



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

KALYNE ALVES COSTA TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA: análise da influência da
concentração de diferentes substratos**

Recife

2023

KALYNE ALVES COSTA TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA: análise da influência da
concentração de diferentes substratos**

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 Perez Fernandez

Recife

2023

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

Teixeira, Kalyne Alves Costa .

Produção de hidrogênio por via biológica: análise da influência da concentração de diferentes substratos / Kalyne Alves Costa Teixeira. - Recife, 2023.

70 : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Perez Fernandez

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2023.

1. Biocombustíveis. 2. Biohidrogênio. 3. Demanda energética. 4. Energia limpa. 5. Hidrogênio. I. Fernandez, Maria de Los Angeles Perez. (Orientação).
II. Título.

660 CDD (22.ed.)

KALYNE ALVES COSTA TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR VIA BIOLÓGICA: análise da influência da
concentração de diferentes substratos**

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: 21/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jorge Vinícius Fernandes Lima Cavalcanti (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Gisely Alves da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Joaquim Costa Teixeira e Chisleide Costa Alves Teixeira, cujo amor incondicional, apoio e sacrifícios inestimáveis tornaram possível a minha jornada acadêmica. Cada conquista minha é um reflexo direto da confiança que depositaram em mim.

Ao meu querido tio Manoel da Costa (*in memoriam*), guardarei no meu coração as suas lembranças, especialmente do dia que juntos realizamos a matrícula nesta universidade.

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo incentivo e compreensão nos momentos de desafio. Seus ânimos foram a luz que me impulsionou nos momentos mais difíceis.

Aos meus professores, cujas contribuições foram fundamentais para o meu desenvolvimento. À Universidade Federal de Pernambuco, que me proporcionou um ambiente propício para a aprendizagem e crescimento. Levo comigo não apenas o conhecimento adquirido, mas também os valores que essa instituição me ensinou.

Por fim, dedico este trabalho a todos aqueles que buscam o conhecimento e acreditam no poder da educação como meio de transformação. Que este trabalho possa contribuir, de alguma forma, para o avanço do saber em nossa sociedade.

AGRADECIMENTOS

Minhas conquistas são reflexo do amor e dedicação dos meus pais, que sempre estão presentes na minha vida. As palavras de encorajamento da minha mãe me fortalecem nos momentos de incerteza, a sabedoria e o exemplo do meu pai moldaram minha visão de mundo e me ensinaram a perseverança, suas conquistas são minhas fontes de inspiração. Aos meus pais, agradeço por tudo de todo coração.

Agradeço especialmente as minhas madrinhas Diana, Adelma, Danielle e Isabele, também as minhas tias e tios, aos meus amigos João Antônio, Mikaelly, Thiago, Lúcia, Irece e Manoela pela parceria de sempre, a Hélia, Cleidinha e Denise por todo apoio no início dessa jornada. Agradeço também a Angélica e Guilherme por toda ajuda na condução do trabalho.

À minha família e amigos, que me apoiaram com palavras de incentivo, compreensão e amor ao longo desta jornada. Vocês foram a força motriz por trás dos meus esforços e realizações. Gostaria de expressar minha sincera gratidão também à minha terapeuta Eliane, cujo apoio e conselhos foram fundamentais ao longo da realização deste trabalho.

À estimada orientadora Profa. Dra. Maria de Los Angeles, minha profunda gratidão pela orientação perspicaz, paciência incansável e valiosas sugestões. Suas orientações delinearão não apenas este trabalho, mas também minha abordagem à pesquisa e ao conhecimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Vinicius pelos preciosos ensinamentos compartilhados e por disponibilizar generosamente seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de estender meus agradecimentos a Gisely Alves da Silva e Maria da Conceição Gomes da Silva Andrade do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia Ambiental, cujo apoio durante a execução das atividades foi fundamental.

Àqueles que coordenam o Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia Ambiental e o Laboratório de Cromatografia Instrumental no Departamento de Engenharia Química da UFPE, expressei minha gratidão por cederem o espaço meus experimentos de pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Departamento de Engenharia Química (DEQ), e a todos os professores desta instituição que contribuíram de maneira significativa para meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este projeto, cada interação, conversa e apoio desempenharam um papel fundamental.

*“Que seus vínculos pelo mundo te permitam explorar a
forma mais linda de ser você”*

