

# **Análise simultânea de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis por CLAE para monitoramento do processo de produção de biohidrogênio por via fermentativa**

L. R. V. de Sá\*, M. A. L. de Oliveira\*\*, A. Matos\*\*\*, M. C. Cammarota\*\*\*\* e V. S. Ferreira-Leitão\*

\* Instituto Nacional de Tecnologia, Laboratório de Biocatálise, CEP 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
(E-mail: *livian.sa@int.gov.br*; *viridiana.leitao@int.gov.br*)

\*\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil  
(E-mail: *marcone.oliveira@ufff.edu.br*)

\*\*\* EMBRAPA Solos, Laboratório de Águas, Solos e Plantas, CEP 22460-000, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
(E-mail: *andreams@cnps.embrapa*)

\*\*\*\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica, CEP 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
(E-mail: *christe@eq.ufrj.br*)

## **Resumo**

A produção de biohidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia tem recebido grande atenção nos últimos tempos. O monitoramento das etapas da fermentação anaeróbia fornece relevantes informações sobre o bioprocessos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi propor uma metodologia para análise simultânea de sacarose, glicose, frutose e dos ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico durante o processo fermentativo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As condições cromatográficas otimizadas foram: coluna Aminex HPX-87H e pré-coluna, fase móvel consistindo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol.L<sup>-1</sup>, fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 55<sup>o</sup>C. Sacarose, glicose e frutose foram analisadas através do detector de índice de refração, enquanto os ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico foram analisados através do detector UV a 210 nm. Alguns parâmetros analíticos foram avaliados, tais como linearidade, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

## **Palavras-chave:**

Biohidrogênio, fermentação anaeróbia, ácidos orgânicos voláteis, carboidratos, CLAE

## **INTRODUÇÃO**

O aumento das necessidades energéticas mundiais, a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis, têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas baseadas em combustíveis alternativos. Dentro deste contexto, o hidrogênio (H<sub>2</sub>) produzido a partir do processo de fermentação anaeróbia vem ganhando grande destaque, devido principalmente à maior produção de H<sub>2</sub> quando comparada a outros processos biológicos e à possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (Mathews e Wang, 2009).

O processo de fermentação anaeróbia consiste de três etapas principais: hidrólise, acidogênese e metanogênese. Na primeira etapa do processo, bactérias hidrolíticas convertem substratos orgânicos complexos em compostos mais simples. Esta etapa consiste na etapa limitante do processo. Na

etapa acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são convertidos em outros compostos, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. A identificação dos ácidos orgânicos voláteis formados durante o processo fornece valiosas indicações do caminho metabólico seguido pelos micro-organismos. Além disso, a razão entre os ácidos acético e butírico (HAc/HBu) pode ser relacionada à produção de H<sub>2</sub>, visto que o aumento desta razão é acompanhada pelo aumento da produção de H<sub>2</sub> (De Sá *et al.*, 2011). A etapa final do processo de fermentação anaeróbia consiste na conversão, pelas arqueias metanogênicas, do H<sub>2</sub> e ácido acético em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Na produção de biohidrogênio, o pré-tratamento térmico do lodo tem sido empregado na tentativa de inibir e/ou eliminar as arqueias metanogênicas e maximizar a produção de H<sub>2</sub> (De Sá, 2011).

Em geral, a análise de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis em meio fermentativo anaeróbio tem sido basicamente realizada através de métodos colorimétricos (Xiao e Liu, 2009) e cromatografia gasosa (Mu *et al.*, 2006), respectivamente. Os métodos colorimétricos fornecem apenas a quantidade total de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956). Deste modo, a maior desvantagem deste tipo de análise consiste na dificuldade de se avaliar simultaneamente diferentes carboidratos (Chávez-Servín *et al.*, 2004). A cromatografia gasosa (CG) tem sido tradicionalmente utilizada para determinar os ácidos orgânicos voláteis em amostras envolvendo lodo anaeróbio. No entanto, devido às características peculiares destes ácidos (por exemplo, alta polaridade, volatilidade e solubilidade em água), uma etapa de derivatização pode ser necessária para obtenção de derivados não-polares, os quais podem ser facilmente analisados por CG, permitindo uma análise mais precisa (Ábalos *et al.*, 2000).

