energético Nacional
C/N	Razão Carbono Nitrogênio
DHA	Dihidroxiacetona
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
Fd	Ferredoxina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAD⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido I
NADPH₂	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido II
NIR	<i>Near-Infrared</i>
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PD	Propanodiol
pH	Potencial hidrogeniônico
PNS	Púrpuras não sulfurosas
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
RCV	<i>Reference Change Value</i>
SF	Senado Federal
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico

Lista de Figuras

Figura 1 – Oferta Interna de Energia brasileira 2023 (ano base 2022).	7
Figura 2 – Caminho metabólico envolvido na produção de biohidrogênio e ácidos graxos voláteis a partir de glicose.	13
Figura 3 – Rota de produção de hidrogênio por fotofermentação em bactérias PNS.	16
Figura 4 – Metabolismo do glicerol para produção de produtos de valor agregado. .	21
Figura 5 – Espectro de absorção típico das bactérias PNS. Os máximos de absorção indicados com * são devidos aos carotenoides, enquanto ** indicam os máximos de absorção devido às bacterioclorofilas.	24
Figura 6 – Esquema simplificado das etapas envolvidas na produção de hidrogênio em escala reduzida e ampliada.	26
Figura 7 – Micrografias das bactérias PNS utilizadas neste estudo. (a) <i>Rhodospirillum rubrum</i> DSM 467; (b) <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710.	27
Figura 8 – Unidade experimental dos ensaios de fotofermentação em escala reduzida. (1) lâmpadas LED tubulares - 60 cm, com iluminação branca fria (6500 K); (2) Aparato de apoio com os biorreatores de sacrifício (frascos de penicilina); (3) Sistema de diodos emissores de luz NIR ($\lambda=850$ nm).	31
Figura 9 – Fotofermentação em Escala Ampliada.	33
Figura 10 – Espectro de luz da LED branca fria.	37
Figura 11 – Espectro de luz da LED NIR.	38
Figura 12 – Espectro de luz das fontes combinadas.	38
Figura 13 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para <i>R. capsulatus</i>	40
Figura 14 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para <i>R. rubrum</i>	41
Figura 15 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para <i>R. capsulatus</i>	43
Figura 16 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para <i>R. rubrum</i>	44

Figura 17 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. capsulatus*. 46

Figura 18 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. rubrum*. 47

Figura 19 – Representação gráfica dos principais resultados de produção de hidrogênio fotofermentativo em diferentes arranjos luminosos e com glicose como substrato. (a) Produtividade e (b) Conversão. As letras “a,b,c,d,e” quando repetidas indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de significância..49

Figura 20 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*. 52

Figura 21 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e succínico (◆) para *R. rubrum*. 53

Figura 22 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*. 55

Figura 23 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. rubrum*. 56

Figura 24 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*. 58

Figura 25 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e succínico (◆) para *R. rubrum* 59

Figura 26 – Representação gráfica dos principais resultados de produção de hidrogênio fotofermentativo em diferentes arranjos luminosos e com glicerol como substrato. (a) Produtividade e (b) Conversão. As letras “a,b,c” quando repetidas indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de significância..62

Figura 27 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 13.....69

Figura 28 – Perfil de concentração celular no Ensaio 13. 70

Figura 29 – Perfil no Ensaio 13 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (—) modelo de Gompertz.....	71
Figura 30 – Perfil de pH no Ensaio 13.....	72
Figura 31 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 13: (a) ácido láctico; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico e (e) etanol.....	73
Figura 32 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 14.....	75
Figura 33 – Perfil de concentração celular no Ensaio 14.	76
Figura 34 – Perfil no Ensaio 14 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (—) modelo de Gompertz.....	76
Figura 35 – Perfil de pH no Ensaio 14.....	77
Figura 36 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 14: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e fórmico (▼).....	78
Figura 37 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 15.....	79
Figura 38 – Perfil de concentração celular no Ensaio 15.	80
Figura 39 – Perfil no Ensaio 15 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (—) modelo de Gompertz.....	80
Figura 40 – Perfil de pH no Ensaio 15.....	81
Figura 41 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 15: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e fórmico (◆).....	82
 Figura A.1 – Curva de Calibração da Bactéria <i>Rhodobacter capsulatus</i>	102
Figura A.2 – Curva de Calibração da Bactéria <i>Rhodospirillum rubrum</i>	102

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Métodos de produção de hidrogênio a partir das principais matérias-primas.	8
Tabela 2 – Vantagens da produção de biohidrogênio.	9
Tabela 3 – Vantagens e desvantagens nos diferentes processos de produção de biohidrogênio.	10
Tabela 4 – Composição do meio RCV proposto por Weaver, Wall e Gest (1975). ...	27
Tabela 5 – Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV proposto por Weaver, Wall e Gest (1975).	28
Tabela 6 – Compilado dos ensaios fotofermentativos em reatores de 50 mL.	31
Tabela 7 – Consolidado dos resultados obtidos em escala reduzida empregando a glicose como substrato e diferentes fontes de luz.	48
Tabela 8 – Consolidado dos resultados obtidos em escala reduzida empregando o glicerol como substrato e diferentes fontes de luz.	61
Tabela 9 – Consolidado dos principais resultados obtidos em escala reduzida.	65
Tabela 10 – Principais resultados relacionados à produção de H ₂ por bactérias PNS utilizando diferentes fontes de luz e as fontes de carbono glicose e glicerol.	67
Tabela 11 – Consolidado dos principais resultados obtidos em escala ampliada.	83
Tabela 12 – Principais resultados relacionados à produção de H ₂ por bactérias PNS em escala ampliada obtidos no NUCBIO.	86

Lista de Símbolos

<i>ADP</i>	Molécula adenosina difosfato
<i>ATP</i>	Molécula adenosina trifosfato
<i>CH₃COOH</i> ou <i>C₂H₄O₂</i>	Molécula de ácido acético
<i>CH₃CHOHCOOH</i> ou <i>C₃H₆O₃</i>	Molécula de ácido láctico
<i>C₃H₆O₂</i>	Molécula de ácido propiônico
<i>CH₃CH₂CH₂COOH</i> ou <i>C₄H₈O₂</i>	Molécula de ácido butírico
<i>C_xH_yO_z</i>	Molécula de substrato genérico
<i>C₆H₁₂O₆</i>	Molécula de glicose
<i>C₃H₈O₃</i>	Molécula de glicerol
<i>C₄H₁₀O</i>	Molécula de éter etílico
<i>C₂H₆O</i>	Molécula de etanol
<i>CO₂</i>	Molécula de gás carbônico
<i>e⁻</i>	Elétron
<i>H⁺</i>	Cátion hidrogênio
<i>H₂</i>	Molécula de gás hidrogênio
<i>HCl</i>	Molécula de ácido clorídrico
<i>H₂O</i>	Molécula de água líquida
<i>N₂</i>	Molécula de gás nitrogênio
<i>NaOH</i>	Molécula de hidróxido de sódio
<i>NH₃</i>	Molécula de amônia
<i>O₂</i>	Molécula de gás oxigênio
<i>P_i</i>	Fósforo elementar genérico

SUMÁRIO

RESUMO	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	x
Lista de Símbolos.....	xi
SUMÁRIO.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Geral.....	5
2.2 Específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Panorama energético	6
3.2 Hidrogênio como fonte de energia renovável	7
3.3 Produção biológica de hidrogênio	8
3.3.1 <i>Biofotólise direta</i>	11
3.3.2 <i>Biofotólise Indireta</i>	12
3.3.3 <i>Fermentação escura</i>	12
3.3.4 <i>Fotofermentação</i>	15
3.3.5 <i>Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio</i>	18
3.3.6 <i>Efeito do substrato</i>	20
3.3.7 <i>Efeito da fonte de luz e distribuição espectral</i>	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26

4.1	Microrganismos	26
4.2	Substratos	28
4.3	Fontes de luz	29
4.3.1	<i>Caracterização espectral das fontes de luz</i>	29
4.4	Produção de hidrogênio	30
4.4.1	<i>Produção de H₂ em escala reduzida</i>	30
4.4.2	<i>Produção de H₂ em escala ampliada</i>	32
4.5	Métodos analíticos.....	33
4.5.1	<i>Quantificação do crescimento celular</i>	33
4.5.2	<i>Determinação do pH</i>	34
4.5.3	<i>Quantificação de glicerol, glicose e metabólitos</i>	34
4.5.4	<i>Quantificação de hidrogênio</i>	35
4.5.5	<i>Conversão e produtividade de hidrogênio.....</i>	35
4.5.6	<i>Produção acumulada de hidrogênio</i>	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Especificação dos diodos emissores de luz	37
5.2	Ensaio de produção de H ₂ em escala reduzida	39
5.2.1	<i>Fotofermentações sob diferentes arranjos de iluminação e suplementadas com glicose</i>	39
5.2.2	<i>Fotofermentações sob diferentes arranjos de iluminação e suplementadas com glicerol</i>	51
5.2.3	<i>Considerações gerais</i>	65
5.3	Ensaio de produção de H ₂ em escala ampliada: reator de 1,5 L	69
5.3.1	<i>Ensaio 13: R. rubrum (1 g/L).....</i>	69
5.3.2	<i>Ensaio 14: R. rubrum (0,5 g/L).....</i>	74
5.3.3	<i>Ensaio 15: R. capsulatus (0,5 g/L)</i>	78
5.3.4	<i>Consolidado dos Ensaio de 13 a 15.....</i>	83

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A.....	102

1 INTRODUÇÃO

A dependência global no uso de combustíveis fósseis como principal fonte de energia tem contribuído significativamente para o rápido esgotamento desses recursos. Além disso, as fontes de energias não renováveis têm um impacto negativo no meio ambiente e são uma das principais causas da poluição e do aquecimento global. Neste sentido, nos últimos anos, tem havido um crescente interesse global em desenvolver fontes alternativas de energia verde, visando complementar os combustíveis fósseis não renováveis (JAFARY et al., 2019; MAAROFF et al., 2019).

Entre esses vetores alternativos de energia sustentável, o hidrogênio (H_2) está atraindo considerável atenção dos cientistas e da sociedade devido ao seu potencial. Essa atenção se deve ao fato de o hidrogênio ser considerado uma alternativa de combustível limpo e renovável, uma vez que a única substância produzida durante sua combustão é a água, sem emissão de gases de efeito estufa (TIANG et al., 2020). Além disso, o hidrogênio possui uma alta densidade de energia, variando de 122 a 142 kJ/g, aproximadamente 2,75 vezes maior do que a dos combustíveis de hidrocarbonetos convencionais (KAPDAN; KARGI, 2006). Aliada a essa característica, este gás funciona bem com células de combustível, sendo compatível com os motores de combustão interna existentes. Ademais, o hidrogênio pode ser transformado em outras formas de energia, como calor e eletricidade, tornando-o uma das fontes de energia mais versáteis (SINGH et al., 2015). Atualmente, o hidrogênio é produzido comercialmente principalmente pelos processos de reforma a vapor do metano (62%), gaseificação do carvão (21%) e como subproduto da reforma da nafta em refinarias (16%) (IEA, 2023). No entanto, estes processos são dispendiosos em função das condições operacionais, bem como pela utilização de energia não renovável.

Os processos biológicos, ao contrário dos seus homólogos químicos ou eletroquímicos, são catalisados por microrganismos em um ambiente aquoso à temperatura ambiente e à pressão atmosférica. Além disso, estas técnicas são adequadas para a produção descentralizada de energia em instalações de pequena escala, em locais onde estão disponíveis biomassa ou resíduos, evitando assim custos de energia e transporte (ADESSI; DE PHILIPPIS, 2014). Logo, esses

processos são considerados viáveis para o futuro mercado energético, uma vez que são processos sustentáveis, renováveis e energeticamente eficientes.

O biohidrogênio pode ser produzido a partir de quatro rotas biológicas: (i) fermentação escura, que é realizada por uma ampla gama de bactérias anaeróbias, incluindo *Clostridium sp.*; (ii) biofotólise direta, por microalgas; (iii) biofotólise indireta, por cianobactérias; e (iv) fotofermentação, por bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS).

As rotas fermentativas para a produção de hidrogênio destacam-se como alternativas promissoras aos demais processos biológicos, pela capacidade de utilizar diversas fontes de carbono. Esses substratos variam desde a glicose, um açúcar simples, até ácidos graxos de cadeia curta, álcoois, resíduos lignocelulósicos, águas residuais e efluentes industriais e agrícolas (HITAM; JALIL, 2023; KESKIN; ABOHASHESH; HALLENBECK, 2011). Embora carboidratos como sacarose e glicose sejam amplamente usados como substratos modelo em estudos de produção de hidrogênio fermentativo, devido à sua fácil biodegradabilidade, os subprodutos agroindustriais despontam como uma alternativa em potencial (GHOSH et al., 2017; GUO et al., 2010). Além de promoverem a produção de biohidrogênio, esses subprodutos oferecem uma solução eficiente para o tratamento de resíduos, combinando sustentabilidade com a geração de energia limpa.

Neste contexto, o glicerol como subproduto do processo produtivo de biodiesel pode ser empregado como substrato nos processos fermentativos. O aumento significativo na produção de biodiesel desde 2003 resultou em um excesso de glicerol e desestabilizou o mercado desse componente, levando a uma queda nos preços tanto do glicerol bruto quanto do refinado. Consequentemente, muitos produtores de biodiesel descartam o glicerol como resíduo (JOHNSON; TACONI, 2007). Neste sentido, muitas rotas para explorar o glicerol bruto como matéria-prima barata foram exploradas (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; DE OLIVEIRA, 2012; POSADA; RINCÓN; CARDONA, 2012; YANG; HANNA; SUN, 2012), entre as quais a produção de hidrogênio fotofermentativo empregando a bactéria PNS *Rhodopseudomonas palustris* se destacou (GHOSH; SOBRO; HALLENBECK, 2012; GHOSH; TOURIGNY; HALLENBECK, 2012; POTT; HOWE; DENNIS, 2013; SABOURIN-PROVOST; HALLENBECK, 2009). No entanto, estudos envolvendo a fotofermentação do glicerol

com outras cepas são escassos. O único achado literário com as bactérias *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* foi conduzido sob iluminação fluorescente por Pio et al. (2023) no Núcleo de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

A fotofermentação é um processo que emprega bactérias PNS capazes de converter substratos orgânicos em hidrogênio em condições anaeróbias e sob iluminação. Tal como acontece com todos os processos fotobiológicos, encontrar condições ideais de iluminação ainda é um desafio devido à complexidade dos sistemas biológicos (coleta de fótons por pigmentos e vias reguladoras metabólicas) e do projeto do processo (geometria do reator, escolha de materiais, mistura, etc.) (ADESSI; DE PHILIPPIS, 2014; BASAK et al., 2014).

A utilização de luz artificial na produção de H_2 por bactérias fotossintetizantes visa evitar a interrupção da produção desse gás durante a noite, o que tem se revelado prejudicial à eficiência em biorreatores ao ar livre (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010). Neste sentido, a iluminação artificial fornecida por lâmpadas incandescentes e halógenas tem sido relatada com êxito na produção de hidrogênio (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010). Esses dois tipos de lâmpadas têm espectros de luz semelhantes e sua principal diferença em relação a outras lâmpadas é a emissão do infravermelho próximo (NIR) (780–1100 nm). A este respeito, aproximam-se mais da luz solar natural, que tem um forte componente infravermelho. Como os principais picos de absorção do pigmento bacterioclorofila, responsável pela coloração púrpura, estão entre 800 e 900 nm, a emissão NIR de lâmpadas incandescentes e halógenas tem sido sugerida como o principal fator de promoção da produção de hidrogênio (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010; KRUIJATZ et al., 2015). No entanto, ambas as fontes de luz dissipam muita energia de entrada como calor, o que, além de aumentar o custo energético do processo, pode levar ao superaquecimento da superfície do biorreator, tornando necessária a presença de sistemas de resfriamento (GLEMSER et al., 2016). Por outro lado, os diodos emissores de luz (LEDs) têm sido amplamente divulgados como soluções econômicas, devido à menor dissipação de energia de entrada, a ausência de problemas de superaquecimento e a vida útil prolongada. Além disso, o uso de LED como fonte de luz oferece a oportunidade de

modelar com precisão os comprimentos de onda com potencial de maximizar a produção de hidrogênio.

Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de biohidrogênio das culturas fotossintéticas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* quando expostas a diodos emissores de luz em diferentes faixas do espectro eletromagnético. Além disso, o efeito dos substratos glicerol e glicose, que diferem significativamente em termos de estrutura e metabolismo celular, foi verificado na produção de hidrogênio sob diferentes configurações de iluminação.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a produção biológica de hidrogênio por fotofermentação com diodos emissores de luz em diferentes faixas do espectro eletromagnético, utilizando diferentes fontes de carbono e as bactérias fotossintetizantes *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*.

2.2 Específicos

- i. Investigar a influência da iluminação nos espectros visível (LED branco frio) e infravermelho próximo (NIR, $\lambda=850$ nm), separadamente e concomitantemente, na produção de biohidrogênio;
- ii. Avaliar o potencial produtivo de hidrogênio das culturas puras *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*;
- iii. Verificar o efeito do tipo de fonte de carbono (glicose e glicerol) sobre a produção de hidrogênio fotoinduzida;
- iv. Avaliar a eficiência do uso do sistema batelada alimentada em reator de tanque agitado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama energético

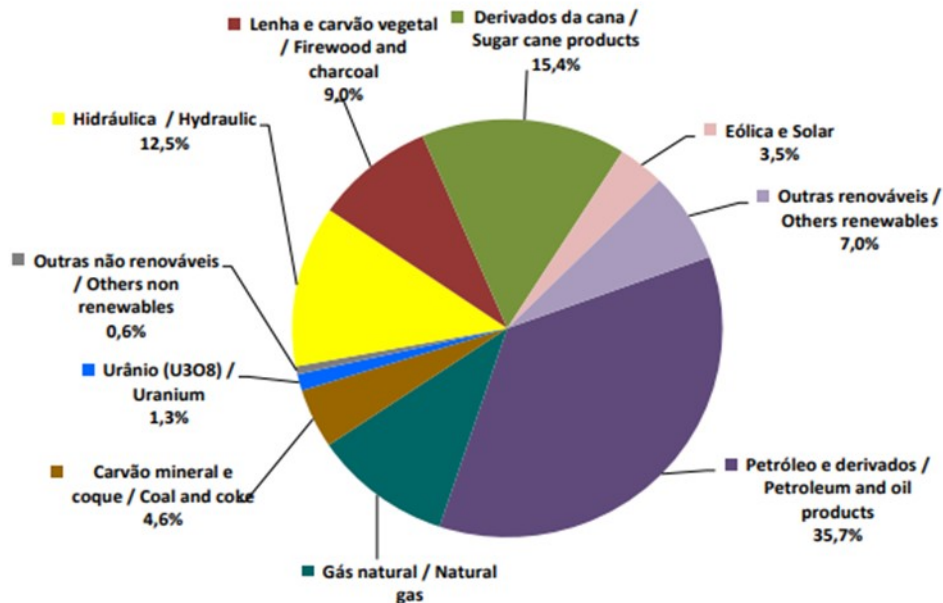
A segurança e a transição energética são as diretrizes que orientam o mercado global de energia na atual conjuntura. A revalorização política da segurança energética, motivada pelo início do conflito entre Ucrânia e Rússia com seus efeitos sobre os preços de petróleo e gás, destaca a importância de se garantir o adequado abastecimento em meio a tensões geopolíticas como a necessidade da Europa em reduzir a dependência dos hidrocarbonetos russos via diversificação de fornecedores. Paralelamente, as mudanças climáticas causadas pelas emissões antropogênicas de gases de efeito estufa reforçam a urgência da transição para um paradigma menos dependente de recursos fósseis. Nesse contexto, é fundamental construir uma economia de baixo carbono, incorporando fontes renováveis, como os biocombustíveis, como parte integral desse movimento em direção à sustentabilidade energética.

Segundo o Balanço Energético de 2023 (BEN, 2023), 47,4% da energia ofertada no Brasil provém de fontes renováveis, enquanto 52,6% ainda são provenientes de fontes não renováveis. Com base nesses dados, é possível afirmar que a matriz energética brasileira é significativamente mais sustentável do que a média global. Em 2021, a proporção mundial era de 15% de fontes renováveis para 85% de fontes não renováveis, segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2023).

Conforme a Figura 1, entre as energias renováveis da matriz energética brasileira destaca-se a biomassa da cana (15,4%), hidráulica (12,5%), lenha e carvão vegetal (9%), lixo e outras (7%), eólica (2,3%) e solar (1,2%) (BEN, 2023).

Para incentivar a transição energética brasileira, o Brasil conta com a Política Nacional dos Biocombustíveis, conhecida como RenovaBio. Desde 2019, as metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis estão em vigor, buscando estimular o crescimento da produção e a ampliação da presença de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país.

Figura 1 – Oferta Interna de Energia brasileira 2023 (ano base 2022).



Fonte: BEN (2023).

Neste contexto, a produção de hidrogênio se desponta como alternativa de descarbonização. O Projeto de Lei 725/2022 propõe a adição de um percentual mínimo de 5% de hidrogênio na rede de gasodutos até 2032, elevando-se para 10% até 2050. Dentro desses percentuais, 60% deve ser hidrogênio sustentável — de fontes energéticas como solar, eólica, biomassa, biogás e hidráulica — no primeiro período. A partir de 2050, a participação do hidrogênio limpo deve atingir 80%. Esse projeto também incorpora o hidrogênio na Lei do Petróleo de 1997 (Lei 9.478) e propõe que este novo combustível seja regulamentado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (SF, 2022).

3.2 Hidrogênio como fonte de energia renovável

Entre os vários combustíveis alternativos limpos, o hidrogênio (H_2) é um combustível verde promissor devido ao seu alto conteúdo energético (122 kJ/g), caráter renovável e emissão de água como subproduto final de sua combustão (PUGAZHENDHI et al., 2019; ZHANG et al., 2020). O gás hidrogênio também é incolor, insípido, inodoro, leve e atóxico. Atualmente, mais de 90% do hidrogênio produzido comercialmente vem da reforma a vapor do metano, gaseificação do carvão

e eletrólise da água (BALACHANDAR et al., 2020). No entanto, esses processos são insustentáveis, altamente intensivos em energia e dependem do uso de reservas de combustíveis fósseis, resultando na emissão de gases de efeito estufa (PUGAZHENDHI et al., 2019; RITTMANN; HERWIG, 2012).

Neste cenário, a produção biológica de hidrogênio surge como uma alternativa atraente no quadro de tecnologias renováveis e sustentáveis. Em comparação com os atuais métodos convencionais de produção comercial, o procedimento de produção de biohidrogênio é uma abordagem promissora para a produção de combustível a partir de recursos de baixo custo, renováveis e ecológicos sob temperatura e pressão ambiente (SILVA, J.S. et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019). A Tabela 1 apresenta as principais matérias-primas e métodos que são utilizados para produção de hidrogênio.

Tabela 1 – Métodos de produção de hidrogênio a partir das principais matérias-primas.

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

Fonte: Souza (2009).

3.3 Produção biológica de hidrogênio

A produção de hidrogênio via processo biológico utiliza a capacidade dos microrganismos (microalgas, cianobactérias, bactérias fotofermentativas ou fermentativas) em transformar matérias-primas em hidrogênio através de processos

foto-sintéticos, fermentativos ou uma combinação de ambos. Embora a quantidade de hidrogênio produzida seja menor em comparação as tecnologias convencionais, a condição operacional é mais branda. Além disso, a tecnologia de obtenção do gás vem evoluindo gradativamente de forma que, no futuro, a produção poderá ser viável sob o ponto de vista econômico. As vantagens da produção de biohidrogênio são listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Vantagens da produção de biohidrogênio.

Vantagens	
Naturalidade	Produzido por microrganismos sob condições ambientais de temperatura e pressão.
Neutralidade	Produção não acarreta a emissão de gases causadores do efeito estufa, desde que o dióxido de carbono seja retido.
Versatilidade	Pode ser produzido a partir de uma grande variedade de substratos, incluindo resíduos agroindustriais.
Garantia de substratos	Certeza da produção contínua de resíduos em grandes quantidades.
Sustentabilidade	Produção e consumo atual não interferem negativamente em processos futuros.
Segurança energética	Redução da dependência energética de países politicamente instáveis.
Acessibilidade	Mais rentável quando comparado aos combustíveis fósseis.
Eficiência	A combustão do H ₂ é 50% mais eficiente do que da gasolina.

Fonte: Adaptado de Das et al. (2014).

Os processos biológicos envolvidos na produção de H_2 podem ser categorizados em dois grupos principais: aqueles dependentes de luz, incluindo a fotofermentação e a biofotólise direta ou indireta, e aqueles que ocorrem na ausência de luz, conhecidos como fermentação escura. Entre esses, a fotofermentação e a fermentação escura têm sido objeto de maior atenção devido aos resultados promissores obtidos (HALLENBECK; GHOSH, 2009; KHETKORN et al., 2017; YANG; WANG, 2017). Existem também os sistemas híbridos, que consistem na combinação de mais de uma rota biológica. Muitos estudos direcionam-se para o sistema híbrido que integra processos fotossintéticos e fermentativos, buscando aumentar os rendimentos totais na produção de hidrogênio. A Tabela 3 resume os processos biológicos, assim como algumas vantagens e desvantagens para a produção de hidrogênio.

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens nos diferentes processos de produção de biohidrogênio.

Processo biológico	Vantagens	Desvantagens
Biofotólise direta	Pode produzir H_2 diretamente da água e da luz solar; Não necessita de ATP;	Requer alta intensidade de luz; Inibição das hidrogenases pelo O_2 ; Requer grandes fotobiorreatores.
Biofotólise indireta	As cianobactérias podem produzir H_2 a partir da água; Capacidade de fixar N_2 da atmosfera.	Necessita de iluminação constante; Necessidade de ATP pelas nitrogenases.
Fotofermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias.	Necessita de iluminação; O_2 tem efeito inibitório sobre a nitrogenase; Baixa eficiência de conversão de luz.
Fermentação escura	A luz não é necessária, economiza energia;	À medida que os rendimentos aumentam, a fermentação de hidrogênio torna-se

Uma variedade de fontes de carbono pode ser usada como substratos; Produz metabólitos valiosos, como ácidos butírico, láctico e acético.

termodinamicamente desfavorável; Baixo rendimento de hidrogênio; Separação necessária dos gases H₂ e CO₂.

Fonte: Adaptado de Das et al. (2014).

3.3.1 Biofotólise direta

No processo de biofotólise direta, os organismos fotoautotróficos convertem moléculas de água em hidrogênio com atividade catalítica da enzima hidrogenase, utilizando energia luminosa sob condições anaeróbicas (TAMAGNINI et al., 2002). As reações gerais são descritas na Equação (1) e na Equação (2).



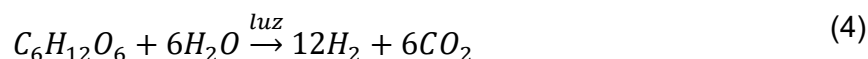
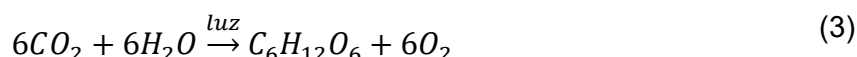
As cianobactérias e as algas verdes pertencem a dois grupos de microrganismos que executam o processo de biofotólise direta. Em ambientes anaeróbios, as algas verdes têm a capacidade de gerar hidrogênio sob iluminação ou absorver hidrogênio por meio do processo de fixação de CO₂ no escuro (KIM; KIM, 2011). Nas últimas décadas, a alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* recebeu grande atenção na produção de moléculas de hidrogênio por este processo (SAKURAI et al., 2013).

Nesta técnica, os fótons capturados da energia luminosa dividem as moléculas de água em prótons (H⁺) e oxigênio por meio do fotossistema II (PS II). Como resultado, elétrons são gerados, e a síntese de ATP ocorre enquanto esses elétrons atravessam a membrana fotossintética que conecta o PS II ao fotossistema I (PS I). Em seguida, os elétrons são transferidos para ferredoxina (Fd) pelo PS I. A Fd

reduzida pode doar elétrons para a [FeFe]-hidrogenase, responsável pela catalisação da produção de hidrogênio em algas verdes, ou reduzir o NADP para NADPH. Este último é então utilizado na fixação de CO₂ através do ciclo de Calvin (MCKINLAY; HARWOOD, 2010).

3.3.2 Biofotólise Indireta

Na produção indireta de hidrogênio por biofotólise, carboidratos como amido e glicogênio se acumulam na etapa de fixação de CO₂, enquanto o O₂ é gerado. Para a produção de hidrogênio, os substratos produzidos na primeira etapa são utilizados como fonte de carbono na etapa seguinte, sob condições anaeróbias (HUESEMANN et al., 2010). A sequência de reações fotoquímicas no processo de biofotólise indireta é apresentada pela Equação (3) e pela Equação (4).



Os organismos mais estudados na biofotólise indireta são as cianobactérias do tipo *Nostoc*, *Anabaema*, *Calothrix* e *Oscillatoria*, devido aos requisitos nutricionais simples e ao maior rendimento de hidrogênio em comparação com as microalgas (JIMÉNEZ-LLANOS et al., 2020).

Além da fixação de CO₂, algumas cianobactérias têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em condições anóxicas, através de células especializadas denominadas de heterocistos (MASUKAWA et al., 2014).

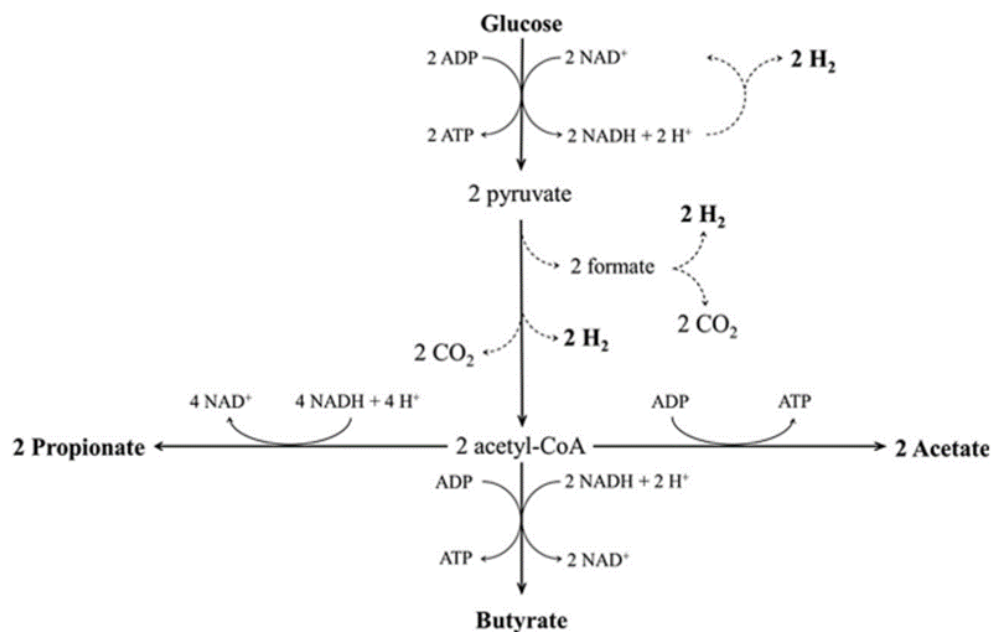
3.3.3 Fermentação escura

Como o próprio termo indica, a fermentação escura é um processo independente de luz. Este processo ocorre em condições anaeróbias e utiliza a decomposição fermentativa bacteriana de inúmeros substratos orgânicos, como resíduos alimentícios, subprodutos agropecuários ou águas residuárias e os transforma em hidrogênio e outros intermediários, tais como ácidos orgânicos voláteis

(ácido láctico, acético, propiônico, butírico) e álcoois, como o etanol (AKROUM-AMROUCHE et al., 2013). Embora uma ampla variedade de microrganismos tenha sido relatada como capaz de produzir biohidrogênio por fermentação escura, as principais categorias incluem as bactérias anaeróbias pertencentes ao gênero *Clostridium* e as bactérias facultativas, como *Enterobacter sp* (PATEL; KUMAR; KALIA, 2012).

