



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENGENHARIA QUÍMICA

ANGELICA RAMOS DA PAZ

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA  
BIOLÓGICA UTILIZANDO MICRO-ORGANISMO**

RECIFE

2022

ANGELICA RAMOS DA PAZ

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA  
BIOLÓGICA UTILIZANDO MICRO-ORGANISMO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Química da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.

Orientador (a): Maria de Los Angeles P. F. Palha

Coorientador (a): Jorge Vinícius F. L. Cavalcanti

Recife

2022

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

Paz, Angelica Ramos Da.

Produção de Hidrogênio por Via Biológica Utilizando Micro-organismo /  
Angelica Ramos Da Paz. - Recife, 2022.  
55 : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Peres Fernandez Palha

Cooorientador(a): Jorge Vinícius Fernandes Lima Cavalcanti

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química -  
Bacharelado, 2022.

1. Hidrogênio. 2. Via biológica de produção. 3. Microbiologia. I. Palha,  
Maria de Los Angeles Peres Fernandez. (Orientação). II. Cavalcanti, Jorge  
Vinícius Fernandes Lima. (Coorientação). III. Título.

660 CDD (22.ed.)

ANGELICA RAMOS DA PAZ

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA  
BIOLÓGICA UTILIZANDO MICRO-ORGANISMO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Química da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.

Aprovado em: 28/10/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez F. Palha (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Sara Horário De Oliveira (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Sônia Melo C. De Albuquerque (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Jocélia Sônia e Severino Paz, pelos ensinamentos, apoio e amor incondicional.

A toda minha família, especialmente aos meus queridos avós, Doralice e Geraldo Paz, Sônia e Amaro Pessoa, além de Amara e José Carneiro com quem pouco convivi, mas sempre os terei comigo.

Aos meus Padrinhos, Marlene e Adenilson Barros.

A minha sobrinha Yasmin, alegria em minha vida.

As minhas queridas amigas e irmãs Doralice Paz e Dayse Porfírio companheiras em todos os momentos.

Aos meus queridos irmãos Henrique, Toninho e Billy.

Ao meu Simba, querido amigo felino das madrugadas de estudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar em toda minha vida e minha trajetória acadêmica, pela saúde e proteção concedida a cada dia.

A toda minha família, especialmente aos meus pais por todo apoio e incentivo na busca dos meus objetivos.

As minhas queridas amigas e companheiras no caminhar em Cristo; Dora Paz, Dayse Porfírio e Eduarda Moura pela paciência e por compartilhar os inúmeros momentos de estresse e ansiedade.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria de Los Angeles pela orientação, atenção, dedicação e por disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

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

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

Agradeço a Kalyne Alves pelo auxílio no desenvolvimento das atividades;  
Agradeço aos responsáveis pelo Laboratório de Microbiologia Industrial e de Cromatografia Instrumental do Departamento de Engenharia Química da UFPE por ceder o espaço para o desenvolvimento dos experimentos relacionados à pesquisa.

Agradeço aos profissionais do laboratório de Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) pelo fornecimento da bactéria *Enterobacter aerogenes* para o desenvolvimento da Pesquisa.

Agradeço aos meus queridos colegas Amanda, Elaine, Elisângela, Camila, Eryka, Sarah e José Cláudio pela amizade e cumplicidade nessa trajetória acadêmica.

À Chesque, pelo auxílio na coleta da amostra padrão do gás carbônico.

À Universidade Federal de Pernambuco especialmente ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) e a todos professores desta Instituição que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

*“Mas eu sei não é o fim,  
É só o começo da jornada.”*

Pedro Valença

## RESUMO

Com o aumento das demandas energéticas mundiais e a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais atrelados a esses, as energias renováveis têm ganhado grande destaque. Com isso, diversas tecnologias de produção de energia limpa que utilizam, por exemplo, os materiais lignocelulósicos como matérias-primas e avanços biotecnológicos vêm tentando desenvolver estratégias geradoras de energia através da utilização de energia limpa e renovável. É neste contexto que a produção de hidrogênio surge como uma alternativa de grande interesse para o desenvolvimento e ampliação da matriz energética renovável no Brasil e no mundo. Em termos energéticos, ele possui uma alta vantagem quando comparado aos combustíveis convencionais, liberando 142 KJ de energia por grama do combustível, cerca de três vezes mais que a gasolina. A produção de hidrogênio por via biológica é uma das metodologias mais promissoras para o futuro, o método por fermentação anaeróbia está entre os mais ambientalmente corretos, visto que não é dependente de combustíveis fósseis nem depende de eletricidade. Desta maneira o presente estudo objetivou avaliar a produção de hidrogênio por *Enterobacter aerogenes* a partir da glicerina, glicose, sacarose e caldo de cana. Os substratos sacarose, glicerina e Glicose apresentaram uma maior eficiência na produção do biohidrogênio. Em relação a avaliação da produção do metabólito etanol, em relação ao substrato glicose, observou-se -se que ela foi maior com a ocorrência da reação de Maillard.

**Palavras chaves:** Fermentação; Biohidrogênio; *Enterobacter aerogenes*;

## **ABSTRACT**

With the increase in global energy demand and the decrease in fossil fuel reserves and the environmental problems linked to these, renewable energies have gained great prominence. As a result, several clean energy production technologies that use, for example, lignocellulosic materials as raw materials and biotechnological advances have been trying to develop energy-generating strategies through clean and renewable energy. It is in this context that the production of hydrogen emerges as an alternative of great interest for the development and expansion of the renewable energy matrix in Brazil and in the world. In terms of energy, it has a high advantage when compared to conventional fuels, releasing 142 KJ of energy per gram of fuel, about three times that of gasoline. Production of hydrogen biological pathways is one of the most promising methodologies for the future, with anaerobic fermentation method being among the most environmentally friendly, since it is not dependent on fossil fuels or electricity. Thus, the present study aimed to evaluate the production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* from glycerin, glucose, sucrose, sugarcane juice. The substrates sucrose, glycerin and Glucose (with Maillard reaction) presented a higher efficiency in biohydrogen production. In the evaluation of the production of the ethanol metabolite, in relation to the substrate glucose, it was observed that it was higher with the occurrence of the Maillard reaction.

**Keywords:** Fermentation; Biohydrogen; *Enterobacter aerogenes*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Emissões de CO <sub>2</sub> por fonte entre 2020 e 2021.....	14
Figura 2:	Oferta interna de Energia no Brasil de acordo por fonte .....	15
Figura 3:	Oferta interna Total de Energia no Brasil (%) .....	16
Figura 4:	Eficiência Típicas de Conversão em processos de produção de Hidrogênio.....	20
Figura 5:	Esquema geral das formas de obtenção do Hidrogênio.....	21
Figura 6:	Princípio de operação da eletrólise alcalina.....	22
Figura 7:	Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio.....	26
Figura 8:	Processo de tamponamento para esterilização dos reatores utilizados na fermentação.....	30
Figura 9:	Processo de desinfecção das seringas a serem acopladas nos reatores.....	30
Figura 10:	Seringas acopladas nos reatores durante o processo fermentativo para captação do gás.....	31
Figura 11:	Análise do teor de sacarose no substrato caldo de cana com 17% de BRIX.....	33
Figura 12:	Evidência colorimétrica da reação de Maillard nas amostras com o substrato glicose.....	33
Figura 13:	Amostras de glicose após o processo de esterilização com e sem reação de Maillard.....	34
Figura 14:	Cromatógrafo Gasoso utilizado durante as análises cromatográficas do biohidrogênio.....	35
Figura 15:	Cromatógrafo gasoso da Master utilizado durante as análises cromatográfica do tanol.....	36
Figura 16:	Amostras líquidas retiradas dos reatores para a análise do etanol por cromatografia.....	37
Figura 17:	Cromatograma obtido pela análise da amostra 1 de glicerina.....	39
Figura 18:	Concentração Média do Hidrogênio formado por substrato.....	40
Figura 19:	Concentração Média do gás carbônico formado por substrato.....	42
Figura 20:	Pico Cromatográfico referente a amostra de Sacarose.....	43

Figura 21:	Pico Cromatográfico referente a amostra de Glicerina.....	44
Figura 22:	Pico Cromatográfico referente a amostra de Glicose Maillard.....	44
Figura 23:	Ilustração mostrando a concentração Média do Etanol formado por substrato.....	45
Figura 24:	Ilustração mostrando a comparação da concentração média do etanol e biohidrogênio produzidos por substrato analisado.....	46
Figura 25:	Relação da produção de biohidrogênio nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard.....	47
Figura 26:	Relação da produção de CO <sub>2</sub> nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard.....	47
Figura 27:	Relação da produção de Etanol nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE	Gases do Efeito Estufa
Mtep	milhões de toneladas de petróleo equivalente
OIE	Oferta Interna de Energia
IEA	Agência Internacional de Energia
SOE	Solid Oxide Electrolysis
PEM	Proton Exchange Membrane
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
TCD	Detector de condutividade térmica
RM	Reação de Maillard
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
GSR	Relatório da situação Global de Energia
STR	Reator do tipo Tanque Agitado
PTFE	Politetrafluoretileno

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	13
1.1.1 Objetivos Específicos .....	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 FONTES DE ENERGIA.....	14
2.2 HIDROGÊNIO .....	18
<b>2.2.2 Rotas de produção do hidrogênio .....</b>	<b>20</b>
2.2.1.1 Reforma a Vapor.....	21
2.2.1.2 Eletroquímico .....	22
2.2.1.2.1 Método alcalino .....	22
2.2.1.1.2 Método por membrana polimérica condutora .....	23
2.2.1.1.3 Método por eletrólise a óxido sólido (SOE) .....	23
2.2.1.3 Gaseificação .....	24
2.2.1.4 Produção Biológica do Hidrogênio.....	25
2.2.1.4.1 Fermentação Anaeróbica.....	26
2.3 MICRO-ORGANISMOS .....	27
2.4 REATORES .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>29</b>
3.1 COLETA DO MICRO-ORGANISMO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO .....	29
3.2 ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES E SERINGAS.....	29
3.3 SUBSTRATOS E PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRIENTE .....	31
3.4 ANÁLISE DO TEOR DE SACAROSE .....	33
3.5 SOLUÇÃO NUTRIENTE PARA O SUBSTRATO GLICOSE .....	34
3.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	36
<b>3.6.1 Análise do Hidrogênio .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.2 Análise do Etanol.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6.3 Análise do Gás Carbônico .....</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1 ANÁLISE DO HIDROGÊNIO.....	39
4.2 ANÁLISE DO GÁS CARBÔNICO POR CG .....	42
4.3 ANÁLISE DO ETANOL .....	43

<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6. TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1.INTRODUÇÃO

Excessiva discussão tem sido realizada acerca das mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global e gases de efeito estufa, problemas estes que estão diretamente ligados ao consumo mundial de energia (FERREIRA et al., 2022). Nesse sentido, o fomento ao uso de tecnologias renováveis de energia é indispensável para atenuação de tais problemas ambientais.

De acordo com a última Resenha Energética Brasileira (REB), as tecnologias renováveis são consideradas uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo, e têm se destacado com um alto potencial de expansão, a matriz energética brasileira, por exemplo, é liderada pela fonte hídrica com 62,72% da matriz, 16,81% de fóssil, 8,96% de eólica, 8,7% de biomassa, 1,66% de solar e 1,14% de nuclear (RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA, 2022).