Deste modo, metodologias analíticas simples, rápidas e precisas são desejáveis para o monitoramento e controle do processo fermentativo anaeróbio. Neste contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com modo de detecção dual, detector UV-VIS (UV) e detector de índice de refração (IR), tem recebido grande atenção devido à capacidade de analisar carboidratos e ácidos orgânicos voláteis em amostras de matrizes complexas. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para análise simultânea de sacarose, glicose, frutose e dos ácidos acético, propiônico, butírico e isobutírico em amostras de processo fermentativo anaeróbio por CLAE, para monitoramento da produção de biohidrogênio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Meio reacional

Utilizou-se como inóculo, lodo anaeróbio oriundo de Estação de Tratamento de Esgoto Municipal localizada no Rio de Janeiro, Brasil. Os experimentos foram conduzidos em frascos tipo penicilina de volume de 100 mL. O meio reacional foi composto de 52 mL de inóculo pré-tratado termicamente, 36,5 mL do substrato sintético (solução de sacarose 10 g.L<sup>-1</sup>) e 1,5 mL de uma solução de nutrientes. A solução de nutrientes foi preparada a partir de duas soluções (mg.L<sup>-1</sup>): solução 1 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2500, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2500 e NH<sub>4</sub>Cl 20000) e solução 2 (FeCl<sub>3</sub> 2000, ZnCl<sub>2</sub> 50, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 30, MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O 500, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 50, AlCl<sub>3</sub> 50, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 2000, HCl concentrado 1 mL). No momento da utilização da solução de nutrientes, 10 mL da solução 2 foram adicionados a 1000 mL da solução 1, perfazendo uma solução única que foi adicionada ao frasco. O pH do meio reacional foi ajustado para 5,5 ± 0,1 com HCl 10 mol.L<sup>-1</sup> e os frascos purgados com N<sub>2</sub> por 60 segundos para manutenção das condições de anaerobiose. Os reatores foram incubados em shaker a 35°C e a 100 rpm de agitação. Os ensaios tiveram duração de 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As amostras do meio fermentativo anaeróbio foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm, e então filtradas em membrana Millipore de porosidade 0,22 µm antes de serem injetadas no sistema cromatográfico (n=3).

### Instrumentação

Utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão) composto dos seguintes módulos: degaseificador (modelo DGU-14A), bomba (modelo LC-10AT), auto-injetor (modelo SIL-20A), forno para coluna (modelo CTO-10AS) e detector UV-VIS (modelo SPD-10AV)

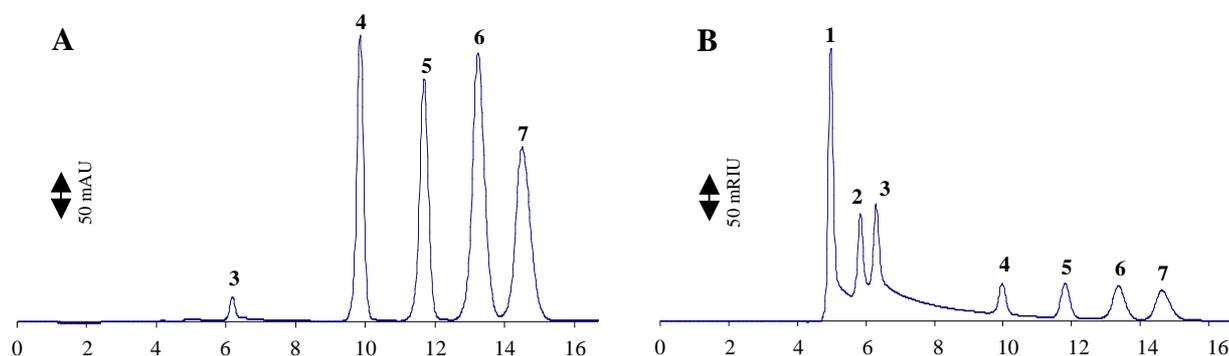
conectado em série com detector de índice de refração (modelo RID-10A). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Class VP 6.1 (Shimadzu, Japão).