Autor desconhecido

RESUMO

A produção de biocombustíveis desempenha um papel significativo diante da crescente demanda energética global, devido aos seus benefícios ambientais, econômicos e de segurança energética. A geração de energia limpa é um investimento estratégico objetivando uma economia de baixo carbono, visando cumprir metas ambientais, como as do Acordo de Paris, que buscam mitigar os efeitos das atividades humanas no clima. Esses combustíveis derivados de fontes renováveis têm a capacidade de substituir parcial ou totalmente os combustíveis fósseis, trazendo impactos positivos para a sociedade e o meio ambiente. No contexto energético, o hidrogênio é uma fonte de energia versátil e ambientalmente amigável, uma vez que a sua queima não produz emissões de dióxido de carbono (CO₂) ou poluentes atmosféricos. Existem várias formas de produzir hidrogênio, com diferentes métodos e tecnologias que variam em eficiência, custo e impacto ambiental. Processos biológicos podem contribuir com a mudança para o desenvolvimento de rotas alternativas para a produção de hidrogênio, fazendo uso de processos naturais, como a fermentação, que se destaca por sua independência com relação aos combustíveis fósseis, também pode-se evidenciar o uso de substratos residuais. Com o intuito de abordar essa temática de maneira mais aprofundada, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de hidrogênio por meio da bactéria *Enterobacter aerogenes* via fermentação a partir de diferentes substratos e variações de concentração. Especificamente, foi observado que o substrato sacarose, quando utilizado na concentração inicial de 100g/L, apresentou uma maior eficiência na produção do hidrogênio, sendo produzido aproximadamente 14% v/v e detectou-se a produção de etanol utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O substrato de cana de açúcar, por sua vez, apresentou a produção máxima de hidrogênio de 5% v/v, levando em consideração que a concentração inicial de sacarose no caldo de cana era de 200g/L, é possível que tenha ocorrido uma inibição pelo excesso de substrato. Por fim, o substrato de glicerina não se mostrou muito eficiente na produção de hidrogênio, detectando-se apenas 0,5% v/v. Portanto, o presente estudo permitiu a avaliação da capacidade fermentativa da bactéria *Enterobacter aerogenes* e mostrou que a produção de hidrogênio por via biológica é uma alternativa promissora na geração de energia.

Palavras-chave: Biocombustíveis; Biohidrogênio; Demanda energética; Energia limpa; Hidrogênio.

ABSTRACT

The production of biofuels plays a significant role in the face of the growing global energy demand, due to its environmental, economic, and energy security benefits. Clean energy generation is a strategic investment aimed at a low-carbon economy, with the goal of meeting environmental targets such as those outlined in the Paris Agreement, which seek to mitigate the effects of human activities on the climate. These fuels derived from renewable sources have the capacity to partially or completely replace fossil fuels, bringing positive impacts to society and the environment. In the energy context, hydrogen is a versatile and environmentally friendly energy source, as its combustion does not produce carbon dioxide (CO₂) emissions or atmospheric pollutants. There are various ways to produce hydrogen, with different methods and technologies varying in efficiency, cost, and environmental impact. Biological processes can contribute to the shift towards alternative routes for hydrogen production, utilizing natural processes such as fermentation, which stands out for its independence from fossil fuels, and residual substrates can also be utilized. In order to delve deeper into this topic, the present study aimed to evaluate hydrogen production through *Enterobacter aerogenes* bacteria via fermentation using different substrates and concentration variations. Specifically, it was observed that sucrose, when used at an initial concentration of 100g/L, showed higher efficiency in hydrogen production, with approximately 14% v/v produced, and the production of ethanol was detected using high-performance liquid chromatography (HPLC). Sugarcane substrate, on the other hand, showed a maximum hydrogen production of 5% v/v, considering that the initial concentration of sucrose in the sugarcane juice was 200g/L; it is possible that inhibition occurred due to excess substrate. Finally, glycerin substrate did not prove to be very efficient in hydrogen production, with only 0.5% v/v detected. Therefore, the present study allowed for the evaluation of the fermentative capacity of *Enterobacter aerogenes* bacteria and demonstrated that biological hydrogen production is a promising alternative in energy generation.

Keywords: Biofuels; Biohydrogen; Clean energy; Energy demand; Hydrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Matriz energética mundial em 2020.....	18
Figura 2:	Matriz energética brasileira.....	19
Figura 3:	Emissões globais de CO ₂ da combustão de energia e processos industriais 1900-2022.....	20
Figura 4:	Projeção da demanda de hidrogênio no cenário de 2020-2050.....	23
Figura 5:	Possíveis rotas para a produção e utilização de hidrogênio como vetor energético.....	26
Figura 6:	Possíveis rotas metabólicas da fermentação de carboidratos.....	33
Figura 7:	Reatores tamponados para esterilização em forno de Pasteur.....	40
Figura 8:	Reatores com 80% do volume útil ocupado com meio e inóculo.....	42
Figura 9:	Reatores com o êmbolo da seringa deslocado, indicando aumento do volume de gás.....	44
Figura 10:	Relação entre a produção de hidrogênio e concentração inicial de sacarose para as amostras mais promissoras.....	49
Figura 11:	Relação entre a produção de hidrogênio e concentração inicial de sacarose para as amostras menos promissoras.....	50
Figura 12:	Cromatograma gasoso da amostra 3 de sacarose 100g/L.....	50
Figura 13:	Relação entre a produção de hidrogênio e o tratamento do caldo de cana.....	52
Figura 14:	Cromatograma gasoso da amostra de caldo de cana com tratamento.....	53
Figura 15:	Cromatograma gasoso da amostra de caldo de cana sem tratamento.....	53
Figura 16:	Relação entre a produção de hidrogênio e concentração inicial de glicerina.....	56
Figura 17:	Cromatograma gasoso da amostra 2 de glicerina 100g/L.....	56
Figura 18:	Curva analítica da sacarose.....	57
Figura 19:	Curva analítica da glicose.....	57
Figura 20:	Curva analítica da frutose.....	58
Figura 21:	Curva analítica do etanol.....	58
Figura 22:	Curva analítica da glicerina.....	58
Figura 23:	Cromatograma líquido da amostra 3 de sacarose 100g/L.....	60
Figura 24:	Cromatograma líquido da amostra de caldo de cana com tratamento.....	61
Figura 25:	Cromatograma líquido da amostra de glicerina 75g/L.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	22
Tabela 2: Composição das soluções nutrientes utilizadas.....	41
Tabela 3: Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com a sacarose.....	48
Tabela 4: Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com o caldo de cana sem e com tratamento.....	52
Tabela 5: Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com o substrato glicerina.....	55
Tabela 6: Concentração inicial e final de sacarose e concentração de etanol na análise de CLAE para o substrato sacarose.....	59
Tabela 7: Concentração final dos açúcares na análise de CLAE para o substrato caldo de cana.....	61
Tabela 8: Concentração final da glicerina, usada como substrato, na análise de CLAE.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