Dessa forma, tem surgido ideias de desenvolvimento sustentável e incentivo ao avanço da matriz energética renovável no Brasil e no mundo, através do uso de biocombustíveis com baixa emissão de carbono. Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2021), apesar do uso de derivados do petróleo ser a maior fonte energética que prevalece no Brasil, a utilização de fontes renováveis e naturais vem crescendo com ritmo acelerado.

Portanto, o estudo das tecnologias de produção bem como da utilização do hidrogênio como fonte de energia renovável e combustível têm um papel fundamental a desempenhar neste setor, haja vista que este possui uma ampla aplicabilidade. Atualmente, ele é usado principalmente como matéria-prima industrial para a fabricação de amônia, metanol e refinarias bem como parte integrante de um mix de gases em siderurgia para geração de calor industrial, a sua produção é de cerca de 87 megatoneladas por ano (MtH<sub>2</sub>/ano) o que equivale a cerca de 2,5% da demanda final de energia requerida no ano 2020 (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2021).

Nesse sentido, no que tange a utilização de Hidrogênio (H<sub>2</sub>) como combustível o estudo da sua produção mostra-se como uma interessante e potencial fonte de contribuição para a diversificação da matriz energética renovável. Ele é um portador

de energia ideal, limpo e potencialmente sustentável para o futuro devido à sua abundância e natureza não poluente.

As tecnologias convencionais de produção do  $H_2$  incluem o método por reforma a vapor de gás natural (metano) e petróleo, decomposição catalítica de gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e gaseificação de carvão ou coque. Estas tecnologias são exigentes em termos de energia, uma vez que são aplicadas, empregando-se altas temperaturas. Além disso, 96% dessas fontes de  $H_2$  são provenientes de combustíveis fósseis (ANDRADE et al. 2022).

Nesse aspecto, evidenciam-se as tecnologias para produção biológica do gás, diversas bactérias e algas são capazes de produzi-lo a partir da água, energia solar e uma variedade de substratos orgânicos. A produção por fermentação anaeróbia, por sua vez, tem se destacado principalmente devido à maior produção do gás quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (MATHEUS; WANG, 2009).

Outrossim, a produção de hidrogênio por via biológica por fermentação anaeróbia está entre os métodos ambientalmente corretos, visto que em comparação com os demais não depende de combustíveis fósseis, como o método de produção por gaseificação do carvão, nem dependem de eletricidade, como pela via eletrolítica (AGYEKUM et al. 2022).

No momento, podem ser utilizados em conjunto com outros métodos para acelerar a transição da economia de hidrogênio, o que tem sido bastante discutido mundialmente.

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia em reator do tipo batelada, utilizando micro-organismo.

.

### **1.1.1 Objetivos Específicos**

- Produzir hidrogênio utilizando como substrato diferentes fontes de carbono
- Analisar a produção do Biohidrogênio por meio de Cromatografia Gasosa;
- Analisar a produção de Etanol por Cromatografia Gasosa;
- Analisar a produção de  $CO_2$  por cromatografia gasosa.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FONTE DE ENERGIA

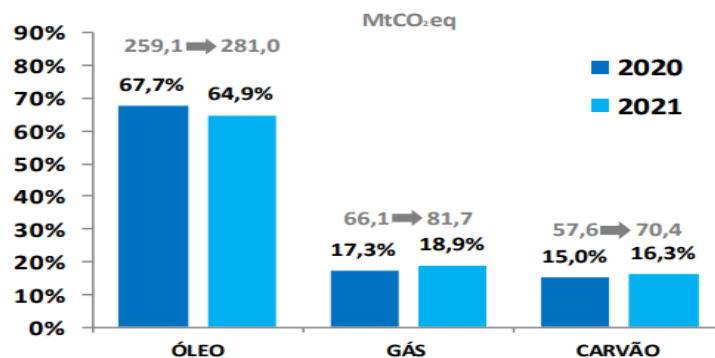
O aumento das demandas energéticas mundiais bem como a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes, constituem o novo panorama para o século XXI e determinam a necessidade de adoção de novas políticas referentes às fontes de energia (SÁ, 2011).

A diminuição de combustíveis fósseis ocorrida nos últimos anos, tem acelerado a busca por fontes menos impactantes e utilizadoras de recursos naturais, bem como tem influenciado na redução dos recursos hídricos e, por conseguinte, a busca por uma distribuição de energia mais limpa e barata. Desse fato, resulta a importância de estudos acerca de tecnologias renováveis e a redução de emissão de gases de efeito estufa (GEE) (COMPLEXOS ENERGÉTICOS, 2022).

Segundo o relatório da Global Energy Review da Agência Internacional de Energia (IEA), no ano de 2021, as emissões dos GEE do Brasil pelo uso da energia foram de 433,1 milhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente (MtCO<sub>2</sub> eq), representando um aumento de 13,2% sobre as emissões de 2020 (RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA, 2022).

A Figura 1, mostra o panorama das emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) no ano de 2020 e 2021 evidenciando a contribuição significativa de fontes não renováveis Óleo (principalmente petróleo), Gás e Carvão.

**Figura 1.** Emissões de CO<sub>2</sub> por fonte - 2020 e 2021



Fonte: (Resenha Energética Brasileira, 2022)

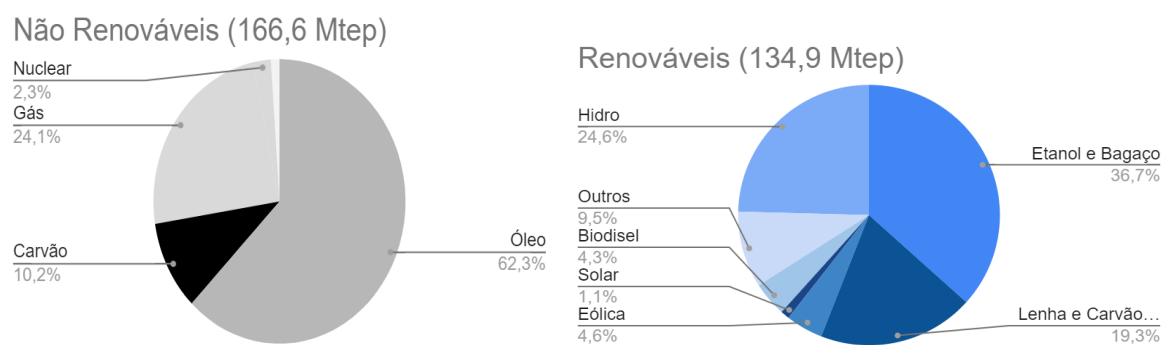
Sendo assim, as energias renováveis, por outro lado, se configuram como uma fonte energética limpa que contribui para a diversificação da matriz energética, além de serem menos poluentes estão alinhadas à ideia do desenvolvimento sustentável (FARIAS; MARTINS; CÂNDIDO, 2021).

As Figuras 2 e 3, ilustram a estrutura da oferta de energia de 2021 (OEI) no Brasil, tendo as fontes renováveis uma parcela de mais de 40% de contribuição da oferta total.

A Figura 2 ilustra a estrutura da OIE de acordo com o tipo de fonte de energia, no que tange a matriz não renovável observa-se que a fonte oriunda de óleo, predominantemente o petróleo, possui uma contribuição de mais de 60% para a matriz correspondente a 103,62 Mtep.

Em relação à matriz renovável, observa-se como principal fonte contribuidora, o etanol e Bagaço com uma parcela de 36,7% equivalente a 49,51 Mtep.

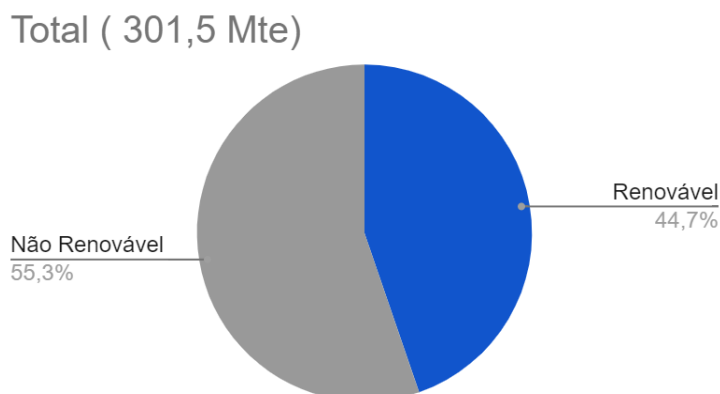
**Figura 2:** Oferta Interna de Energia no Brasil – 2021 (%) de acordo com o tipo de fonte



Fonte: (Resenha Energética Brasileira, 2022)

Na Figura 3 pode-se observar as vantagens comparativas da participação de 44,7% das fontes renováveis na matriz energética brasileira.

**Figura 3:** Oferta Interna de Energia Total no Brasil – 2021 (%)



Fonte: Adaptado de (Resenha Energética Brasileira, 2022)

Em relação à economia brasileira, observa-se a diversidade na eficiência das cadeias produtivas devido às características legais e políticas existentes no país, como o setor sucroenergético, por exemplo, que possui forte influência na economia desde períodos coloniais, além de ser o pioneiro na substituição do uso de recursos fósseis pelos renováveis (PÉRICO; SILVA, 2021).

De acordo com o balanço de energia realizado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2022), o volume energético ofertado a partir da cana-de-açúcar foi de 54,9 Mtep, o maior da série histórica iniciada em 2006, já no grupo de fontes renováveis que compõem a oferta nacional de energia, a biomassa a partir da cana teve uma contribuição de 19,1%, assim, o Brasil teve destaque mundial, com 9,1% de participação devido à forte geração por bagaço de cana e lixo.

Contudo, de acordo com a REB 2022, as fontes renováveis tiveram um recuo percentual de 3,8 % na matriz energética brasileira em razão da diminuição na participação do setor hidráulico, uma vez que ele foi afetado por um baixo regime de chuvas, além disso, a oferta de derivados da cana também foi afetada por condições climáticas adversas como a estiagem durante o ciclo produtivo das lavouras, e pelas baixas temperaturas em junho e julho de 2021 em importantes regiões produtoras. Apesar disso, as fontes renováveis não tiveram uma redução ainda maior devido a outras renováveis, incluindo Eólica e Solar, que apresentaram um aumento de 13,2% (EPE, 2022).

Ainda no que tange o aspecto das energias renováveis, a Organização das Nações Unidas (ONU) reconhece a importância e emergência do tema ao dispor dentre os seus dezessete objetivos, um diretamente voltado para a questão energética, o qual visa “assegurar o acesso confiável, sustentável, moderno e a preço acessível à energia para todos”, apresentando também como meta o aumento da participação de energias renováveis na matriz energética global até 2030.

Em relação ao cenário atual, o Relatório da Situação Global de Energias Renováveis (GSR) de 2022, documenta o progresso feito no setor de energia renovável e destaca as oportunidades oferecidas por uma economia e sociedade baseada por este viés energético. Além de mencionar que ela atraiu no ano de 2021 maiores investimentos do que o baseado em combustível fóssil.

No entanto, apesar da significativa contribuição das fontes renováveis supracitadas é de suma importância o estudo e desenvolvimento de novas tecnologias de produção de energia renovável para a expansão da matriz, posto que elas apresentam potencial de reduzir a emissão de gases de efeito estufa (GEE) de uma forma sustentável e muitas delas não dependem de fatores climáticos, como a produção de hidrogênio (EPE, 2022).