Na fermentação escura, o hidrogênio é principalmente produzido como uma forma de os microrganismos reutilizarem elétrons gerados durante a oxidação de compostos orgânicos durante o metabolismo. A produção de hidrogênio pode ocorrer por diferentes vias, sendo influenciada pelas espécies de bactérias envolvidas, pelos substratos utilizados e pelas condições operacionais (LI; FANG, 2007). Usando glicose como substrato modelo (Figura 2), a fermentação escura inicia-se com a glicólise, na qual a glicose é convertida em piruvato.

Figura 2 – Caminho metabólico envolvido na produção de biohidrogênio e ácidos graxos voláteis a partir de glicose.

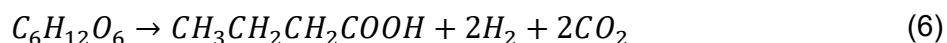
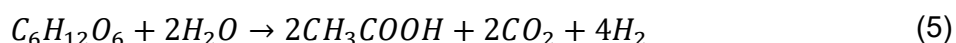


Fonte: Ventura et al. (2023).

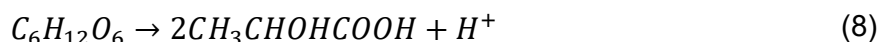
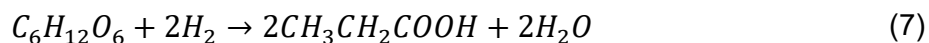
O piruvato é posteriormente oxidado para formar acetil-CoA e CO₂ por meio da piruvato ferredoxina oxidoreductase para gerar ferredoxina reduzida. O hidrogênio é

gerado a partir da ferredoxina reduzida por meio da atividade da enzima hidrogenase (LI; FANG, 2007; ŁUKAJTIS et al., 2018). Além disso, pela atividade da piruvato formiato liase, o piruvato pode sofrer oxidação formando acetil-CoA e formiato. Este último pode ser convertido em hidrogênio e CO₂ na presença de hidrogenase. Simultaneamente, o acetil-CoA gerado é transformado em ácidos graxos voláteis ou álcoois, como acetato e butirato, dependendo do tipo de microrganismo e das condições ambientais (GOPALAKRISHNAN; KHANNA; DAS, 2019).

Segundo Levin et al. (2004) os carboidratos são os substratos preferenciais para produção de hidrogênio, sendo a estimativa do rendimento teórico da fermentação a partir do metabolismo da glicose aceitável como referência. O máximo rendimento teórico é obtido quando há a formação de ácido acético como produto, resultando em quatro mols de hidrogênio por mol de glicose, Equação (5). No entanto, o rendimento real da produção de hidrogênio é inferior ao rendimento teórico devido ao consumo de uma parte da glicose pelo microrganismo para crescimento e manutenção, além da produção de ácidos graxos voláteis (AGV) (ARGUN; KARGI, 2011; ZHAO; CHEN, 2011). Quando o produto final é o ácido butírico, o rendimento será dois mols de hidrogênio por mol de glicose, Equação (6) (SAADY, 2013).



A produção de ácido propiônico ou láctico ao final do processo desfavorecem o rendimento de hidrogênio, conforme mostram as Equações (7) e (8) (SAADY, 2013):



O hidrogênio pode ser consumido em duas formas: como equivalente redutor (NADH₂) e como hidrogênio molecular. As bioreações que produzem ácidos graxos voláteis, como lactato e propionato consomem NADH₂ como doador de elétrons (RODRÍGUEZ et al., 2009). O consumo de NADH₂ impede a formação de ferredoxina

reduzida e formiato, que levam à formação de H_2 (LEE; SALERNO; RITTMANN, 2008).

Devido à não dependência da luz para a produção de hidrogênio, a fermentação escura apresenta diversas vantagens, incluindo a possibilidade de produção contínua de hidrogênio, menor consumo de energia, além de oferecer maior facilidade de aumento de escala e controle. No entanto, essa técnica apresenta menor rendimento de hidrogênio e uma eficiência do processo reduzida. A diminuição da eficiência do processo pode ser atribuída ao fato de que a fermentação está associada à produção de diversos subprodutos ricos em energia, como álcoois e ácidos orgânicos (LEE; SALERNO; RITTMANN, 2008).

3.3.4 Fotofermentação

O processo de fotofermentação ocorre em condições anaeróbicas e envolve a conversão fermentativa de substratos orgânicos em moléculas menores (H_2 e CO_2) por bactérias fotossintéticas (HUANG et al., 2020). Esses organismos usam luz como fonte de energia e matéria orgânica como fonte de carbono e elétrons. Na fotofermentação, o biohidrogênio é produzido durante a decomposição de compostos orgânicos na presença de energia luminosa por micróbios fotossintéticos (PUTATUNDA et al., 2023).

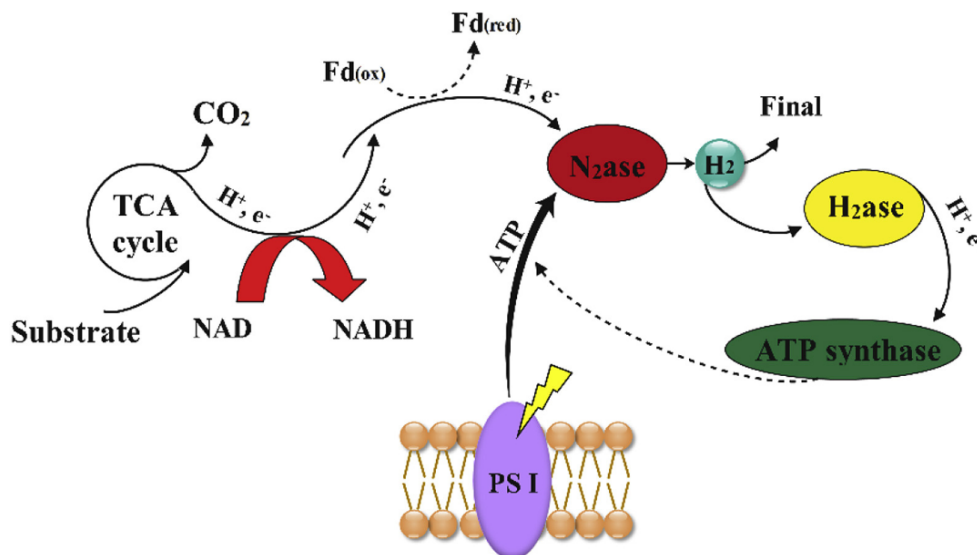
Essa técnica está ganhando cada vez mais destaque devido à sua alta eficiência, ao fato de ser ecologicamente correta e ao potencial para produção de hidrogênio em larga escala à temperatura e pressão ambiente (HITAM; JALIL, 2023). Esta abordagem também permite o uso de uma ampla gama de materiais orgânicos, incluindo águas residuais, efluentes industriais e resíduos lignocelulósicos como substrato para o crescimento microbiano. Isso não apenas leva à produção de biohidrogênio, mas também oferece uma solução para o tratamento de resíduos (BATISTA et al., 2015; LAKATOS et al., 2014).

A fotofermentação é realizada utilizando a ação catalítica de duas enzimas, a nitrogenase e a hidrogenase, através do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA). O desempenho do ciclo TCA na produção de hidrogênio é altamente dependente da

atividade da nitrogenase, uma vez que rotas alternativas podem ser seguidas em caso de repressão desta enzima (GHOSH et al., 2017).

A Figura 3 ilustra a via de produção de hidrogênio em bactérias PNS. Inicialmente, o substrato de carbono é oxidado em CO_2 , H^+ e elétrons por meio do ciclo TCA. Em seguida, os elétrons gerados são transferidos para a nitrogenase, utilizando o dinucleotídeo nicotinamida adenina (NAD) e a ferredoxina (Fd) como transportadores de elétrons. Ao mesmo tempo, o ATP necessário para a atividade catalítica da nitrogenase é fornecido pelo fotossistema I (PS I) utilizando a energia luminosa, e é fornecido pela ação da ATP-sintase. Finalmente, a nitrogenase reduz os prótons a hidrogênio. Por outro lado, a hidrogenase funciona principalmente na direção do consumo de H_2 , consumindo gás hidrogênio e gerando prótons e elétrons para a ATP-sintase (AKHLAGHI; NAJAFPOUR-DARZI, 2020). Assim, a produção total de H_2 é determinada pelo equilíbrio entre o H_2 produzido pela nitrogenase e o H_2 consumido pela hidrogenase.

Figura 3 – Rota de produção de hidrogênio por fotofermentação em bactérias PNS.

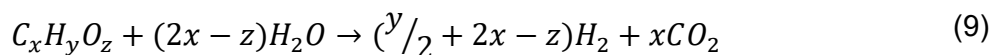


Fonte: Akhlaghi e Najafpour-darzi (2020).

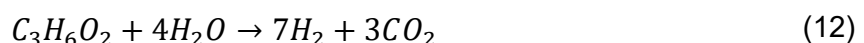
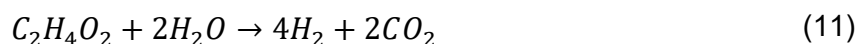
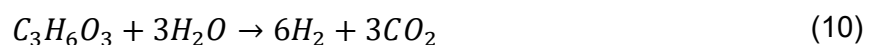
3.3.4.1 Organismos fotossintéticos

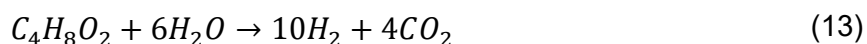
Uma categoria importante de microrganismos fotofermentativos comumente utilizados para a produção fotofermentativa de biohidrogênio inclui as bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS). As bactérias PNS mostram um alto nível de flexibilidade metabólica, sendo capazes de crescer de forma fotoheterotrófica, fotoautotrófica ou quimioheterotrófica (BASAK; DAS, 2007). O modo fotoheterotrófico é preferencial para o crescimento dessas bactérias e evolução de hidrogênio. Em condições fotoheterotróficas, compostos orgânicos e luz são utilizados como fontes de carbono e energia para o crescimento destes microrganismos e produção de hidrogênio, respectivamente (AKHLAGHI; NAJAFPOUR-DARZI, 2020).

As principais bactérias PNS relatadas como capazes de produzir H_2 por fotofermentação incluem *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Rhodopseudomonas faecalis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter sulfidophilus* e *Rhodobacter capsulatus* (MAHATA; RAY; DAS, 2020). Embora a literatura destaque o uso de ácidos graxos voláteis (ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, etc.) como substratos, as espécies fotossintéticas são também capazes de converter açúcares simples e complexos (glicose, sacarose etc.), resíduos lignocelulósicos (como palha de arroz) e águas residuais (HUANG et al., 2020; KUMAR et al., 2019). De acordo com Loss et al. (2012) a Equação (9) apresenta o rendimento teórico quando todo o substrato consumido é utilizado unicamente para a produção de hidrogênio.



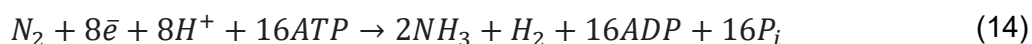
A partir da Equação (9), os rendimentos teóricos para o consumo dos ácidos orgânicos láctico, acético, propiônico e butírico são apresentados respectivamente nas Equações (10) a (13):





É importante ressaltar que, por serem reações teóricas não consideram a utilização do substrato para o crescimento nem os fatores limitantes que ocorrem em uma cultura. Logo, é esperado um rendimento real de produção de hidrogênio inferior ao rendimento teórico.

Como visto anteriormente, as bactérias PNS produzem hidrogênio devido à presença da enzima nitrogenase. Este processo ocorre em condições deficientes de oxigênio, utilizando a energia da luz e algum substrato. De acordo com a Eq. (14) na presença de N_2 , a nitrogenase catalisa a reação de fixação de nitrogênio, resultando na geração de hidrogênio como subproduto. Além disso, é liberada amônia que tem efeitos inibitórios no desempenho da nitrogenase (GHOSH et al., 2017).



Na ausência de N_2 , a nitrogenase altera seu metabolismo catalítico de fixação de nitrogênio para a Eq. (15). Através desta reação, quatro moléculas de hidrogênio são geradas (GHOSH et al., 2017).



Embora uma grande quantidade de energia intracelular (ATP) seja necessária para ambas as reações acima, sob condições de deficiência de nitrogênio, todos os prótons podem ser convertidos no produto preferencial (WU et al., 2012).

3.3.5 Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio

Diversos parâmetros podem influenciar a produção biológica de hidrogênio. Dentre esses parâmetros, destaca-se: a fonte de nitrogênio e proporção C/N, idade do inóculo, pH, temperatura, configuração do biorreator, intensidade da luz, fonte de luz e substrato.

Determinar as fontes de nitrogênio mais adequadas, juntamente com as concentrações ideais, é crucial para a melhoria do processo de fotofermentação, já que a produção de hidrogênio é majoritariamente contribuída pela nitrogenase (BASAK et al., 2014; HAY et al., 2013). Em diversos estudos com diferentes cepas PNS, o glutamato tem sido identificado como a melhor fonte de nitrogênio (BASAK et al., 2014; LAOCHAROEN; REUNGSANG, 2014; TAO et al., 2008). A concentração das fontes de nitrogênio também é essencial, pois um excesso dessas fontes pode levar ao acúmulo de amônia, o que inibirá a produção de hidrogênio (HILLMER; GEST, 1977; KOKU et al., 2002). A relação C/N ideal também varia com as diferentes fontes de nitrogênio. Uma relação C/N tão alta quanto 30:1 (mol/mol) é ideal quando se usa sulfato de amônio, enquanto, ao empregar glutamato essa relação reduz para 13:1 (mol/mol) (PANDEY; SRIVASTAVA; SINHA, 2012).

O inóculo das bactérias PNS na fase exponencial da curva de crescimento parece ser o mais adequado para um maior rendimento na produção de H₂. Em contraste, o inóculo envelhecido, com um longo tempo de retenção no meio de crescimento durante a fase de pré-cultura, resulta em baixo desempenho na produção de hidrogênio fotofermentativo (KOKU et al., 2002). O grande tempo de retenção no meio de crescimento pode direcionar as vias metabólicas para outras vias além da produção de H₂, como a produção de poli-b-hidroxibutirato (OOSHIMA et al., 1998).

O pH desempenha um papel importante na regulação do metabolismo das bactérias PNS, uma vez que afeta muito as atividades enzimáticas. A nitrogenase, por exemplo, é ótima em 7,1–7,3 para *A. vinelandii* (KOKU et al., 2002). Para um processo descontínuo sem controle de pH, o pH inicial pode ser otimizado para a maior produtividade de hidrogênio (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG, 2015; LAOCHAROEN; REUNGSANG, 2014; TAO et al., 2008). Em trabalhos anteriores, o pH ideal está entre 6,5 e 7,5 (LAZARO; VARESCHE; SILVA, 2015; NATH; DAS, 2009; TAO et al., 2008).

A temperatura afeta as vias metabólicas da taxa de crescimento do microrganismo, a taxa de hidrólise do substrato e a taxa de produção de hidrogênio. Além disso, a temperatura, juntamente com o pH, está entre os fatores que mais regulam o desempenho das enzimas, particularmente a nitrogenase, que é ideal a 30°C (KOKU et al., 2002). Portanto, a maioria das cepas isoladas de PNS relatadas

na produção de hidrogênio são mesofílicas, com melhor desempenho na faixa de temperatura de 25 a 35 °C (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG, 2015; CHEN, Xin et al., 2017).

A intensidade da luz é um fator importante que afeta a fotofermentação. O aumento da intensidade da luz, até certo ponto, geralmente resulta no aumento da produção de hidrogênio, mas após esse ponto ocorre a fotoinibição. Vale ressaltar que águas residuais têm diferentes graus de transparência e, portanto, podem exigir diferentes intensidades de iluminação para uma produção ideal de hidrogênio. Compostos absorventes de luz ou turbidez reduzirão a penetração da luz e, portanto, reduzirão a eficiência de conversão da luz (KESKIN; ABO-HASHESH; HALLENBECK, 2011).

Os fotobiorreatores para produção de biohidrogênio devem ser sistemas fechados, devido à necessidade de manter condições anaeróbias e evitar a dispersão do gás H₂. Devem ter uma elevada relação superfície iluminada/volume e um sistema de mistura eficiente para permitir que as células sejam iluminadas tão uniformemente quanto possível; eles também precisam de um sistema de troca gasosa satisfatório para remover o H₂ produzido e, possivelmente, de um controle de temperatura (ADESSI; DE PHILIPPIS, 2014).

3.3.6 Efeito do substrato

Um dos fatores cruciais na obtenção sustentável de biocombustíveis reside no uso de uma fonte confiável de carbono. Os benefícios de um processo sustentável, caracterizado por alta eficiência, baixo custo e reduzida poluição ambiental, estão intrinsecamente ligados à escolha de uma matéria-prima adequada (NAJAFPOUR, 2015). Na fotofermentação, a taxa de crescimento das bactérias PNS, a eficiência de conversão do substrato e a taxa de produção de hidrogênio variam significativamente com o tipo de substrato de carbono escolhido (GHOSH et al., 2017).

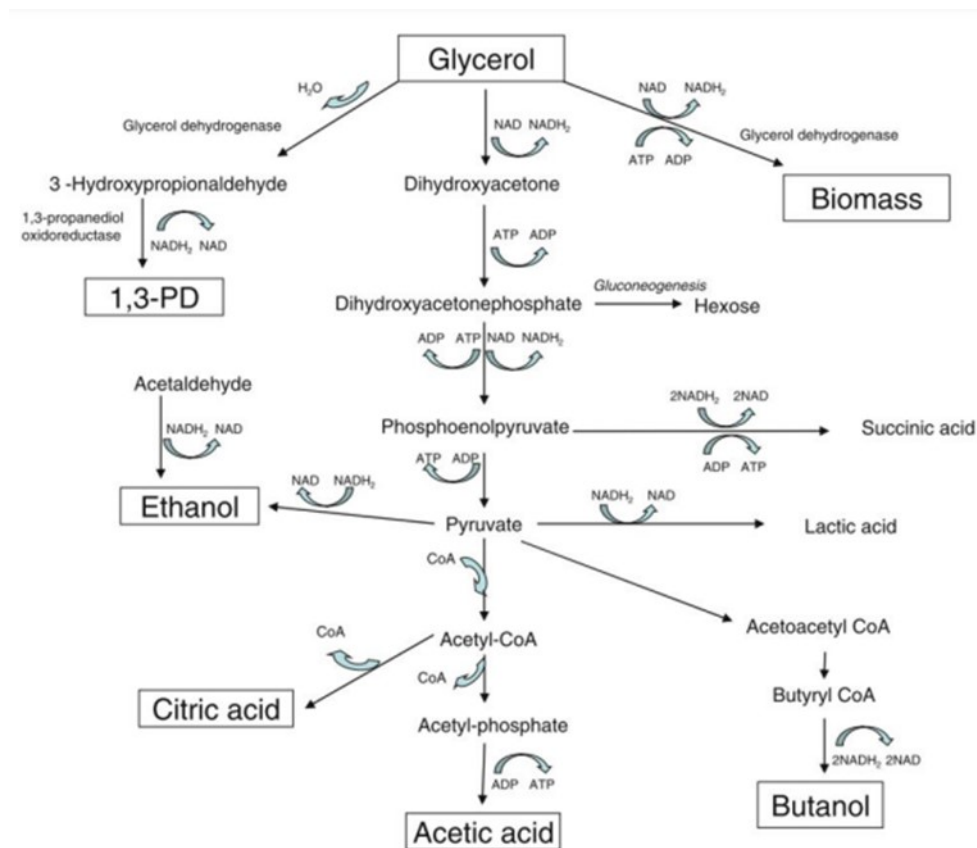
3.3.6.1 Glicerol como substrato

O desenvolvimento de uma conversão biológica econômica do glicerol, uma matéria-prima de baixo custo, em produtos de maior valor é esperado para tornar a

produção de biodiesel mais econômica e, assim, contribuir para o estabelecimento de mais biorrefinarias (DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006).

Existe uma ampla variedade de microrganismos capazes de metabolizar glicerol e gerar produtos valiosos. Após sua internalização, o glicerol pode ser direcionado a três vias principais: redutiva, oxidativa ou produção de massa celular, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Metabolismo do glicerol para produção de produtos de valor agregado.



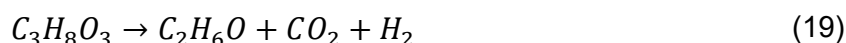
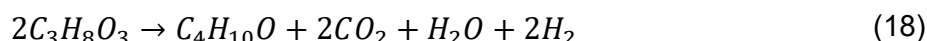
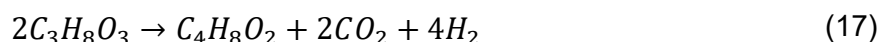
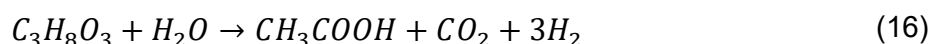
Fonte: Dobson et al. (2012).

Através da rota redutiva, o glicerol é inicialmente desidratado para formar 3-hidroxi-propionaldeído, e esse composto é então reduzido para formar 1,3-propanodiol (PD) e regenerar o NAD^+ .

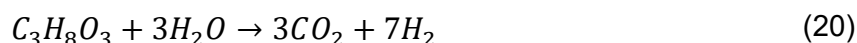
No caminho oxidativo, o glicerol é inicialmente transformado em dihidroxiacetona (DHA) pela ação da enzima glicerol desidrogenase, resultando na geração de equivalentes redutores (NADH_2). Posteriormente, a DHA é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato (DHA fosfato) pela enzima glicolítica dihidroxiacetona quinase e, em seguida, convertida no produto intermediário piruvato através da glicólise. Nesta rota a maioria dos produtos de valor agregado é gerada, tais como, etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido butírico e outros.

A maioria das pesquisas tem se concentrado na bioconversão do glicerol em H_2 e 1,3-propanodiol (PD) (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Durante a fermentação escura oxidativa do glicerol, o H_2 pode ser gerado como subproduto juntamente com ácidos orgânicos e álcoois. Na fotofermentação do glicerol, produtos intermediários (ácidos orgânicos e etanol) podem ser metabolizados para formar hidrogênio (XIAO, 2017). As equações estequiométricas que mostram o rendimento de hidrogênio durante a bioconversão do glicerol são apresentadas abaixo.

i. Fermentação escura:



ii. Fotofermentação:



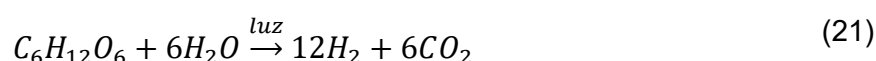
Como evidenciado nas Equações (16) a (20), o rendimento de H_2 proveniente do glicerol por meio da fotofermentação é consideravelmente superior ao obtido pela fermentação escura. Isso se deve à oxidação incompleta na fermentação escura, que resulta na produção de ácidos orgânicos como subprodutos indesejados. Dessa forma, a fotofermentação do glicerol se mostra mais vantajosa para a produção de H_2 em comparação à fermentação escura.

3.3.6.2 Glicose como substrato

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é um carboidrato simples facilmente biodegradável, sendo por esse motivo utilizada como substrato modelo na produção biológica de hidrogênio. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H_2 em grande escala, tornando-se viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo (KAPDAN; KARGI, 2006).

Muitos fluxos de resíduos agroindustriais; resíduos de cervejarias, resíduos da indústria de laticínios e efluentes de muitas fábricas de processamento de alimentos contêm quantidades apreciáveis de açúcares simples, mono e dissacarídeos. Os monossacarídeos são diretamente utilizáveis para a produção de hidrogênio por muitos organismos que também são, obviamente, geralmente capazes de converter os dissacarídeos em seus componentes hexoses e pentoses (KESKIN; ABOHASHESH; HALLENBECK, 2011).

Em comparação com a fermentação escura, a produção fotofermentativa de hidrogênio destaca-se pela obtenção de níveis significativamente elevados desse gás (CHEN et al., 2011). Enquanto a estequiometria das reações no processo de fermentação escura é tal que se produz muito menos hidrogênio, Equações (16) a (19), a produção teórica deste gás por fotofermentação a partir de 1 mol de glicose é de 12 mol, conforme a reação mostrada na Equação (21) (REUNGSANG et al., 2018).

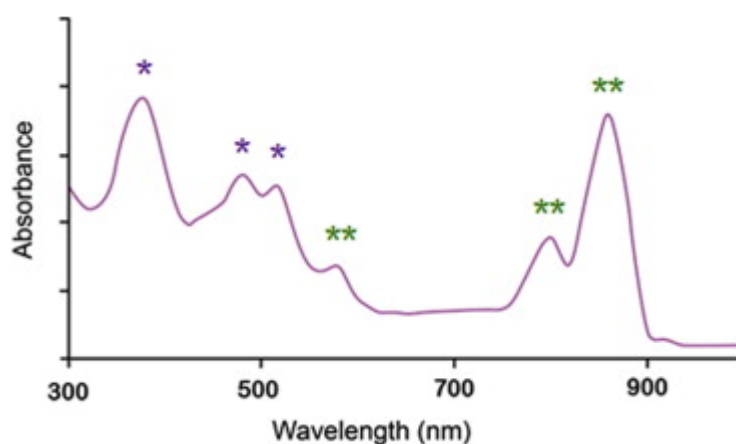


3.3.7 Efeito da fonte de luz e distribuição espectral

A questão mais importante no processo de fotofermentação se correlaciona com a luz; especificamente, intensidade da luz, fontes de luz e distribuição de luz. O emprego eficiente da luz é essencial, pois a síntese de ATP em organismos fotossintéticos é um processo dependente da luz. Uma quantidade substancial de ATP é necessária para impulsionar o transporte de elétrons no processo de fixação de nitrogênio e, por conseguinte, na produção de hidrogênio (AKKERMAN, 2002).

A composição de pigmentos em bactérias PNS influencia a escolha do espectro e da intensidade da fonte de luz utilizada em fotobiorreatores. Os dois principais grupos de pigmentos em bactérias PNS são as bacterioclorofilas e os carotenoides (GADHAMSHETTY et al., 2011). O espectro de absorção das bactérias púrpuras (Figura 5) abrange as duas extremidades do espectro visível. Os carotenoides absorvem a radiação entre 450 e 550 nm, dando ao espectro a típica forma de “três dedos”. As bacterioclorofilas (BChls) absorvem em 590, na região do visível, e em 800, 850 e 880 nm, na região do infravermelho próximo. Os picos em 850 e 880 nm geralmente se fundem em um pico maior, com o máximo em um comprimento de onda intermediário entre eles, embora ombros possam ser observados ocasionalmente (LOACH; PARKES-LOACH, 2009).

Figura 5 – Espectro de absorção típico das bactérias PNS. Os máximos de absorção indicados com * são devidos aos carotenoides, enquanto ** indicam os máximos de absorção devido às bacterioclorofilas.



Fonte: Adessi e De Phillippis (2014).

O conhecimento preliminar da composição dos pigmentos é, portanto, um ponto de partida na escolha da fonte de luz. Quando se utiliza luz artificial, as fontes de luz mais utilizadas são as lâmpadas de tungstênio, pois seu espectro de emissão cobre todo o espectro de absorção das bactérias PNS (ADESSI; DE PHILIPPIS, 2014). Particularmente importante é a alta emissão no infravermelho próximo, onde está localizado o máximo de absorção das bacterioclorofilas. Lâmpadas halógenas também são empregadas com frequência nesse contexto.

Outras fontes de luz artificiais usadas na fotofermentação incluem lâmpadas fluorescentes, lâmpadas de iodetos metálicos, fibras ópticas, diodos emissores de luz e radiações fotossinteticamente ativas (PARs) (BASAK et al., 2014). A eficiência na conversão de eletricidade em luz varia entre as diversas fontes de luz, sendo LEDs, lâmpadas fluorescentes e incandescentes/halógenas as fontes, respectivamente, em ordem decrescente de eficiência (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010). Como as lâmpadas com filamento de tungstênio, especialmente as incandescentes, são fontes de luz de alto consumo energético, uma alternativa interessante é oferecida pelos diodos emissores de luz (LEDs). Kawagoshi et al. (2010) afirmam que os LEDs têm uma vida útil que varia entre 20.000 e 30.000 h, enquanto uma lâmpada de tungstênio dura de 1.000 a 2.000 h, e preveem uma redução de 98% nos custos de energia usando LEDs em substituição às de lâmpadas de tungstênio.

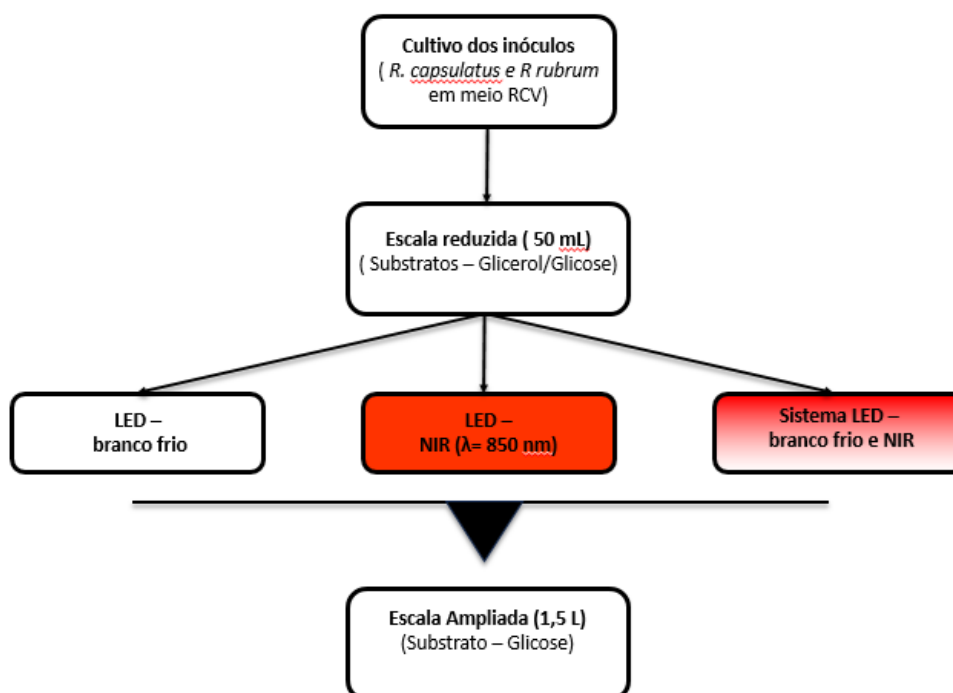
A utilização da luz solar, embora proporcione uma produção sustentável e econômica de hidrogênio, enfrenta a limitação imposta pela variação diurna da iluminação solar quando essa é a única fonte de energia. A localização geográfica e os padrões sazonais também determinam a duração média em que a intensidade luminosa é suficientemente alta para sustentar a produção de hidrogênio fotofermentativo. Na ausência de energia luminosa, as bactérias PNS metabolizam os componentes celulares para obter energia de manutenção, reduzindo a densidade celular (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010). Portanto, o desenvolvimento de um sistema de iluminação integrando fontes solares e artificiais é necessário, o que tem implicações na necessidade de pesquisas adicionais baseadas em luz artificial para a produção de hidrogênio fotofermentativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados nos procedimentos experimentais e a metodologia analítica.