acetil-CoA	Acetil coenzima A
BNB	Banco do Nordeste do Brasil
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sacarose
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
CCUS	Carbon Capture, Utilization, and Storage - Captura, utilização e armazenamento de carbono
CH_4	Metano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
COP21	21ª Conferência das Partes
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
ETENE	Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste
FCEVs	Veículos Elétricos a Célula de Combustível
Fd_{ox}	Oxidação da ferredoxina
Fd_{red}	Ferredoxina redutase
FHL	Liase de Hidrogênioformiato
GEE	Gases de Efeito Estufa
H^+	Íon hidrônio
H_2	Gás Hidrogênio
H_2O	Água
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
IEA	Agência Internacional de Energia
IR	Índice de Refração
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kt	Quilotoneladas
Mt	Milhões de toneladas
N_2	Gás Nitrogênio
NAD^+	Dinucleotídio de nicotinamida-adenina
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

O ₂	Oxigênio molecular
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OH ⁻	Íon hidroxila
ONU	Organização das Nações Unidas
PFL	Piruvato Liase
PFOR	Piruvato Ferredoxina Oxido-Redutase
TCD	Detector de Condutividade Térmica
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.1.1 Objetivos específicos.....	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 HIDROGÊNIO	21
2.1.1 Demanda de hidrogênio.....	22
2.1.2 Utilização do hidrogênio	24
2.1.3 Obtenção de hidrogênio.....	26
2.1.3.1 Reforma a vapor	27
2.1.3.2 Gaseificação.....	27
2.1.3.3 Eletrólise.....	28
2.1.3.4 Produção biológica do hidrogênio – biofotólise.....	29
2.1.3.5 Produção biológica do hidrogênio – fermentação	31
2.1.4 Classificação das fontes de hidrogênio.....	35
2.2 MICRO-ORGANISMOS	36
2.3 SUBSTRATOS.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES	40
3.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS	41
3.2.1 Análise do pH.....	41
3.2.2 Análise do teor de sacarose do caldo de cana.....	41
3.3 REPLIQUE DO MICRO-ORGANISMO	43
3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DO MEIO	43
3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	44
3.5.1 Produção de hidrogênio e gás carbônico	44
3.5.2 Degradação dos substratos e verificação da produção de etanol.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E GÁS CARBÔNICO.....	47
4.1.1 Substrato sacarose: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico.....	47
4.1.2 Substrato caldo de cana: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico	51
4.1.3 Substrato glicerina: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico	54
4.2 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO E VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	57
4.2.1 Substrato sacarose: análise da degradação e verificação da produção de etanol.....	59
4.2.2 Substrato caldo de cana: análise da degradação e verificação da produção de etanol ...	60

4.2.3 Substrato glicerina: análise da degradação e verificação da produção de etanol	62
5. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética intensifica as discussões acerca do estabelecimento de uma matriz energética limpa e renovável, visando o suprimento energético global de forma a garantir as metas climáticas e o desenvolvimento econômico sustentável. De acordo com Farias e Sellito (2011), a energia é de fundamental importância para a sobrevivência humana, posto isso, ao longo dos anos, novas fontes e formas alternativas de uso dos recursos energéticos tem sido estudadas a fim de suprir as necessidades e assegurar a sustentabilidade.

Em 2015, a Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), entre eles estão propostos a garantia de energia acessível e limpa, de forma confiável, sustentável e renovável para todos, bem como ações para combater a mudança global do clima e seus impactos.

O acordo de Paris (2015), tratado global adotado pelos países signatários da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, durante a 21ª Conferência das Partes (COP21), tem como objetivo principal estabelecer medidas para reduzir as emissões de dióxido de carbono a partir de 2020. Seu propósito é fortalecer a resposta à ameaça da mudança climática e reforçar a capacidade dos países para lidar com os impactos gerados por essa transformação.

Nesse contexto, o Brasil assumiu compromissos significativos para conter a emissão de gases de efeito estufa. Até 2025, o país se comprometeu a reduzir suas emissões em até 30%, e até 2030, pretende alcançar uma redução de até 43%. Além disso, o Brasil está empenhado em promover o aumento do uso de fontes alternativas de energia, diminuir o desmatamento e, ainda, restaurar e reflorestar uma área de até 12 milhões de hectares em todo o seu território (Nunes; Coelho, 2023).

Esses esforços são cruciais para combater as mudanças climáticas, proteger o meio ambiente e garantir um futuro sustentável para as gerações presentes e futuras. O Brasil, ao cumprir suas metas, contribui significativamente para o objetivo maior do Acordo de Paris, que é mitigar os efeitos prejudiciais das atividades humanas sobre o clima global.