Portanto, tem-se estudado diversas tecnologias de produção de energia limpa que utilizam, por exemplo, os materiais lignocelulósicos como matérias-primas (resíduos agroflorestais, madeira de florestas plantadas, culturas energéticas de curto ciclo, lixo urbano), que são mais baratos, mais abundantes e podem ser produzidos nas mais variadas condições de solo e clima (LEITE; LEAL, 2007).

Ademais, avanços biotecnológicos vêm tentando desenvolver estratégias geradoras de energia através da utilização de energias limpas e renováveis, a fim de minimizar os impactos ambientais supracitados, bem como fomentar o aproveitamento de resíduos provenientes de biomassa.

Segundo a EPE, as fontes renováveis de energia são consideradas limpas pois emitem menos GEE que as fontes fósseis e, por isso, estão conseguindo uma boa inserção no mercado brasileiro e mundial.

É neste contexto que a produção de hidrogênio surge como uma alternativa de grande interesse para o desenvolvimento e ampliação da matriz energética renovável no Brasil e no mundo.

## 2.2 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é o elemento químico mais simples que existe na natureza, sendo seu átomo formado por apenas um próton e um elétron.

Ele é visto como uma alternativa promissora de energia no futuro, uma vez que possui alta energia por unidade de massa, além disso, o seu rendimento energético é cerca de três vezes maior do que os combustíveis fósseis (SOUZA, 2018).

Em termos de Energia, o hidrogênio possui vantagem quando comparado aos combustíveis convencionais. A Tabela 1 mostra o teor energético dele em comparação aos demais.

**Tabela 1** – Teor energético de combustíveis 25°C e 1 atm.

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

Fonte: Adaptado de SOUZA, 2018.

O hidrogênio é um gás muito leve quando comparado aos combustíveis comumente usados, possui maior conteúdo energético por unidade de massa e em condições normais de temperatura e pressão apresenta-se como um gás incolor, inodoro e muito mais leve que o ar (BARBOSA, 2020).

A principal diferença entre o hidrogênio e a eletricidade é que o hidrogênio pode ser utilizado como um portador de energia química, por ser composto de moléculas e não apenas elétrons, facilita o armazenamento e o transporte de forma estável, similar a outras fontes como o petróleo e carvão, além disso, a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água como produto. Além disso, o hidrogênio pode ser utilizado diretamente como fonte de energia de baixo ou nulo carbono (a depender de seu processo de produção), viabilizando a maior entrada de renováveis variáveis na matriz energética brasileira (MATHEWS; WANG, 2009).

Devido ao seu baixo impacto ambiental e seu alto valor energético, ele tem sido visto como um grande potencial energético.

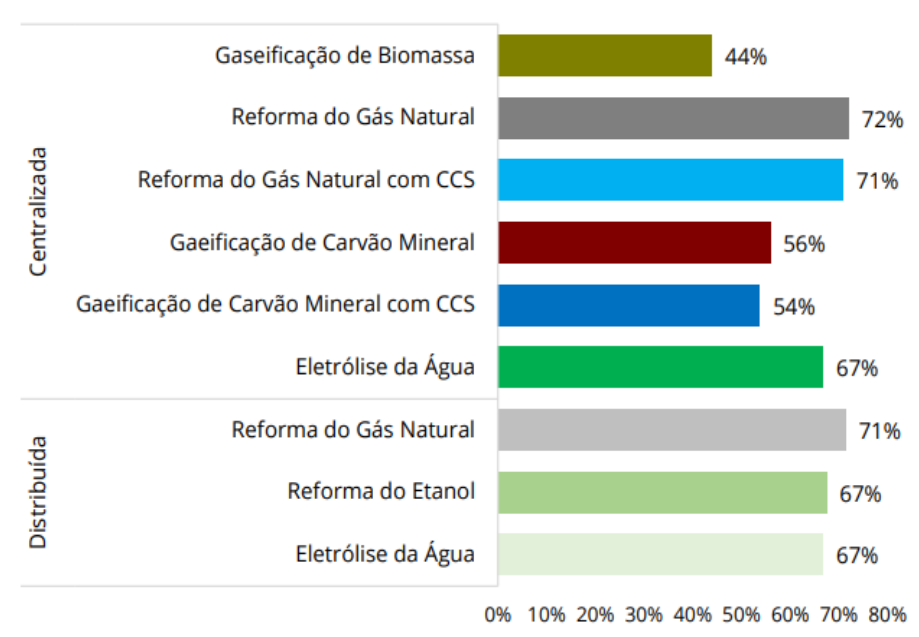
Nos últimos anos, o mercado de hidrogênio tem se tornado uma das principais estratégias climáticas e de energia de diversos países, vez que se mostra como uma alternativa para setores onde a diminuição de emissões de carbono é difícil. Fato esse

que pode ser evidenciado pela Resolução nº 06, de 23 de junho de 2022 elaborada pelo Conselho Nacional de Política Energética em 2022, a qual implementou o Programa Nacional do Hidrogênio (PNH2), a qual estabelece a estrutura de governança do programa (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2022).

Nesse sentido, após décadas sendo visto como uma fonte de energia de grande potencial, mas com significativos desafios tecnológicos e de mercado, o hidrogênio tornou-se um objetivo estratégico de governos e empresas em todo o mundo, e seu mercado tem sido impulsionado a partir de políticas energéticas pós-pandemia para a retomada da economia e para acelerar a transição energética em diversos países (EPE, 2021).

Além disso, o hidrogênio é projetado cobrindo 12% da demanda global de energia e diminuindo 10% das emissões de CO<sub>2</sub> até 2050 (ENERGIA HOJE, 2022). É por esta razão que as tecnologias de produção e utilização do hidrogênio como fonte de energia e como combustível têm um papel fundamental a desempenhar neste setor. Ademais, o panorama realizado em 2019, pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) do estado de São Paulo, mostra que de 100% da demanda mundial por Hidrogênio puro em Mega toneladas, 96% foi para o setor de produção de amônia para fertilizantes e para o refino do petróleo evidenciando a sua importância e aplicabilidade. Nesse sentido, o estudo das diversas matrizes renováveis para Produção do Hidrogênio, torna-se relevante para consolidá-lo como uma alternativa de grande interesse para a matriz energética renovável brasileira e mundial, bem como para o setor industrial.

No que se refere às rotas de produção de hidrogênio, há uma distinção principal quanto à eficiência de conversão em hidrogênio, a Figura 4, mostra os valores de conversão para os principais processos de produção do gás.

**Figura 4.** Eficiência Típicas de Conversão em processos de produção de Hidrogênio

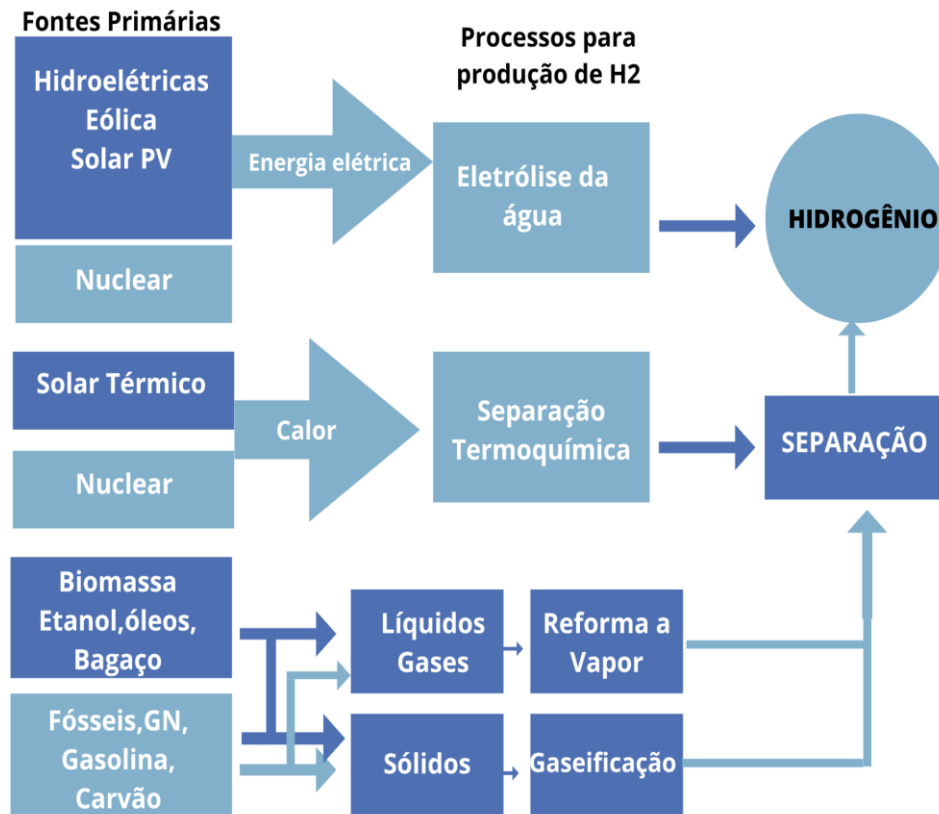
Fonte: BCEBH, 2021.

### 2.2.1 Rotas de produção do hidrogênio

Estima-se que cerca de 96% do hidrogênio produzido em todo o mundo é obtido a partir de combustíveis fósseis convencionais onde 30% advém da reforma de nafta, 48% da reforma a vapor de gás natural e 18% da gaseificação do carvão (AGYEKUM; NUTAKOR; AGWA; KAMEL, 2022).

A Figura 5 apresenta, de modo geral, os processos de obtenção do Hidrogênio de forma simplificada, onde é ilustrada a necessidade de um processo de separação, com exceção da via eletrolítica, antes da obtenção do H<sub>2</sub> propriamente dito.

**Figura 5.** Esquema geral das formas de obtenção do Hidrogênio



Fonte: Adaptado de BCEBH, 2021.

O hidrogênio, tem despertado grande interesse, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água como produto ( $\text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ), além disso, ele apresenta uma elevada densidade energética (da ordem de  $142 \text{ kJ g}^{-1}$ ), sendo aproximadamente três vezes superior quando comparada aos combustíveis à base de hidrocarbonetos pesados (SÁ; CAMMAROTA; LEITÃO, 2014).

#### 2.2.1.1 Reforma a Vapor

Em larga escala, o método por Reforma a vapor de hidrocarbonetos é um dos processos mais utilizados. Neste processo, uma mistura de vapor d'água e hidrocarbonetos, principalmente o gás Natural, reage a altas temperaturas na presença de um catalisador, formando uma mistura de dióxido de carbono e hidrogênio (CRUZ, 2010).

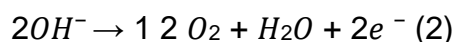
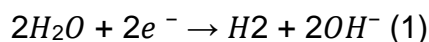
Ademais, tem-se a produção do hidrogênio pela reforma a vapor do metano, no qual ele reage com vapor de água produzindo monóxido de carbono (CO) e hidrogênio, esse processo é endotérmico e requer elevadas temperaturas em torno de 900°C (BARBOSA, 2020).

#### 2.2.1.2 Eletroquímico

A rota eletroquímica possui grande visibilidade dentre os métodos de obtenção do hidrogênio, sendo a água a principal fonte de produção do gás. De modo geral, a produção por esta via consiste na dissociação da água em moléculas de H<sub>2</sub> e Oxigênio (O<sub>2</sub>) por meio da passagem de corrente elétrica na água deionizada. A produção por este método pode ser de três tipos principais, a alcalina, a SOE (Solid Oxide Electrolysers) e a PEM (Proton Exchange Membrane) (BARBOSA, 2020).