Este trabalho foi conduzido no Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU). Com o intuito de compilar a investigação, a Figura 6 apresenta um fluxograma simplificado das etapas para produção de hidrogênio em escala reduzida e ampliada.

Figura 6 – Esquema simplificado das etapas envolvidas na produção de hidrogênio em escala reduzida e ampliada.



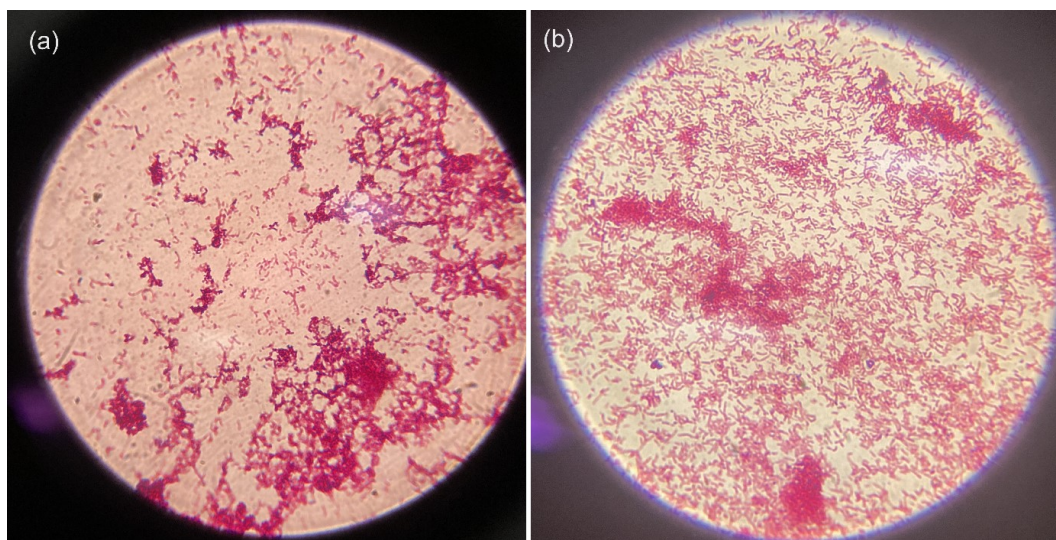
Fonte: O Autor (2024).

4.1 Microrganismos

As cepas utilizadas nos ensaios de fotofermentação foram as bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS) *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710 e *Rhodospirillum*

rubrum DSM 467 (Figura 7), adquiridas da coleção alemã de microrganismos e cultura de células - DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Culture*).

Figura 7 – Micrografias das bactérias PNS utilizadas neste estudo. (a) *Rhodospirillum rubrum* DSM 467; (b) *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710.



Fonte: O Autor (2024).

O meio de cultura utilizado para a manutenção das bactérias fotossintetizantes foi o meio basal RCV, conforme descrito por Weaver et al. (1975). Esse meio foi preparado pela dissolução dos compostos relacionados na Tabela 4 e na Tabela 5 em água deionizada.

Tabela 4 – Composição do meio RCV proposto por Weaver, Wall e Gest (1975).

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido Málico - $C_4H_6O_5$	4,02
Fosfato de potássio monobásico - KH_2PO_4	0,60
Fosfato de potássio dibásico - K_2HPO_4	0,90
Sulfato de magnésio - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,12
Cloreto de cálcio - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,075
Glutamato monossódico – $C_5H_8NO_4Na$	1,31
EDTA sal dissódico - $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	0,02
Tiamina	0,001
Micronutrientes	1,0 mL

Tabela 5 – Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV proposto por Weaver, Wall e Gest (1975).

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido bórico - H_3BO_3	2,80
Sulfato de manganês - $MnSO_4 \cdot H_2O$	1,59
Molibdato de sódio - $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,75
Sulfato de zinco - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,24
Cloreto de cobre (II) - $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,05

Após a dissolução dos reagentes, o meio teve o pH ajustado para $6,8 \pm 0,2$ utilizando HCl P.A. 37% e NaOH P.A. (micropérolas) e, em seguida, foi esterilizado em autoclave a $121^\circ C$ e 1 kgf/cm^2 por 20 min. Após o resfriamento até à temperatura ambiente, a tiamina foi adicionada, e as bactérias foram cultivadas separadamente, em frascos *schott* de 500 e 1000 mL de capacidade, sendo purgadas com gás argônio por 3 minutos para manter a condição de anaerobiose. No período de 10 a 15 dias o repique das culturas foi realizado, descartando-se aproximadamente metade do volume de inóculo e substituindo-o por meio basal RCV fresco. Os frascos de cultura foram mantidos em uma incubadora sob temperatura de $30 \pm 2^\circ C$ e iluminação de 2500 lux.

4.2 Substratos

Os substratos empregados nos ensaios fotofermentativos foram glicose e glicerol de padrão analítico. A concentração inicial dos substratos foi de 10 g/L, escolhida de acordo com a literatura (PIO; SILVA; CARDOSO; BATISTA, 2023; MACHADO; MOREIRA; BATISTA; FERREIRA; CARDOSO, 2018; LO; CHEN; HUANGC; YUAN; CHANG, 2013). O meio fermentescível utilizado nos experimentos de fotofermentação, designado RCV modificado, foi preparado pela dissolução dos reagentes do meio basal RCV e acrescentando o substrato de interesse. No entanto, o ácido málico foi suprimido da formulação original do meio RCV, uma vez que o objetivo foi estudar exclusivamente a glicose e o glicerol como fontes de carbono.

4.3 Fontes de luz

Neste estudo, foram empregadas as distintas fontes de iluminação: (a) Um arranjo composto por quatro lâmpadas LED tubulares - 60 cm, com iluminação branca fria (6500 K) e intensidade luminosa de 3500 lux (25 W/m^2); (b) Um painel de LED NIR (60 cm x 48 cm, 40 x 1 W) com pico de emissão no comprimento de onda de 850 nm, lentes com ângulo de abertura de 30° e intensidade luminosa de 100 W/m^2 ; (c) O Sistema LED – Luz branca fria + NIR, composto pelo fornecimento simultâneo das fontes de iluminação (a) e (b); e (d) Arranjo misto em estrutura circular, composto por 4 segmentos de 1 m de fita LED (5050, branca fria) com intensidade luminosa total de 7000 lux (50 W/m^2), intercalados com diodos emissores de luz NIR (40 x 1 W, $\lambda = 850 \text{ nm}$). Os componentes emissores de radiação NIR foram equipados com lentes de ângulo de abertura de 30° , conectados em série e forneceram uma intensidade luminosa de 100 W/m^2 .

Os sistemas de diodos emissores de luz NIR foram alimentados pela fonte de alimentação digital ajustável – EMG 18134. A intensidade luminosa e a radiação global foram verificadas usando um radiômetro (Solar Light, modelo PMA 2100) com sensor visível (400 – 700 nm) e um piranômetro (Hukseflux, modelo SR05 – D2A2, faixa de 285 – 3000 nm).

A escolha dos fotoparâmetros como, fontes de iluminação, intensidade luminosa e comprimento de onda, justificam-se através das diversas pesquisas realizadas com produção de biohidrogênio fotofermentativo (ZHANG et al., 2023; MA et al., 2021; ZHANG et al., 2021; ZHANG et al., 2020; JIA et al., 2021; TURON; ANXIONAZ-MINVIELLE; WILLISON, 2018; GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010).

4.3.1 Caracterização espectral das fontes de luz

Os diodos emissores de luz foram caracterizados com o auxílio de uma esfera integradora de 2 polegadas de diâmetro, fabricada pela empresa Thorlabs, combinada com uma fonte de luz SLS201L/M com espectro de 360-2600 nm e um espelho para direcionar o feixe luminoso. Utilizou-se um espectrômetro Ocean Optics HR400 (200-1100 nm) e o software SpectraSuite para aquisição dos dados da esfera integradora.

4.4 Produção de hidrogênio

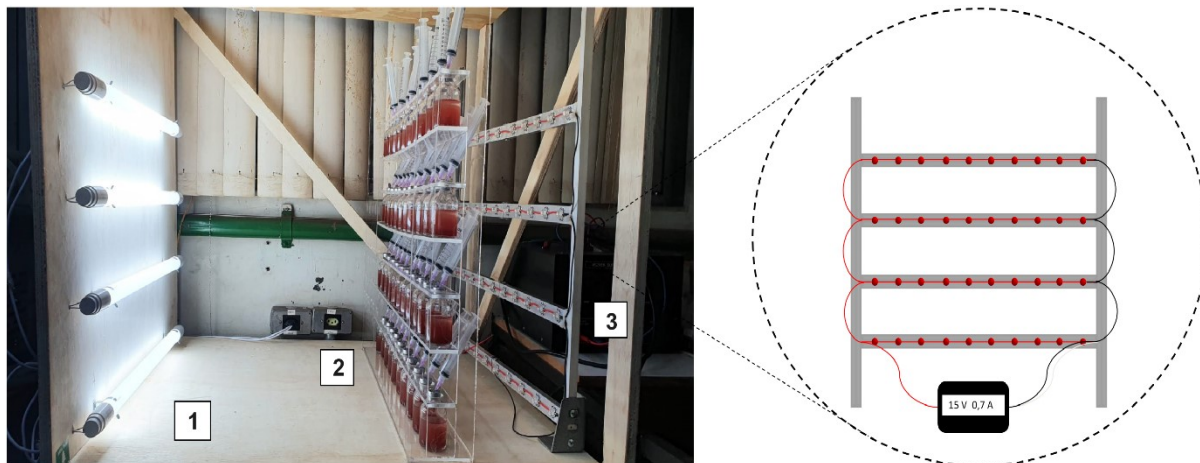
O processo fermentativo foi realizado em escala reduzida com reatores anaeróbios de 50 mL (frascos de penicilina) e, em escala ampliada, utilizando um reator anaeróbio de tanque agitado de 1,5 L. Conforme descrito detalhadamente abaixo.

4.4.1 Produção de H₂ em escala reduzida

A produção de H₂ foi conduzida em biorreatores de 50 mL (frascos de vidro cilíndricos) com volume de trabalho de 37 mL e em duplicata (FERREIRA et al., 2022). Os frascos foram inoculados com 5 mL das culturas puras na fase logarítmica tardia em 32 mL de meio fermentescível (RCV modificado). Após a inoculação, gás argônio foi purgado por 3 minutos em cada biorreator, preenchendo assim o *headspace* (13 mL) e mantendo o sistema em condição de anaerobiose. Por fim, os frascos foram selados com um septo de borracha butílica e uma espessa cápsula de alumínio. As fermentações foram conduzidas em incubadora sob temperatura de 30 ± 2 °C, densidade celular inicial de 1 g/L, pH inicial de 6,8 e sob diferentes condições de iluminação (PIO et al., 2023; AKMAN et al., 2015).

Na Figura 8 está ilustrada a unidade experimental utilizada para realizar as fermentações em escala reduzida. O monitoramento dos ensaios fotofermentativos foi realizado pela coleta periódica do biogás produzido e do meio reacional em biorreatores descartáveis (uso único para cada intervalo de tempo). O gás produzido foi coletado através de seringas graduadas previamente acopladas ao sistema e armazenado em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA., Brasil) para posterior análise de composição. Amostras de 10 mL do meio reacional foram retiradas e centrifugadas durante 12 min a 7730 g para subsequente monitoramento do pH e avaliação dos metabólitos produzidos por meio do sobrenadante, bem como para a determinação da densidade da biomassa pelo método gravimétrico, utilizando o sedimentado.

Figura 8 – Unidade experimental dos ensaios de fotofermentação em escala reduzida. (1) lâmpadas LED tubulares - 60 cm, com iluminação branca fria (6500 k); (2) Aparato de apoio com os biorreatores de sacrifício (frascos de penicilina); (3) Painel de diodos emissores de luz NIR ($\lambda=850$ nm).



Fonte: O Autor (2024).

A Tabela 6 compila as condições exploradas durante a pesquisa experimental. A proposta dos Ensaios (1-6) foi avaliar a produção de biohidrogênio empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, em cultura pura, com glicose (10 g/L) como substrato e sob as diferentes fontes de luz (LED Branco Frio, LED NIR, Sistema LED – Luz branca fria e NIR). Analogamente, os Ensaios (7-12) verificaram, nas mesmas condições, a produção de hidrogênio biológico, entretanto com o glicerol (10 g/L) como substrato.

Tabela 6 – Compilado dos ensaios fotofermentativos em reatores de 50 mL.

Condição	Fonte de luz	Substrato	Cepa
1	LED branco frio	Glicose	<i>R. capsulatus</i>
2			<i>R. rubrum</i>
3	LED NIR		<i>R. capsulatus</i>
4			<i>R. rubrum</i>
5	Sistema LED – Luz branca fria + NIR		<i>R. capsulatus</i>
6			<i>R. rubrum</i>
7	LED branco frio	Glicerol	<i>R. capsulatus</i>
8			<i>R. rubrum</i>
9	LED NIR		<i>R. capsulatus</i>
10			<i>R. rubrum</i>
11	Sistema LED – Luz branca fria + NIR		<i>R. capsulatus</i>
12			<i>R. rubrum</i>

4.4.2 Produção de H₂ em escala ampliada

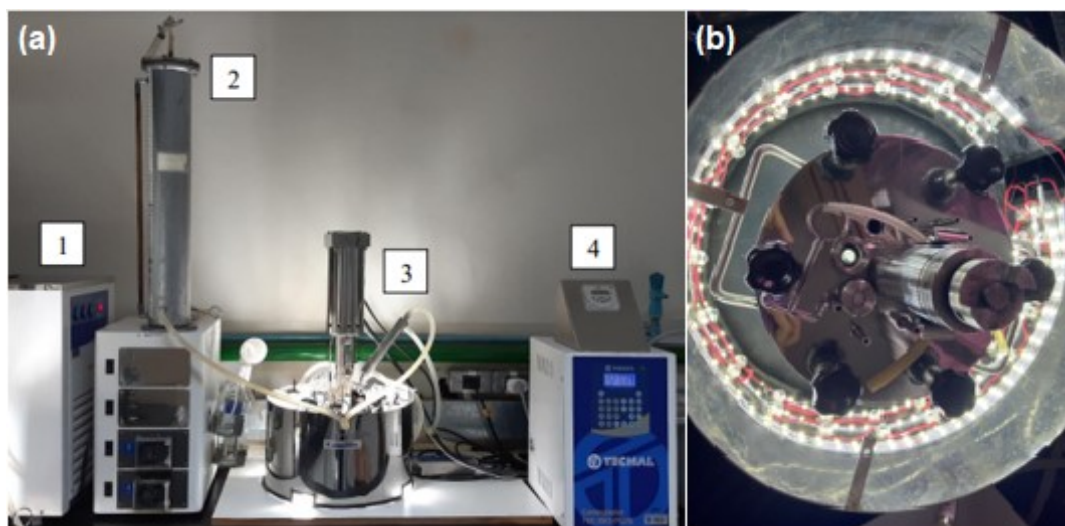
Os ensaios realizados em escala ampliada foram conduzidos em reator anaeróbio de tanque agitado (STR) com capacidade de 1,5 L - módulo Fermentador Tec-Bio-Flex da marca Tecnal (Figura 9). O volume útil foi de 700 mL, composto por 635 mL de meio fermentescível e 65 mL de inóculo. O reator foi higienizado com álcool 70% e permaneceu 20 minutos sob incidência de luz ultravioleta no fluxo laminar para garantir condições assépticas. Após a adição do meio fermentescível e inóculo, gás argônio foi borbulhado por 15 min para garantir a condição de anaerobiose e então o reator foi selado. A iluminação foi fornecida pelo arranjo misto em estrutura circular, composto por diodos emissores de luz branca fria e NIR, com intensidade luminosa de 150 W/m². A temperatura foi mantida em 32 ± 1 °C e a agitação mecânica em 130 rpm. As condições de operação no reator STR foram baseadas em estudos anteriores conduzidos pelo grupo de pesquisa do NUCBIO (FERREIRA et al., 2022; MOREIRA et al., 2022; SILVA et al., 2019; MACHADO et al., 2018).

O monitoramento do processo fotofermentativo ocorreu por meio da coleta periódica de amostras. O biogás produzido foi quantificado através de uma coluna de deslocamento de água. Paralelamente, amostras do biogás foram recolhidas a partir de seringas graduadas de 10 mL e preservadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) para posterior análise de produção de hidrogênio. Para o acompanhamento do crescimento celular, pH e produção de metabólitos, amostras de 10 mL do meio reacional foram coletadas com o auxílio de seringas. Cada amostra foi centrifugada durante 12 min a 7730 g. A partir do sobrenadante coletado, realizou-se a quantificação do substrato, ácidos orgânicos e etanol mediante cromatografia líquida de alta eficiência. As células separadas após a centrifugação foram utilizadas para análise de concentração celular por absorbância. O pH inicial do meio fermentescível foi de aproximadamente 6,8, e ao longo dos ensaios permitiu-se sua redução até o valor de 5, sendo essa diminuição controlada pela adição de solução de NaOH (2 M).

A produção de hidrogênio em escala ampliada foi realizada com glicose PA como substrato na concentração inicial de 10 g/L. De modo a manter o volume reacional e ajustar a concentração para 10 g/L após ser detectado o consumo deste substrato, a adição periódica de uma solução concentrada de glicose foi realizada.

Figura 9 – Fotofermentação em Escala Ampliada.

(a) Unidade experimental dos ensaios de fotofermentação em escala ampliada, sendo: 1 – Banho termostatzado da marca Tecnal modelo TE-2005; 2 – Medidor do volume de biogás (coluna de deslocamento de água); 3 – Reator STR de 1,5 L com estrutura de iluminação; e 4 – Módulo controlador de agitação mecânica. (b) Arranjo de iluminação em estrutura circular – Diodos emissores de luz branca fria e NIR.



Fonte: O Autor (2024).

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Quantificação do crescimento celular

A quantificação do crescimento celular foi feita pela análise de absorvância do meio fermentativo, utilizando o espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UVmini-1240 no comprimento de onda de 660 nm (AKMAN et al., 2015; RODOLFO; GRAMMEL, 2012). As análises foram realizadas em duplicata, sendo convertidas em concentração de células (g/L) por meio de curvas de calibração previamente estabelecidas. Essas curvas correlacionam a leitura de absorvância com a massa seca de células, sendo esta última baseada no método gravimétrico de análise, conforme descrito pela *American Public Health Association* (APHA, 2005).

Para construir as curvas de calibração, amostras de 30 mL (em triplicata) foram retiradas da solução mãe da cepa de interesse e centrifugadas a 7730 g por 12 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido com água destilada. Os sedimentos obtidos foram transferidos para cadinhos previamente tratados termicamente em mufla (3 horas em 550 °C) e pesados. Posteriormente, os cadinhos

foram levados à estufa a 105 °C até atingir peso constante e, em seguida, realizou-se a pesagem dos cadinhos com a massa seca. Para a determinação da massa de sólidos voláteis, os cadinhos com massa seca foram levados à mufla a 550°C durante 30 min. Após resfriamento em dessecador, foram pesados e a partir da massa de sólidos e do volume da amostra, foi obtida a concentração de células em gSV/L. Em paralelo, alíquotas foram coletadas da mesma solução mãe e preparadas em diferentes diluições, na qual para cada uma das soluções diluídas fez-se a leitura da absorbância. Para o branco foi usado água destilada. As curvas de calibração (concentração de sólidos voláteis de células *versus* absorbância) das cepas *R. capsulatus* e *R. rubrum* estão apresentadas no Apêndice A.

4.5.2 Determinação do pH

A aferição do pH foi realizada com o auxílio de um pHmetro digital BEL ENGINEERING, modelo W3B. O equipamento possui um eletrodo de vidro para medição de pH, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e pH 7.

4.5.3 Quantificação de glicerol, glicose e metabólitos

A quantificação de glicerol, glicose, ácidos orgânicos e etanol foi obtida por meio da cromatografia líquida de alto desempenho, conforme descrito por Moreira et al. (2022). Utilizou-se o equipamento HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) marca Shimadzu, modelo LC-20A Proniece, equipado com coluna SUPELCOGEL C-610H. O ácido fosfórico (0,1 % v/v) foi utilizado como fase móvel, com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 µL. As amostras foram diluídas, filtradas (membrana 0,22 µm) e injetadas no equipamento. As leituras de açúcar e álcoois foram determinadas por um detector de índice de refração, enquanto os ácidos orgânicos foram identificados por um detector ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm. As áreas obtidas nos cromatogramas para cada composto foram convertidas para concentrações em g/L por meio de curvas de calibração previamente estabelecidas.

4.5.4 Quantificação de hidrogênio

A concentração do hidrogênio produzido foi determinada pela injeção do biogás no Cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2014, constituído por um detector de condutividade térmica, um forno e uma coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,53 mm), conforme descrito por Pio et al. (2023). As temperaturas de operação do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230°C, 30°C e 230°C, respectivamente. O argônio foi utilizado como gás de arraste a 15 mL/min. O tempo de análise foi de 28 ± 2 minutos, sendo que o pico do hidrogênio foi formado em aproximadamente 1,6 min. A área fornecida neste tempo foi utilizada na curva de calibração do equipamento para quantificação de H₂.

4.5.5 Conversão e produtividade de hidrogênio

O rendimento (conversão) em mol de hidrogênio por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação (22).

$$\text{Conversão} = \frac{\text{mol de H}_2 \text{ produzido}}{\text{mol de substrato consumido}} \quad (22)$$

O cálculo da taxa de produção de hidrogênio foi feito utilizando-se a Equação (23).

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (mmol)}}{\text{Volume reacional (L).tempo de fermentação(dia)}} \quad (23)$$

4.5.6 Produção acumulada de hidrogênio

A equação de Gompertz modificada (Equação 24) foi utilizada para ajustar os dados experimentais de produção cumulativa de hidrogênio (ensaios em escala ampliada) e determinar os parâmetros cinéticos H_{max}, R_{max} e λ, utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A escolha deste modelo se deu devido à sua ampla aceitação e uso para descrever o progresso cumulativo da produção de

hidrogênio em batelada (PIO et al., 2023; XIE et al., 2012; ARGUN; KARGI; KAPDAN, 2008).

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (24)$$

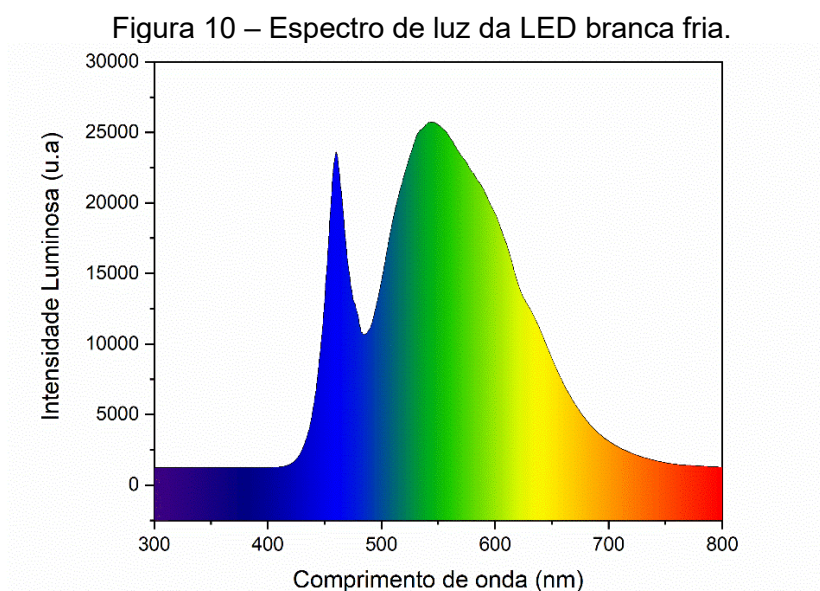
Onde: H é a produção acumulada de hidrogênio (mmol), P é o potencial máximo de produção de hidrogênio (mmol), R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio ($\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1}$), t é o tempo de fermentação, λ é o tempo da fase *lag* (h) e *e* é o número de Euler (valor aproximado de 2,718218).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão detalhados os resultados obtidos nos ensaios de fermentação fotoinduzida quando expostos a diferentes regiões do espectro eletromagnético, bactérias fotossintetizantes e fontes de carbono. Além disso, a caracterização dos diodos emissores de luz foi descrita.

5.1 Especificação dos diodos emissores de luz

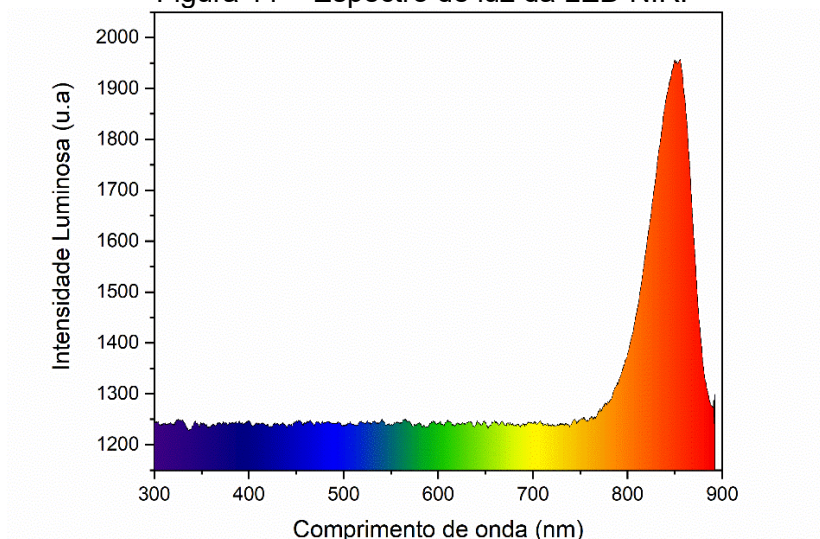
A caracterização espectral da iluminação fornecida pelas lâmpadas LED tubulares branca fria (temperatura de cor de 6500 K) pode ser visualizada na Figura 10. Nota-se a ocorrência de luminosidade somente no espectro visível (400 – 700 nm), com picos de intensidade luminosa nos comprimentos de onda 450 e 550 nm. A banda espectral com pico em 450 nm compreende a região do azul, enquanto a do pico em 550 nm compreende as regiões da luz amarela, laranja e principalmente do verde.



O espectro de emissão dos diodos emissores de luz infravermelha próxima (LED NIR) é apresentado na Figura 11. Observa-se a presença de radiação eletromagnética somente na região do infravermelho próximo, com o espectro

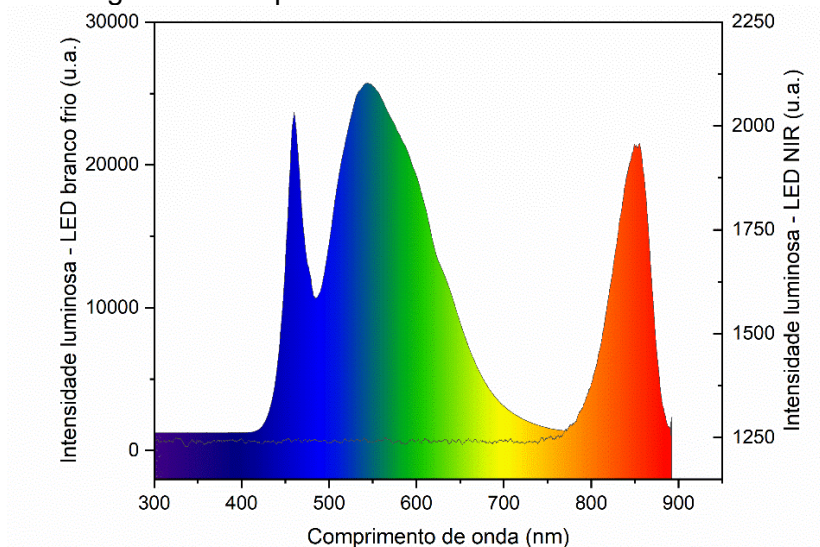
caracterizado por uma única banda estreita em torno de um pico de emissão em 850 nm.

Figura 11 – Espectro de luz da LED NIR.



O espectro de iluminação do arranjo composto pelo sistema LED – luz branca e NIR pode ser visualizado na Figura 12. Observa-se que os picos de emissão de luz no visível (450 e 550 nm) e infravermelho (850 nm) corroboram com a absorção dos pigmentos carotenoides e bacterioclorofila, respectivamente, do espectro de absorção *in vivo* típico das bactérias PNS (Figura 5).

Figura 12 – Espectro de luz das fontes combinadas.



5.2 Ensaios de produção de H₂ em escala reduzida

Estes ensaios foram realizados em reatores de 50 mL e avaliaram a produção de biohidrogênio fotofermentativo sob diferentes condições com as cepas *R. capsulatus* e *R. rubrum* em culturas puras. Testou-se a influência das iluminações LEDs branca fria e infravermelha próxima, individualmente e concomitantemente, bem como do meio fermentescível contendo glicose ou glicerol em grau analítico, como fontes de carbono na concentração de 10 g/L.

5.2.1 Fotofermentações sob diferentes arranjos de iluminação e suplementadas com glicose

Na primeira etapa do trabalho, a influência de diferentes diodos emissores de luz na produção de hidrogênio foi estudada perante as cepas *R. rubrum* e *R. capsulatus*, quando inoculadas em meio contendo glicose como fonte de carbono. Os ensaios tiveram duração de 264 h.