### Preparação das curvas analíticas

As curvas analíticas foram preparadas usando o método de adição padrão e o método de padronização externa nos seguintes níveis de concentração: 10, 30, 50, 70 e 100 mmol.L<sup>-1</sup>. Na preparação da curva de adição padrão foram utilizados 2 mL de sobrenadante do lodo anaeróbio (matriz). As soluções de ambas as curvas foram preparadas em triplicata e filtradas em membrana Millipore de porosidade 0,22 µm antes de serem injetadas no sistema cromatográfico (n=3). As curvas foram obtidas por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes preliminares foram realizados para selecionar as condições cromatográficas iniciais para determinação simultânea de sacarose, glicose, frutose, ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido isobutírico (HIb) e ácido butírico (HBU) em amostras do processo fermentativo para a produção de H<sub>2</sub>. A condição cromatográfica ótima encontrada foi: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel consistindo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol.L<sup>-1</sup>, fluxo de 1.0 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 55°C. A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido sob as condições ótimas para uma mistura de padrões adicionados à amostra de meio de cultura oriunda de processo fermentativo para produção de H<sub>2</sub>. Sacarose, glicose e frutose foram determinadas através do detector de índice de refração (IR), enquanto os ácidos orgânicos voláteis foram determinados através do detector UV-VIS a 210 nm.



**Figura 1:** Cromatogramas da mistura de padrões adicionados à amostra de meio de cultura do processo de produção de H<sub>2</sub>. A = Detector UV-VIS a 210nm e B = Detector IR. Picos: sacarose (1), glicose (2), frutose (3), ácido acético (4), ácido propiônico (5), ácido isobutírico (6) e ácido butírico (7). A concentração dos analitos adicionados foi de 100 mmol.L<sup>-1</sup>.

Após a determinação das condições cromatográficas, alguns parâmetros de validação, tais como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez, foram avaliados.

### Seletividade e linearidade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas pelo método de adição padrão e curvas analíticas obtidas pelo método de padronização externa. A similaridade dos coeficientes angulares das curvas analíticas (Tabela 1) indica que o método apresenta apropriada seletividade.

Para avaliação dos modelos propostos, foi realizada a análise de variância. O teste de falta de ajuste para as curvas analíticas apresentaram em todos os casos o  $F_{\text{calculado}}$  menor que o  $F_{\text{crítico}}$  (2,84) (Tabela 1), o que indica, com 95% de confiança, que não ocorre falta de ajuste para os modelos propostos, o que confere ao método aceitável linearidade (Montgomery, 2004).