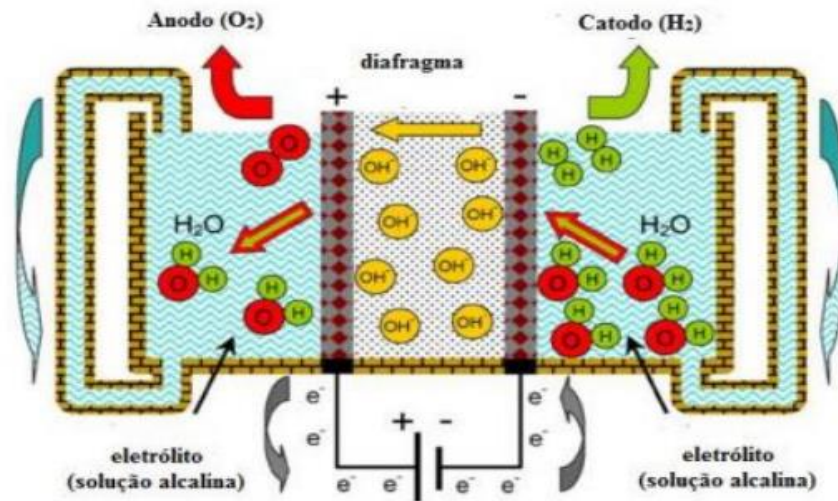
##### 2.2.1.1.2 Método alcalino

A forma alcalina consiste na utilização de uma solução alcalina como eletrólise, onde o hidrogênio é produzido no cátodo, região onde ocorre a redução de acordo com a equação 1, e os ânions de hidroxila (OH<sup>-</sup>) podem circular pelo diafragma sofrendo oxidação no eletrodo anódico gerando o oxigênio, conforme a equação 2.



A Figura 6 mostra o funcionamento da célula da eletrólise alcalina

**Figura 6.** Princípio de operação da eletrólise alcalina



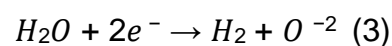
Fonte: Barbosa, 2020.

#### 2.2.1.1.3 Método por membrana polimérica condutora

Neste método utiliza-se uma membrana polimérica condutora de prótons como eletrólito. Essas membranas apresentam espessura entre 20 e 300  $\mu\text{m}$  e possuem um caráter ácido devido à presença do grupo ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) de ácidos sulfônicos. Além disso, devido à natureza fortemente ácida ligada ao eletrólito torna-se necessário utilizar metais do grupo da platina nos eletrodos, sendo esse um dos principais fatores que encarecem a produção (BARBOSA, 2020).

#### 2.2.1.1.4 Método por eletrólise a óxido sólido (SOE)

É um método avançado de produção onde óxidos sólidos são utilizados como eletrólitos e a eletrólise do vapor d'água ocorre a elevadas temperaturas, geralmente entre 600 e 900°C. Neste processo, vapor e hidrogênio recirculado são alimentados no cátodo, ocorrendo a reação que produz hidrogênio conforme a equação 3 (BARBOSA, 2020).



De modo geral, a obtenção de hidrogênio por eletrólise é a mais consolidada. Nesse sentido, estudou-se a produção pelo método eletroquímico utilizando diversos sistemas eletrolíticos, incluindo a eletrólise de membranas de troca aniônica (AEMs),

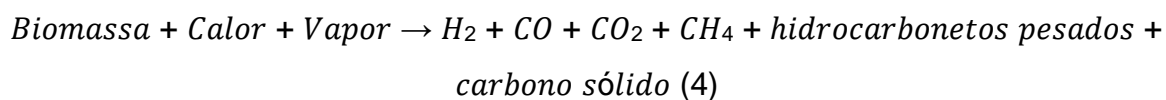
eletrólise de água alcalina (AWE), eletrólise de água de óxido sólido (SOE) e eletrólise de membranas de troca de prótons (PEMs) obtendo um equilíbrio no regime de funcionamento térmico e uma eficiência energética total com mais de 87% para a planta de hidrogênio modelada (AGYEKUM et al., 2022).

Ainda no que tange a produção via Eletrólise, estudou-se a produção do gás por meio de água alcalina para investigar o efeito de espaçamento dos eletrodos para a produção de hidrogênio, obteve-se que menores distâncias de espaçamento para eletrodos aumenta a interação entre o imerso eletrodo e o iônico eletrólito, o que aumenta a taxa de eletroquímica da reação, eficiência e produção de hidrogênio (OKONKWO et al., 2022).

Dado o exposto, apesar de ser o método mais utilizado para a obtenção do hidrogênio, a produção pela via eletroquímica é um tanto onerosa pois além do alto gasto energético atrelado tem-se o alto custo devido a estrutura das membranas.

### 2.2.1.3 Gaseificação

Este método ocorre em temperaturas acima de 970° K numa atmosfera oxidante seja pela presença de vapor de água ou oxigênio puro, o que leva a produção de hidrogênio e outros gases. Diversas matérias primas orgânicas podem ser gaseificadas, dentre as quais resíduos agrícolas e madeira. A equação 4 mostra o sistema de gaseificação, usando como matéria prima a biomassa (BARBOSA, 2020).



O método por gaseificação do carvão, por exemplo, consiste na pirólise dele sólido com certa quantidade de oxigênio, ar, vapor e dióxido de carbono numa temperatura em torno de 700°C. Pode-se utilizar diversos tipos de gaseificadores como o de leito móvel e fluidizado (MISHRA, A.; GAUTAN, S.; SHARMA, T., 2018).

Dado o exposto, apesar das tecnologias convencionais para a produção de hidrogênio supracitadas possuírem um maior destaque e utilização em detrimento das rotas biológicas, elas estão fortemente ligadas às poluições ambientais experimentadas em todo o mundo devido sua contribuição significativa na liberação

de GEE, possuem fontes não renováveis de energia bem como requerer um alto gasto energético.

É notório o grande interesse despertado pelo hidrogênio como combustível, visto que mais de 30 países publicaram roteiros para projetos de energia do hidrogênio com planos de investimentos audaciosos em 2021. Além de serem anunciadas ações de diversos governos relativas ao investimento de mais de 70 bilhões de dólares com verba pública (MIRANDA, 2021).

Dessa forma, haja vista a potencialidade do hidrogênio como combustível, torna-se imprescindível o estudo de sua produção por vias sustentáveis e menos poluidoras, entrando em evidência, desse modo, a rota biológica.

#### *2.2.1.4 Produção Biológica do Hidrogênio*

A produção de hidrogênio por vias biológicas é uma das metodologias mais promissoras para o futuro e, apesar de plantas industriais ainda não existirem o número de pesquisas tem tido um aumento significativo (SOUZA, 2017).

Há diversos processos para a produção do hidrogênio de forma biológica, dentre os quais a biofotólise direta e indireta da água, foto-fermentação, fermentação anaeróbia ou ainda por meio de sistemas híbridos.

No que tange tais tecnologias para produção biológica do gás, a via por fermentação anaeróbia tem se destacado, devido principalmente à maior produção de  $H_2$  quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato, o que viabiliza não apenas a substituição de uma matriz não renovável por uma matriz renovável, mas também a geração de resíduos menos danosos ao meio ambiente (MATHEWS; WANG, 2009).

No âmbito recente, estudos na literatura mostram um modelo de cofermentação sintrófico para avaliar a evolução da comunidade microbiana e a rota de transferência de carbono do sistema com biomassa lignocelulósica para produção de hidrogênio, obteve níveis máximos de produção de hidrogênio com concentrações médias de 52,3%. Além disso, mostraram que as bactérias anaeróbicas contribuíram na degradação lignocelulósica e nos processos de transferência de carbono (OKONKWO et al., 2022).

#### 2.2.1.4.1 Fermentação Anaeróbica

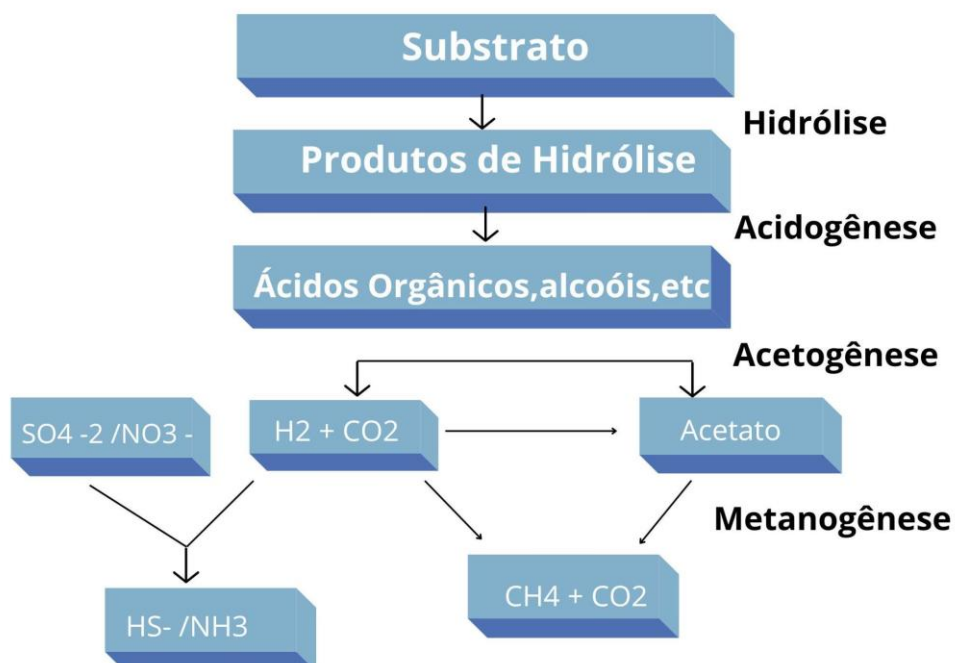
A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia está entre os métodos ambientalmente corretos, visto que em comparação com os demais não é dependente de combustíveis fósseis, como por meio da gaseificação do carvão, nem dependem de eletricidade, como pela via por eletrólise.

Além disso, possui como vantagem a capacidade de utilizar qualquer matéria orgânica rica em carboidratos, a qual é renovável, tendo taxas de produção mais rápidas que outros processos biológicos e baixo custo operacional comparado a outros métodos que requerem alta energia (SOARES, 2019).

De modo geral, a fermentação consiste na conversão de açúcares simples e puros, na presença de micro-organismos na ausência de oxigênio, em hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos. Nesse processo, pode-se utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carboidratos para as bactérias, ou até substratos puros (SOARES, 2019).

De modo geral, a Figura 7, mostra as quatro principais etapas do processo fermentativo anaeróbio, sendo elas a hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

**Figura 7.** Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio.



Fonte: Adaptado de SÁ, 2014.

## 2.3 MICRO-ORGANISMOS

Muitos micro-organismos podem ser empregados nas rotas biológicas de produção de hidrogênio. No entanto, a determinação do inóculo desempenha um papel fundamental na eficiência do processo, uma vez que os produtos finais são influenciados pelo metabolismo bacteriano (SOUZA, 2017).