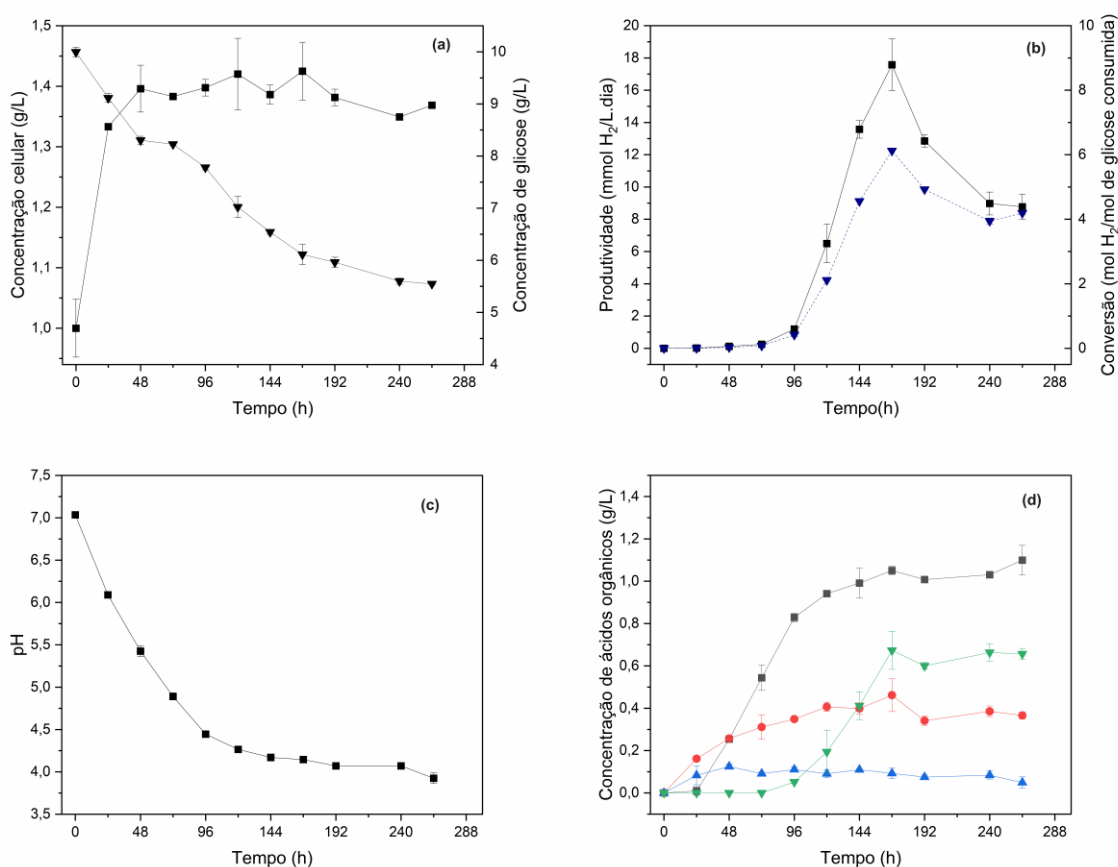
5.2.1.1 Ensaios 1 e 2: Iluminação LED branca fria

Nos Ensaios 1 e 2 avaliou-se a influência da iluminação LED branca fria na produção de hidrogênio empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente. A Figura 13(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 1 e a Figura 14(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 2.

Na Figura 13a pode ser visualizada a concentração celular da cepa *R. capsulatus* correlacionada com o consumo do substrato ao longo do processo fotofermentativo. A concentração da biomassa celular aumentou de 1 g/L para 1,33 g/L em 24h de ensaio e manteve-se na faixa de 1,33 a 1,42 g/L até o final do processo. A glicose foi consumida em cerca de 45%. Na Figura 14a visualiza-se o crescimento celular da cepa *R. rubrum* de 1 g/L para $1,37 \pm 0,005$ g/L em 24h de fermentação e a permanência da concentração celular posteriormente em uma faixa de concentração de 1,48 a 1,38 g/L. Comparativamente a cepa *R. capsulatus*, o consumo de glicose pela cepa *R. rubrum* foi maior, sendo ele de aproximadamente 54%. De acordo com Koku et al. (2002), quando um substrato de carbono orgânico é fornecido à bactéria,

ele é parcialmente consumido para a biossíntese, o que corrobora com os perfis de crescimento celular *versus* consumo de substrato aqui demonstrados.

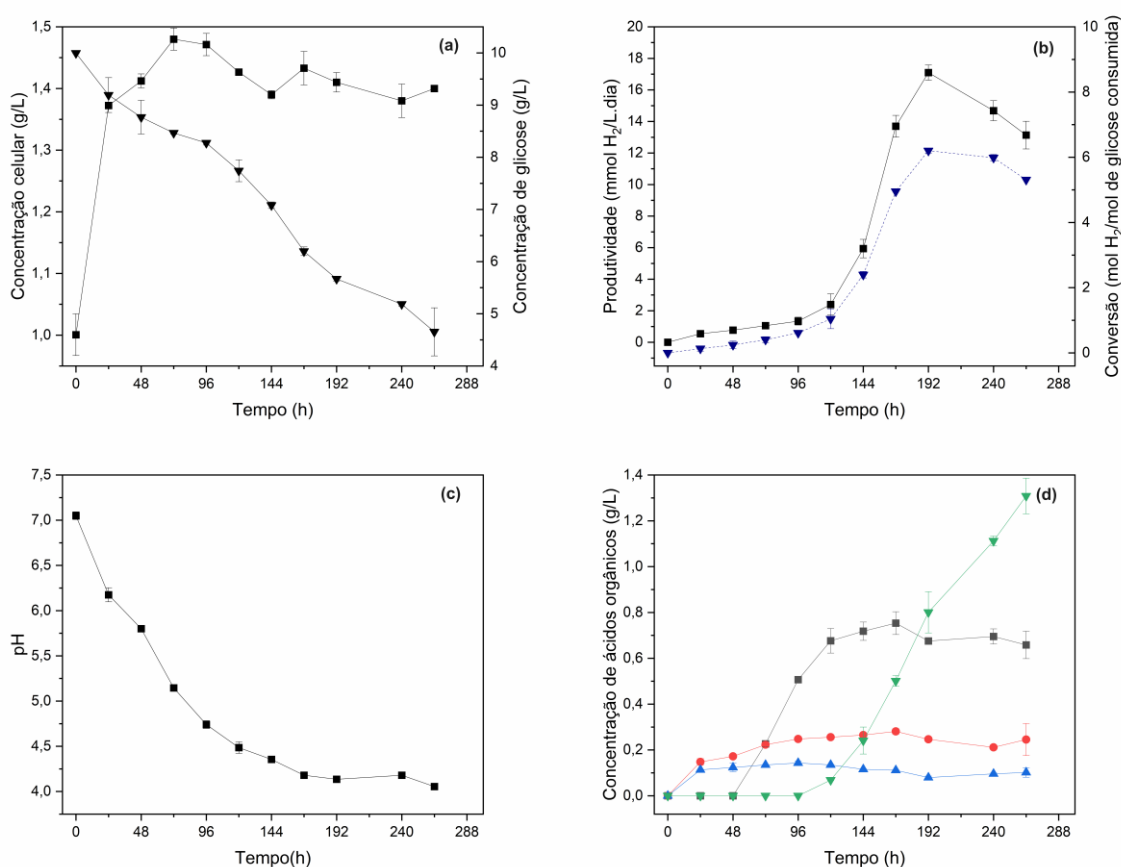
Figura 13 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. capsulatus*.



Conforme Figura 13b a produtividade de hidrogênio para *R. capsulatus* se despontou após 96h de processo atingindo um pico de $17,57 \pm 0,6$ mmol H₂/L.dia e um rendimento máximo de $6,12$ mol H₂/mol de glicose consumida, após 168 h de fermentação. De acordo com a Figura 14b, a produtividade de hidrogênio para *R. rubrum* evoluiu de forma mais acentuada após 120h e atingiu um pico de $17,10 \pm 0,5$ mmol H₂/L.dia e um rendimento máximo de $6,2 \pm 0,08$ mol H₂/mol de glicose consumida, mais tardiamente que a cultura *R. capsulatus*, em 192h de fotofermentação. Esses dados nos permitem concluir que ambas as cepas produziram hidrogênio não associado ao crescimento bacteriano e apresentaram perfis de

produtividade e conversão semelhantes. No entanto, a *R. capsulatus* produziu hidrogênio com maior celeridade, enquanto a *R. rubrum* apresentou uma queda de produtividade menos acentuada. Esses comportamentos possivelmente estão associados aos perfis da rota metabólica butírica (Figuras 13d e 14d), produtora de hidrogênio.

Figura 14 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. rubrum*.



Os perfis de pH conforme apontado pela Figura 13c e Figura 14c diminuíram ao longo dos ensaios, sendo ao final de 3,93 para o Ensaio 1 e 4,06 para o Ensaio 2. A redução de pH está relacionada com o aumento da concentração de ácidos orgânicos (Figura 13d e Figura 14d), formados durante o processo fermentativo. Em relação à composição destes metabólitos, observa-se a formação de ácido láctico, acético, propiônico e butírico em ambos os testes e com concentrações após 264h de fotofermentação respectivamente de, $1,1 \pm 0,07$, $0,37 \pm 0,02$, $0,05 \pm 0,01$ e $0,66 \pm 0,03$

g/L para o Ensaio 1 e $0,66 \pm 0,06$, $0,25 \pm 0,07$, $0,1 \pm 0,02$ e $1,31 \pm 0,08$ g/L para o Ensaio 2. Logo, em ambos os ensaios não houve a oxidação completa da glicose em H_2 e CO_2 , uma vez que houve a produção de ácidos orgânicos com o consumo do carboidrato. Além disso, observa-se que, em ambos os ensaios, a produtividade e conversão aumentaram de forma mais acentuada no período de formação do ácido butírico. Assim, conforme a Equação 6, sugere-se que a produção de biohidrogênio nesses experimentos se correlacionou principalmente com a formação desse ácido.

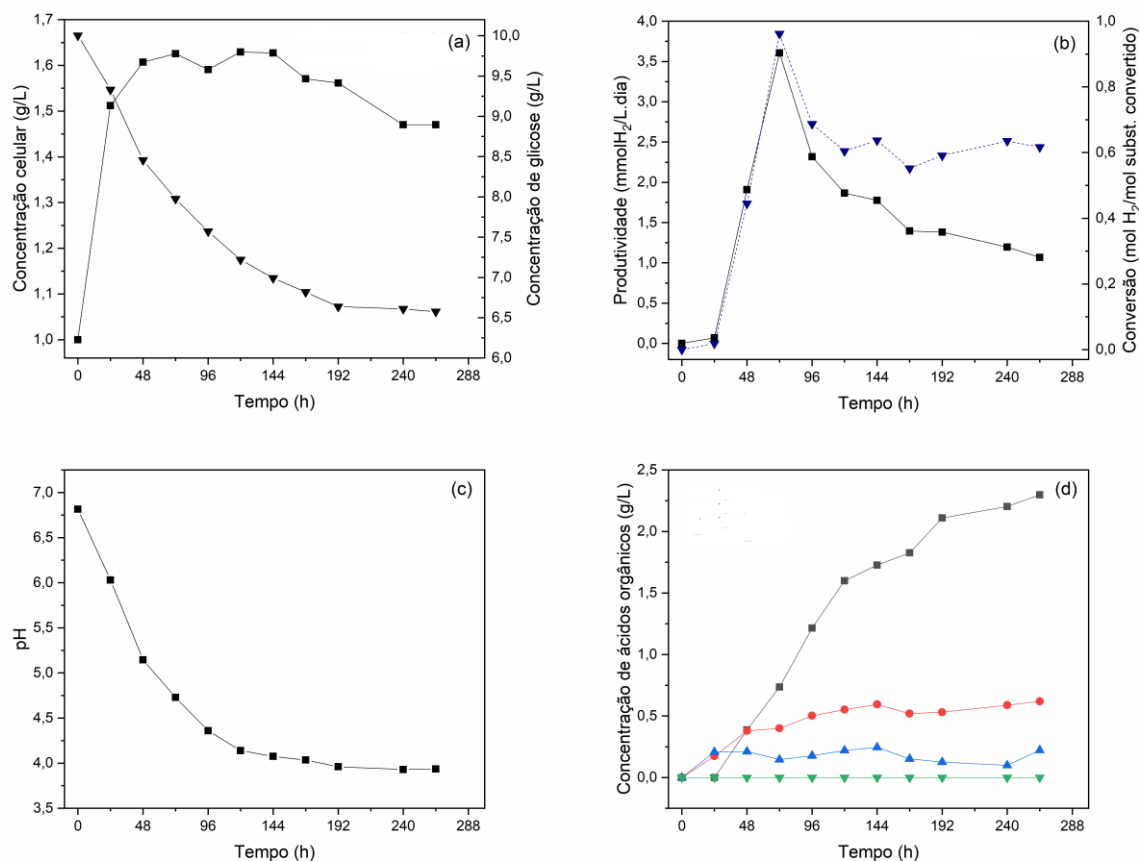
5.2.1.2 Ensaios 3 e 4: Iluminação LED NIR

Os Ensaios 3 e 4 foram realizados para avaliar a influência da iluminação do espectro infravermelho próximo (LED NIR, $\lambda=850$ nm) na produção de hidrogênio empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente. A Figura 15(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 3 e a Figura 16(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 4.

De acordo com a Figura 15a a biomassa celular da cultura *R. capsulatus* cresceu 61% do seu valor inicial após 48h e manteve-se em fase estacionária até 192h, em seguida houve um declínio em sua concentração que permaneceu constante até o final do processo em cerca de $1,47 \pm 0,008$ g/L. O carboidrato foi consumido até o final da fase estacionária e permaneceu com sua concentração em $6,58 \pm 0,03$ g/L ao final da fermentação fotoinduzida. Na Figura 16a visualiza-se um crescimento menos pronunciado para a *R. rubrum*, atingindo um máximo de 53% do seu valor inicial em 48h. A partir de 96h o crescimento celular foi estabilizado em $1,45 \pm 0,02$ g/L. O consumo de glicose foi mais acentuado nas primeiras 120h, após isto ocorreu vagarosamente até atingir a concentração final de 7,08 g/L.

Ao compararmos os resultados de crescimento celular e consumo de substrato obtidos nas diferentes iluminações percebe-se que, embora tenha ocorrido um maior consumo de substrato pelas bactérias sob iluminação LED branca fria, a biomassa cresceu mais sob iluminação LED NIR.

Figura 15 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. capsulatus*.

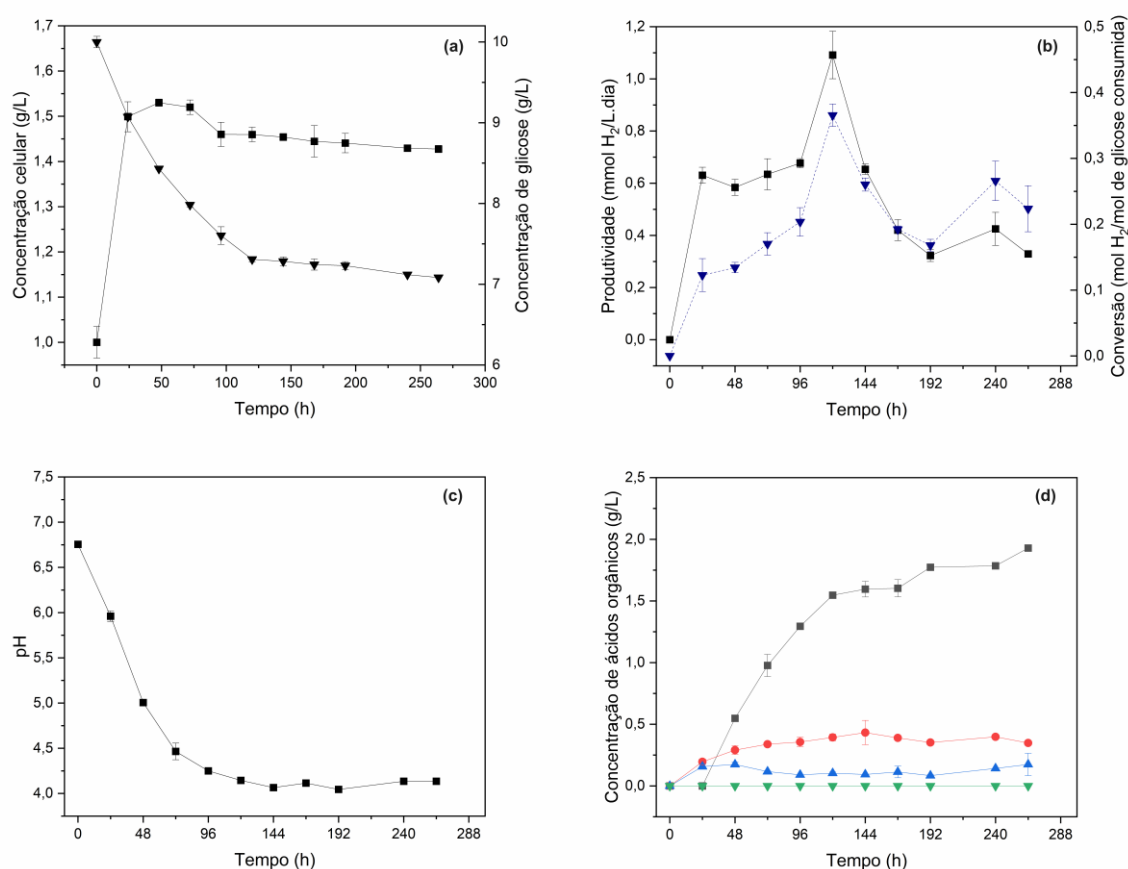


Estudos anteriores concluíram que, em comparação com a luz visível, a luz infravermelha aumentou a concentração de biomassa das bactérias púrpuras não sulfurosas (YU et al., 2022; ZHU; PENG; MA, 2019). Isso possivelmente se deve ao fato da banda espectral NIR estar na faixa de comprimento de onda de absorção do pigmento bacterioclorofila (800–900 nm), que é utilizado pelas bactérias púrpuras não sulfurosas para captura de energia luminosa (GADHAMSHETTY; SUKUMARAN; NIRMALAKHANDAN, 2010). Desta forma, uma maior quantidade de energia luminosa pode ter sido convertida em energia química para a biossíntese das bactérias.

Em relação à produtividade de hidrogênio e conversão de substrato, o Ensaio 3 obteve desempenho superior. Observa-se na Figura 15b produtividade e conversão máximas de $3,61 \pm 0,27$ mmol H₂/L.dia e $0,96 \pm 0,02$ mol H₂/mol de glicose consumida, respectivamente, no tempo de 72h. Em contrapartida, na Figura 16b nota-se produtividade e conversão máximas para o Ensaio 4 de $1,09 \pm 0,09$ mmol H₂/L.dia e

$0,37 \pm 0,02$ mol H_2 /mol de glicose consumida, respectivamente, em 120h de fotofermentação. A cultura *R. capsulatus* nesta condição de iluminação além de crescer mais, se demonstrou 3,3 vezes mais produtiva e em menos tempo que a da *R. rubrum*. Isto nos demonstra que, a fotofermentação somente sob o efeito do infravermelho próximo e com glicose como fonte de carbono é mais efetiva quando empregada a *R. capsulatus*.

Figura 16 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. rubrum*.



Na Figura 15c e Figura 16c nota-se o decaimento do pH devido a produção dos metabólitos ácidos, atingindo um valor final no Ensaio 3 de 3,94 e no Ensaio 4 de 4,14. Em nenhum dos ensaios houve a produção do metabólito ácido butírico e em ambos o ácido predominante foi o láctico (Figura 15d e Figura 16d). Os valores obtidos para o referido ácido foram de $2,3 \pm 0,04$ e 1,93 g/L para os Ensaio 3 e 4, respectivamente.

Conforme estequiometria das Equações 5-8, o único ácido presente associado a produção de H_2 nestes experimentos foi o acético, que atingiu concentrações de 0,62 g/L no Ensaio 3 e 0,35 g/L no Ensaio 4. A maior quantidade deste ácido no Ensaio 3 reafirma o melhor rendimento obtido por este experimento.

5.2.1.3 Ensaio 5 e 6: Sistema de iluminação LED – Luz branca fria + NIR

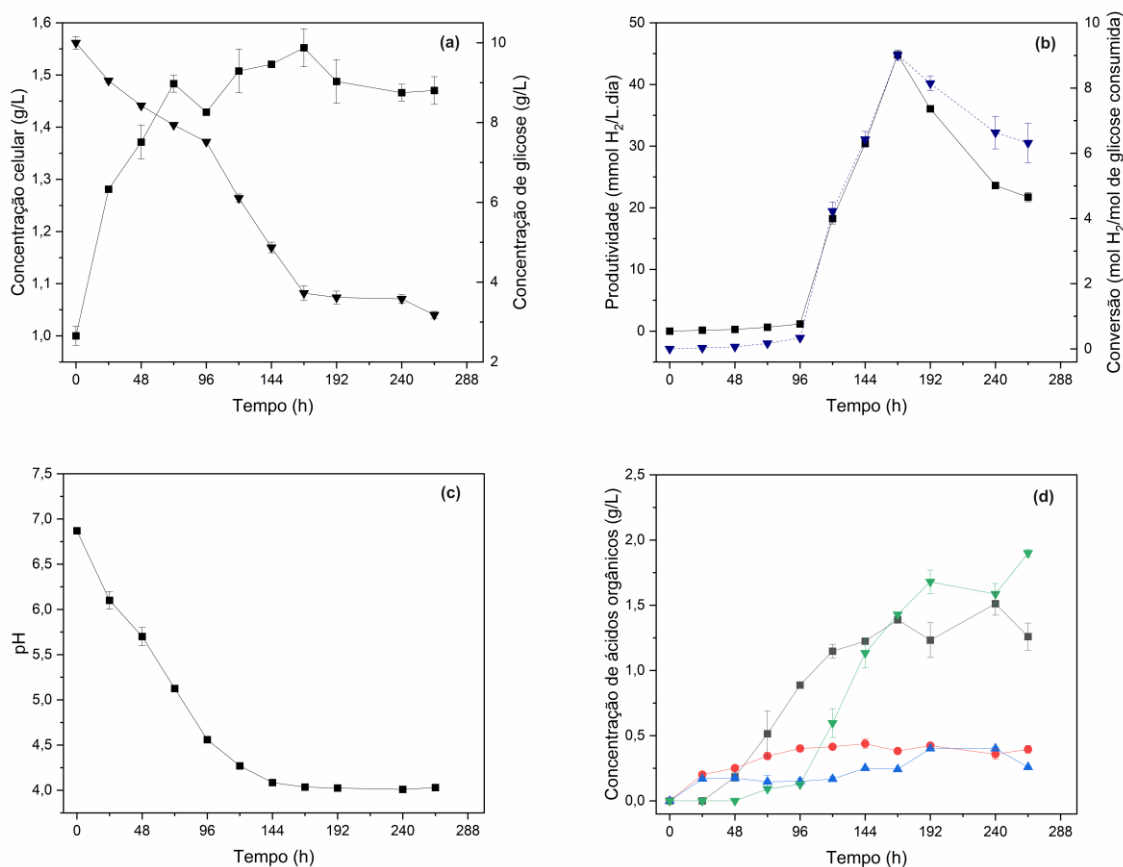
Nos Ensaio 5 e 6 a influência da iluminação simultânea do espectro visível (LED branco frio) e infravermelho (LED NIR, $\lambda=850$ nm) na produção de H_2 , empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente, foi avaliada. Os resultados do Ensaio 5 estão representados nas Figura 17(a-d), enquanto os resultados do Ensaio 6 estão apresentados nas Figura 18(a-d).

Conforme as Figura 17a e Figura 18a os perfis de crescimento das bactérias *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente, foram semelhantes e a fase exponencial ocorreu nas primeiras 72h de fotofermentação. Ao final de 264h, o Ensaio 5 apresentou uma concentração celular de $1,47 \pm 0,03$ g/L, enquanto o Ensaio 6 registrou uma concentração celular de $1,53 \pm 0,04$ g/L. O consumo de glicose foi maior no Ensaio 6, atingindo uma concentração final de $2,52 \pm 0,07$ g/L, correspondente a um consumo de aproximadamente 75% do substrato. No ensaio 5, além do menor consumo de substrato, que foi de 68%, este se tornou pouco significativo após 168h, evidenciando-se uma concentração final de glicose de $3,18 \pm 0,09$ g/L.

Os resultados da produção de hidrogênio e conversão do substrato são apresentados na Figura 17b e Figura 18b. No Ensaio 5, a produtividade de hidrogênio ocorre de forma significativa após 96h, atingindo um máximo de $44,81 \pm 0,15$ mmol H_2 /L.dia em 168h. Após esse ponto, a produtividade apresentou uma tendência de queda até o fim do experimento, atingindo o valor de $21,73 \pm 0,7$ mmol H_2 /L.dia. A conversão seguiu o perfil da produtividade, sendo o seu máximo de $9,01 \pm 0,16$ mol H_2 /mol de glicose consumida, o que corresponde a 75% da conversão máxima teórica. O Ensaio 6 também despontou a produtividade após 96h, havendo um primeiro pico de produtividade de $38,78 \pm 0,6$ mmol H_2 /L.dia em 120h e um segundo pico de $39,67$ mmol H_2 /L.dia em 168h. A tendência de queda ocorreu após 192h, encerrando o experimento em $26,84 \pm 0,66$ mmol H_2 /L.dia. A conversão máxima obtida foi de $9,46$ mol H_2 /mol de glicose consumida no tempo de 192 h, e corresponde a

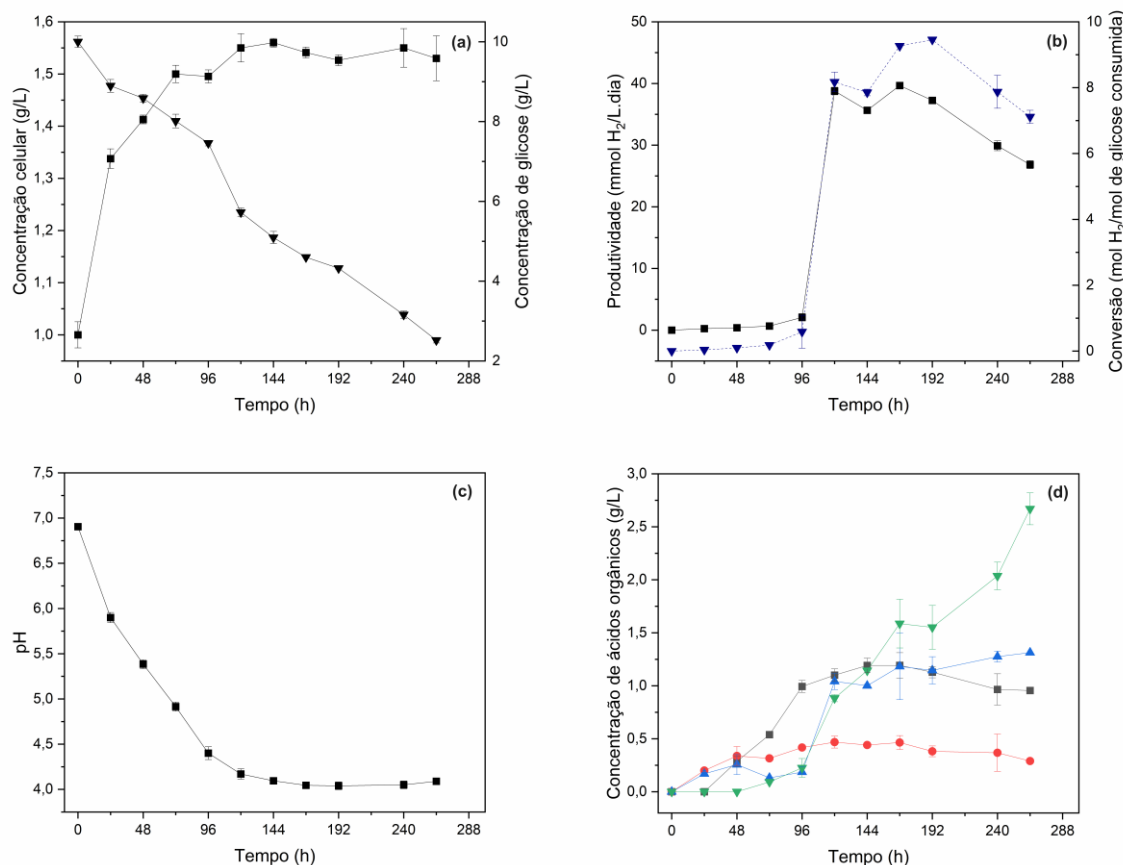
aproximadamente 79% da conversão máxima teórica. Embora o Ensaio 5 tenha obtido um máximo de produtividade superior, o Ensaio 6 se demonstrou mais factível, pois teve uma produtividade de gás sustentada e uma queda inferior de produção até o final do experimento. Isso resultou em uma maior produtividade média de hidrogênio durante o processo fotofermentativo, corroborando com a maior conversão de glicose em hidrogênio também obtida neste ensaio.

Figura 17 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. capsulatus*.



Assim como nos ensaios anteriores, o pH seguiu uma tendência de redução associada a produção de ácidos orgânicos. Na Figura 17c observa-se um pH final de 4,04 e na Figura 18c um pH final de 4,09.

Figura 18 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicose (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e butírico (▼) para *R. rubrum*.



A Figura 17d e a Figura 18d demonstram o comportamento dos metabólitos formados ao longo dos experimentos. Em ambos os ensaios, a presença do ácido butírico aumenta de forma mais pronunciada após 96h, alinhando-se à notável evolução na produtividade e conversão. Ao término dos processos, torna-se o ácido majoritário, com concentrações de $1,90 \pm 0,03$ g/L no Ensaio 5 e $2,67 \pm 0,15$ g/L no Ensaio 6. Portanto, a rota metabólica de produção de hidrogênio dos ensaios está primariamente associada a formação deste ácido, conforme Equação 6.

5.2.1.4 Consolidado dos Ensaios de 1 a 6

A Tabela 7 apresenta o comparativo dos principais resultados dos Ensaios 1-6, detalhados nos tópicos 5.1.1.1, 5.1.1.2 e 5.1.1.3.

Tabela 7 – Consolidado dos resultados obtidos em escala reduzida empregando a glicose como substrato e diferentes fontes de luz.

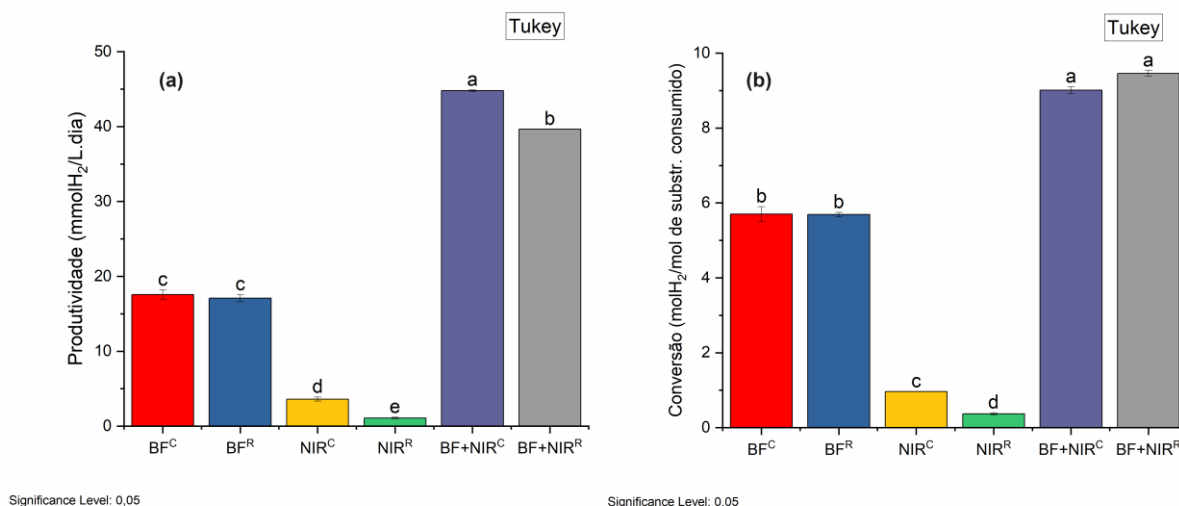
Fonte de luz	Ensaio	Produtividade	Conversão
		máxima (mmol H ₂ /L.dia)	máxima (mol H ₂ /mol glicose)
LED – Luz branca fria	1 ^a	17,57 ± 0,6 (168h)	6,12
	2 ^b	17,10 ± 0,5 (192h)	6,2 ± 0,08
LED NIR	3 ^a	3,61 ± 0,27 (72h)	0,96 ± 0,02
	4 ^b	1,09 ± 0,09 (120h)	0,37 ± 0,02
LED – Luz branca fria e NIR	5 ^a	44,81 ± 0,15 (168h)	9,01 ± 0,16
	6 ^b	39,67 (168h)	9,46

a – *Rhodobacter capsulatus*.b – *Rhodospirillum rubrum*.