Segundo a Agência Internacional de Energia – IEA (2022), atualmente as fontes mais utilizadas no mundo para a produção de energia são os combustíveis fósseis, como o petróleo, o carvão mineral e o gás natural. Tais fontes de energia são ditas não renováveis, dado que provêm de recursos naturais finitos e esgotáveis. Além disso, de acordo com a Empresa de Pesquisa Energética – EPE (2023a), essas fontes são as responsáveis pelas maiores emissões de dióxido de carbono e de outros gases de efeito estufa (GEE).

Neste sentido, destaca-se a importância da produção de biocombustíveis como um investimento estratégico visando uma economia de baixo carbono para múltiplos setores, como, por exemplo, o setor industrial, podendo destacar sua utilização como fonte de energia em processos, contribuindo para a redução da dependência de combustíveis fósseis.

Biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de material orgânico renovável, tem o potencial de reduzir alguns aspectos indesejáveis da produção e uso de combustíveis fósseis, como esgotamento de recursos naturais, emissões de poluentes convencionais e de gases de efeito estufa (USEPA, 2018). Ademais, de acordo com Nanda *et al.* (2015), a biomassa de resíduos orgânicos é a única fonte que pode fornecer biocombustíveis com alto teor de energia para substituir potencialmente os combustíveis fósseis.

Destarte, entre as fontes de energias renováveis, cabe destacar o hidrogênio, que é um versátil transportador de energia, podendo ser utilizado diretamente como fonte de energia de baixo carbono em setores de difícil descarbonização ou como vetor para armazenamento de energia, sendo, portanto, uma peça fundamental para transições energéticas.

As tecnologias convencionais de produção de hidrogênio utilizam, em geral, combustíveis fósseis como matéria prima primária, incluem 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 (Guariero *et al.*, 2022).

Conforme Kim *et al.* (2021), os processos biológicos podem contribuir com a mudança para o desenvolvimento de rotas alternativas para a produção de hidrogênio, fazendo uso de processos naturais, como a fermentação, o hidrogênio pode ser capturado e transformado a partir de água, biomassa lignocelulósica, biomassa microbiana, resíduos orgânicos, entre outros substratos renováveis e de baixo custo.

Embora essas rotas alternativas sejam promissoras, elas ainda enfrentam desafios tecnológicos e econômicos significativos para torná-las competitivas em grande escala. A pesquisa e o desenvolvimento contínuos são necessários para aprimorar a eficiência e a viabilidade desses processos biológicos para a produção de hidrogênio. Cabe destacar que a vantagem dessas abordagens é que elas podem usar matérias-primas renováveis e biodegradáveis, como resíduos agrícolas, biomassa, resíduos orgânicos e água, o que pode ajudar a reduzir a dependência de combustíveis fósseis e mitigar a emissão de gases de efeito estufa.

Portanto, vale salientar a importância do estudo acerca da produção de hidrogênio por via biológica, em especial utilizando o método de fermentação anaeróbia, dado a independência com relação aos combustíveis fósseis, também pode-se evidenciar o uso de substratos residuais. Ademais, é de grande relevância acadêmica e industrial o desenvolvimento de técnicas eficientes para melhorar significativamente a bioconversão e os rendimentos de biohidrogênio.

1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia em reator do tipo batelada, utilizando *Enterobacter aerogenes*, em diferentes substratos e condições.

1.1.1. Objetivos específicos

- Produzir hidrogênio utilizando como substrato diferentes fontes de carbono sob diferentes concentrações.
- Analisar a produção do biohidrogênio por meio de cromatografia gasosa.
- Analisar a produção de gás carbônico por cromatografia gasosa.
- Analisar a degradação dos substratos por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Verificar se há produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

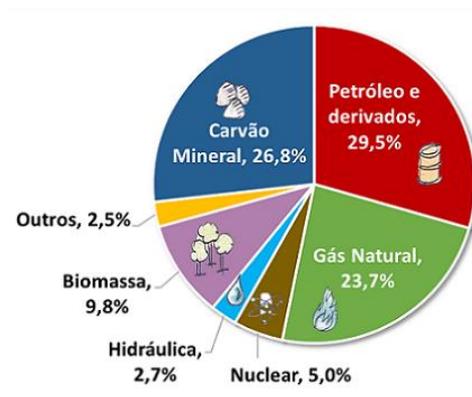
A primeira Revolução Industrial evidenciou a importância da energia para a realização das atividades humanas. Dada a importância da energia, espera-se que o consumo continue aumentando, uma vez que é intrínseco à industrialização e ao crescimento populacional (Capa *et al.*, 2020). Nessa perspectiva, a utilização de energias renováveis surge com o intuito de reduzir as alterações climáticas e o aquecimento global, tendo em vista a redução das emissões de gases de efeito estufa para a atmosfera proposta com o uso de tais fontes.

As fontes de energia podem ser classificadas como renováveis e não renováveis, sendo as não renováveis caracterizadas pelo esgotamento de sua matéria prima, posto o processo lento de reposição na natureza, pode-se exemplificar o petróleo, o carvão mineral e o gás natural. Por sua vez, as fontes de energia renováveis são consideradas inesgotáveis, além de limpas, cita-se a energia eólica e solar.

Outrossim, também podem ser classificadas como fonte primária e fonte secundária. As fontes de energia primárias são as fornecidas pela natureza de forma direta (petróleo, gás natural, energia hidráulica, entre outros), já as fontes secundárias constituem a energia que é transformada a partir de fontes primárias, como o hidrogênio.