Ademais, distintas linhagens bacterianas têm sido analisadas para produzir  $H_2$  por diferentes substratos, dentre as vantagens na utilização de culturas puras estão a seletividade do substrato, a fácil manipulação do metabolismo bem como os elevados rendimentos da produção e redução de subprodutos. Todavia, as culturas puras são sensíveis a contaminações o que requer condições assépticas maiores, implicando no aumento do custo total do processo (SÁ, 2011).

Apesar disso, com o crescente interesse pela produção biológica do hidrogênio algumas bactérias do gênero *Enterobacter* passaram a ser estudadas devido ao seu possível potencial de produção, rápida taxa de crescimento e baixo custo de manutenção, sendo as principais a *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*, (KUMAR; DAS, 2000).

Ademais, estudou-se a produção de hidrogênio pelas bactérias do gênero *Enterobacter aerogenes* por meio de ensaios em reatores de 50 ml com duração de 108 horas, obtendo-se um maior volume de hidrogênio usando glicose como substrato em relação ao soro de leite (SOUZA, 2017).

Desse modo, o presente trabalho almejou avaliar a influência do substrato na produção de hidrogênio por meio da utilização de um sistema de cultura pura de *Enterobacter aerogenes*.

## 2.4 REATORES

A maior parte dos estudos relacionados à produção de  $H_2$  por via fermentativa anaeróbia tem sido conduzida em batelada. Os reatores em batelada possuem a vantagem de serem simples, flexíveis e facilmente operados. No entanto, operações em grande escala requerem processos de produção contínuos por razões práticas de armazenamento de resíduos e por questões econômicas (GUO; TRABLY, LATRILLE; ; CARRÈRE ; STEYER, 2010).

No que tange a produção de hidrogênio por fermentação no escuro, os biorreatores usados são mais simples e baratos em comparação os demais métodos, além disso, observou-se várias vantagens em relação aos outros processos biológicos, como a capacidade de controlar e estabilizar os resíduos. No entanto, a baixa capacidade de produção por unidade é ainda um dos principais desafios (DINCER; ACAR, 2015).

Dessa forma, estudou-se a produção de Hidrogênio a partir de glicerol bruto residual de biodiesel que foi co-digerido em esgoto sanitário, por meio de um reator horizontal de leito fixo (RAHLF), com alimentação contínua a fim de determinar a partida do mesmo na produção de  $H_2$ , observou-se, desse modo, que a produção de  $H_2$  ocorreu a partir do 89º dia de operação na fase de partida do reator (ADAMES ADORNO; MAINTINGUER, 2021).

Estudou-se a produção de hidrogênio em escala maior em reator do tipo tanque agitado (STR) de 1,5 L e volume útil de 700 ml, obtendo melhores resultados para a bactéria *E. cloacae* em detrimento da *E. aerogenes*, ao utilizar glicose como substrato (SOUZA, 2017).

Desse modo, é válida uma investigação futura quanto a utilização do reator do tipo tanque agitado (STR) utilizando outros tipos de substratos, volume do reator e gêneros de bactérias para verificação da ampliação da produção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente realizou-se uma pesquisa da literatura relacionada ao tema em artigos provenientes de periódicos, monografias e dissertações na base Scielo, Google Acadêmico e Periódico Capes.

Em seguida, partiu-se para a realização dos experimentos e análises, os quais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial e no Laboratório de Cromatografia Instrumental do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), assim, a metodologia foi dividida nas seguintes etapas principais:

- Coleta do micro-organismo e preparação do Inóculo;
- Esterilização dos reatores e Seringas;
- Preparação do Meio de Cultivo;
- Avaliação do H<sub>2</sub> e Etanol produzidos.

#### 3.1 COLETA DO MICRO ORGANISMO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O Micro-organismo utilizado no presente estudo foi a Bactéria *Enterobacter aerogenes* sob o código UFPEDA 348 anos 08/2022, cedido pelo Laboratório de Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da UFPE. Desse modo, fez-se a preparação do inóculo 10% v/v, no qual foram introduzidos 8 ml de suspensão em cada reator usado no experimento, contendo 72 ml de meio de cultivo.

#### 3.2 ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES E SERINGAS

O reator utilizado no presente estudo consistiu em frascos de Penicilina de 100 ml, que foram devidamente tamponados utilizando algodão Hidrófobo, conforme mostra a Figura 8.

Desse modo, realizou-se o processo de esterilização do meio de cultivo e substrato presentes nos reatores pelo método térmico, utilizando um forno de Pasteur. As amostras foram submetidas a uma temperatura em torno de 170°C por aproximadamente duas horas.

Ademais, a higienização das seringas descartáveis do tipo hospitalar utilizadas na captação do possível gás gerado, foi realizada com solução de Hipoclorito de sódio (NaClO) por cerca de dez minutos. Elas foram mergulhadas na solução, conforme mostra a Figura 9, em seguida, lavadas com água corrente.

**Figura 8.** Processo de tamponamento para esterilização dos reatores utilizados na fermentação



Fonte: Autor, 2022.

**Figura 9.** Processo de desinfecção solução de NaClO das seringas a serem acopladas nos reatores



Fonte: Autor, 2022.

Em seguida, após o processo de esterilização, adicionaram-se 8 ml da suspensão de inóculo nos reatores e as seringas foram devidamente acopladas para a captação do possível gás formado, conforme mostra a Figura 10.

**Figura 10.** Seringas acopladas nos reatores durante o processo fermentativo para captação do gás.



Fonte: Autor, 2022.

### 3.3 SUBSTRATOS E PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRIENTE

Todos os testes biológicos de fermentação anaeróbia realizados no decorrer do presente trabalho, usaram como fonte de carbono Sacarose, Glicose, Glicerina Bruta e Caldo de Cana.

Ademais, a composição da solução de nutriente foi definida baseado em (SÁ, 2011) conforme mostra a Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição do meio de cultivo para os ensaios de produção de H<sub>2</sub>.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/l)</b>	<b>Finalidade</b>
Sacarose	25*	Substrato
Glicose	25*	Substrato
Glicerina	25*	Substrato
Caldo de cana	72 *	Substrato
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,8	Tampão
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2,025	Macronutriente
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,025	
ZnCl <sub>2</sub>	0,005	
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005	
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,005	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,015	Micronutriente
CaCl <sub>2</sub>	0,05	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	
NaCl	0,01	
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05	

Fonte: Adaptado SÁ, 2011.

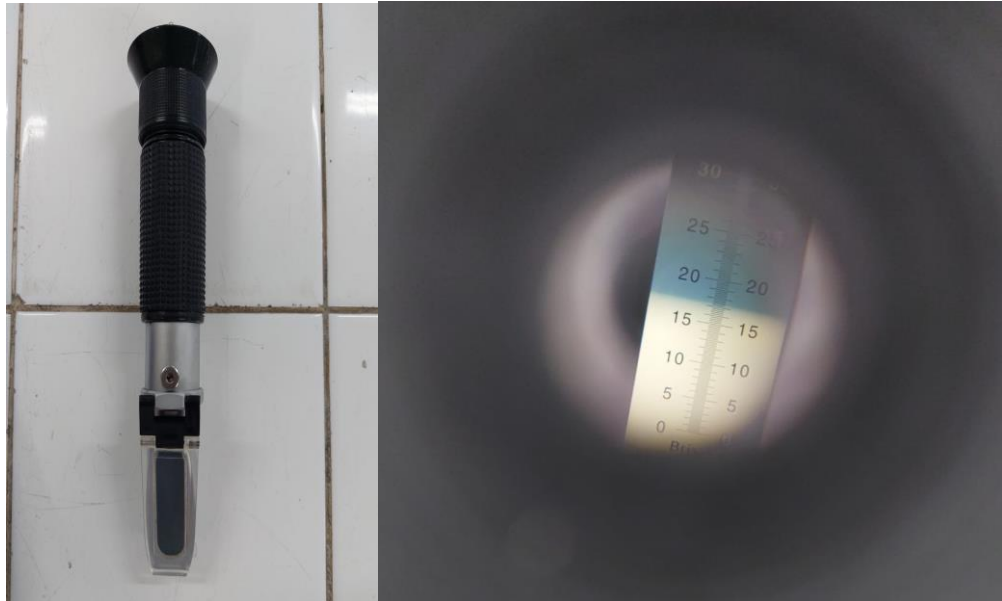
\* Nota: Em cada análise em duplicata utilizou-se um tipo de substrato, para o caldo de cana utilizou-se 72 ml para dissolver os demais componentes sólidos tampão, macro e micronutrientes.

Desse modo, foram adicionados 72 ml da solução nutriente em cada reator. Os testes foram realizados em duplicata.

### 3.4 ANÁLISE DO TEOR DE SACAROSE

Para o substrato caldo de cana fez-se inicialmente a determinação do teor de sacarose por meio do instrumento Sugar Refractometer (ATC) modelo K52-032 da KASVI com um ranger de 1 a 32 % BRIX e resolução de 0,2% BRIX. A Figura 11 mostra o instrumento utilizado nessa determinação e o valor lido em porcentagem para a concentração de sacarose.

**Figura 11.** Análise do teor de sacarose no substrato Caldo de Cana com 17% de sacarose

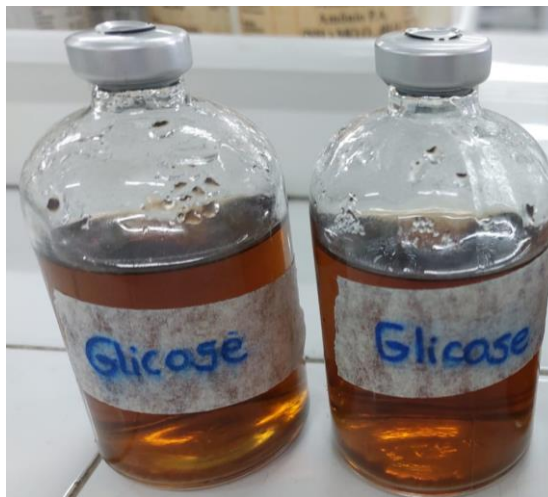


Fonte: Autor, 2022.

### 3.5 SOLUÇÃO NUTRIENTE PARA O SUBSTRATO GLICOSE

Ao analisar os reatores após o processo de esterilização verificou-se que as amostras contendo Glicose, apresentaram uma coloração escurecida evidenciando uma ocorrência da reação de Maillard, conforme mostra a Figura 12.

**Figura 12.** Evidência colorimétrica da reação de Maillard nas amostras com o substrato Glicose



Fonte: Autor, 2022.

A reação de Maillard (RM) é uma reação de escurecimento não enzimático que se inicia com o ataque nucleofílico do grupo D-carbônico de um açúcar redutor. A

ocorrência da reação em alimentos depende de diversos fatores como temperaturas elevadas acima de 40°C, nesse sentido, a elevada temperatura usada no processo de esterilização pode ter tido forte influência na ocorrência da reação comprometendo, desse modo, a disponibilidade do substrato (BASTOS; SHIBAO, 2011).

Portanto, realizou-se um novo preparo do meio de cultivo para o substrato glicose utilizando todos os componentes, exceto os sais bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e molibdato de amônio ( $\text{NH}_4\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), uma vez que se inferiu que eles influenciaram na ocorrência da reação de Maillard.

Dessa forma, adicionou-se os sais de amônio nos reatores após o processo de esterilização com o auxílio de uma seringa estéril.

A Figura 13 mostra a diferença colorimétrica dos reatores com e sem a evidência da RM para o substrato glicose após o processo de esterilização.