Ao analisar os dados da Tabela 7, fica evidente a influência significativa do espectro de luz na fotofermentação. Esta influência pode ser mais bem explicitada por meio da ANOVA (Análise de variância) aplicada ao Teste de Tukey (Teste de comparações múltiplas), em relação aos resultados obtidos pelas duplicatas de produtividade e conversão máxima. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software OriginPro® 2018, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

Em termos práticos, o resultado do teste de Tukey proporciona uma margem de igualdade; se a diferença entre dois tratamentos for maior do que essa margem, as médias são consideradas diferentes. Assim, na Figura 19(a-b), quando as produtividades e/ou conversões foram iguais, elas foram rotuladas com a mesma letra para facilitar a identificação.

Figura 19 – Representação gráfica dos principais resultados de produção de hidrogênio fotofermentativo em diferentes arranjos luminosos e com glicose como substrato. (a) Produtividade e (b) Conversão. As letras “a,b,c,d,e” quando repetidas indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de significância.



BF – Branca fria; NIR – Infravermelho próximo; ^C – *R. capsulatus*; ^R – *R. rubrum*.

Ao analisar a Figura 19a, nota-se que houve diferença significativa entre todos os arranjos de iluminação, exceto para a iluminação branca fria, que apresentou produtividade máxima estatisticamente igual tanto com a *R. capsulatus* quanto com a *R. rubrum*. A Figura 19b demonstra que em termos de conversão, os ensaios com iluminação branca fria foram estatisticamente iguais entre si, bem como os sob influência do sistema LED – branco frio e NIR. A iluminação NIR demonstrou diferença significativa na conversão de glicose em hidrogênio empregando as diferentes cepas. Além disso, ao comparar as diferentes fontes de iluminação, todos apresentaram diferença significativa na conversão.

Diante do exposto, nota-se que a produção de hidrogênio fotoinduzida pela iluminação simultânea de diodos emissores de luz branca fria e infravermelho próximo, com suplementação de glicose, se destaca em relação as iluminações individualizadas. Embora a máxima produtividade de hidrogênio tenha sido obtida pelo Ensaio 5, a alternativa mais promissora ocorreu na presença da cepa *R. rubrum* (Ensaio 6). Conforme visto anteriormente (Figura 17b e Figura 18b), enquanto o perfil de produtividade de hidrogênio do Ensaio 5 apresenta um pico seguido por uma queda

pronunciada, o perfil do Ensaio 6 sustenta por mais tempo uma elevada produtividade do gás de interesse. O arranjo de iluminação deste experimento gerou um efeito sinérgico, resultando em um aumento de 36,4 vezes na produtividade e 25,6 vezes na conversão, em comparação com a condição de iluminação LED NIR para a mesma bactéria. Estudos anteriores sugerem que algumas partes do espectro de luz visível são essenciais para a cepa alcançar uma alta produção de H_2 (TIANG et al., 2020). Somado a isso, de acordo com a pesquisa de Turon et al. (2018), a presença de luz visível aumenta a capacidade das células bacterianas de aproveitar os fótons da parte NIR do espectro.

A cinética de produtividade foi positivamente influenciada pela iluminação infravermelha. Na configuração com maior potencial (LED – Luz branca fria e NIR), o pico de produtividade do Ensaio 6 ocorreu 72 h antes da condição que também utilizou a cepa *R. rubrum*, no entanto, unicamente sob iluminação branca fria. Além disso, apesar dos picos de produtividade nos Ensaios 5 e 1 terem sido ambos alcançados em 168 h, a celeridade associada à radiação NIR é evidente. Conforme visto na Figura 17b, em 120 h o Ensaio 5 já demonstrava uma produtividade superior ao Ensaio 1 (Figura 13b).

Uyar e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do comprimento de onda da luz no crescimento e produção de hidrogênio com a bactéria PNS *Rhodobacter sphaeroides* OU 001. Assim como no presente estudo, os resultados mostraram que a ausência da luz infravermelha (750 – 950 nm) gerou um atraso maior na produção de hidrogênio, sendo, neste caso, de 40h em comparação com 17 horas para o fotobiorreator de controle (370 – 1035 nm).

Embora tenham sido observadas as maiores cinéticas de crescimento celular, o fornecimento unicamente de radiação infravermelha próxima não se demonstrou eficaz para a produção de biohidrogênio nas condições abordadas. Isso porque, quando comparada com a iluminação LED branca fria, a produtividade reduziu em 79,5% e 93,6% com as cepas *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente. Sugere-se que a ausência do componente visível foi um fator limitante na conversão de substrato e produtividade de hidrogênio. Além disso, a queda de produção de hidrogênio pode estar associada a predileção pela rota láctica (Equação 8), notavelmente estimulada por esta radiação.

Uma diferença de maior magnitude na produtividade e conversão entre as cepas estudadas quando expostas somente ao espectro infravermelho próximo foi observada. Sugere-se que esses resultados estejam associados a uma maior eficiência fotoquímica da cepa *R. capsulatus*, uma vez que esta bactéria exibe um pico de absorção no infravermelho próximo mais compatível com a banda de emissão do LED NIR utilizado. Segundo Wang et al. (2014), o espectro de absorção *in vivo* da cepa *R. capsulatus* DSM 1710 apresenta picos de absorção em 803 e 860 nm no infravermelho próximo. Enquanto isto, a cepa *R. rubrum* DSM 467 apresenta um único pico de absorção na região do infravermelho, em 890 nm (GOBEL, 1978).

Turon e colaboradores (2018) conduziram um estudo de produção de hidrogênio fotofermentativo, utilizando diferentes fontes de luz, com a cepa *Rhodobacter capsulatus* IR3 e lactato como fonte de carbono. Os resultados mostraram que a luz NIR usada como única fonte de luz não sustentou eficientemente a produção de H₂. Adicionalmente, a presença de luz visível aumentou o uso do comprimento de onda NIR pelas bactérias. Por fim, o fornecimento concomitante do comprimento de onda visível e NIR maximizou a produção de hidrogênio.

5.2.2 Fotofermentações sob diferentes arranjos de iluminação e suplementadas com glicerol

Como segunda etapa deste trabalho, a influência de diferentes diodos emissores de luz na produção de hidrogênio foi estudada perante as cepas *R. rubrum* e *R. capsulatus*, quando inoculadas em meio contendo glicerol, uma fonte de carbono de estrutura química bastante diferente ao do monossacarídeo. Os ensaios tiveram duração de 456 h.

5.2.2.1 Ensaios 7 e 8: Iluminação LED branca fria

Nos Ensaios 7 e 8 avaliou-se a influência da iluminação LED branca fria na produção de hidrogênio empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente. A Figura 20(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 7 e a Figura 21(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 8.

Na Figura 20a pode ser visualizado o crescimento da cultura *R. capsulatus* até 144 horas de ensaio, atingindo uma concentração de $1,55 \pm 0,03$ g/L. Posteriormente, a biomassa manteve-se em fase estacionária até o final do experimento. O glicerol foi consumido parcialmente, em cerca de 38%, e somente nas primeiras 288 h de fermentação. Na Figura 21a é possível observar um crescimento da cultura *R. rubrum* mais acentuado e por um período mais prolongado que a *R. capsulatus*, atingindo a concentração de 1,90 g/L após 192h. A partir de 336h o crescimento celular foi estabilizado em 1,63 g/L. O glicerol foi consumido em cerca de 43,4%.

Figura 20 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*.

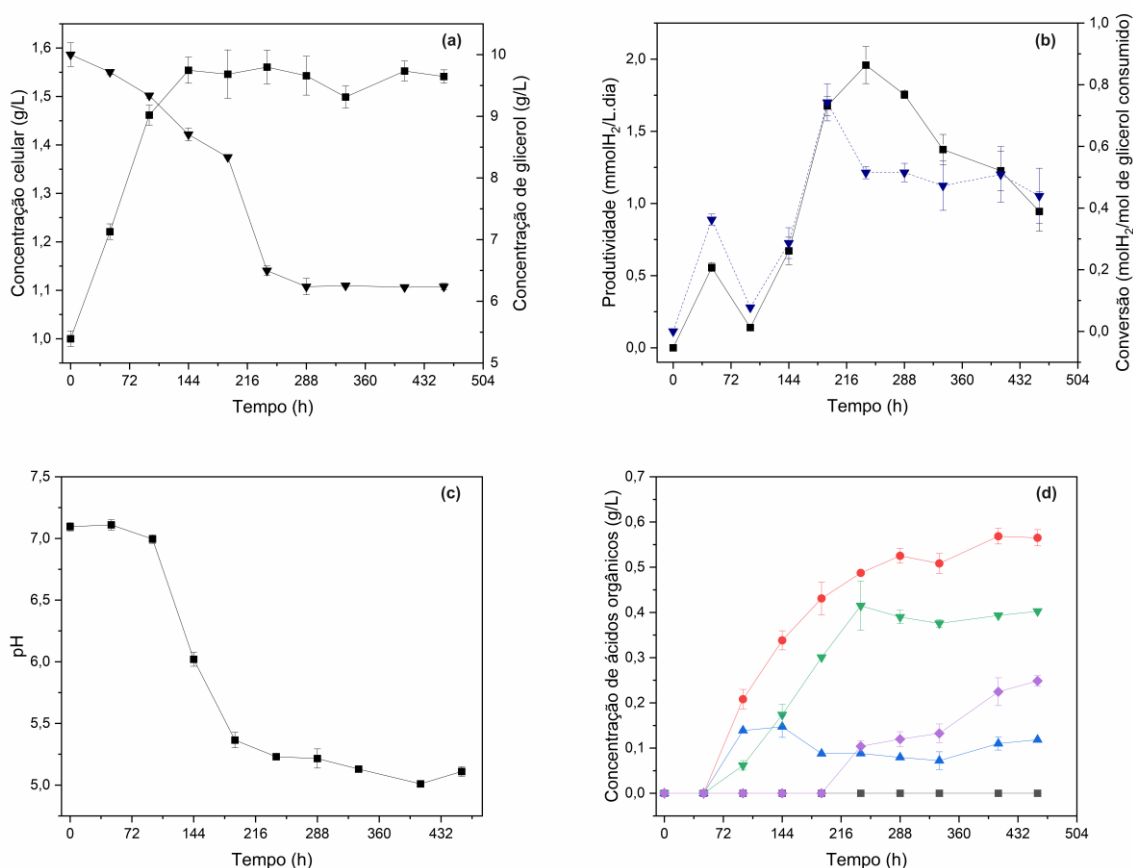
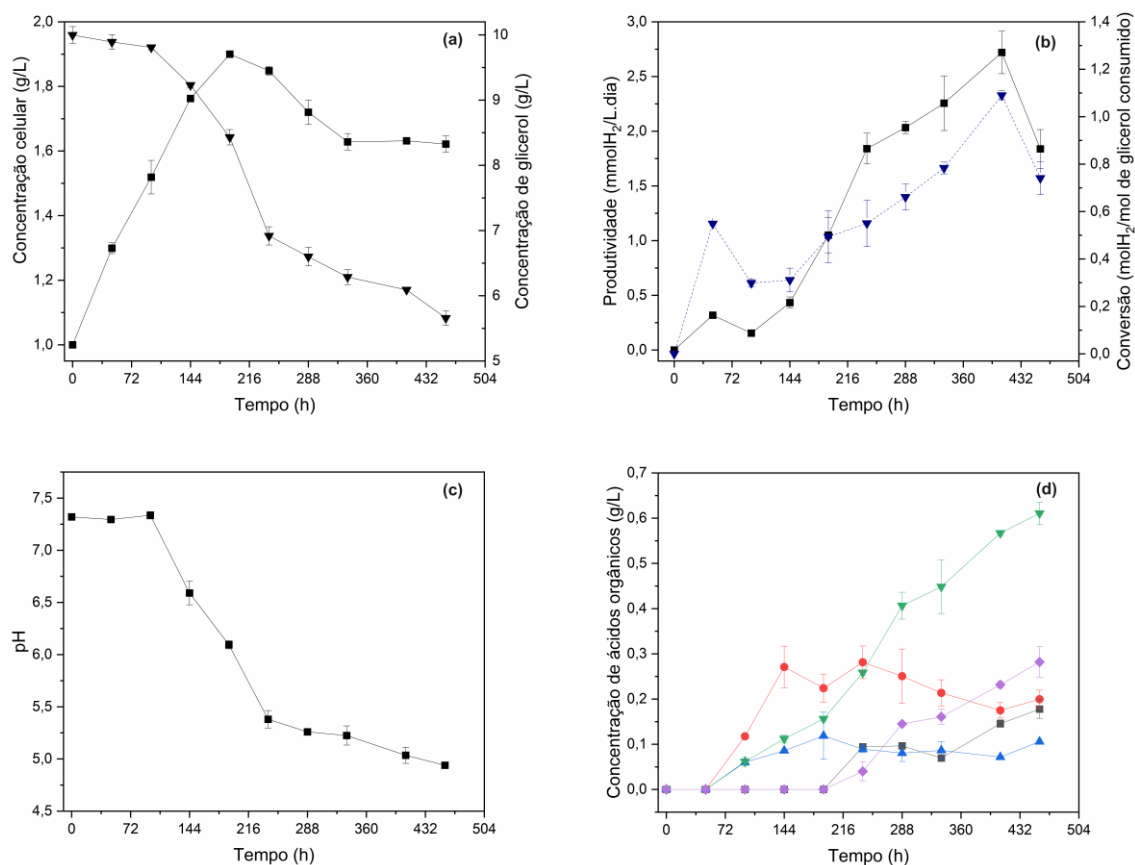


Figura 21 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. rubrum*.



Os resultados de produtividade de hidrogênio e conversão do glicerol estão representados na Figura 20b e na Figura 21b. No Ensaio 7, a produtividade máxima alcançada foi de $1,96 \pm 0,12$ mmol H₂/L.dia em 240 h. Após esse ponto, observou-se uma tendência de queda na produtividade, chegando a $0,94 \pm 0,13$ mmol H₂/L.dia no final do experimento. A conversão máxima obtida foi de $0,74 \pm 0,06$ mol H₂/mol de glicerol consumido, após 192 h de processo. Enquanto isso, o Ensaio 8 obteve uma produtividade máxima de $2,72 \pm 0,19$ mmol H₂/L.dia com uma conversão de $1,09 \pm 0,02$ mol H₂/mol de glicerol consumido, no tempo de 408 h. Embora o pico de produtividade do Ensaio 8 tenha sido obtido tardiamente em relação ao Ensaio 7, a produtividade deste ensaio, em 240 h, aproximou-se da do Ensaio 7 e, posteriormente, manteve-se acima até o final do experimento.

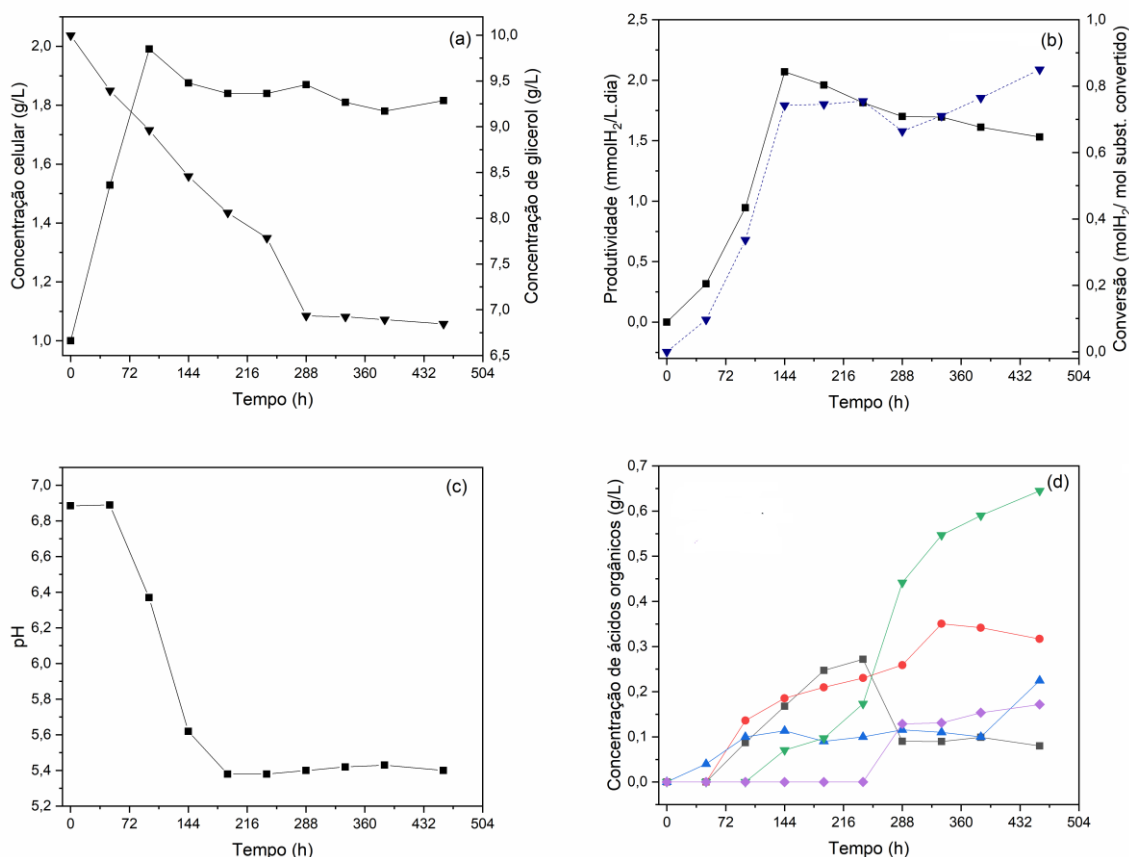
Assim como nos ensaios com glicose, os ensaios com glicerol como fonte de carbono e iluminação LED branca fria resultaram na produção de ácidos orgânicos, desencadeando o decréscimo do pH com o tempo. Conforme apontado pela Figura 20c e Figura 21c, o pH diminuiu de forma significativa somente após 96 h, devido à baixa quantidade de ácidos formados. Ao final, o Ensaio 7 apresentou um pH de 5,11 e o Ensaio 8 um pH de 4,94.

Os perfis dos ácidos orgânicos formados podem ser visualizados na Figura 20d e na Figura 21d. Na Figura 20d observa-se como rota metabólica preferencial da cepa *R. capsulatus* a de produção do ácido acético, atingindo uma concentração final de $0,57 \pm 0,02$ g/L. Os ácidos butírico e propiônico também foram gerados, sendo suas concentrações finais de 0,40 e 0,12 g/L, respectivamente. Além disso, houve a produção de ácido succínico a partir de 240 h, metabólito não observado quando utilizada a glicose como substrato. A produção desse ácido ocorreu após 240 h e atingiu a concentração máxima de $0,25 \pm 0,01$ g/L no final do processo. A Figura 21d apresenta uma rota metabólica preferencial para a bactéria *R. rubrum* diferente da demonstrada pela *R. capsulatus*, sendo a de produção de ácido butírico, atingindo uma concentração final de $0,61 \pm 0,02$ g/L. Os ácidos láctico, acético, propiônico e succínico também foram produzidos, sendo suas concentrações finais de $0,18 \pm 0,02$, $0,20 \pm 0,02$, 0,11 e $0,28 \pm 0,03$ g/L, respectivamente. Conforme demonstrado pelas Equações (16-19), a rota metabólica que produz o ácido butírico a partir do glicerol está associada a uma maior produção de hidrogênio, o que corrobora com os resultados e o consequente melhor desempenho obtido pelo Ensaio 8.

5.2.2.2 Ensaios 9 e 10: Iluminação LED NIR

Os Ensaios 9 e 10 foram realizados para avaliar a influência da radiação do espectro infravermelho próximo (LED NIR, $\lambda=850$ nm) na produção de hidrogênio empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente. A Figura 22(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 9 e a Figura 23(a-d) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 10.

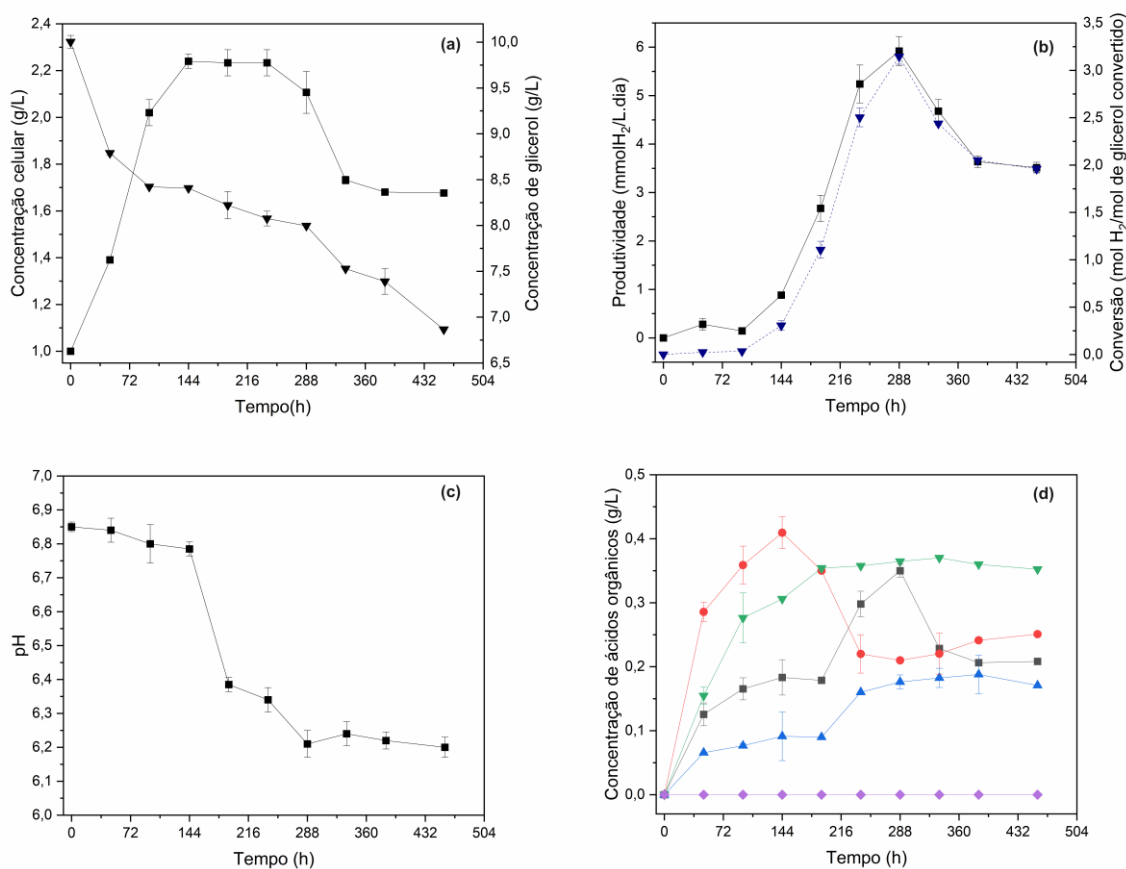
Figura 22 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*.



De acordo com a Figura 22a, houve um aumento na concentração celular da cultura *R. capsulatus* de 2 vezes em relação ao valor inicial, após 96 h. Subsequentemente, ocorreu um pequeno declínio na concentração celular e a bactéria se manteve em fase estacionária. Ao final do ensaio a concentração da biomassa celular foi de 1,82 g/L. O glicerol foi consumido de modo mais expressivo nas primeiras 288 h de fermentação. O consumo deste álcool foi de 31,5%, o que corresponde a uma concentração final de 6,85 g/L. Na Figura 23a visualiza-se um crescimento mais pronunciado para a *R. rubrum*, atingindo 2,2 vezes a concentração inicial até o tempo de 144 h. A partir de 240 horas, ocorre um decréscimo na concentração de biomassa, que se estabiliza em 336 h e permanece em $1,68 \pm 0,005$ g/L até o final do ensaio. O glicerol foi consumido na mesma proporção que a cultura

R. capsulatus, sendo este consumo pela *R. rubrum* de 31,3%, equivalente a uma concentração final de 6,87 g/L.

Figura 23 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. rubrum*.



Em relação a produtividade de hidrogênio e conversão de substrato, o Ensaio 10 obteve desempenho superior. Observa-se na Figura 22b produtividade e conversão máximas de $5,71 \pm 0,3$ mmol H₂/L.dia e $3,14 \pm 0,08$ mol H₂/mol de glicerol consumido, respectivamente, no tempo de 288 h. Em contrapartida, na Figura 23b se observa uma produtividade máxima de $2,07 \pm 0,17$ mmol H₂/L.dia para o Ensaio 9, em 144h de fotofermentação. Posteriormente, a produtividade decaiu sutilmente, mantendo-se em $1,53 \pm 0,009$ mmol H₂/L.dia ao final do processo. Nota-se que a produção de hidrogênio foi parcialmente associada ao crescimento celular. A

conversão máxima foi de $0,85 \pm 0,002$ mol H_2 /mol de glicerol consumido, obtida ao final do ensaio. Essa tendência crescente de conversão após 288 horas ocorre devido à continuidade da produção de hidrogênio com uma quantidade mínima de substrato consumido.

O pH para ambos os ensaios seguiu uma tendência de queda associada à produção de ácidos orgânicos. Na Figura 22c visualiza-se o decaimento do pH até 192 h, mantendo-se, ao final do Ensaio 9, em 5,40. Na Figura 23c identifica-se um ligeiro decaimento, de um pH inicialmente em 6,85 a um pH de 6,20 ao final do Ensaio 10. O referido fato está associado ao consumo dos metabólitos ácidos formados (ácidos láctico e acético).

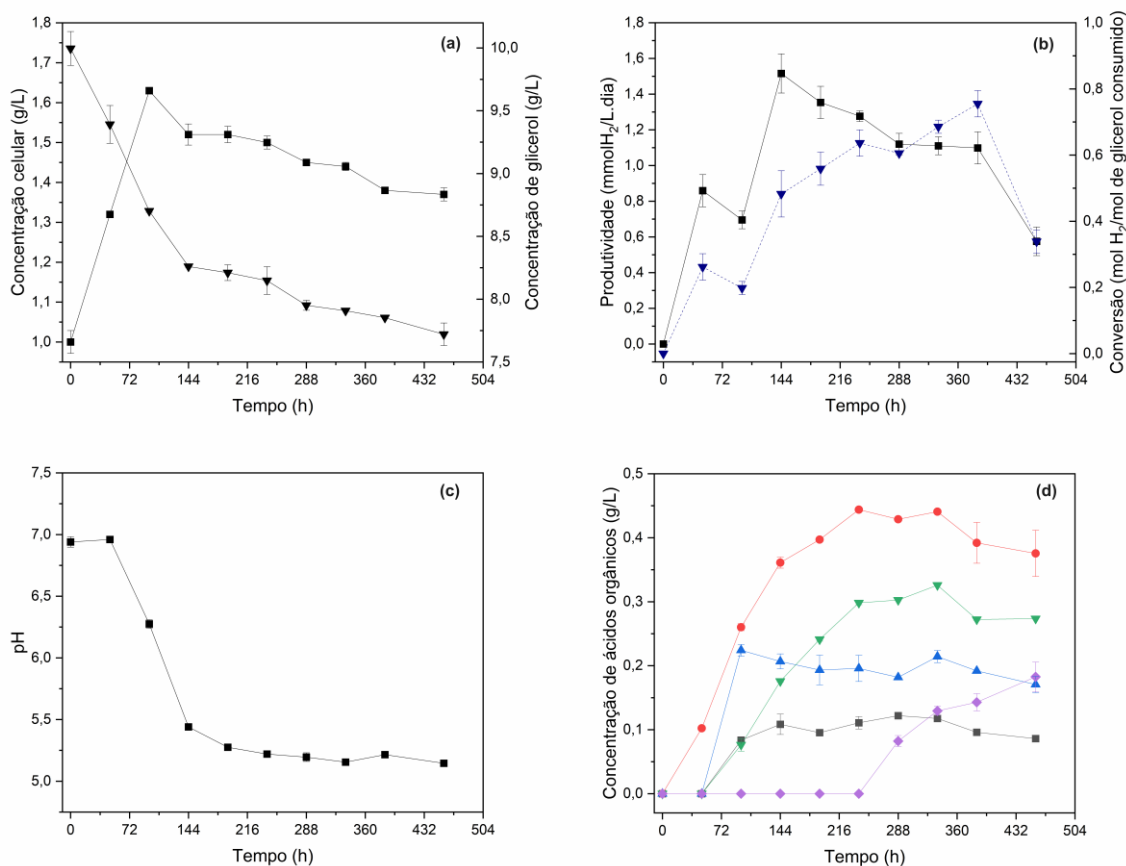
A Figura 22d e a Figura 23d demonstram o comportamento dos metabólitos formados ao longo dos experimentos. Em ambos os ensaios, o ácido predominante ao final do processo foi o butírico. Na Figura 22d, após 288 h nota-se o consumo parcial do ácido láctico produzido acompanhado da produção de ácido succínico. Ao final, as concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico, butírico e succínico gerados no Ensaio 9 foram de $0,08 \pm 0,01$, 0,32, $0,23 \pm 0,03$, $0,65 \pm 0,04$ e 0,17 g/L, respectivamente. Na Figura 23d observa-se a produção e consumo parcial dos ácidos acético e láctico e a ausência de produção de ácido succínico. Ao final, as concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico gerados no Ensaio 10 foram de 0,21, 0,25, 0,17 e 0,35 g/L, respectivamente. A maior produção de hidrogênio observado no ensaio com a cultura *R. rubrum* está predominantemente vinculada ao consumo de ácido acético, capaz de produzir 4 mol H_2 / mol CH_3COOH (Equação 11). Nota-se que a maior evolução na produtividade de hidrogênio ocorre simultaneamente ao consumo deste ácido, indicando que a maior parte da produção está indiretamente relacionada ao glicerol.