A matriz energética mundial exposta na Figura 1, demonstra com evidência a predominância das fontes não renováveis, como o carvão, o petróleo e o gás natural. É possível observar que mais de 80% da matriz energética é composta de combustíveis fósseis (EPE, 2023b).

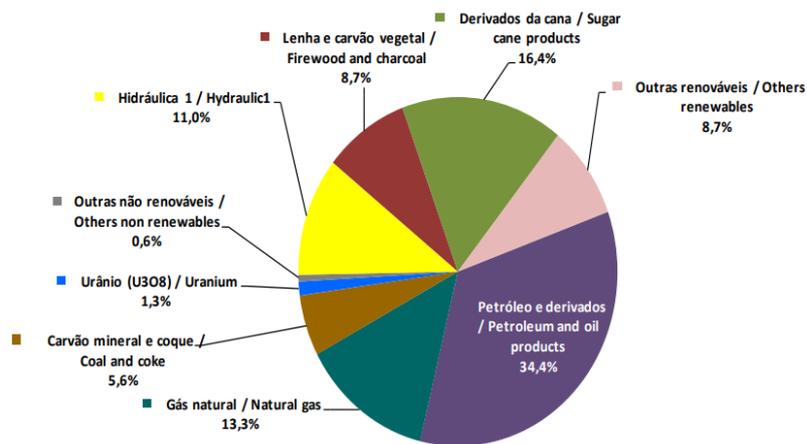
Figura 1. Matriz energética mundial em 2020.



Fonte: EPE (2023b).

Por sua vez, a matriz energética brasileira, apresentada na Figura 2, demonstra a diferença do Brasil em comparação ao cenário mundial, uma vez que há maior uso de fontes renováveis. Cabe ainda ressaltar a diversificação da matriz energética brasileira, fato que pode ser associado à extensão e a diversidade territorial do país.

Figura 2. Matriz energética brasileira.



Fonte: EPE (2021a).

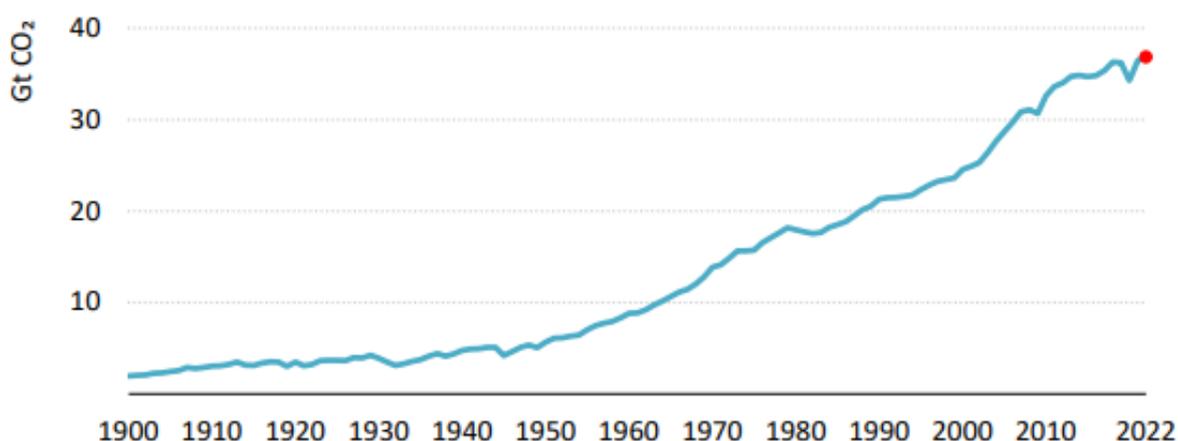
Historicamente, o Brasil apresenta uma importante vantagem comparativa no setor energético, relacionada à abundância de recursos naturais a baixos custos em termos relativos. Logo, pode-se dizer que o Brasil dispõe de condições especiais de recursos energéticos renováveis e de tecnologia para transformar suas riquezas naturais em energia e assim agregar valor à sua produção de riqueza (Tolmasquim *et al.*, 2007).

De fato, o Brasil possui uma matriz energética relativamente limpa e diversificada, com uma participação significativa de fontes renováveis em sua oferta energética interna. Ainda conforme Tolmasquim *et al.* (2007), isso tem contribuído para reduzir os índices de emissão de gases de efeito estufa em comparação com muitos outros países.

É importante salientar que levando em conta fatores mencionados, como o ritmo de crescimento econômico e a estrutura do consumo de energia, é possível que as emissões de CO₂ aumentem, mesmo com um aumento da participação de fontes renováveis na matriz energética.

De acordo com o Relatório de Emissões Globais da Agência Internacional de Energia (IEA) de 2022, as emissões globais de dióxido de carbono (CO₂) relacionadas à energia e processos aumentaram em cerca de 0,9% em 2022, consoante o exposto na Figura 3.

Figura 3. Emissões globais de CO₂ da combustão de energia e processos industriais 1900-2022.



Fonte: IEA (2023).