**Figura 13.** Amostras de glicose após o processo de esterilização com e sem evidência da RM



Fonte: Autor, 2022.

## 3.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

### 3.6.1 Análise do H<sub>2</sub>

O acompanhamento da produção de gás foi realizado inicialmente por observação visual por meio do deslocamento do êmbolo das seringas nos reatores, a partir do décimo dia do processo fermentativo.

A partir disso, após 21 dias de fermentação a composição do gás produzido foi analisada por cromatografia gasosa em equipamento da Thermo Scientific, modelo 5890 SERIES II da HEWLETT PACKARD, mostrado na Figura 14, com detector de condutividade térmica (TCD) e temperatura do forno em torno de 80°C.

Coletou-se as amostras gasosas diretamente dos reatores, a fim de representar de forma mais fidedigna a composição do gás em cada análise. Além disso, para a interpretação e quantificação dos resultados, assim, realizou-se uma calibração inicial injetando 10 µL (microlitros) de H<sub>2</sub> 100% puro para verificação do tempo de saída do sinal e determinação da concentração percentual das amostras gasosas analisadas. As injeções foram realizadas em duplicata.

**Figura 14.** Cromatógrafo Gasoso utilizado durante as análises cromatográficas do biohidrogênio



Fonte: Autor, 2022.

### 3.6.2 Análise do Etanol

A verificação da produção de etanol se deu por cromatografia gasosa em equipamento CG-MASTER com Detector de Ionização de Chama (DIC) com temperatura de 60°C e um tempo de corrida em torno de 1,9 min, o tratamento dos dados foi realizado no software SRI-Instruments.

A Figura 15 apresenta o equipamento utilizado durante as análises cromatográficas do etanol.

**Figura 15.** Cromatógrafo Gasoso da Master utilizado durante as análises cromatográficas do etanol



Fonte: Autor, 2022.

Ademais, as amostras foram retiradas dos reatores com o auxílio de um filtro para seringa PTFE (Politetrafluoretileno) com poros de 45 micrômetros, além disso, utilizou-se uma solução inicial de etanol de 0,2% para fins comparativos.

Para a realização da análise coletou-se do reator cerca de 2 ml das amostras líquidas, conforme mostra a Figura 16, assim, 2 microlitros foram injetados no cromatógrafo.

**Figura 16.** Amostras líquidas retiradas dos reatores para a análise do etanol por cromatografia



Fonte: Autor, 2022.

### 3.6.3 Análise do Gás Carbônico

A verificação da produção de gás carbônico se deu por cromatografia gasosa em equipamento CG-MASTER com Detector de Ionização de Chama (DIC) mostrado na Figura 14.

De forma análoga as outras análises, injetou-se 10 microlitros de CO<sub>2</sub> puro no cromatógrafo para a quantificação do gás carbônico produzido.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DO HIDROGÊNIO

A área obtida do pico cromatógrafo referente a amostra padrão foi de 3 078 550, correspondente a 100% de concentração. Assim, esse valor foi usado como padrão de comparação para determinar a concentração do biohidrogênio nas amostras analisadas.

Os resultados obtidos a partir das injeções das amostras no cromatógrafo estão apresentados na Tabela 3.

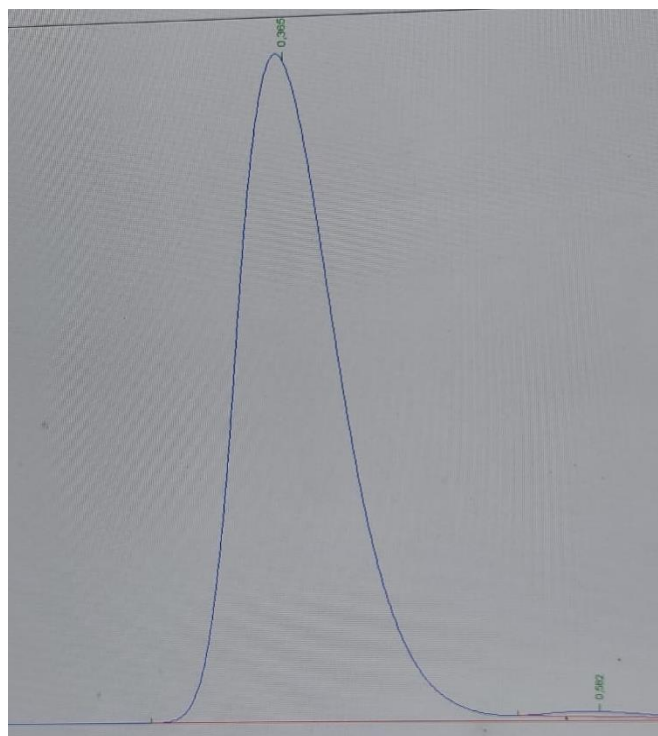
**Tabela 3** – Área dos Picos Cromatográficos das amostras

<b>Substrato</b>	<b>Área na Injeção 1</b>	<b>Área na Injeção 2</b>	<b>Média</b>
Glicose 1	85 3349	65 2578	752 963,5
Glicose Maillard	13 8969	10 6667	122 818
Sacarose 1	1 577 761	1 303 200	1 440 480,5
Sacarose 2	1 671 524	1 338 495	1 505 009,5
Glicerina 1	838448,4	782081,9	810 265,1
Glicerina 2	820922,5	700649,6	760 789
Caldo de cana 1	43 771,0	35518,53	39 644,7

Fonte: Autor, 2022.

O cromatograma de uma das amostras analisadas de Glicerina está ilustrado na Figura 17.

**Figura 17.** Cromatograma obtido pela análise da amostra 1 de Glicerina



Fonte: Autor, 2022.

Com os valores das áreas médias, procedeu-se para determinação da concentração em título, os resultados obtidos estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Concentração média em porcentagem de produzido amostra analisada

<b>Substrato</b>	<b>[H<sub>2</sub>] med (%)</b>
Glicose 1	24,4
Glicose Maillard	3,98
Sacarose 1	46,79
Sacarose 2	48,88
Glicerina 1	26,32
Glicerina 2	24,71
Caldo de cana 1	1,28

Fonte: Autor, 2022.

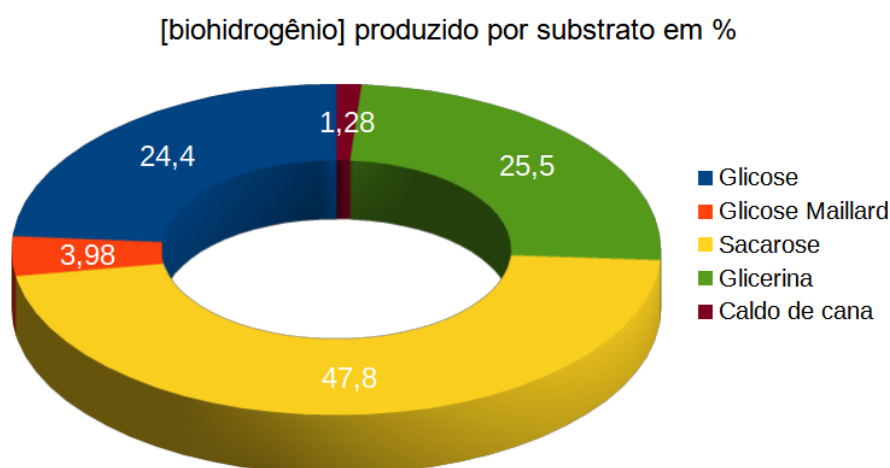
Verificou-se que ocorreu uma maior produção do H<sub>2</sub> nas amostras contendo os substratos Sacarose, glicerina e glicose (sem a ocorrência da reação de Maillard). Ademais, o reator que apresentou a menor produção do gás foi o que continha o

substrato caldo de cana com menos de 2% e a glicose com a ocorrência da reação de Maillard com menos de 4% de concentração do biohidrogênio.

A menor disponibilização do açúcar para o processo fermentativo pela *Enterobacter*, devido a ocorrência da reação de Maillard, pode ter influenciado na baixa produção do hidrogênio pelo substrato glicose (com a ocorrência da reação).

A Figura 18 ilustra graficamente a média da concentração do biohidrogênio produzido em relação a cada substrato utilizado.

**Figura 18.** Concentração Média em porcentagem do Hidrogênio por substrato



Há poucos trabalhos publicados sobre a fermentação anaeróbia utilizando a bactéria *Enterobacter* para a produção de hidrogênio nas condições analisadas, temperatura ambiente e comparação dos quatros substratos utilizados. Todavia, Neves (2009) obteve um aumento da taxa de produção de biohidrogênio com a diminuição da temperatura de operação de 37° para 30°C, utilizando glicerina como substrato.

Desse modo, a condição de realizar o processo fermentativo em temperatura ambiente não só pode ser um fator potencializador da produção, pelo menos para o substrato glicerina, como também é vantajoso no quesito custo energético.

## 4.2 ANÁLISE DO GÁS CARBÔNICO (CO<sub>2</sub>) POR CG

A área do pico da amostra padrão obtida foi de 152 156, correspondente a 100% de concentração. Esse valor foi usado como padrão de comparação para determinar a concentração do gás nas amostras.

As amostras foram analisadas com uma injeção em duplicata e as áreas médias dos picos obtidos estão expressas na Tabela 5.

**Tabela 5** – Área média dos Picos Cromatográficos das amostras analisadas

<b>Substrato</b>	<b>Áreas médias</b>
Glicose	125 051
Glicose M.	129 745
Sacarose	59 852
Glicerina	43 689
Caldo de Cana	99 029

Fonte: Autor, 2022.

Com os valores das áreas médias, procedeu-se para determinação da concentração em título, os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6** – Concentração Média de CO<sub>2</sub> produzido por substrato analisado

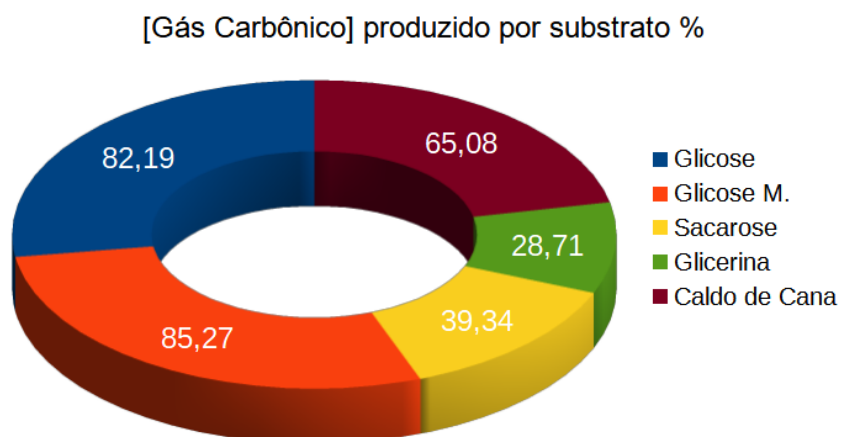
<b>Substrato</b>	<b>[CO<sub>2</sub>]<sub>med</sub> (%)</b>
Glicose	82,2
Glicose Maillard	85,2
Sacarose	39,3
Glicerina	28,7
Caldo de cana	65,1

Fonte: Autor, 2022.

Por meio das áreas dos picos cromatográficos verificou-se que os substratos que o micro-organismo mais fermentou foram glicose, glicose com RM e caldo de cana respectivamente, visto que apresentaram uma maior quantidade de CO<sub>2</sub> produzido.