**Tabela 1:** Resultados estatísticos obtidos no cálculo do parâmetro seletividade.

Analitos	Coefficiente angular	Coefficiente linear	r	F <sub>calculado</sub>
Sacarose <sup>a</sup>	31502,6 ± 1092,3	119516,7 ± 66263,5	0,9751	1,61
Sacarose <sup>b</sup>	28960,5 ± 1849,5	178558,5 ± 112197,4	0,9224	1,36
Glicose <sup>a</sup>	14665,5 ± 674,9	181307,1 ± 40941,0	0,9574	2,37
Glicose <sup>b</sup>	12812,5 ± 941,0	184596,2 ± 57082,9	0,9009	1,30
Frutose <sup>a</sup>	19490,8 ± 561,4	58796,8 ± 34056,6	0,9826	0,60
Frutose <sup>b</sup>	17827,8 ± 1124,3	83161,9 ± 68201,4	0,9241	1,05
Ácido acético <sup>a</sup>	32191,1 ± 935,9	20633,7 ± 56776,4	0,9823	2,15
Ácido acético <sup>b</sup>	31518,5 ± 2142,0	329271,7 ± 129938,9	0,9343	1,64
Ácido propiônico <sup>a</sup>	37402,0 ± 1106,5	41834,3 ± 67125,9	0,9816	2,30
Ácido propiônico <sup>b</sup>	34871,7 ± 2293,4	208623,1 ± 139123,9	0,9183	1,90
Ácido isobutírico <sup>a</sup>	58843,0 ± 1717,4	69246,2 ± 104181,0	0,9822	1,87
Ácido isobutírico <sup>b</sup>	56979,8 ± 3452,3	14234,3 ± 209426,0	0,9293	1,67
Ácido butírico <sup>a</sup>	45094,8 ± 1318,9	10512,2 ± 80011,4	0,9820	1,96
Ácido butírico <sup>b</sup>	43234,9 ± 2765,3	250443,8 ± 167748,7	0,9222	1,59

<sup>a</sup>curva analítica de padronização externa (n=3); <sup>b</sup>curva analítica de adição padrão (n=3)

### Precisão

A precisão deste método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária foram determinadas através da avaliação do desvio padrão relativo (RSD) calculado a partir das áreas dos picos obtidos para os padrões e para as amostras fortificadas nos seguintes níveis de concentração: 10, 50 e 100 mmol.L<sup>-1</sup> (ANVISA, 2003). A diferença é que no caso da precisão intermediária os estudos foram realizados 30 dias após os estudos iniciais. A Tabela 2 mostra que os valores de RSD (%) obtidos para ambos os parâmetros são menores que 3 % tanto para os padrões quanto para as amostras fortificadas. Deste modo, os valores de RSD (%) obtidos para ambos os estudos de repetibilidade e precisão intermediária são considerados aceitáveis (menores que 5 %) (ANVISA, 2003).

**Tabela 2:** Valores de RSD (%) obtidos no estudo do parâmetro de precisão intermediária.

Repetibilidade							
Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )	RSD (%) para padrões <sup>a</sup>						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	Hib	HBu
10	2,30	2,65	2,99	2,08	1,86	1,17	0,83
50	1,69	1,50	2,70	1,83	1,78	1,61	1,10
100	2,49	2,60	0,97	0,54	0,77	1,14	0,97
Concentração adicionada (mmol.L <sup>-1</sup> )	RSD (%) para amostras fortificadas <sup>a</sup>						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	Hib	HBu
10	0,88	2,32	2,17	0,90	2,84	0,89	1,94
50	0,63	1,05	2,28	1,80	0,76	0,88	0,76
100	1,37	1,36	2,31	0,98	1,03	1,24	2,09
Precisão intermediária							
Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )	RSD (%) para padrões <sup>a</sup>						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	Hib	HBu
10	0,55	1,47	1,20	0,86	1,02	1,96	0,40
50	1,17	1,51	1,76	0,31	0,58	1,17	0,44
100	0,92	0,82	1,62	0,46	0,96	1,88	0,75
Concentração adicionada (mmol.L <sup>-1</sup> )	RSD (%) para amostras fortificadas <sup>a</sup>						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	Hib	HBu
10	1,30	0,54	0,26	1,99	1,43	0,53	0,72
50	1,93	1,53	2,36	1,02	2,12	1,55	1,87
100	0,97	2,45	2,19	2,53	0,20	0,85	0,59

<sup>a</sup>n=3

### Exatidão

A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de analitos adicionados às amostras. Os testes de recuperação foram realizados através da adição de quantidades conhecidas de padrões (10, 50 e 100 mmol.L<sup>-1</sup>) nas amostras oriundas do processo fermentativo antes do processo de centrifugação. Somente após a adição dos padrões, procedeu-se à centrifugação das amostras. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana Millipore de 0,22 µm e analisado por CLAE. As porcentagens de recuperação obtidas foram: sacarose (99%), glicose (113%), frutose (111%), ácido acético (83%), ácido propiônico (71%), ácido isobutírico (92%) e ácido butírico (100%). Como pode ser observado, as porcentagens de recuperação obtidas estão dentro da faixa de 70-120%, o que demonstra que o método apresenta aceitável exatidão (Ribani *et al.*, 2004).