Destarte, observa-se que as atividades humanas dependem diretamente do uso de fontes fósseis, dada a parte representativa dos setores industriais, meios de transporte e diversos outros serviços necessários à vida que utilizam derivados de tais fontes. Sendo assim, pode-se afirmar que essas fontes são limitadas e podem se tornar inviáveis a nível de investimento nas próximas décadas, a exemplo dos combustíveis fósseis, cujo preço sofre influência direta da crescente demanda mundial e das decisões tomadas pelos países detentores do monopólio de produção (Barbosa, 2020).

À vista disso, a adoção de tecnologias limpas é imprescindível para garantir as metas climáticas e o desenvolvimento econômico sustentável, bem como a preservação ambiental e consequente cumprimentos dos ODS e do Acordo de Paris.

Outrossim, tendo em vista os impactos ambientais causados pela combustão das fontes fósseis, que liberam diversos gases de efeito estufa para a atmosfera, enfatiza-se a importância da utilização das fontes renováveis e limpas de energia.

O hidrogênio é uma fonte de energia secundária, ou seja, trata-se de um portador de energia, que possui importantes propriedades para o desenvolvimento sustentável, posto que é um combustível renovável e economicamente viável, que possui diversas aplicações em diferentes áreas, como, por exemplo, vetor de armazenamento de energia e combustível em células que geram eletricidade.

2.1. HIDROGÊNIO

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa, sua utilização como vetor energético tem ganhado destaque devido a sua eficiência e sustentabilidade, posto seus benefícios econômicos e ambientais. Conforme Balat (2008), o hidrogênio tem uma importância estratégica na busca de um sistema energético de baixa emissão, benigno ao meio ambiente, mais limpo e mais sustentável.

Ainda de acordo com Balat (2008), o hidrogênio é um eficiente combustível de transporte, tendo em vista a velocidade de queima e nenhuma toxicidade ou potencial de formação de ozônio, além de possuir altos limites de inflamabilidade no ar. Ademais, a combustão do hidrogênio consiste em água e uma pequena quantidade de óxidos de nitrogênio, evidenciando a viabilidade ambiental almejada.

Dessa forma, o hidrogênio tem potencial para se tornar um importante combustível capaz de atenuar problemas ambientais, levando em consideração a redução das emissões de gases de efeito estufa e, conseqüente, diminuição das alterações climáticas e aquecimento global.

Consoante Pereira *et al.* (2017), além da alta eficiência de conversão de energia e produção de água sem emissões, há diversas vantagens do hidrogênio, que já foram mencionadas por vários autores, algumas delas são: a) abundância na natureza; b) diferentes formas de armazenamento (por exemplo, gasoso, líquido ou em conjunto com hidretos metálicos); c) transporte de longa distância; d) facilidade de conversão para outras formas de energia; e) poder calorífico mais alto do que a maioria dos combustíveis fósseis convencionais.

O hidrogênio é a substância mais abundante na natureza, embora seja muitas vezes encontrado em combinação com outros compostos. A seleção da tecnologia de armazenamento de hidrogênio depende do uso pretendido, da quantidade a ser armazenada, das condições operacionais e dos custos envolvidos. Quanto ao transporte, existem várias opções, incluindo

rodovias, transporte marítimo e dutovias. Além das aplicações e propriedades físico-químicas do hidrogênio, é essencial considerar a distância e a quantidade a ser transportada (Puga, 2023).

O poder calorífico é uma medida da quantidade de energia liberada por unidade de massa ou volume de um combustível durante a sua combustão completa, trata-se de uma propriedade importante para determinar a eficiência e o potencial energético de diferentes combustíveis. Observa-se na Tabela 1 que o poder calorífico do hidrogênio é significativamente maior do que outros combustíveis, isso se deve à sua alta densidade de energia e ao fato de que, durante a combustão do hidrogênio, a única emissão resultante é vapor de água.

Tabela 1. Poder calorífico de diferentes combustíveis.

Combustível	Valor do poder calorífico superior (a 25°C e 1 atm) [KJ/g]	Valor do poder calorífico inferior (a 25°C e 1 atm) [KJ/g]
Hidrogênio	141,86	119,93
Gasolina	47,5	44,5
Gasóleo	44,8	42,5
Metano	55,53	50,02
Metanol	19,96	18,05
Propano	50,36	45,6

Fonte: Santos; Santos (2004).

À vista disso, o hidrogênio desponta como uma opção extremamente interessante para diversas aplicações, graças às suas características únicas e ao seu potencial em promover a sustentabilidade e a redução das emissões de gases de efeito estufa. Consequentemente, espera-se um aumento significativo na sua demanda.