5.2.2.3 Ensaios 11 e 12: Sistema de iluminação LED – Luz branca fria + NIR

Nos Ensaios 11 e 12 a influência da iluminação simultânea do espectro visível (LED branco frio) e infravermelho (LED NIR, $\lambda=850$ nm) na produção de H_2 , empregando os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*, respectivamente, foi avaliada. Os resultados do Ensaio 11 estão representados nas Figura 24(a-d), enquanto os resultados do Ensaio 12 estão apresentados nas Figura 25(a-d).

Conforme Figura 24a, nesta configuração experimental a cepa *R. capsulatus* cresceu por 96 h, atingindo uma concentração máxima de $1,63 \pm 0,006$ g/L. Após isto, houve um declínio da concentração que se manteve entre 1,52 e 1,37 g/L até o final do experimento. O glicerol foi consumido mais expressivamente na fase log de crescimento bacteriano e a sua concentração ao final do ensaio foi de $7,72 \pm 0,09$ g/L, o que representa um consumo de aproximadamente 23%.

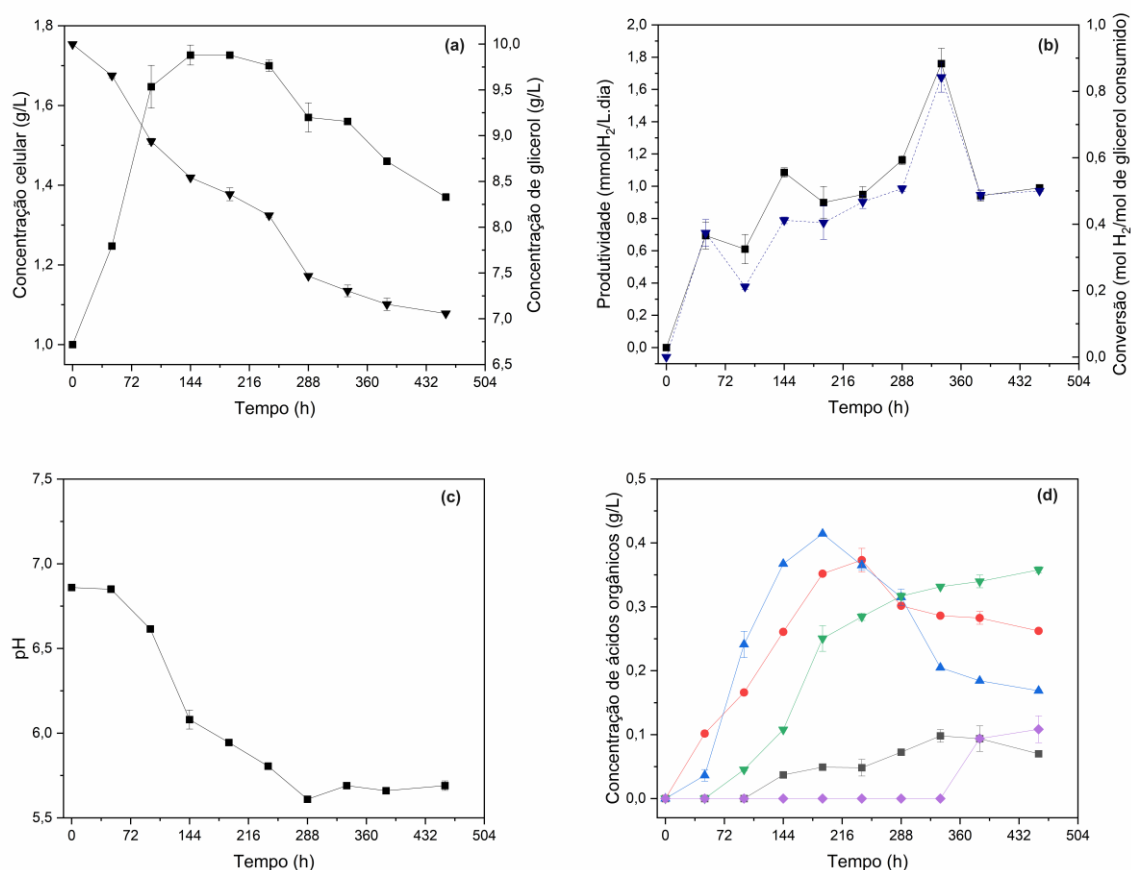
Figura 24 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. capsulatus*.



Na Figura 25a, é possível observar o crescimento da cepa *R. rubrum* até 144 horas de experimento, atingindo uma concentração de $1,73 \pm 0,02$ g/L. A fase estacionária mantém-se até 240 h. Posteriormente, ocorre um declínio na concentração da biomassa que atinge $1,37 \pm 0,009$ g/L ao final do ensaio. O glicerol

foi consumido em cerca de 29,4%, o que equivale a uma concentração de $7,06 \pm 0,001$ g/L após 456 h.

Figura 25 – Perfil de (a) concentração celular (■) / concentração de glicerol (▼); (b) produtividade (■) / conversão (▼); (c) pH; (d) concentração de ácidos orgânicos: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲); butírico (▼) e succínico (◆) para *R. rubrum*.



Os resultados da produção de hidrogênio e conversão do substrato são apresentados na Figura 24b e na Figura 25b. O Ensaio 11 obteve seu pico de produtividade de hidrogênio após 144 h, sendo este de $1,52 \pm 0,11$ mmol H₂/L.dia. A conversão máxima obtida foi de $0,76 \pm 0,04$ mol H₂/mol de glicerol consumido, após 384h de fermentação fotoinduzida. Já o Ensaio 12 obteve uma produtividade máxima de $1,76 \pm 0,09$ mmol H₂/L.dia, em 336 h de processo. A conversão seguiu o perfil da produtividade, sendo o seu máximo de $0,84 \pm 0,04$ mol H₂/mol de glicerol consumido. Assim, percebe-se que ambos os ensaios alcançaram valores máximos semelhantes,

porém o Ensaio 11 destacou-se em relação à precocidade, uma vez que atingiu sua produtividade máxima 192h antes da do Ensaio 12.

De acordo com a Figura 24c, o pH diminuiu mais expressivamente nas primeiras 144 h e se manteve em 5,15 ao término do experimento. Enquanto isto, na Figura 25c o pH decresce até 288h. Subsequentemente, um leve incremento ocorre devido ao consumo de metabólitos ácidos presentes no meio reacional. Desta forma, ao final, o experimento 12 apresenta um pH de 5,69.

O perfil dos metabólitos formados pode ser verificado na Figura 24d e na Figura 25d. No Ensaio 11, o metabólito ácido acético foi majoritariamente formado ao longo de todo o ensaio, apresentando uma concentração de $0,38 \pm 0,04$ g/L após 456 horas. Além disso, os ácidos láctico, propiônico, butírico e succínico foram formados ao longo do experimento, sendo suas concentrações $0,09 \pm 0,003$, $0,17 \pm 0,01$, $0,27$ e $0,18 \pm 0,02$ g/L, respectivamente, ao final do ensaio. No Ensaio 12 o metabólito produzido em maior quantidade foi o ácido propiônico, atingindo a concentração máxima de $0,41$ g/L em 192 horas de fotofermentação. Posteriormente, foi parcialmente consumido até $0,17$ g/L ao final do processo. O perfil de produção e consumo também foi observado com o ácido acético, sendo sua concentração máxima de $0,37 \pm 0,02$ g/L em 240 h e $0,26$ g/L ao final do processo. Ademais, os ácidos láctico, butírico e succínico foram formados, sendo suas concentrações ao final do ensaio de $0,07 \pm 0,001$, $0,36 \pm 0,005$ e $0,11 \pm 0,02$ g/L, respectivamente. Nota-se que neste experimento o período de maior evolução na produtividade de hidrogênio ocorreu com o consumo do ácido propiônico, que conforme Equação 12 pode formar $7 \text{ mol H}_2 / \text{mol C}_3\text{H}_6\text{O}_2$. Desta forma, evidencia-se uma produção de hidrogênio dominada pela rota do ácido acético no Ensaio 11 e, no Ensaio 12, pelas rotas dos ácidos acético, butírico e principalmente por uma rota indiretamente associada ao glicerol, a de consumo do metabólito ácido propiônico.

5.2.2.4 Consolidado dos Ensaio de 7 a 12

A Tabela 8 apresenta o compilado dos principais resultados dos Ensaio 7-12, detalhados nos tópicos 5.1.2.1, 5.1.2.2 e 5.1.2.3.

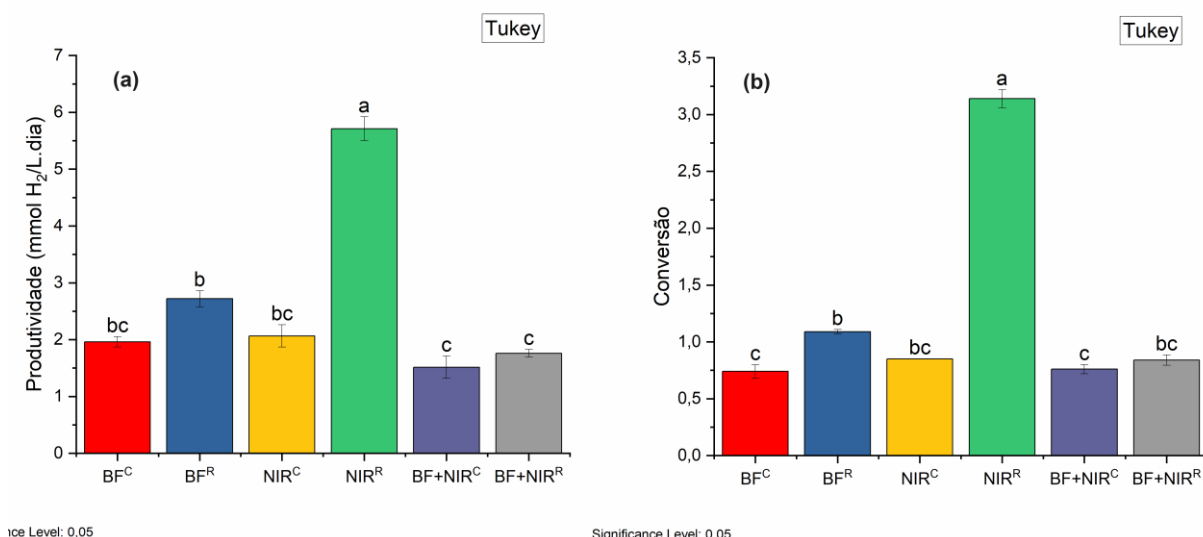
Tabela 8 – Consolidado dos resultados obtidos em escala reduzida empregando o glicerol como substrato e diferentes fontes de luz.

Fonte de luz	Ensaio	Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão máxima (mol H ₂ /mol glicerol)
LED – Luz branca fria	7 ^a	1,96 ± 0,12 (240h)	0,74 ± 0,06
	8 ^b	2,72 ± 0,19 (408h)	1,09 ± 0,02
LED NIR	9 ^a	2,07 ± 0,17 (144h)	0,85 ± 0,002
	10 ^b	5,71 ± 0,3 (288h)	3,14 ± 0,08
LED – Luz branca fria e NIR	11 ^a	1,52 ± 0,11 (144h)	0,76 ± 0,04
	12 ^b	1,76 ± 0,09 (336h)	0,84 ± 0,04

a – *Rhodobacter capsulatus*.b – *Rhodospirillum rubrum*.

Os dados da Tabela 8 demonstram que a produção fotofermentativa de hidrogênio utilizando glicerol como substrato e sob iluminação NIR destacou-se em comparação às demais condições de luminosidade. Este resultado pode ser melhor compreendido ao se aplicar o teste de Tukey aos resultados de produtividade e conversão máxima. Assim como nos Ensaio de 1 a 6, nos Ensaio de 7 a 12 a interpretação do teste de Tukey foi realizada após determinar-se a diferença mínima significativa pelo *software* OriginPro® 2018, utilizando a ferramenta ANOVA, que gerou a comparação par a par de Tukey ao nível de significância de 5%. Na Figura 26(a-b), quando as produtividades e/ou conversões foram iguais, elas foram rotuladas com a mesma letra para facilitar a identificação.

Figura 26 – Representação gráfica dos principais resultados de produção de hidrogênio fotofermentativo em diferentes arranjos luminosos e com glicerol como substrato. (a) Produtividade e (b) Conversão. As letras “a,b,c” quando repetidas indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de significância.



BF – Branca fria; NIR – Infravermelho próximo; ^C – *R. capsulatus*; ^R – *R. rubrum*.

A Figura 26a demonstra que a iluminação branca fria (BF) não afeta significativamente a produtividade, independentemente da bactéria empregada. A mesma ausência de significância na produtividade foi observada sob a iluminação simultânea de luz branca fria e infravermelho próximo (BF+NIR). A única fonte de luz que apresentou diferença significativa na produtividade com as diferentes bactérias foi a NIR, destacando-se o ensaio com a *R. rubrum* (NIR^R) em comparação a todas as conformações experimentais. O emprego da bactéria *R. capsulatus* não afetou significativamente a produtividade nas diferentes fontes luminosas, enquanto o da bactéria *R. rubrum* mudou a produtividade significativamente com a fonte de luz. Em termos de conversão, observa-se na Figura 26b que os ensaios sob iluminação isolada (BF/NIR) foram significativamente afetados pela mudança de bactéria. A iluminação concomitante de luz branca fria e NIR (BF+NIR) não teve sua conversão de substrato afetada de forma significativa com a variação de microrganismo. Os arranjos experimentais com a presença da cultura *R. capsulatus* não demonstraram variações significativas na conversão. Assim como para a produtividade, o ensaio sob influência do espectro infravermelho próximo e utilizando a cultura *R. rubrum* (NIR^R)

se destacou, apresentando uma conversão maior e estatisticamente diferente dos demais arranjos experimentais.

A radiação NIR não apenas aumentou a produtividade de hidrogênio e a conversão do substrato, mas também conferiu celeridade a esses ensaios. Como visto acima, o experimento com esta iluminação e inoculado com a cultura *R. rubrum* sobressaiu-se dos demais, alcançando uma produtividade máxima cerca de duas vezes a do ensaio com esta cepa sob iluminação LED branca fria, e 120 h antes. Além disso, a conversão de glicerol em hidrogênio obtida neste ensaio corresponde a 45% da conversão teórica máxima e foi aproximadamente três vezes maior que a obtida com luz branca fria. Adicionalmente, os experimentos com a cepa *R. capsulatus* obtiveram picos de produtividade com 96h de antecedência devido à presença da iluminação NIR.

Xiao (2017) investigou a produção de hidrogênio com glicerol e a cultura *R. palustris* sob três fontes de luz diferentes: lâmpada incandescente, LED branco e LED infravermelho com comprimento de onda de 850 nm. A taxa média de produção de hidrogênio com LEDs infravermelhos foi de $1,78 \pm 0,02$ mmol/L.dia, o que representou um aumento de 22% em relação aos LEDs brancos ($1,46 \pm 0,01$ mmol/L.dia). A produção de H₂ com lâmpada incandescente foi a mais baixa ($0,06 \pm 0,01$ mmol/L.dia), representando 3 a 4% da obtida com LEDs infravermelhos e brancos. Esses resultados corroboram com o melhor desempenho também obtido pela iluminação NIR no presente estudo.

Pio e colaboradores (2023) obtiveram a produtividades máximas sob iluminação fluorescente e em escala reduzida com as bactérias *R. capsulatus* e *R. rubrum* de 2,3 e 2,17 mmol H₂/L.dia, respectivamente. Adicionalmente, as conversões alcançadas foram de 9,4% e 19,14%, respectivamente, em relação ao máximo teórico de 7 mol H₂ /mol glicerol. Pode-se verificar que a produtividade e conversão obtidas para a cepa *R. rubrum* sob iluminação NIR foram maiores, sugerindo uma provável relação de sinergia com a fonte de luz empregada.

A investigação do processo fotofermentativo empregando a bactéria *R. palustris* e o glicerol como substrato é bem documentada na literatura. Em uma pesquisa conduzida por Pott et al. (2013), a eficiência de conversão de glicerol em hidrogênio com a cepa *R. palustris* foi encontrada na faixa de 80-85%, com algumas

repetições dando valores tão altos quanto 90%. Esses resultados estão alinhados com outros estudos, como o de Sabourin-Provost e Hallenbeck (2009), que relataram uma conversão de 75%, e o de Ghosh et al. (2012), que alcançou uma conversão de até 96%. Por outro lado, no estudo de Bosman e colaboradores (2023), as conversões de glicerol em hidrogênio sob iluminação LED e halógena foram substancialmente menores, registrando 19,0% ($\pm 2,3\%$) e 17,6% ($\pm 1,6\%$), respectivamente.

Os resultados menos expressivos obtidos pelos ensaios inoculados com *R. capsulatus* podem estar associados a uma capacidade limitada de assimilação do glicerol. Estudos anteriores demonstraram que esse organismo é normalmente incapaz de crescer neste álcool (VAN NIEL, 1944; WEAVER; WALL; GEST, 1975). Entretanto, é possível adquirir a capacidade de utilizar o glicerol por meio de eventos mutacionais. Spear e Sojka (1984) examinaram cepas de *R. capsulatus* de origens geográficas diversas e constataram que podem ser convertidas para um fenótipo catabólico de glicerol. Isso sugere que a capacidade de utilizar este álcool após passar por uma mutação de ganho de função é uma propriedade generalizada de *R. capsulatus*. Estas constatações corroboram com o trabalho atual, que embora tenha alcançado baixas conversões de glicerol em hidrogênio com esta bactéria, cresceram neste substrato.

5.2.3 Considerações gerais

Os resultados obtidos com substratos de diferentes grupos funcionais foram contrastantes nas bactérias púrpuras não sulfóricas abordadas (Tabela 9). A capacidade de absorver, processar e utilizar a glicose para fins de produção de hidrogênio se mostraram muito superiores em comparação ao glicerol, que se demonstrou um composto de difícil assimilação para estas estirpes.

Tabela 9 – Consolidado dos principais resultados obtidos em escala reduzida.

Fonte de Luz	Organismo	Substrato - Glicose		Substrato - Glicerol	
		Produtividade máx. (mmol H ₂ / L.dia)	Conversão máx. (mol H ₂ / mol subst. consum.)	Produtividade máx. (mmol H ₂ / L.dia)	Conversão máx. (mol H ₂ / mol subst. consum.)
LED – Luz branca fria	<i>R. capsulatus</i>	17,57	5,70	1,96	0,74
	<i>R. rubrum</i>	17,10	5,69	2,72	1,09
LED - NIR	<i>R. capsulatus</i>	3,61	0,96	2,07	0,85
	<i>R. rubrum</i>	1,09	0,37	5,71	3,14
LED – Luz branca fria e NIR	<i>R. capsulatus</i>	44,81	9,01	1,52	0,76
	<i>R. rubrum</i>	39,67	9,46	1,76	0,84

Observa-se que, nos ensaios com glicose como fonte de carbono, o uso combinado das fontes de luz criou um sinergismo que estimulou a rota metabólica de produção do ácido butírico e, conseqüentemente, a produção de hidrogênio. Em contrapartida, nos ensaios com glicerol como fonte de carbono, o fornecimento simultâneo dos espectros visível e infravermelho próximo estimulou a rota de produção do ácido propiônico. No estudo de Jiang et al. (2021), a formação desse ácido a partir do glicerol foi acompanhada por uma diminuição na produção de hidrogênio. Desta forma, sugere-se que, no presente estudo, a maior geração de ácido propiônico esteja associada à menor produção de hidrogênio obtida nesse arranjo luminoso. Além disso, o fornecimento isolado da radiação NIR estimulou significativamente a bactéria *R. rubrum* a hidrolisar o glicerol por rotas metabólicas com maior potencial de produção de hidrogênio que as demais configurações luminosas. Por outro lado, quando utilizada a glicose como substrato essa iluminação estimulou as bactérias a produzirem ácido láctico e a inibirem a produção do ácido butírico, reduzindo dessa forma substancialmente a produção de hidrogênio. Evidencia-se assim que a interação entre fonte luminosa e substrato interfere expressivamente na produção de hidrogênio.

Baseado nos resultados apresentados anteriormente, conclui-se que a fotofermentação sob iluminação do Sistema LED – Luz branca fria + NIR ($\lambda = 850$ nm) empregando a cultura *R. rubrum* em meio contendo glicose como fonte de carbono apresentou o melhor desempenho para a produção de biohidrogênio. Em vista disso, as condições do Ensaio 6 foram replicadas em escala ampliada, a fim de verificar o comportamento desta configuração em reator de tanque agitado com funcionamento em modo batelada alimentada com controle de pH.

Uma breve comparação dos principais resultados obtidos com diferentes fontes de luz, utilizando glicerol e glicose como substratos, é apresentada na Tabela 10, visando identificar correlações com os resultados de outros pesquisadores.

Tabela 10 – Principais resultados relacionados à produção de H₂ por bactérias PNS utilizando diferentes fontes de luz e as fontes de carbono glicose e glicerol.

Fonte de luz	Organismo	Substrato	Produtividade (mmolH ₂ /L.dia)	Conversão (molH ₂ /mol subst. consum.)	Ref.
Lâmpadas fluorescentes	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Glicose	2,40	0,56	Pio (2020)
LED (λ =590 nm)	<i>R. palustris</i> GCA009	Glicose	32,6	1,15	Wang et al. (2019)
LED (λ =590 nm)	<i>R. palustris</i>	Glicose	38,2	0,2	Tian et al. (2010)
Lâmpadas halógenas	<i>R. capsulatus</i>	Glicose	-	3	Abo-Hashesh et al. (2011)
Lâmpadas halógenas	<i>R. capsulatus</i> JP91	Glicose	-	5,5	Ghosh et al. (2012)
Lâmpadas halógenas	<i>R. capsulatus</i> YL1	Glicose	-	7,63	Liu et al. (2016)
Lâmpadas incandescentes	Consórcio de fototróficos	Glicose	25,5	9,33	Hu et al. (2016)
Lâmpadas incandescentes	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> CNT 2A	Glicose	-	0,46	Subudhi et al. (2016)
Sistema LED – Luz branca fria + NIR (λ=850 nm)	<i>R. rubrum</i> DSM 467	Glicose	39,67	9,46	Este estudo

Fonte de luz	Organismo	Substrato	Produtividade (mmolH ₂ /L.dia)	Conversão (molH ₂ /mol subst. consum.)	Ref.
Sistema LED – Luz branca fria + NIR (λ=850 nm)	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Glicose	44,81	9,01	Este estudo
Lâmpadas halógenas	<i>R. palustris</i>	Glicerol	-	6	Sabourin-Provost et al. (2009)
Lâmpadas halógenas	<i>R. palustris</i>	Glicerol	-	6,69	Ghosh et al. (2012)
Lâmpadas halógenas	<i>R. palustris</i>	Glicerol	21,38	2,34	Bosman et al. (2023)
Lâmpada incandescente	<i>R. palustris</i>	Glicerol	-	5,8	Pott et al. (2013)
Lâmpadas fluorescentes	<i>R. rubrum</i> DSM 467	Glicerol	2,17	1,34	Pio (2020)
Lâmpadas fluorescentes	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Glicerol	2,30	0,66	Pio (2020)
LED (500 – 800 nm)	<i>R. palustris</i>	Glicerol	18,96	2,70	Bosman et al. (2023)
Lâmpadas halógenas	<i>R. palustris</i>	Glicerol	21,38	2,34	Bosman et al. (2023)
LED NIR (λ=850 nm)	<i>R. rubrum</i> DSM 467	Glicerol	5,71	3,14	Este estudo
LED NIR (λ=850 nm)	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Glicerol	2,07	0,85	

5.3 Ensaios de produção de H₂ em escala ampliada: reator de 1,5 L

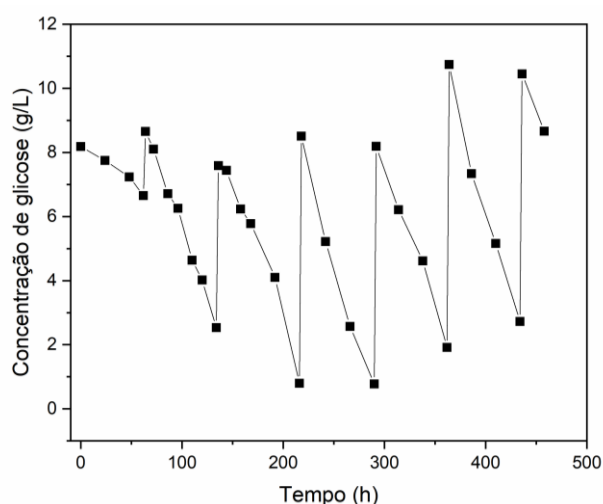
5.3.1 Ensaio 13: *R. rubrum* (1 g/L)

O Ensaio 13 foi realizado em reator anaeróbico de tanque agitado com a cultura *R. rubrum* (1 g/L) inoculada em meio contendo glicose (10 g/L) como fonte de carbono e sob iluminação do Sistema LED – Luz branca fria e NIR ($\lambda=850$ nm). O tempo de fermentação foi de 458 h com amostragens em intervalos que variaram de 12 a 24 h.

Conforme descrito na seção de metodologia (4.4.2), o reator foi suplementado periodicamente com glicose. O critério estabelecido para a suplementação do meio reacional fundamentou-se no consumo do substrato, sendo repostado sempre que a concentração fosse menor ou igual a 3 g/L.

A Figura 27 apresenta a concentração de glicose ao longo do tempo de funcionamento do reator. Por questões técnicas a primeira suplementação foi realizada com 62h de experimento. Posteriormente, as suplementações foram realizadas com uma frequência média de 72 h (3 dias), período em que o consumo de substrato sempre foi superior a 70%.

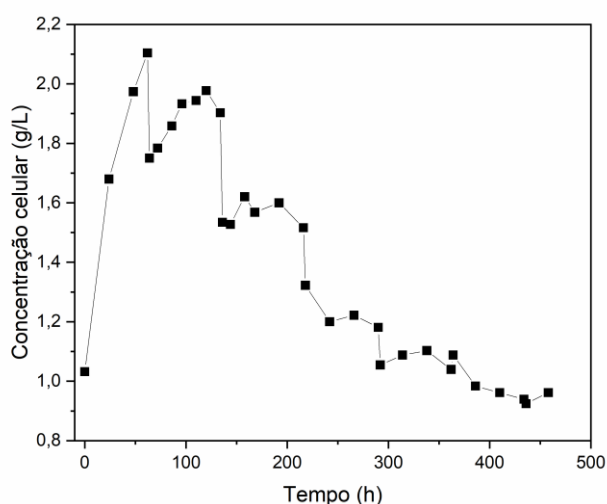
Figura 27 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 13.



Na Figura 28 observa-se uma concentração celular máxima de 2,1 g/L após 62 h de fermentação. O crescimento celular observado representou um aumento de aproximadamente 2 vezes na biomassa celular em comparação com a concentração

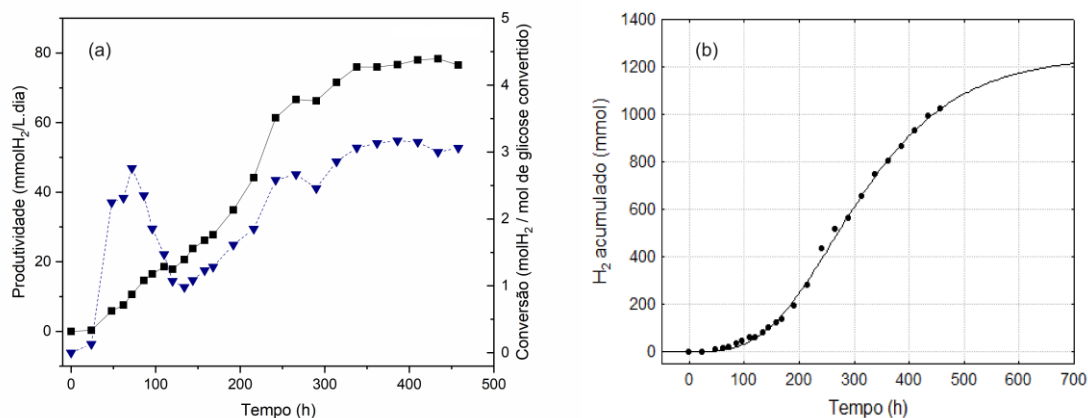
inicial. Durante o processo fermentativo, foi observada uma diminuição na concentração de biomassa, resultante da reposição do substrato por meio da adição de uma solução concentrada de glicose, o que levou à diluição no meio. A fase de crescimento celular foi observada até 120h. Posteriormente, a partir de 136 horas, a biomassa se manteve estável. No encerramento do ensaio, a concentração celular foi de 0,96 g/L.

Figura 28 – Perfil de concentração celular no Ensaio 13.



Os dados referentes à produtividade, conversão e quantidade de hidrogênio acumulado (mmol) ajustada ao modelo de Gompertz, são apresentados na Figura 29(a-b). Na Figura 29a, visualiza-se uma produtividade com tendência crescente até 338h, ponto a partir da qual ela ocorre de maneira sustentada até o final da fermentação. O valor máximo de produtividade atingida foi de 78,36 mmol H₂/L.dia, após 434 h. A conversão atingiu um primeiro pico de 2,76 mol de H₂/mol de glicose consumida no período de 72 h, seguida de uma queda até o valor de 0,98 mol de H₂/mol de glicose consumida em 134 h. Subsequentemente, a conversão acompanhou o perfil da produtividade e atingiu uma conversão máxima de 3,17 mol de H₂/mol de glicose consumida em 386 h de experimento.

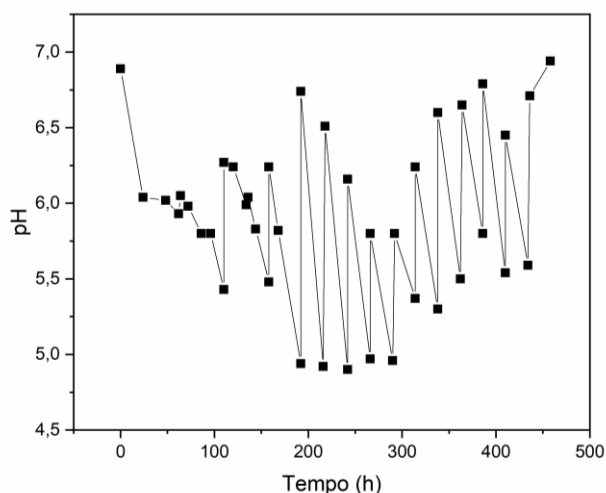
Figura 29 – Perfil no Ensaio 13 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (–) modelo de Gompertz.



A Figura 29b exibe os dados experimentais de hidrogênio acumulado bem ajustados ao modelo de Gompertz ($R^2 = 0,9982$). Os parâmetros obtidos pelo modelo indicam uma duração da fase *lag* (λ) de 135,88 h, taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m) de 3,74 mmol H_2 /h e potencial máximo de produção de hidrogênio (P) de 1249,49 mmol.

Ao longo do ensaio fotofermentativo o pH foi monitorado e ajustado sempre que necessário para se manter na faixa de 6,5 – 7,5 até cerca de 5, a fim de mantê-lo próximo da condição ideal, já que o pH possui influência na produção de hidrogênio por alterar a atividade enzimática e as reações bioquímicas (LAZARO; VARESCHE; SILVA, 2015; HAN et al., 2013; KIM; KIM; CHA, 2012). Conforme Figura 30 nas primeiras 192 h os ajustes foram necessários em tempos mais espaçados, após isto, ocorreram em um intervalo de tempo de 24 h.