### Limite de detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Neste estudo, o LOD e o LOQ foram determinados através dos parâmetros das curvas analíticas (Ribani *et al.*, 2004). Os valores de LOD e LOQ obtidos foram respectivamente: sacarose (0,54 e 1,80 mmol.L<sup>-1</sup>), glicose (0,13 e 0,43 mmol.L<sup>-1</sup>), frutose (0,48 e 1,59 mmol.L<sup>-1</sup>), ácido acético (0,28 e 0,94 mmol.L<sup>-1</sup>), ácido propiônico (0,68 e 2,27 mmol.L<sup>-1</sup>), ácido isobutírico (0,39 e 1,32 mmol.L<sup>-1</sup>) e ácido butírico (0,36 e 1,19 mmol.L<sup>-1</sup>). Os baixos valores obtidos para estes dois parâmetros, LOD e LOQ, permitem a determinação precisa dos analitos em baixas concentrações.

### Robustez

Neste trabalho, a robustez foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo de três fatores em três níveis (3<sup>3</sup>): temperatura da coluna (54, 55 e 56°C), fluxo da fase móvel (0,9; 1,0 e 1,1 mL.min<sup>-1</sup>) e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na fase móvel (4,8; 5,0 e 5,2 mmol.L<sup>-1</sup>). Para o teste de robustez, as amostras foram fortificadas com padrões de carboidratos e ácidos orgânicos na concentração de 50 mmol.L<sup>-1</sup> cada.

A Tabela 3 apresenta os experimentos realizados para avaliação da robustez e os resultados obtidos em relação à porcentagem de recuperação. Como pode ser observado, as porcentagens de recuperação se encontram dentro da faixa de 70-121%. Deste modo, pequenas variações nos parâmetros cromatográficos, tais como temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e concentração da fase móvel, não apresentam significativas mudanças nos valores de recuperação, pois estes se encontram dentro do intervalo de referência (Ribani *et al.*, 2004).

**Tabela 3:** Resultados de robustez de amostras da fermentação anaeróbia em relação à porcentagem de recuperação.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
1	-1	-1	-1	106	116	119	100	85	79	92
2	+1	-1	-1	103	119	118	98	83	76	88
3	-1	+1	-1	95	116	115	91	77	68	81
4	+1	+1	-1	91	121	119	93	74	68	72
5	-1	-1	+1	91	119	109	92	79	76	82
6	+1	-1	+1	92	117	119	90	78	76	82
7	-1	+1	+1	102	110	116	98	87	79	81
8	+1	+1	+1	99	119	118	94	80	71	85
9	0	0	0	100	109	116	95	80	76	87
10	0	0	0	102	106	117	97	83	76	89
11	0	0	0	102	108	115	98	85	78	91
				98 ± 5,34 <sup>a</sup>	115 ± 5,24 <sup>a</sup>	116 ± 3,0 <sup>a</sup>	95 ± 3,44 <sup>a</sup>	81 ± 4,08 <sup>a</sup>	75 ± 3,25 <sup>a</sup>	85 ± 5,73 <sup>a</sup>

X<sub>1</sub>- Temperatura da coluna (°C): (-) 54; (0) 55; (+) 56; X<sub>2</sub>- Fluxo da fase móvel (mL.min<sup>-1</sup>): (-) 0,9; (0) 1,0; (+) 1,1; X<sub>3</sub>- Concentração da fase móvel (mmol.L<sup>-1</sup>): (-) 4,8; (0) 5,0; (+) 5,2; <sup>a</sup>média ± desvio padrão (n=3)