A Figura 19 ilustra graficamente a média da concentração do gás carbônico produzido em relação a cada substrato utilizado.

**Figura 19.** Concentração Média em porcentagem de gás carbônico por substrato



#### 4.3 ANÁLISE DO ETANOL

A Tabela 7 mostra as áreas correspondentes aos picos cromatográficos das análises do etanol. Uma vez que a solução com cerca de 0,2 % de etanol apresentou um pico com 1 278 de área, no tempo de corrida de 1,8 min, utilizou-se esse valor como base de comparação para verificar a concentração de etanol nas amostras analisadas em porcentagem. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 4.

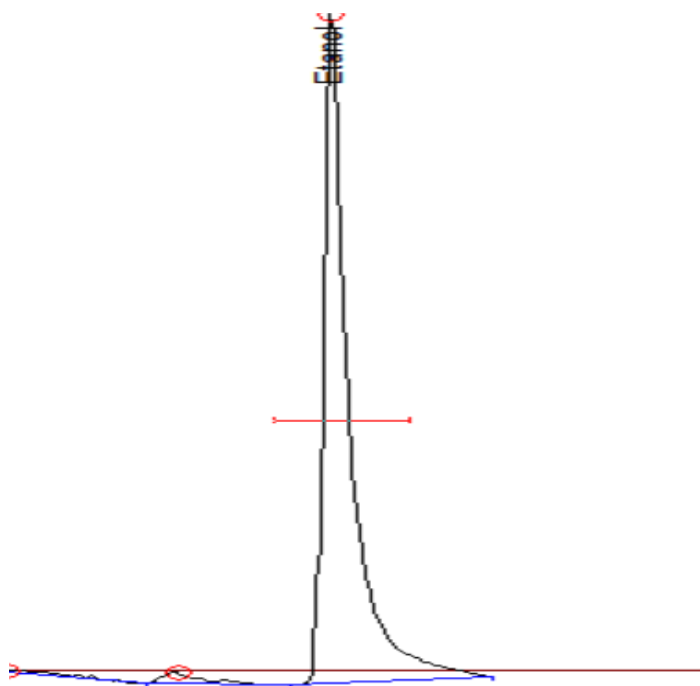
**Tabela 7** – Área dos Picos Cromatográficos referente ao etanol das amostras analisadas

Substrato	Área na Injeção 1	Área na Injeção 2	Média
Glicose 1	1 509,0	1 383,7	1 446,3
Glicose 2	1 507,0	1 425,5	1 466,2
Glicose Maillard	2 927,4	2 803,4	2 865,4
Sacarose 1	2 074,4	1 833,7	1 954,0
Sacarose 2	1 747,5	1 734,5	1 741
Glicerina 1	2 974,7	2 673,6	2 824,1
Glicerina 2	1 107,1	926,04	1 016,5
Caldo de cana 1	309,3	331,7	320,5
Caldo de cana 2	282,6	262,7	272,6

Fonte: Autor, 2022.

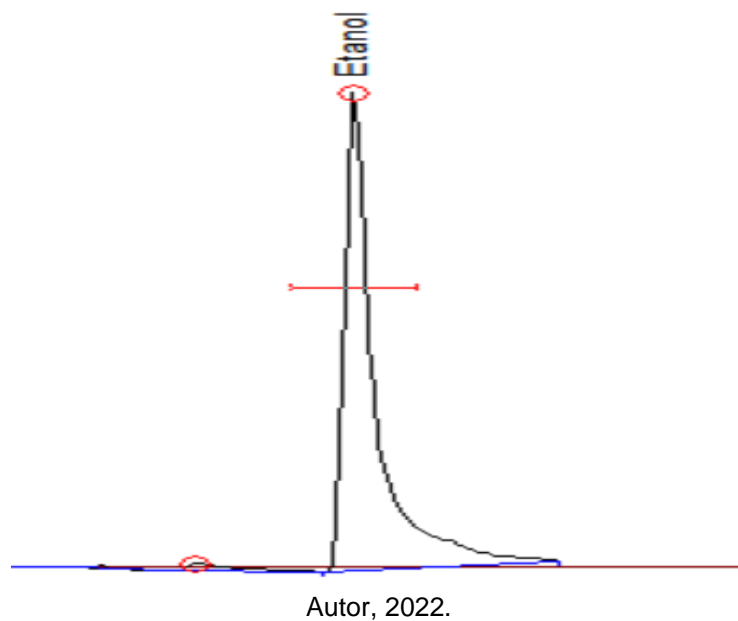
As Figuras 20, 21 e 22 ilustram os cromatogramas obtidos para as amostras de sacarose e glicerina e Glicose (com reação de Maillard) respectivamente, tais substratos apresentaram uma maior produção de etanol.

**Figura 20.** Pico cromatográfico referente a amostra de sacarose

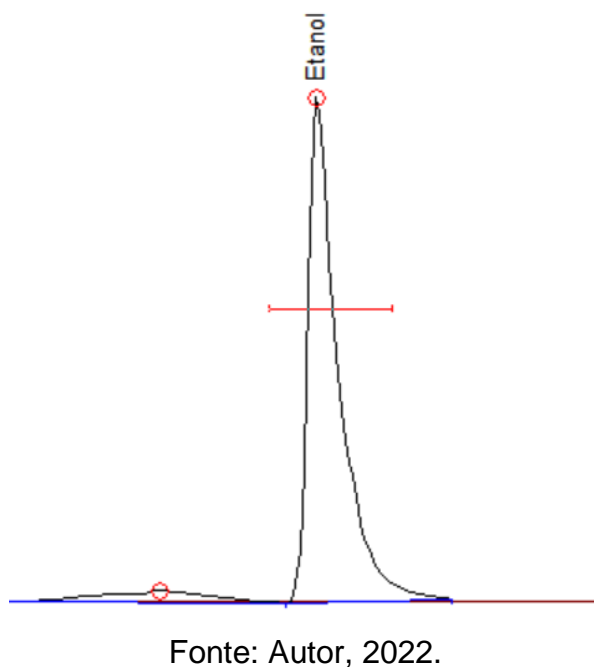


Fonte: Autor, 2022.

**Figura 21.** Pico cromatográfico referente a amostra de Glicerina



**Figura 22.** Pico cromatográfico referente a amostra de Glicose Maillard



Com os valores das áreas médias procedeu-se para determinação da concentração em título, os resultados obtidos estão expressos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Concentração de etanol produzido em porcentagem por amostra analisada

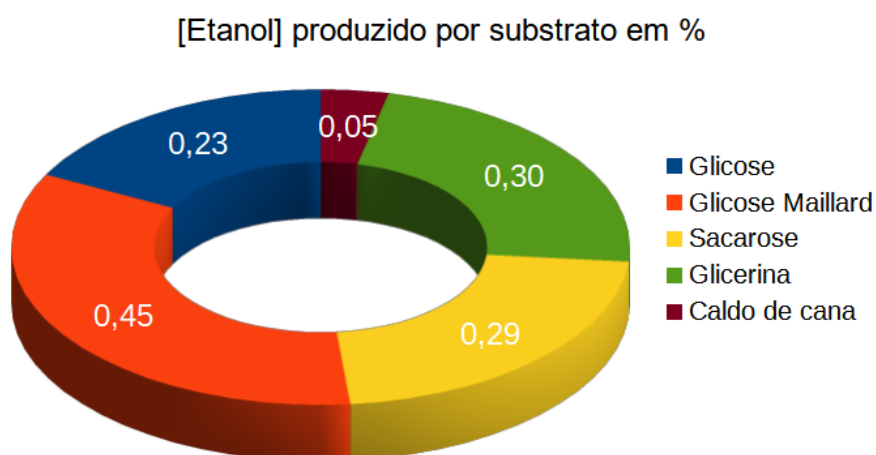
Substrato	[etanol] <sub>med</sub> (%)
Glicose 1	0,226
Glicose 2	0,229
Glicose Maillard	0,448
Sacarose 1	0,306
Sacarose 2	0,272
Glicerina 1	0,442
Glicerina 2	0,159
Caldo de cana 1	0,05
Caldo de cana 2	0,043

Fonte: Autor, 2022.

Verificou-se que houve uma maior produção de etanol nas amostras contendo o substrato glicerina 1, a amostra de glicose (com a ocorrência da reação de Maillard), e a amostra 1 da sacarose. Ademais, o substrato que apresentou a menor produção foi o substrato calda de cana.

A Figura 23 ilustra graficamente as concentrações de etanol obtidas por substratos.

**Figura 23.** Concentração média em porcentagem de Etanol por substrato



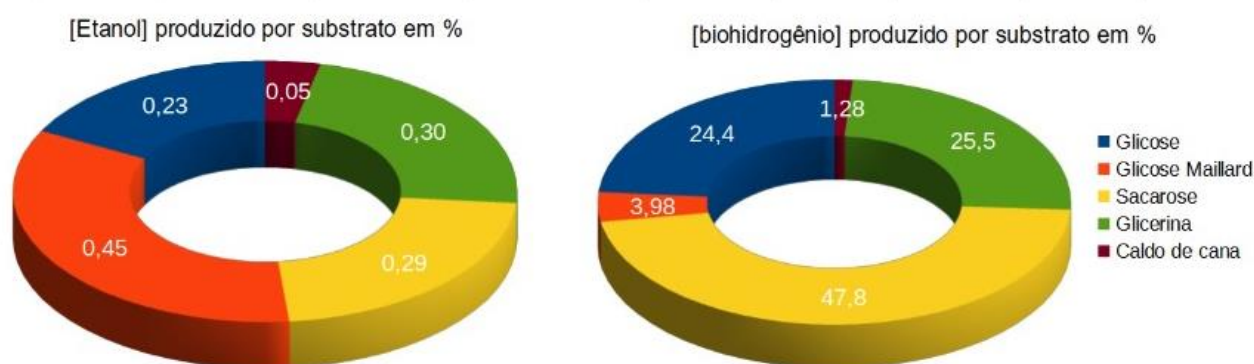
Fonte: Autor, 2022.

Segundo Souza (2018), a glicerina pode ser convertida em vários subprodutos de valor agregado além do hidrogênio como o ácido acético e o etanol. Estudou-se a

produção de diferentes metabólitos durante o processo fermentativo obtendo-se uma maior produção de etanol, com 0,59 mmol etanol/mmol de rendimento para uma concentração de glicerina de 5g/l, vinte vezes menor do que a estudada no presente trabalho.

A Figura 24 mostra em termos comparativos o nível de produção dos dois tipos de gás gerados no processo fermentativo.