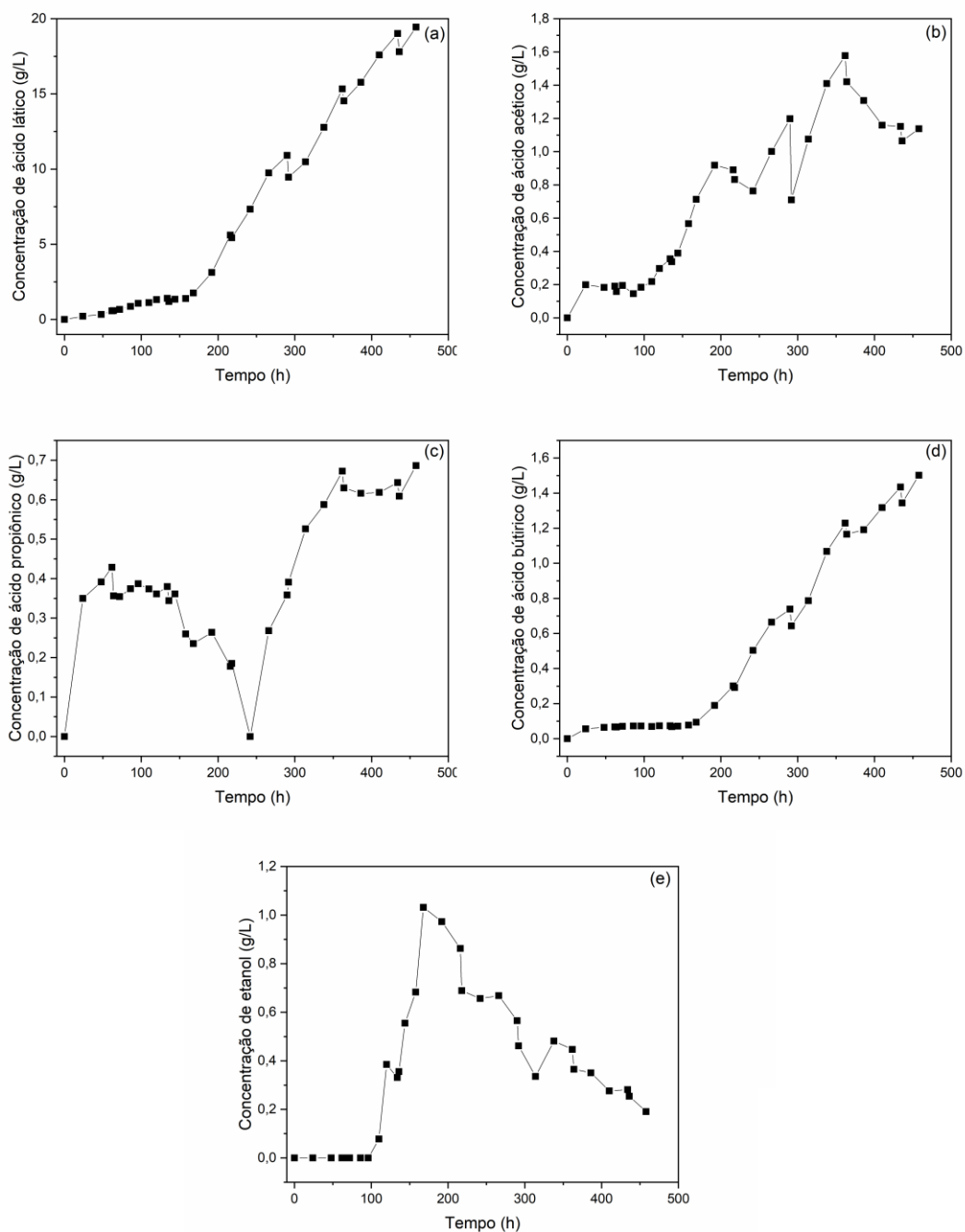
Figura 30 – Perfil de pH no Ensaio 13.



A formação dos metabólitos é apresentada na Figura 31(a-e), em que é possível observar uma fermentação do tipo láctica, uma vez que este ácido foi predominante formado no processo. O referido ácido foi produzido de forma mais expressiva após 168 h, atingindo uma concentração máxima de 19,45 g/L ao final do ensaio. O ácido propiônico foi gerado e totalmente consumido no período de 242 h, em seguida, foi produzido novamente atingindo a concentração de 0,69 g/L após 458 h. Destaca-se que o consumo de ácido propiônico está associado à produção de hidrogênio, conforme Equação 12. Além desses ácidos, o ácido acético e o butírico foram formados e apresentaram concentrações finais de 1,14 e 1,50 g/L, respectivamente. No decorrer deste ensaio foi possível observar a produção de etanol a partir de 110 h, atingindo sua concentração máxima de 1,03 g/L em 168 h, seguida por um decréscimo até 0,19 g/L no encerramento experimental. Acredita-se que, devido à sua volatilidade e à agitação do meio, este álcool foi arrastado junto com os gases gerados durante o processo.

Comparativamente ao Ensaio 6, realizado em biorreatores de 50 mL, o Ensaio 13, que contou com controle de temperatura, pH e agitação em uma escala ampliada, revelou uma produtividade aproximadamente duas vezes maior. No entanto, observou-se uma redução de 66,5% na conversão do substrato em hidrogênio.

Figura 31 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 13: (a) ácido láctico; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico e (e) etanol.



Os fotobiorreatores para produção de biohidrogênio com bactérias púrpuras não sulfóreas devem ter uma elevada relação superfície iluminada/volume, além de um sistema de mistura eficiente para permitir que as células sejam iluminadas tão

uniformemente quanto possível. Neste sentido, os biorreatores fotossintéticos do tipo fermentador raramente são utilizados devido ao longo caminho da luz através do reator, cujo diâmetro é maior que nos reatores tubulares (ADESSI; DE PHILIPPIS, 2014). Segundo Basak e colaboradores (2014), a energia luminosa incidente diminui logarithmicamente com a distância da fonte de luz e a concentração do microrganismo no meio de cultura, de acordo com a lei de Beer-Lambert.

Savasturk et al. (2018) investigaram a produção fotofermentativa de hidrogênio com uma cepa de *Rhodobacter capsulatus* inoculada em fotobiorreator de 20L ao ar livre, empregando melaço como fonte de carbono. As produtividades média e máxima obtidas foram de 1,68 e 11,28 mmol H₂/L.dia, respectivamente. A baixa produtividade média foi associada a alta concentração bacteriana, em torno de 1 g/L.

Desta forma, sugere-se que a queda na conversão de substrato em hidrogênio esteja associada ao incremento do caminho ótico, resultante do aumento de escala e geometria do biorreator. Além disso, essa queda também pode ser atribuída a fenômenos de sombreamento derivados da elevada concentração de biomassa celular. Segundo Lazaro et al. (2015), um excesso de microrganismos pode promover a autofloculação. Esse fenômeno, por sua vez, tem o potencial de limitar a difusão de substratos nos flocos e dificultar a penetração da luz, resultando no efeito de auto-sombreamento. Somado a isso, a taxa de difusão de massa no processo pode ter sido ineficiente, o que potencializa os fenômenos de sombreamento. Conforme Chen et al. (2017) a agitação auxilia na distribuição da luz, diminuindo o efeito de sombreamento.

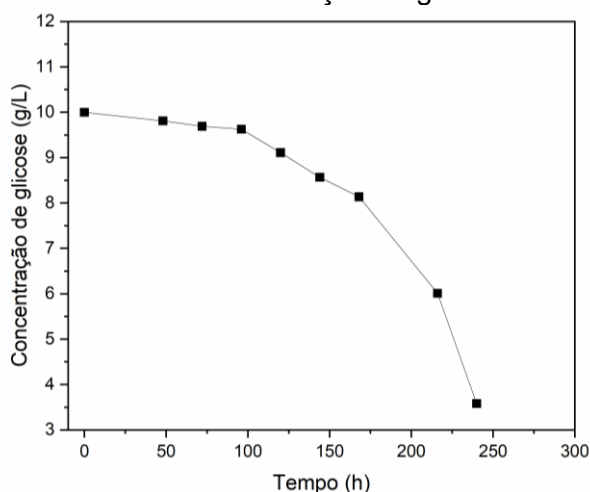
Diante do exposto acima, visando otimizar a produção de hidrogênio em escala ampliada, optou-se por investigar o efeito da redução na concentração celular inicial de 1 para 0,5 g/L das cepas *R. rubrum* e *R. capsulatus*.

5.3.2 Ensaio 14: *R. rubrum* (0,5 g/L)

O Ensaio 14 foi realizado em reator anaeróbio de tanque agitado com a bactéria *R. rubrum* na concentração inicial de 0,5 g/L, glicose (10 g/L) como fonte de carbono e sob iluminação do sistema LED – Luz Branca e NIR ($\lambda=850$ nm). A fermentação foi mantida até haver queda de produtividade (240 h), com amostragens em intervalos que variaram de 24 a 48 h.

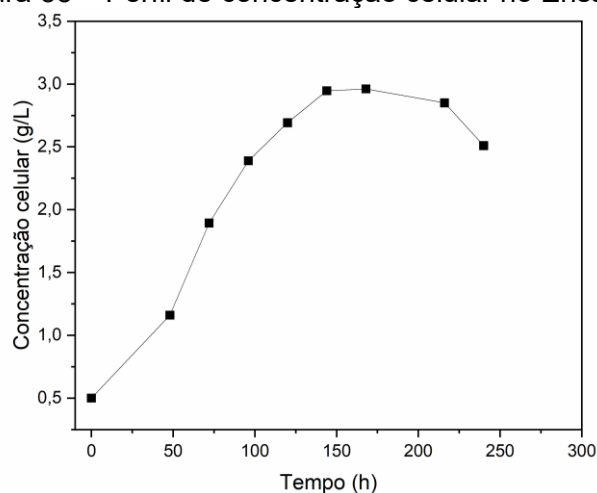
Na Figura 32 observa-se que o consumo de glicose ocorre lentamente até cerca de 168h, posteriormente, se intensifica e atinge a concentração final de 3,50 g/L, o que representa um decréscimo de aproximadamente 65% em relação a sua concentração inicial. Destaca-se que o consumo mais intenso de glicose após 168 h provavelmente associa-se a rota metabólica de produção de ácido láctico (Figura 36). Além disso, devido à lenta cinética de consumo não houve a necessidade de suplementação de substrato durante a fermentação.

Figura 32 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 14.



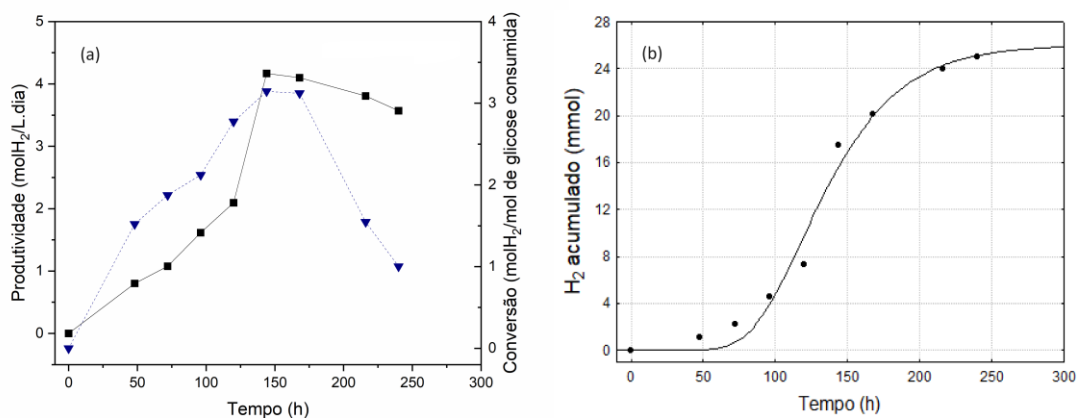
O perfil de concentração celular está apresentado na Figura 33. A concentração celular máxima foi observada no período de 144 h e no valor de 2,95 g/L, um aumento de 5,9 vezes em relação à concentração inicial. Logo após esse período, a fase estacionária é observada até cerca de 216 h e então, um pequeno declínio ocorre encerrando a fermentação com a biomassa na concentração de 2,51 g/L.

Figura 33 – Perfil de concentração celular no Ensaio 14.



A Figura 34(a-b) contém os dados de produtividade, conversão e quantidade de hidrogênio acumulado (mmol) ajustada ao modelo de Gompertz.

Figura 34 – Perfil no Ensaio 14 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (—) modelo de Gompertz.

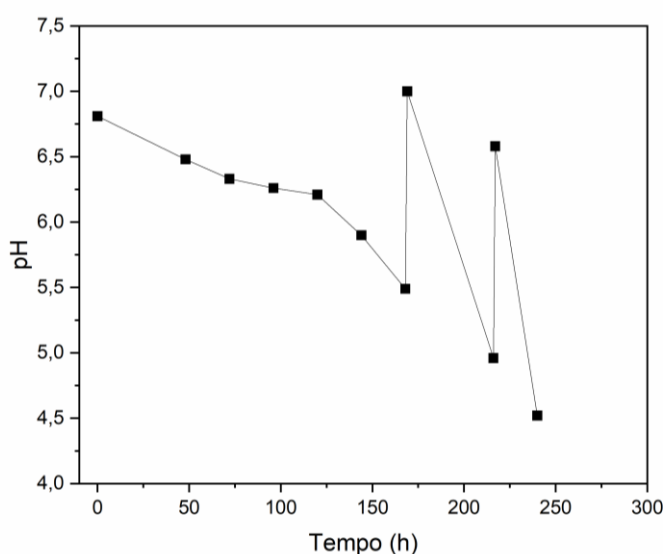


Na Figura 34a observa-se produtividade e conversão crescentes até cerca de 144 h de fermentação, atingindo os valores máximos de 4,17 mmol H₂/L.dia e 3,15 mol de H₂/mol de glicose consumida, respectivamente. Após 168 h, a conversão de glicose em hidrogênio diminui abruptamente devido à predileção acentuada pela rota metabólica do ácido láctico (Figura 36), que conforme Equação 8 não está associada

a produção deste gás. Além disso, percebe-se que a maior parte do hidrogênio foi produzido durante a fase de crescimento celular exponencial, como relatado anteriormente em outros estudos (SAVASTURK; KAYAHAN; KOKU, 2018; ZAGRODNIK; SEIFERT; STODOLNY; LANIECKI, 2015). A Figura 34b demonstra um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz ($R^2 = 0,9839$). Os parâmetros obtidos pelo modelo indicam uma duração da fase *lag* (λ) de 82,91 h, taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m) de 0,2627 mmol H₂/h e potencial máximo de produção de hidrogênio (P) de 26,05 mmol.

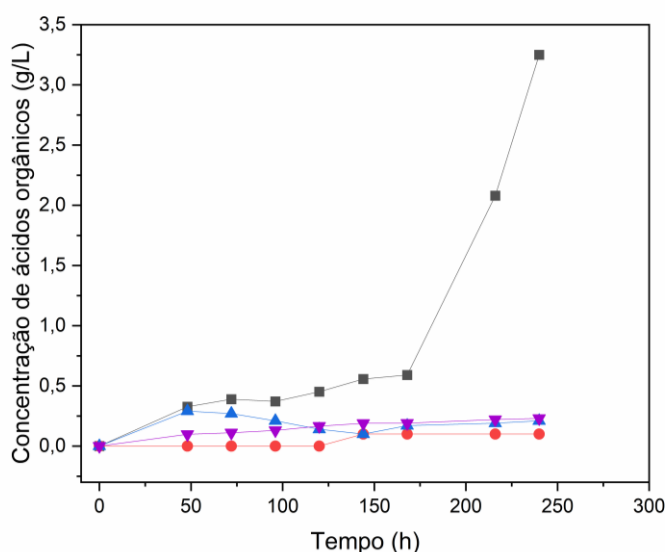
Os perfis de pH e metabólitos formados no decorrer do processo fotofermentativo são apresentados na Figura 35 e na Figura 36, respectivamente.

Figura 35 – Perfil de pH no Ensaio 14.



Conforme Figura 35, o pH decaiu lentamente até 168h devido à baixa produção de ácidos orgânicos. Posteriormente, o ajuste de pH foi realizado com NaOH (2 M) sempre que atingia cerca de 5 para a faixa de 6,5 – 7,5, a fim de mantê-lo próximo da condição ideal de atividade da nitrogenase. Nota-se que o ajuste foi necessário em intervalos de tempo de 48h e 24h, respectivamente, após 168h de fermentação, devido à produção acelerada de ácido láctico.

Figura 36 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 14: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲) e fórmico (▼).



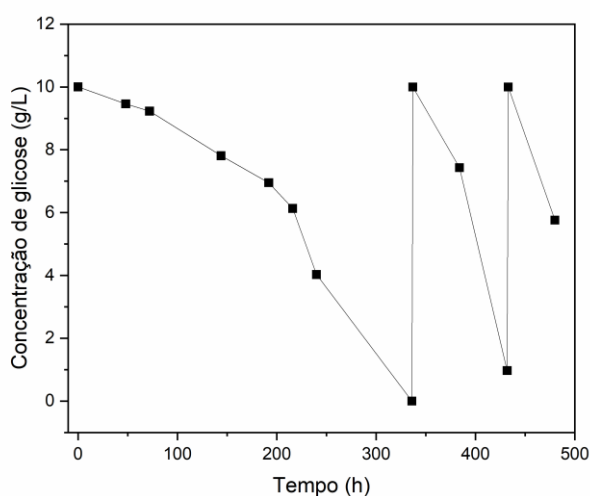
No perfil dos metabólitos formados apresentado na Figura 36, a predominância da rota de produção do ácido láctico foi observada durante todo processo. O referido ácido foi produzido mais intensamente após 168h, período em que a *R. rubrum* estava em fase estacionária de crescimento. A concentração de ácido láctico atingiu 3,25 g/L ao final do experimento, enquanto as concentrações dos ácidos acético e propiônico foram de 0,1 e 0,21 g/L, respectivamente. Durante o ensaio não houve a produção de ácido butírico e um metabólito não observado nos ensaios anteriores foi produzido, o ácido fórmico, sua presença atingiu a concentração máxima de 0,23 g/L em 240 h. Segundo a literatura, a presença de ácido fórmico indica penetração de luz insuficiente no interior do biorreator (ZAGRODNIK et al., 2015).

5.3.3 Ensaio 15: *R. capsulatus* (0,5 g/L)

O Ensaio 15 foi realizado em reator anaeróbico de tanque agitado com a bactéria *R. capsulatus* (0,5 g/L) inoculada em meio contendo glicose (10 g/L) como fonte de carbono e sob iluminação do sistema LED – Luz Branca e NIR ($\lambda=850$ nm). A fermentação foi monitorada por 480 h com amostragens em intervalos que variaram de 24 a 72 h.

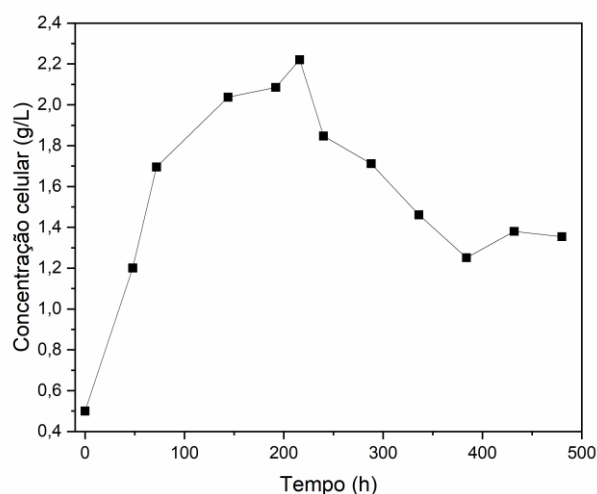
Analogamente ao Ensaio 13, o fotofermentador foi alimentado periodicamente com glicose, ajustando-se a concentração deste substrato para cerca de 10 g/L quando o consumo atingia 70% ou mais. A Figura 37 apresenta a concentração de glicose ao longo do tempo de fotofermentação. Verifica-se que a cinética de consumo ocorre mais lentamente até a primeira suplementação, que ocorre após 336h. Posteriormente, seu consumo é intensificado paralelamente ao incremento considerável dos metabólitos ácidos (lático e butírico, Figura 41), sendo realizada duas suplementações em um intervalo de 96 horas. Nota-se que no período de consumo mais lento do substrato a bactéria está em fase de crescimento (Figura 38) e menor produção de metabólitos (Figura 41), o que sugere uma assimilação majoritária para a biossíntese nesta etapa.

Figura 37 – Perfil de concentração da glicose no Ensaio 15.



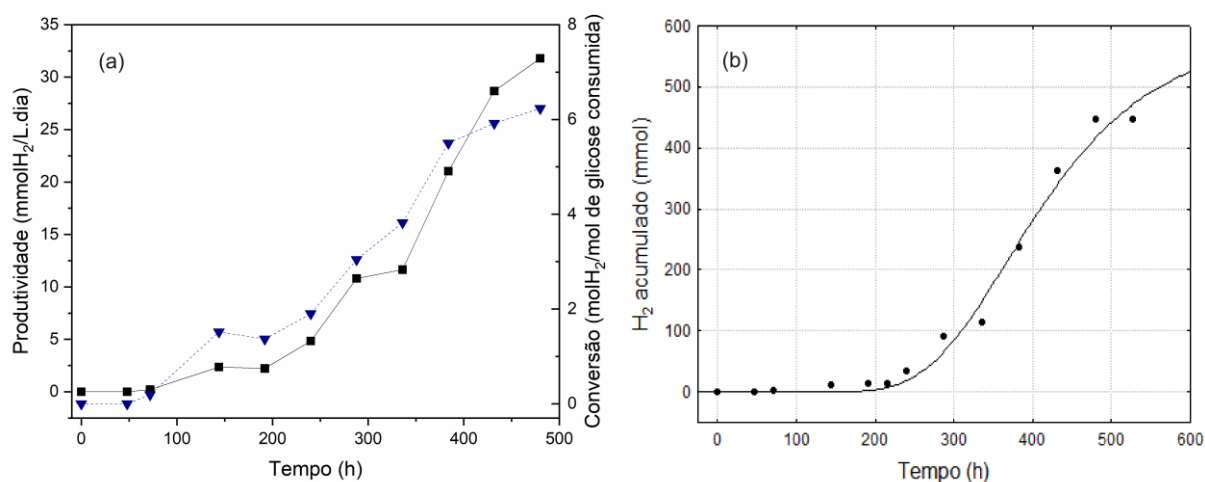
O perfil cinético de crescimento celular está apresentado na Figura 38. A concentração máxima atingida pela bactéria *R. capsulatus* foi de 2,22 g/L após 216h, o que representou um aumento de cerca de 4 vezes na biomassa em relação à concentração inicial. Logo após esse período, observa-se uma queda na concentração celular até a estabilização, que inicia em aproximadamente 336h e perdura até o encerramento experimental.

Figura 38 – Perfil de concentração celular no Ensaio 15.



A Figura 39(a-b) contém os dados de produtividade, conversão e quantidade de hidrogênio acumulado (mmol) ajustada ao modelo de Gompertz.

Figura 39 – Perfil no Ensaio 15 de (a) Produtividade (■) /Conversão (▼); (b) Hidrogênio acumulado ajustado ao modelo de Gompertz: (●) dado experimental e (—) modelo de Gompertz.



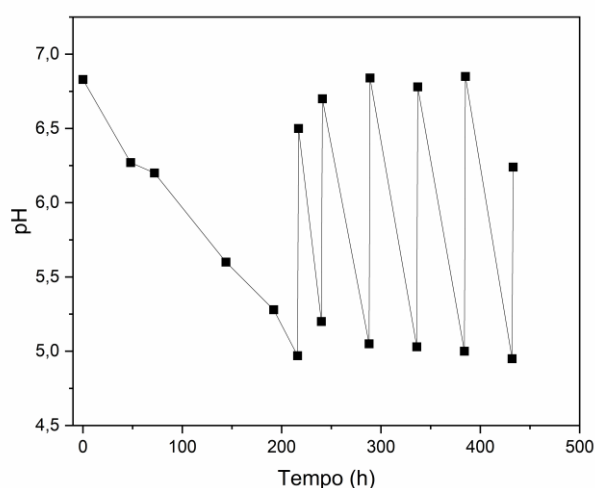
Na Figura 39a, visualiza-se produtividade e conversão ascendentes ao longo de todo o ensaio, alcançando os valores máximos de 31,8 mmol H₂/L.dia e 6,23 mol de H₂/mol de glicose consumida, respectivamente, em 480 horas. Nos perfis

apresentados, salienta-se o aumento considerável na produção de hidrogênio após 240 horas, possivelmente devido à ascensão da rota metabólica do ácido butírico (Figura 41).

Na Figura 39b pode ser visualizado um ajuste significativo dos dados experimentais de hidrogênio acumulado ao modelo preditivo de Gompertz ($R^2 = 0,988$). Os parâmetros obtidos pelo modelo indicam uma duração da fase *lag* (λ) de 264,77 h, taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m) de 2,08 mmol H_2 /h e potencial máximo de produção de hidrogênio (P) de 581,12 mmol.

Assim como nos Ensaios 13 e 14, o ajuste de pH do Ensaio 15 foi realizado com NaOH (2 M) sempre que atingia cerca de 5 para a faixa de pH ótimo da enzima nitrogenase (6,5 – 7,5). Na Figura 39, observa-se que o primeiro ajuste foi realizado após 216 h, período em que o pH alcançou o valor de 4,97. Posteriormente, o pH foi alterado em intervalos de 48h, devido à maior formação de ácidos orgânicos.

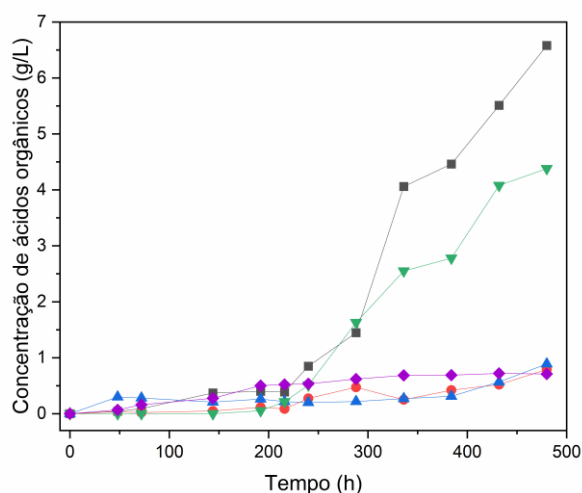
Figura 40 – Perfil de pH no Ensaio 15.



O perfil dos metabólitos formados pode ser visualizado na Figura 41. Neste processo fotofermentativo, os ácidos láctico e butírico foram predominantemente produzidos, atingindo concentrações máximas de 6,58 e 4,38 g/L, respectivamente, ao final do experimento. Os demais ácidos foram gerados em concentrações bastante

inferiores, não ultrapassando 1 g/L. Conforme as Equações 6 e 8, a produção de hidrogênio foi atribuída principalmente à rota metabólica do ácido butírico.

Figura 41 – Perfis de concentração de metabólitos produzidos no Ensaio 15: ácido láctico (■); ácido acético (●); ácido propiônico (▲), butírico (▼) e fórmico (◆).



Diante dos resultados apresentados, nota-se que durante a fase de crescimento celular, que durou aproximadamente 216 h, a produtividade de hidrogênio não ultrapassou 5 mmolH₂/L.dia. Além disso, a produção deste gás aumentou significativamente apenas quando houve a estabilidade na concentração bacteriana, acompanhada pelo aumento dos ácidos acético e, notavelmente, butírico. De acordo com Melnicki et al. (2008), esses resultados sugerem que um nutriente diferente do carbono orgânico está limitando o crescimento das bactérias fotossintéticas, enquanto a abundância de carbono orgânico no meio permite uma atividade contínua de nitrogenase e uma produção hidrogênio. No estudo de Xie et al. (2012), a caracterização cinética de produção de hidrogênio pela bactéria fotofermentativa *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 em diferentes fases de crescimento foi realizada. Como resultado, as bactérias em fase estacionária foram mais eficazes para a produção de hidrogênio.

5.3.4 Consolidado dos Ensaio de 13 a 15

A Tabela 11 apresenta o compilado dos principais resultados dos Ensaio 13-15, detalhados nos tópicos 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3.

Tabela 11 – Consolidado dos principais resultados obtidos em escala ampliada.

Ensaio	<i>R. rubrum</i>		<i>R. capsulatus</i>
	13 ^a	14 ^b	15 ^b
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	78,36	4,17	31,8
Conversão máxima (mol H ₂ /mol glicose)	3,17	3,15	6,23
R _m (mmol H ₂ /h)	3,74	0,263	2,08
λ (h)	135,88	82,91	264,77
P (mmol)	1249,5	26,05	581,12

^a – Concentração celular inicial de 1 g/L.

^b – Concentração celular inicial de 0,5 g/L.

Ao observar os dados da Tabela 11, ressalta-se que todos os ensaios foram realizados no modo batelada alimentada em reator anaeróbio de tanque agitado (1,5 L) sob iluminação do sistema LED – Luz Branca e NIR ($\lambda=850$ nm), com intensidade luminosa de 150 W/m², e em meio fermentescível contendo glicose (10 g/L) como fonte de carbono. Sabendo disso, percebe-se que a produção de hidrogênio fotoinduzida com a cepa *R. rubrum*, concentrada em 1 g/L, foi mais promissora para a produção de hidrogênio comparada aos ensaios com concentração celular inicial de 0,5 g/L. Sugere-se que a queda acentuada na produção de hidrogênio, com a menor concentração celular inicial em ambas as bactérias, esteja associada a um maior estímulo desta configuração experimental à rota de biossíntese em detrimento as de formação deste gás. Logo, a baixa produção de hidrogênio pode ser resultado do acúmulo de biomassa e acesso limitado à luz. Segundo Lee et al. (2008), concentrações baixas de inóculo reduzem a velocidade e o rendimento do processo, e produzem um excesso de células, causando um aumento nas atividades bacterianas que acaba limitando o rendimento e a taxa de formação de produtos de fermentação.

O excesso de biomassa interfere na penetração da luz devido ao sombreamento, reduzindo a formação de ATP e a produção de hidrogênio pelas bactérias fotossintetizantes (KIM; SON; KIM, 2012). Além disso, uma elevada concentração celular pode levar à formação de flocos bacterianos ou biofilme, dificultando a distribuição do substrato no biorreator (REUNGSANG et al., 2018).

Ademais, concentrações celulares menores podem resultar em um maior tempo de adaptação ao meio. Segundo Reungsang et al. (2018), na fermentação em batelada, a relação entre a concentração inicial de células (X_0) e a concentração inicial de substrato (S_0) afeta o nível inicial de energia dos microrganismos necessário para apoiar a síntese e o metabolismo celular. Em uma alta relação S_0/X_0 , ou seja, baixa concentração de inóculo, os microrganismos precisam de mais tempo para se adaptar e utilizar a alta concentração de substrato, resultando em um período de atraso na fermentação. Enquanto que, em uma baixa relação S_0/X_0 , ou seja, alta concentração de inóculo, o substrato é insuficiente para suportar o crescimento das células.