Ferramentas de análise estatística (análise de variância – ANOVA) foram utilizadas para identificar os efeitos significativos (Tabela 4). Um fator independente possui efeito significativo sobre uma resposta quando ele possui um p-valor < 0,05. Os resultados indicaram que todos os fatores tiveram efeito não significativo sobre as respostas de glicose e ácido propiônico. Os fatores temperatura da

coluna ( $X_1$ ) e fluxo da fase móvel ( $X_2$ ) são significativos para a frutose e ácido isobutírico, respectivamente. A interação entre o fluxo e a concentração da fase móvel ( $X_2X_3$ ) apresentou efeito significativo para a sacarose, ácido acético e ácido butírico. Embora alguns efeitos tenham sido significativos no intervalo de confiança de 95%, o método pode ser considerado robusto, visto que a dispersão das respostas (porcentagem de recuperação – R%) foi relativamente baixa (Tabela 3).

**Tabela 4:** Resultados da análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial completo 3<sup>3</sup>.

Fatores	Sacarose		Glicose		Frutose		HAc		HPr		Hib		HBu	
	E*	p**	E*	p**	E*	p**	E*	p**	E*	p**	E*	p**	E*	p**
X <sub>1</sub>	-2,17	0,09	3,50	0,10	3,85	< 0,05	-1,63	0,24	-3,34	0,19	-2,48	0,09	-2,18	0,26
X <sub>2</sub>	-1,26	0,23	-1,45	0,34	0,51	0,61	-1,16	0,36	-1,71	0,42	-4,00	< 0,05	-6,13	0,05
X <sub>3</sub>	-3,07	0,05	-1,76	0,27	-2,46	0,10	-1,78	0,22	0,97	0,62	1,99	0,13	-1,10	0,51
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-1,04	0,30	3,22	0,11	-0,69	0,51	0,47	0,68	-1,65	0,43	-1,07	0,31	-0,23	0,88
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1,19	0,25	-0,16	0,90	2,35	0,11	-1,47	0,28	-0,91	0,64	-1,52	0,20	4,36	0,09
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	10,26	< 0,05	-2,17	0,20	2,12	0,13	6,31	< 0,05	7,02	0,05	3,23	0,06	7,42	< 0,05
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,85	0,37	2,37	0,18	-3,54	0,05	-1,72	0,23	-1,71	0,42	-2,82	0,07	2,06	0,28

\*E = efeito; \*\*p = p-valor

## CONCLUSÕES

A simultânea determinação de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico) por CLAE foi aplicada com êxito em amostras do processo fermentativo para a produção de H<sub>2</sub>. Todos os parâmetros de validação do método estudados obedeceram à faixa dos limites estabelecidos por protocolos oficiais. Deste modo, a metodologia proposta neste trabalho pode ser aplicada no monitoramento da produção de H<sub>2</sub> via fermentação anaeróbia.

## AGRADECIMENTOS



## REFERÊNCIAS

- Ábalos M., Bayona J. M., Pawliszyn J. (2000) Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *Journal of Chromatography A*, 873, 107-115;
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, Maio/2003;
- Chávez-Servín J. L., Castellote A. I., López-Sabater M. C. (2004) Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography*, 1043, 211-215;
- De Sá L. R. V., Oliveira T. C., Santos T. F., Matos A., Cammarota M. C., Oliveira E. M. M., Ferreira-Leitão V. S. (2011) Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial communities performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7543-7549;
- De Sá L. R. V. (2011) Produção Biológica de Hidrogênio por Bactérias Fermentativas Utilizando Diferentes Carboidratos ou Glicerina Como Substrato. Tese mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356;
- Mathews J., Wang G. (2009) Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7404-7416;
- Montgomery D. C. (2004). Design and Analysis of Experiments, 6<sup>th</sup> ed; Wiley: New York;
- Mu Y., Wang G., Yu H-Q. (2006) Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microbiology Technology*, 38, 905-913;
- Ribani M., Bottoli C. B. G., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., Melo L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780;
- Xiao B.Y., Liu J. X. (2009) Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. *Chinese Science Bulletin*, 54, 2038-2044.