2.1.1. Demanda de hidrogênio

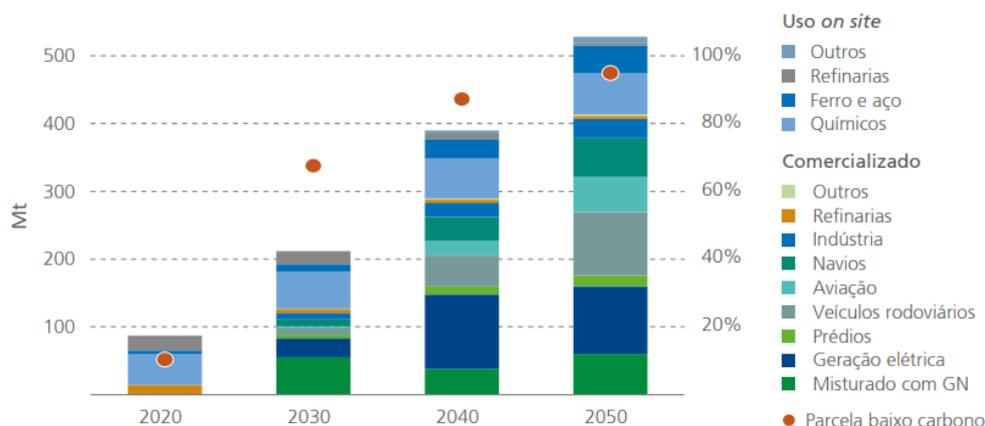
Em 2021, a demanda global por hidrogênio alcançou mais de 94 milhões de toneladas (Mt), representando um aumento de 5% em relação ao ano anterior e um comparativo com as 91 Mt registradas em 2019 (antes da pandemia). Esse crescimento significativo foi impulsionado, em grande parte, pelo aumento da utilização de hidrogênio em aplicações

tradicionais, especialmente na indústria química, que registrou um acréscimo de quase 3 Mt, e no setor de refino, com um aumento de cerca de 2 Mt em relação a 2020. É importante ressaltar que esses subsetores, especialmente o refino, foram fortemente afetados pela pandemia de Covid-19. No entanto, a partir de 2021, com a retomada das atividades e a recuperação econômica geral, houve um aumento na demanda por hidrogênio (IEA, 2022).

Por outro lado, ainda de acordo com IEA (2022), a demanda por hidrogênio em novas aplicações, como na indústria pesada, transporte, geração de energia e nos setores de construção ou na produção de combustíveis derivados de hidrogênio, ainda foi bastante baixa em 2021, totalizando aproximadamente 40 quilotoneladas (kt) de H₂ (cerca de 0,04% da demanda global por hidrogênio). Esse volume foi principalmente utilizado no transporte rodoviário, que registrou um crescimento significativo de 60%, embora a partir de uma base inicial muito baixa. Esse aumento reflete o acelerado desenvolvimento de veículos elétricos a célula de combustível (FCEVs).

No entanto, é relevante mencionar que a maior parte do hidrogênio fornecido foi produzido a partir de combustíveis fósseis, o que não traz benefícios para as mudanças climáticas. Essa dependência de combustíveis fósseis na produção de hidrogênio representa um desafio significativo para alcançar as metas de redução de emissões estabelecidas pelos acordos internacionais, como o Acordo de Paris. A transição para fontes de hidrogênio mais limpas e sustentáveis é essencial para mitigar os impactos negativos das mudanças climáticas e avançar para um futuro de baixo carbono.

As características ímpares do hidrogênio, como alta eficiência energética e nenhuma emissão de poluentes diretos, tornam-no uma opção viável e atraente para diversas aplicações em busca de sustentabilidade e redução das emissões de gases de efeito estufa. De fato, é evidente o crescente potencial de demanda por hidrogênio no mundo. Conforme representado na Figura 4, estima-se um aumento de mais de 500% na demanda até 2050 (IEA, 2021). Esse crescimento sinaliza a importância crescente do hidrogênio como uma alternativa promissora na busca por soluções energéticas mais limpas e sustentáveis.

Figura 4. Projeção da demanda de hidrogênio no cenário de 2020-2050.

Fonte: BNDES (2022).

2.1.2. Utilização do hidrogênio

Atualmente, o setor industrial é o maior consumidor de hidrogênio, utilizando-o como insumo em diversas atividades. Os quatro principais usos do hidrogênio são o refino de petróleo (33% do consumo), produção de amônia (27%), produção de metanol (11%) e produção de aço (3%). É importante salientar que o setor de refino, que também é o maior consumidor, é responsável por aproximadamente três quartos da produção total de hidrogênio. Isso ocorre principalmente devido ao processo de reforma a vapor do metano, amplamente utilizado nesse setor para gerar hidrogênio a partir de hidrocarbonetos (BNDES, 2022)

Ainda conforme o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES (2022), nos últimos anos, houve um aumento significativo no consumo de hidrogênio no processo de refino de petróleo devido tanto ao crescimento da demanda por combustíveis como às exigências ambientais. O objetivo é produzir derivados de melhor qualidade para uso rodoviário, levando em consideração as legislações ambientais.

Nesse contexto, o hidrogênio desempenha um papel crucial ao ser utilizado principalmente para remover impurezas presentes no óleo cru, evitando assim a emissão de compostos prejudiciais, como enxofre e óxidos de nitrogênio (NOx), durante a combustão dos derivados refinados. Para alcançar esse objetivo, as refinarias empregam processos de hidrodessulfurização e hidrodesnitrogenação, o que resulta em um aumento significativo no consumo de hidrogênio. Essa tendência transformou as refinarias em grandes consumidoras de

hidrogênio, tornando esse elemento essencial para atender aos requisitos de qualidade e às regulamentações ambientais.