Argun et al. (2009) avaliaram o efeito da concentração celular na produção de biohidrogênio a partir da solução de trigo moído em fermentação combinada (escura e fotoinduzida) sob iluminação fluorescente. O consórcio fototrófico era composto pelas bactérias *Rhodobacter sphaeroides* NRRL B-1727, *Rhodobacter sphaeroides* DSMZ 158 e *Rhodopseudomonas palustris* DSMZ 127. A concentração inicial de células variou entre 0,5 e 5 g/L, sendo que a maior formação cumulativa de hidrogênio (4,77 mmol) foi obtida com a concentração celular inicial de 1,1 g/L.

Abo-Hashesh et al. (2013) investigaram a produção de hidrogênio em um fotobiorreator operado em modo contínuo, utilizando glicose como substrato e a bactéria *Rhodobacter capsulatus* JP91. As taxas de produção de H_2 variaram entre 0,57 e 0,81 mmol/h e o maior rendimento de hidrogênio obtido foi de $9,0 \pm 1,2$ mol H_2 /mol de glicose.

Moreira et al. (2022) estudaram a produção de hidrogênio por fotofermentação em biorreator do tipo fermentador com capacidade de 1,5 L. A fermentação fotoinduzida com glicose PA como substrato e utilizando a cocultura de *E. cloacae* e *R. capsulatus* apresentou produtividade máxima de $122,58 \pm 3,67$ mmol H_2 /L.dia e rendimento de $2,64 \pm 0,06$ mol H_2 /mol de hexose consumida.

Machado et al. (2018) avaliaram a produção de hidrogênio com reator em batelada inoculado com a cultura *R. palustris* e glicose como substrato. A quantidade total de hidrogênio produzido foi de $0,51 \pm 0,01$ mol e a produtividade máxima foi de $149,60 \pm 1,50$ mmolH₂/L·dia em 23 horas de fermentação.

Ferreira et al. (2022) averiguaram a produção de hidrogênio fotofermentativo em um reator de tanque agitado de 1,5 L. A fotofermentação com lactose proveniente do permeado de soro de leite, empregando uma cocultura das espécies *Rhodospirillum rubrum* e *Rhodobacter capsulatus* e operando em modo batelada sem renovação de meio, resultou em uma produtividade máxima de 104,47 mmol H₂/L.dia e um rendimento máximo de hidrogênio de 11,71 mol H₂/mol lactose.

A Tabela 12 apresenta um compilado comparativo deste estudo com outros realizados em escala ampliada no Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU).

Tabela 12 – Principais resultados relacionados à produção de H₂ por bactérias PNS em escala ampliada obtidos no NUCBIO.

Cepa	Conc. Inicial (g/L)	Substrato	Fonte de luz	Produtividade (mmolH ₂ /L.dia)	Conversão (molH ₂ /mol substrato)	Ref.
<i>R. capsulatus</i> / <i>R. rubrum</i> (1:1)	0,2	Lactose (permeado do soro de leite)	Lâmpadas fluorescentes (5000 lux)	104,47	-	Ferreira (2022)
<i>E. cloacae</i> / <i>R. capsulatus</i>	-	Lactose (permeado do soro de leite)		141,67	2,82	Moreira (2020)
<i>R. capsulatus</i>	0,3	Lactose		5,05	-	Silva (2015)
<i>R. capsulatus</i>	1	Glicerol		18,27	4,74	Pio (2020)
<i>R. rubrum</i>	1	Glicerol		1,60	0,32	Pio (2020)
<i>R. capsulatus</i>	0,3	Glicose		42,79	-	Silva (2015)
<i>E. cloacae</i> / <i>R. palustris</i>	-	Glicose/Lactose		74,30	1,53	Moreira (2020)
<i>E. cloacae</i> / <i>R. capsulatus</i>	-	Glicose/Lactose		112,36	2,10	Moreira (2020)
<i>R. palustris</i>	0,65	Glicose		149,60	-	Machado (2016)
<i>E. cloacae</i> / <i>R. palustris</i>	-	Glicose		90,47	1,55	Moreira (2020)
<i>E. cloacae</i> / <i>R. capsulatus</i>	-	Glicose	Sistema LED – Luz branca fria (7000 lux) + NIR (100 W/m ²)	133,04	1,19	Moreira (2020)
<i>R. rubrum</i>	1	Glicose		78,36	3,17	Este estudo
<i>R. rubrum</i>	0,5	Glicose		4,17	3,15	
<i>R. capsulatus</i>	0,5	Glicose		31,8	6,23	

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que a fotofermentação com diodos emissores de luz é uma alternativa em potencial para a produção de hidrogênio. Além disso, foi constatada a influência significativa da interação entre substrato e fonte de luz na produção deste biocombustível.

A partir dos ensaios realizados em escala reduzida e com o auxílio do teste de Tukey, observou-se que a produção de hidrogênio fotoinduzida simultaneamente por diodos emissores de luz branca fria e infravermelho próximo, com suplementação de glicose, se destacou em relação as iluminações individualizadas. Este arranjo de iluminação proporcionou um efeito sinérgico, em que a presença da luz visível aumentou a capacidade das células bacterianas de aproveitar os fótons da parte NIR do espectro. A produtividade foi 36 vezes superior à condição com iluminação NIR quando utilizada a cepa *R. rubrum* e 12 vezes superior quando empregada a cepa *R. capsulatus*. A alternativa mais promissora foi obtida na presença da cepa *R. rubrum*, devido a estabilidade na produtividade de gás, atingindo um máximo de 39,67 mmol H₂/L.dia e 9,46 mol H₂/mol de glicose consumida, respectivamente.

Diferentemente dos resultados obtidos com a glicose como fonte de carbono, a produção fotofermentativa de hidrogênio utilizando glicerol como substrato destacou-se sob iluminação NIR. Essa condição de iluminação promoveu celeridade aos processos fotofermentativos. No entanto, a produtividade de hidrogênio e a conversão do substrato nesse gás só aumentaram significativamente com a radiação NIR na presença da cepa *R. rubrum*, que se sobressaiu aos demais ensaios ao atingir produtividade e conversão máximas de 5,71 mmol H₂/L.dia e 3,14 mol H₂/mol de glicerol consumido, respectivamente. Em contrapartida, o fornecimento simultâneo dos espectros visível e NIR gerou um efeito inibitório para esta bactéria, reduzindo a produção de hidrogênio. A bactéria *R. capsulatus*, por outro lado, não foi afetada significativamente pela alteração da fonte de luz em termos de rendimento do substrato e produtividade de hidrogênio.

Em escala ampliada, a fotofermentação sob iluminação do Sistema LED – Luz branca fria + NIR ($\lambda = 850$ nm) e com glicose como fonte de carbono foi mais promissora quando empregue a bactéria *R. rubrum* na maior concentração celular inicial (1 g/L). Nesta condição a produção de hidrogênio se sustentou a partir de 338h

e atingiu uma produtividade máxima de 78,36 mmol H₂/L.dia. Esse valor é aproximadamente 19 vezes maior do que o obtido com a mesma cepa na concentração de 0,5 g/L (4,17 mmol H₂/L.dia). A bactéria *R. capsulatus* com concentração inicial de 0,5 g/L apresentou uma produtividade máxima de 31,8 mmol H₂/L.dia, uma queda de aproximadamente 2,5 vezes na produtividade de gás em relação a *R. rubrum* (1 g/L).

Assim sendo, constatou-se que a produção de hidrogênio foi afetada pelo espectro de luz e que ocorreu uma interação entre fonte de luz e substrato, estimulando diferentes rotas metabólicas. Ademais, o *scale-up* do processo produtivo de hidrogênio por fotofermentação foi afetado pela mudança na concentração celular inicial, priorizando o acúmulo de biomassa em detrimento da produção de hidrogênio quando em menor concentração.

REFERÊNCIAS

- ABO-HASHESH, Mona; DESAUNAY, Nicolas; HALLENBECK, Patrick C. High yield single stage conversion of glucose to hydrogen by photofermentation with continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* JP91. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 513-517, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.091>
- ABO-HASHESH, Mona et al. Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: An attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13889–13895, out. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.122>
- ADESSI, Alessandra; DE PHILIPPIS, Roberto. Photobioreactor design and illumination systems for H₂ production with anoxygenic photosynthetic bacteria: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 7, p. 3127–3141, fev. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.084>
- AKHLAGHI, Neda; NAJAFPOUR-DARZI, Ghasem. A comprehensive review on biological hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 43, p. 22492–22512, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>
- AKKERMAN, I. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1195–1208, nov. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00071-X)
- AKMAN, Melih et al. Investigation of the effects of initial substrate and biomass concentrations and light intensity on photofermentative hydrogen gas production by Response Surface Methodology. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 15, p. 5042–5049, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.093>
- AKROUM-AMROUCHE, Dahbia et al. Biohydrogen production by dark and photo-fermentation processes. mar. 2013, [S.l.]: IEEE, mar. 2013. p. 499–503. <https://doi.org/10.1109/IRSEC.2013.6529679>
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.
- ARGUN, Hidayet; KARGI, Fikret; KAPDAN, Ilgi K. Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 15, p. 6181–6188, ago. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.130>
- ARGUN, Hidayet; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 13, p. 7443–7459, jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>
- ASSAWAMONGKHOLSIRI, Thitirut; REUNGSANG, Alissara. Photo-fermentational hydrogen production of *Rhodobacter* sp. KCU-PS1 isolated from

an UASB reactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 221–230, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.03.011>

BALACHANDAR, G. et al. Biological hydrogen production via dark fermentation: A holistic approach from lab-scale to pilot-scale. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 8, p. 5202–5215, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.006>

BASAK, Nitai et al. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 13, p. 6853–6871, abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.093>

BASAK, Nitai; DAS, Debabrata. The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 31–42, 10 jan. 2007. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>

BATISTA, Ana Paula et al. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 230–235, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>

BEN. **Balanco Energético Nacional**. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-687/BEN2023.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

BOSMAN, Catharine E.; POTT, Robert W. M.; BRADSHAW, Steven M. The effect of light emission spectrum on biohydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 6, p. 913–919, 28 jun. 2023. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02863-8>

CHEN, Chun-Yen et al. Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8484–8492, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.082>

CHEN, Xin et al. The hydrogen production characteristics of mixed photoheterotrophic culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4840–4847, fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.155>

DA SILVA, Gervásio P.; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>

DAS, Debabrata; KHANNA, Namita; DASGUPTA, Chitralekha Nag. **Biohydrogen production: fundamentals and technology advances**. [S.l.]: CRC Press, 2014. <https://doi.org/10.1201/b16574>

DHARMADI, Yandi; MURARKA, Abhishek; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821–829, ago. 2006. <https://doi.org/10.1002/bit.21025>

DOBSON, Rosemary; GRAY, Vincent; RUMBOLD, Karl. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 217–226, fev. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1038-0>

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2023: Ano-base 2022**. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dadosabertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2023>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

GADHAMSHETTY, Venkataramana; SUKUMARAN, Anoop; NIRMALAKHANDAN, Nagamany. Photoparameters in Photofermentative Biohydrogen Production. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–51, 30 dez. 2011. <https://doi.org/10.1080/10643380802502011>

GHOSH, Shiladitya et al. Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 299–314, jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.001>

GHOSH, Dipankar; SOBRO, Irma F.; HALLENBECK, Patrick C. Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by *Rhodobacter capsulatus* JP91 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 199–206, nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.061>

GHOSH, Dipankar; SOBRO, Irma F.; HALLENBECK, Patrick C. Stoichiometric conversion of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen: Response surface methodology study of the effects of light intensity and crude glycerol and glutamate concentration. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 154–160, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.021>

GHOSH, Dipankar; TOURIGNY, Alexandre; HALLENBECK, Patrick C. Near stoichiometric reforming of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen by photofermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 3, p. 2273–2277, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.011>

GLEMSER, M. et al. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1077–1088, 21 fev. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7144-6>

GOBEL, Florian. Direct measurement of pure absorbance spectra of living phototrophic microorganisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 538, n. 3, p. 593–602, fev. 1978. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90420-8)

GOPALAKRISHNAN, Balachandar; KHANNA, Namita; DAS, Debabrata. Dark-Fermentative Biohydrogen Production. **Biohydrogen**. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 79–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00004-6>

GUO, Xin M. et al. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10660–10673, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>

HALLENBECK, Patrick C.; GHOSH, Dipankar. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>

HAN, Hongliang et al. Fermentative hydrogen production from acetate using *Rhodobacter sphaeroides* RV. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 25, p. 10773–10778, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.134>

HAY, Jacqueline X. W. et al. Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 3, p. 334–352, 2013. <https://doi.org/10.1002/bbb.1403>

HILLMER, P; GEST, H. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 129, n. 2, p. 724–731, fev. 1977. <https://doi.org/10.1128/jb.129.2.724-731.1977>

HITAM, C. N. C.; JALIL, A. A. A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 10, p. 8465–8483, jul. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01140-y>

HU, Jianjun et al. Photosynthetic hydrogen production from enzyme-hydrolyzed micro-grinded maize straws. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 46, p. 21665–21669, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.029>

HUANG, Jingjing et al. Continuous hydrogen production from food waste by anaerobic digestion (AD) coupled single-chamber microbial electrolysis cell (MEC) under negative pressure. **Waste Management**, v. 103, p. 61–66, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.12.015>

HUESEMANN, Michael H. et al. Hydrogen Generation Through Indirect Biophotolysis in Batch Cultures of the Nonheterocystous Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 208–220, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8741-6>

JAFARY, Tahereh et al. Clean hydrogen production in a full biological microbial electrolysis cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 58, p. 30524–30531, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.010>

JIA, Yuxia et al. Effect of silica-core gold-shell nanoparticles on the kinetics of biohydrogen production and pollutant hydrogenation via organic acid photofermentation over enhanced near-infrared illumination. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 11, p. 7821–7835, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.257>

JIANG, Danping et al. Insights into correlation between hydrogen yield improvement and glycerol addition in photo-fermentation of *Arundo donax* L. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124467, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124467>

JIMÉNEZ-LLANOS, Jorge et al. Sustainable biohydrogen production by *Chlorella* sp. microalgae: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 15, p. 8310–8328, mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.059>

JOHNSON, Duane T.; TACONI, Katherine A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 338–348, dez. 2007. <https://doi.org/10.1002/ep.10225>

KAPDAN, Ilgi Karapinar; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, mar. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>

KAWAGOSHI, Yasunori et al. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 24, p. 13365–13369, dez. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.121>

KESKIN, Tugba; ABO-HASHESH, Mona; HALLENBECK, Patrick C. Photofermentative hydrogen production from wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8557–8568, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.004>

KHETKORN, Wanthanee et al. Microalgal hydrogen production – A review. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1194–1206, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085>

KIM, Dong-Hoon; KIM, Mi-Sun. Hydrogenases for biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8423–8431, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>

KIM, Dong-Hoon; SON, Hannna; KIM, Mi-Sun. Effect of substrate concentration on continuous Photo-fermentative hydrogen production from lactate using *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15483–15488, out. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.039>

KOKU, Harun et al. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1315–1329, nov. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1)

KRUJATZ, Felix et al. Light-field-characterization in a continuous hydrogen-producing photobioreactor by optical simulation and computational fluid dynamics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 12, p. 2439–2449, dez. 2015. <https://doi.org/10.1002/bit.25667>

KUMAR, Sunil et al. Bioprospecting of Microbes for Biohydrogen Production: Current Status and Future Challenges. **Bioprocessing for Biomolecules Production**. [S.l.]: Wiley, 2019. p. 443–471. <https://doi.org/10.1002/9781119434436.ch22>

LAKATOS, Gergely et al. Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas algae*. **Green Chem.**, v. 16, n. 11, p. 4716–4727, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4GC00745J>

LAOCHAROEN, Sucheera; REUNGSANG, Alissara. Isolation, characterization and optimization of photo-hydrogen production conditions by newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* KKU-PS5. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 21, p. 10870–10882, jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.05.055>

LAZARO, Carolina Z.; VARESCHE, Maria B. A.; SILVA, Edson L. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. **Renewable Energy**, v. 75, p. 1–7, mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.09.034>

LEE, Sang Yup et al. Fermentative butanol production by *clostridia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, jun. 2008. <https://doi.org/10.1002/bit.22003>

LEE, Hyung-Sool; SALERNO, Michael B.; RITTMANN, Bruce E. Thermodynamic evaluation on H₂ production in glucose fermentation. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 7, p. 2401–2407, abr. 2008. <https://doi.org/10.1021/es702610v>

LEONETI, Alexandre B.; ARAGÃO-LEONETI, Valquiria; DE OLIVEIRA, Sonia V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138–145, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.02.032>

LEVIN, David B; PITT, Lawrence; LOVE, Murray. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 2, p. 173–185, fev. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)

LI, Chenlin; FANG, Herbert H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1–39, jan. 2007. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>

LIU, Yuan; HALLENBECK, Patrick C. A kinetic study of hydrogen production by a Calvin-Benson-Bassham cycle mutant, PRK (phosphoribulose kinase), of the

photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 26, p. 11081–11089, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.203>

LOACH, Paul A.; PARKES-LOACH, Pamela S. Structure-Function Relationships in Bacterial Light-Harvesting Complexes Investigated by Reconstitution Techniques. [S.l: s.n.], 2009. p. 181–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_10

LOSS, Raquel A. **Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ŁUKAJTIS, Rafał et al. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 665–694, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>

MA, Hongyu et al. Promoting photo-fermentative hydrogen production performance by substituting the rnf promoter in *Rhodobacter capsulatus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 5, p. 3742–3752, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.10.270>

MAAROFF, Rizal M. et al. Biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) by two stage anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) system for better utilization of carbon sources in POME. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 6, p. 3395–3406, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.06.013>

MACHADO, R.G. et al. Repeated batch cycles as an alternative for hydrogen production by co-culture photofermentation. **Energy**, v. 153, p. 861–869, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.101>

MAHATA, Chandan; RAY, Subhabrata; DAS, Debabrata. Optimization of dark fermentative hydrogen production from organic wastes using acidogenic mixed consortia. **Energy Conversion and Management**, v. 219, p. 113047, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113047>

MASUKAWA, Hajime et al. Sustained photobiological hydrogen production in the presence of N₂ by nitrogenase mutants of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 34, p. 19444–19451, nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.090>

MCKINLAY, James B; HARWOOD, Caroline S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 244–251, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.012>

MELNICKI, Matthew R. et al. Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 22, p. 6525–6534, nov. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.041>

MOREIRA, F.S. et al. Single-stage repeated batch cycles using co-culture of *Enterobacter cloacae* and purple non-sulfur bacteria for hydrogen production. **Energy**, v. 239, p. 122465, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.122465>

MOREIRA, Felipe Santos. **Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando co-culturas de bactérias**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

NAJAFPOUR, G. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63357-6.00002-X>

NATH, Kaushik; DAS, Debabrata. Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7497–7501, set. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.065>

OOSHIMA, Hiroshi et al. Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 470–475, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80064-0](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80064-0)

PANDEY, Anjana; SRIVASTAVA, Neha; SINHA, Pallavi. Optimization of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* NMBL-01. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 251–256, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.005>

PATEL, Sanjay K.S.; KUMAR, Prasun; KALIA, Vipin C. Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolisms. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 14, p. 10590–10603, jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.045>

PIO, Flávia Souza. **Produção de biohidrogênio por fotofermentação empregando glicerol como substrato**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

PIO, Flávia Souza et al. Overview of glycerol as a carbon source in the hydrogen production process. **Biomass Conversion and Biorefinery**, ago. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04722-8>

POSADA, John A.; RINCÓN, Luis E.; CARDONA, Carlos A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 282–293, maio 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.151>

POTT, Robert W.M.; HOWE, Christopher J.; DENNIS, John S. Photofermentation of crude glycerol from biodiesel using *Rhodopseudomonas palustris*: Comparison with organic acids and the identification of inhibitory compounds. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 725–730, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.126>

PUGAZHENDHI, Arivalagan et al. Application of nanotechnology (nanoparticles) in dark fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 3, p. 1431–1440, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.114>

PUTATUNDA, Chayanika et al. Current challenges and future technology in photofermentation-driven biohydrogen production by utilizing algae and bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 55, p. 21088–21109, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.10.042>

RAMPRAKASH, Balasubramani; INCHAROENSAKDI, Aran. Light-driven biological hydrogen production by *Escherichia coli* mediated by TiO₂ nanoparticles. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6254–6261, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.011>

REUNGSANG, Alissara et al. Hydrogen from Photo Fermentation. **Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion**, p. 221–317, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_7

RITTMANN, Simon; HERWIG, Christoph. A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 115, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-115>

RODOLFO, Cristiane; GRAMMEL, Hartmut. Fructose metabolism of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Effect of carbon dioxide on growth, and production of bacteriochlorophyll and organic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 4-5, p. 238-246, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.007>

RODRÍGUEZ, J. et al. Metabolic models to investigate energy limited anaerobic ecosystems. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 7, p. 1669–1675, out. 2009. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.224>

ROMÃO, Betânia Braz et al. Alternative techniques to improve hydrogen production by dark fermentation. **3 Biotech**, v. 9, n. 1, p. 18, jan. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1538-y>

SAADY, Noori M. Cata. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>

SABOURIN-PROVOST, Guillaume; HALLENBECK, Patrick C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3513–3517, jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.027>

SAKURAI, Hidehiro et al. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 17, p. 1–25, dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001>

SAVASTURK, Dilan; KAYAHAN, Emine; KOKU, Harun. Photofermentative hydrogen production from molasses: Scale-up and outdoor operation at low carbon-to-nitrogen ratio. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 26, p. 11676–11687, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.014>

SF, Senado Federal. **Projeto de Lei nº 725, de 2022. Disciplina a inserção do hidrogênio como fonte de energia no Brasil, e estabelece parâmetros de incentivo ao uso do hidrogênio sustentável**. Brasília: [s.n.], 2022. Disponível em: <<https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/152413>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

SILVA, Felipe et al. Dark fermentation effluent as substrate for hydrogen production from *Rhodobacter capsulatus* highlighting the performance of different fermentation systems. **3 Biotech**, v. 9, n. 153, mar. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1676-x>

SILVA, J.S. et al. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal of Biotechnology**, v. 286, p. 71–78, nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.004>

SINGH, Sonal et al. Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 623–633, nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.040>

SOUZA, MARIANA DE MATTOS VIEIRA MELLO. **TECNOLOGIA DO HIDROGÊNIO**. 1. ed. Rio de Janeiro: SYNERGIA EDITORA, 2009.

SPEAR, Nancy; SOJKA, Gary A. Conversion of two distinct *Rhodopseudomonas capsulata* isolates to the glycerol-utilizing phenotype. **FEMS Microbiology Letters**, v. 22, n. 3, p. 259–263, maio 1984. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(84\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0378-1097(84)90021-1)

SRIVASTAVA, Neha et al. Nanoengineered cellulosic biohydrogen production via dark fermentation: A novel approach. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107384, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.006>

SUBUDHI, Sanjukta et al. Photofermentative hydrogen production by a new strain; *Rhodobacter sphaeroides* CNT 2A, isolated from pond sediment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 32, p. 13979–13985, ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.255>

TAMAGNINI, Paula et al. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 1–20, mar. 2002. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.1-20.2002>

TAO, Yongzhen et al. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 3, p. 963–973, fev. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.11.021>

TIAN, Xin et al. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 977–983, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.007>

TIANG, Ming Foong et al. Recent advanced biotechnological strategies to enhance photo-fermentative biohydrogen production by purple non-sulphur bacteria: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 24, p. 13211–13230, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.03.033>

TURON, Violette; ANXIONNAZ-MINVIELLE, Zoé; WILLISON, John C. Replacing incandescent lamps with an LED panel for hydrogen production by photofermentation: Visible and NIR wavelength requirements. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 16, p. 7784–7794, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.019>

UYAR, Basar; EROGLU, Inci; YUCEL, Meral; GUNDUZ, Ufuk; TURKER, Lemi. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 18, p. 4670–4677, dez. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.002>

VAN NIEL, C. B. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–118, mar. 1944. <https://doi.org/10.1128/MMBR.8.1.1-118.1944>

VENTURA, Jey-R S. et al. Potential for biohydrogen production from organic wastes with focus on sequential dark- and photofermentation: the Philippine setting. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 10, p. 8535–8548, 28 jul. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01324-0>

WANG, Yi et al. Grid columnar flat panel photobioreactor with immobilized photosynthetic bacteria for continuous photofermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121806, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121806>

WANG, Dan et al. *Paenirhodobacter enshiensis* gen. nov., sp. nov., a non-photosynthetic bacterium isolated from soil, and emended descriptions of the genera *Rhodobacter* and *Haematobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 551–558, 2014. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.050351-0>

WEAVER, Paul F.; WALL, Judy D.; GEST, Howard. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. **Archives of Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 207–216, 1975. <https://doi.org/10.1007/BF00447139>

WU, Ta Yeong et al. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3117–3122, jun. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.002>

XIAO, N. **Use of a Purple Non-Sulphur Bacterium, *Rhodopseudomonas palustris*, as a Biocatalyst for Hydrogen Production from Glycerol**. 2017. 186 f. Dissertation (Doctorate of Philosophy - Faculty of Engineering) – University of Cambridge, Cambridge, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17863/CAM.16680>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

XIE, Guo-Jun et al. The kinetic characterization of photofermentative bacterium *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 and its application for enhancing continuous hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13718–13724, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.168>

YANG, Fangxia; HANNA, Milford A; SUN, Runcang. Value-added uses for crude glycerol - a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 13, 14 dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13>

YANG, Guang; WANG, Jianlong. Enhanced Hydrogen Production from Sewage Sludge by Co-fermentation with Forestry Wastes. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 9, p. 9633–9641, set. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02135>

YU, Siwei et al. Spectral bands of incandescent lamp leading to variable productivity of purple bacteria biomass and microbial protein: Full is better than segmented. **Science of The Total Environment**, v. 823, p. 153736, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153736>

ZAGRODNIK, R. et al. Continuous photofermentative production of hydrogen by immobilized *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 15, p. 5062–5073, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.079>

ZHANG, Tian et al. Comparative study on bio-hydrogen production from corn stover: Photo-fermentation, dark-fermentation and dark-photo co-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 6, p. 3807–3814, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.170>

ZHANG, Xueting et al. Modeling and optimization of photo-fermentation biohydrogen production from co-substrates basing on response surface methodology and artificial neural network integrated genetic algorithm. **Bioresource Technology**, v. 374, p. 128789, abr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128789>

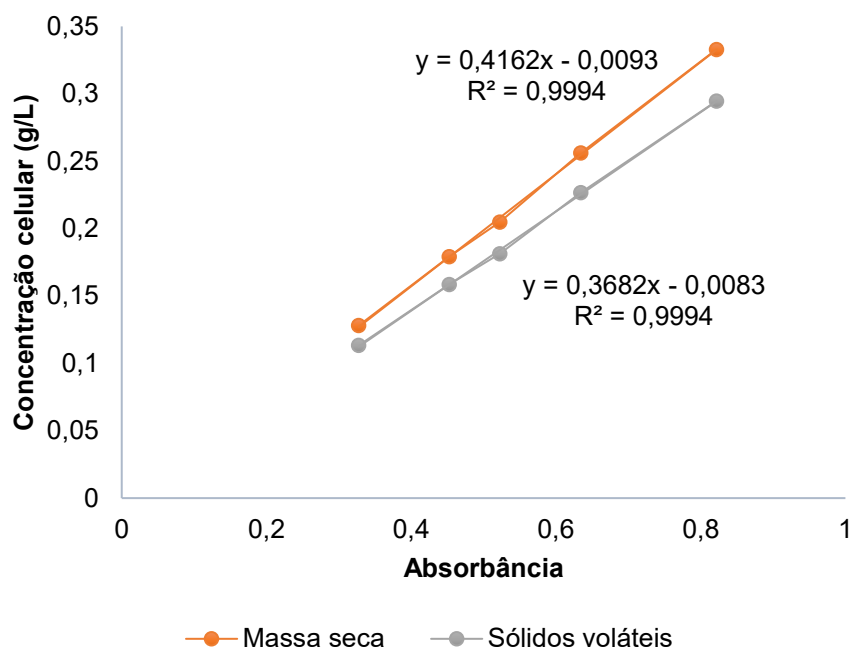
ZHANG, Xueting et al. Enhancement of the biohydrogen production performance from mixed substrate by photo-fermentation: Effects of initial pH and inoculation volume ratio. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124153, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124153>

ZHAO, Yuxiao; CHEN, Yinguang. Nano-TiO₂ Enhanced Photofermentative Hydrogen Produced from the Dark Fermentation Liquid of Waste Activated Sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 19, p. 8589–8595, out. 2011. <https://doi.org/10.1021/es2016186>

ZHU, Hong-bo; PENG, Yong-zhen; MA, Bin. Effects of light, nitrogen and carbon on the growth characteristics of purple non-sulfur bacteria. **CHINA ENVIRONMENTAL SCIENCE**, v. 39, n. 1, p. 290–297, 2019. Disponível em: <<http://www.zghjkx.com.cn/EN/Y2019/V39/I1/290>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

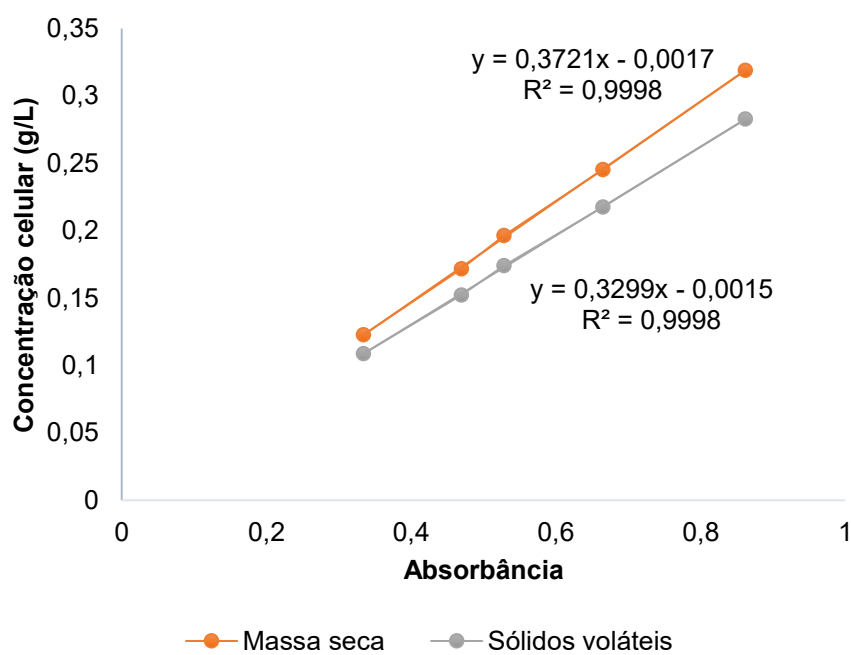
APÊNDICE A

Figura A.1 – Curva de Calibração da Bactéria *Rhodobacter Capsulatus*.



Fonte: O Autor (2024).

Figura A.2 – Curva de Calibração da Bactéria *Rhodospirillum rubrum*.



Fonte: O Autor (2024).