**Figura 24.** Comparação da concentração média do etanol e biohidrogênio produzidos por substrato analisado.

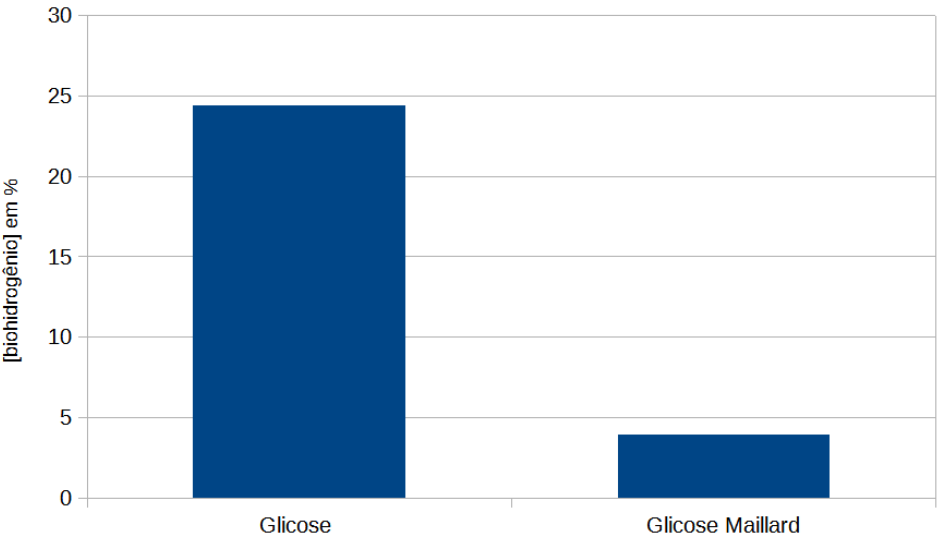


Fonte: Autor, 2022.

Observou-se que tanto a produção do metabólito etanol e do biohidrogênio foi menor para o substrato caldo de cana. Além disso, para o substrato Glucose (com Reação de Maillard) verificou-se que a ocorrência da reação e a alta produção do metabólito etanol pode ter influenciado na menor produção do biohidrogênio. Para os demais substratos não foi verificada uma significativa interferência da produção do metabólito etanol na produção do biohidrogênio.

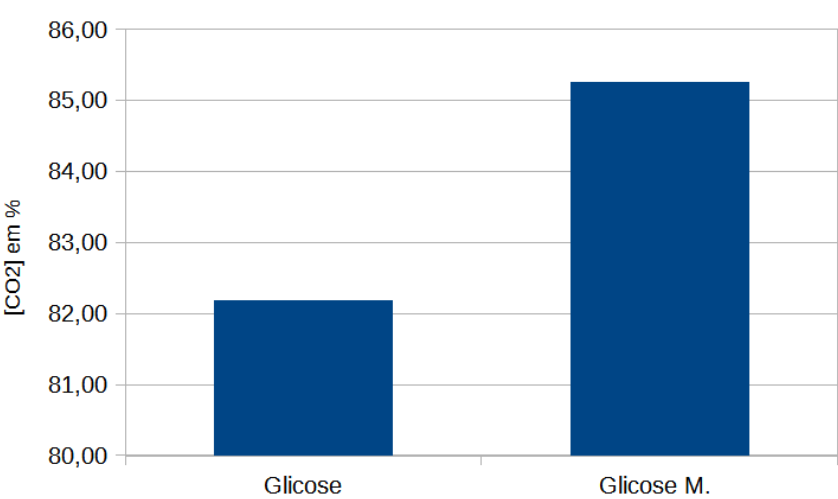
Ademais, as Figuras 25, 26 e 27 mostram a relação gráfica da produção do biohidrogênio, gás carbônico e etanol respectivamente nas amostras de glucose com e sem RM.

**Figura 25.** Relação da produção de biohidrogênio nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard (RM)



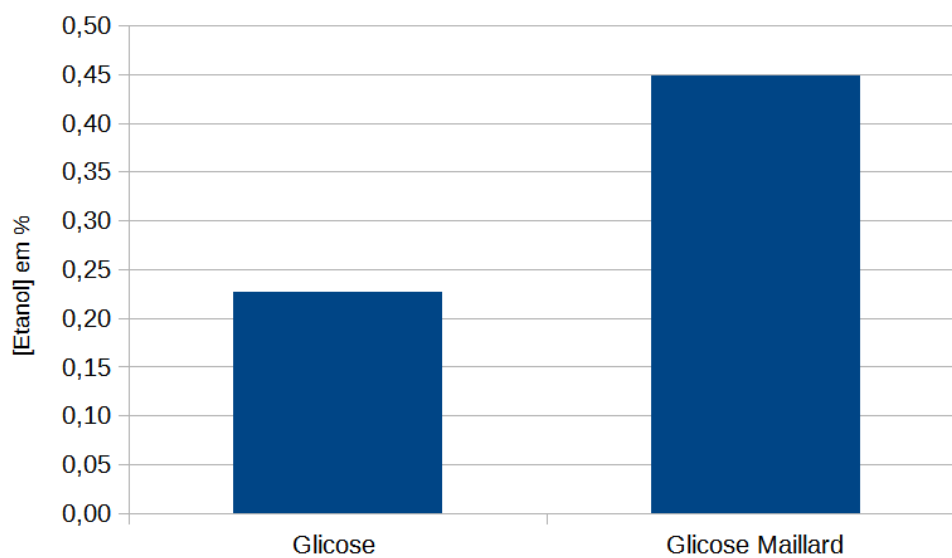
Fonte: Autor, 2022.

**Figura 26.** Relação da produção do gás carbônico nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard (RM)



Fonte: Autor, 2022.

**Figura 27.** Relação da produção de etanol nas amostras contendo o substrato glicose com e sem Reação de Maillard (RM)



Fonte: Autor, 2022.

Portanto, verificou-se que a ocorrência da reação de Maillard para o reator contendo o substrato glicose influenciou na produção do biohidrogênio.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos realizados foram interessantes e forneceram evidência da potencialidade da bactéria fermentativa *Enterobacter aerogenes* em produzir biohidrogênio. O substrato sacarose contribuiu para uma maior produção do gás com mais de 40% (V/V).

Ademais, foi observado que a ocorrência da reação de Maillard não afetou a produção do etanol pela bactéria *Enterobacter aerogenes*, de maneira oposta, a amostra apresentou uma maior produção com uma concentração de 0,45%, praticamente o dobro da amostra sem a ocorrência da reação. Contudo, verificou-se que há influência para uma redução da produção do biohidrogênio.

## **6. TRABALHOS FUTUROS**

- I. Realizar a avaliação cinética microbiana durante o processo fermentativo.
- II. Avaliar a influência da temperatura e concentração dos substratos no processo fermentativo.
- III. Estudar a produção de hidrogênio com o substrato sacarose em condições de diferentes temperaturas.

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMES, L. V., ADORNO, T.A.M.; MAINTINGUER, I. S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. **Matéria** (Rio de Janeiro), vol. 26, May 2022.

ANDRADE, J., GUARIEIRO, L. L. N., MARINHO, F., PESSOA, F., ROCHA, G., SANTOS, A., 'Technological Perspectives and Economic Aspects of Green Hydrogen in the Energetic Transition: Challenges for Chemistry'. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 33, June 2022, pp. 844–69.

AGYEKUM, E. B.; NUTAKOR, C.; AGWA, M. A.; KAMEL, S. A Critical Review of Renewable Hydrogen Production Methods: Factors Affecting Their Scale-Up and Its Role in Future Energy Generation'. **Membranes**, vol. 12, no. 2, Feb. 2022, p. 173.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL 2021: Ano base 2020 / Empresa de Pesquisa Energética. – Rio de Janeiro: EPE, 2021. Brazilian Energy Balance 2021 Year 2020 / **Empresa de Pesquisa Energética** – Rio de Janeiro: EPE, 2021.

BASES PARA A CONSOLIDAÇÃO DA ESTRATÉGIA BRASILEIRA DO HIDRIGÊNIO (BCEBH). **Nota Técnica**, No EPE-DEA-NT-003/2021 rev01, 14 de junho de 2021.

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

BASTOS, M.H.D.; SHIBAO, J. **Produtos da reação de Maillard em alimentos: Implicações para a saúde**. **Revista Nutrição**. Dez, 2021.

COMPLEXOS ENERGÉTICOS: UMA ANÁLISE DA NOVA COMPOSIÇÃO DAS MATRIZES DE ENERGIA DO BRASIL E DO MUNDO | **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. Feb. 2022.

CRUZ, D. E.F. **Produção de Hidrogênio em Refinarias de Petróleo: Avaliação exergética e Custo de Operação**. Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010.

DINCER, I.; ACAR, C. **Review and Evaluation of Hydrogen Production Methods for Better Sustainability**. International Journal of Hydrogen Energy, Vol.6 N.3, ago 16, 2016.

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

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

Dez, 2021.

FERREIRA, F.L.; SANTANA, R.J.; RAPINI, M. S.; MOURA, R.F. Financiamento à Pesquisa em energia renovável no Brasil: uma análise a partir do Fundo Setorial de Energia. **Nova Economia**, Maio-Agosto, 2022. V.32 n.02 p.505-537, 2022.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10660-10673, 2010; A Review. 2010.

HALLENBECK, P. C.; DIPANKAR G. 'Advances in Fermentative Biohydrogen Production: The Way Forward?' **Trends in Biotechnology**, vol. 27, nº. 5, May 2009, pp. 287–97.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Impactos das Adversidades Climáticas sobre o Comércio Exterior Brasileiro de Produtos Seleccionados**, V.16, n. 9, Set, 2021.

KUMAR, N.; DAS, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochemistry**, V. 35, p.589-593, Jan 2000.

LEITE, R. C. C. R.; LEAL, V. R. M. 'O biocombustível no Brasil'. Novos estudos CEBRAP, July 2007, pp. 15–21.

MANISH, S.; RANGAN B.. 'Comparison of Biohydrogen Production Processes'. **International Journal of Hydrogen Energy**, vol. 33, no. 1, Jan. 2008, pp. 279–86.

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

RESOLUÇÃO INSTITUI O PROGRAMA NACIONAL DO HIDROGÊNIO. **Ministério de Minas e Energia**, 04 de ago. de 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/resolucao-institui-o-programa-nacional-do-hidrogenio>>. Acesso em: 20 de set. de 2022.

MIRANDA, D. E. V. P. **Energia do Hidrogênio e a Área de Materiais no Brasil**. Rio de Janeiro, COPPE, **Revista Matéria**, V.26, N.01. janeiro, 2021.

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

NEVES, D. V. M. L. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. Dissertação de Mestrado. Lisboa, Portugal: FCT/UNL, 2009.

OKONKWO, C. P.; BHOWMIK, H.; MANSIR, B. I.; MARHOON, A. S. A. A. M.; S.

FARINI, A.A.F.N. '**Effect of Electrode Spacing on Hydrogen Production Using a Home-Made Alkaline Electrolyzer**'. *Materials Letters*, vol. 306, jan. 2022, p. 130841.

OBRIEM, E. **ENERGIA HOJE: Hidrogênio pode cobrir 12% da Demanda Global Energética**. Editora Brasil Energia, Jul, 2022. Disponível em: <<https://energiahoje.editorabrasilenergia.com.br/hidrogenio-pode-cobrir-12-da-demanda-globalenergetica.htm> > Acesso em: set. 2022.

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

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

SÁ, V. R. L.; CAMMAROTA, C. M.; LEITÃO, F. S. V. '**Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros**'. *Química Nova*, vol. 37, Junho 2014, pp. 857–67.

SÁ, D. V. R. L. **Produção Biológica de Hidrogênio Por Bactérias Fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou Glicerina como Substrato**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ, Mai 2011.

SOARES, F. J. **Produção de Hidrogênio a partir da Fermentação Anaeróbia de Hidrolisados de Resíduos Agroindustriais**. Tese de Doutorado, Santa Maria, RS:UFSM, 2019.

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

SOUZA, T. I. **Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia: Enriquecimento nutricional e influência da luminosidade**. Dissertação de

Mestrado, Uberlândia, Minas Gerais: UFU, 2017.