Na produção de amônia, o hidrogênio é um componente essencial e desempenha um papel fundamental no processo conhecido como Haber-Bosch. Essa reação química permite a síntese de amônia (NH_3) a partir de nitrogênio (N_2) e hidrogênio (H_2) gasosos. O hidrogênio age como o agente redutor na reação, fornecendo elétrons necessários para a conversão do nitrogênio em amônia. Embora o processo Haber-Bosch tenha sido uma revolução na produção de amônia, é importante considerar abordagens mais sustentáveis, como a produção de hidrogênio a partir de fontes renováveis para tornar a produção de amônia mais ecoeficiente e reduzir o impacto ambiental associado ao uso de combustíveis fósseis na produção de hidrogênio. A busca por alternativas mais sustentáveis e tecnologias mais eficientes é uma prioridade para garantir um futuro mais limpo e ambientalmente responsável (Bárcia; Costa; Carvalho, 2023).

As principais aplicações do hidrogênio como parte de uma mistura de gases são na produção de aço e na produção de metanol (IEA, 2019). Na produção de aço, uma das rotas tecnológicas utiliza o hidrogênio como agente redutor do minério de ferro, produzindo vapor de água como um gás residual. Da mesma maneira, na produção de metanol, o hidrogênio atua como o agente redutor, enquanto o monóxido de carbono fornece o carbono necessário para a formação do metanol, a produção também pode acontecer pela oxidação direta do metano ou pela conversão redutiva do CO_2 com hidrogênio (Oliveira, 2021).

De acordo com Lima (2023):

A produção do hidrogênio tem um impacto muito significativo na fabricação de metanol a partir do CO_2 . Espera-se que, no futuro, com a necessidade crescente de fontes renováveis de energia, o hidrogênio seja o protagonista na matriz energética global. Consequentemente, seu desenvolvimento contribuirá para o consumo de CO_2 e impulsionará a cadeia econômica do metanol renovável.

O hidrogênio tem sido alvo de notáveis avanços em várias aplicações, com destaque para o setor de transportes. Nesse campo, a tecnologia de células de combustível se destaca, pois utiliza hidrogênio para gerar eletricidade através de uma reação química com oxigênio, produzindo apenas água e calor como subprodutos. Essas células podem ser empregadas em

veículos para alimentar motores elétricos, proporcionando uma forma limpa e eficiente de mobilidade, sem emissões de poluentes.

Essa abordagem difere dos carros elétricos convencionais, que dependem de baterias internas e requerem recargas externas, eventualmente resultando em uma alta demanda futura para o descarte desses resíduos químicos. Em contraste, os veículos movidos a hidrogênio utilizam a célula de combustível para produzir energia, e estão em constante recarga devido ao combustível (hidrogênio), o que resulta em um impacto ambiental significativamente menor (Duarte; Ferreira; Cruz, 2023).

Essa característica torna o hidrogênio uma opção com baixo impacto no meio ambiente, já que não há necessidade de produção e descarte em larga escala de baterias. Além disso, o hidrogênio pode ser produzido a partir de fontes renováveis, como energia solar ou eólica, o que destaca ainda mais a sua importância na transição para uma sociedade mais sustentável.

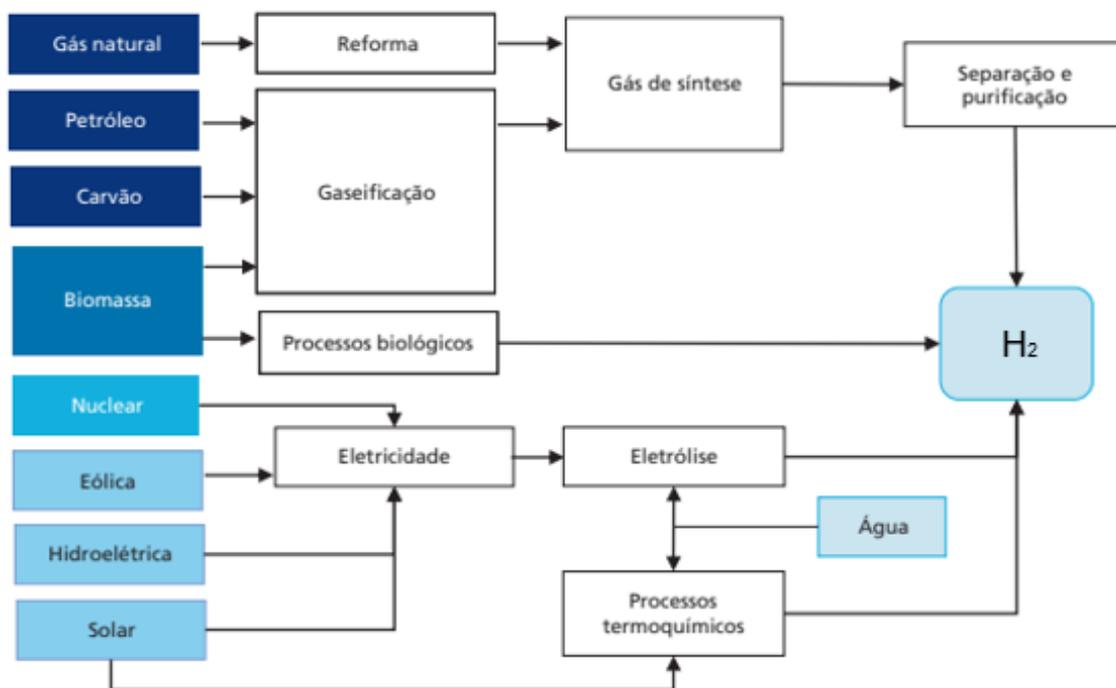
Contudo, é importante destacar que a tecnologia de células de combustível e a infraestrutura necessária para o abastecimento de hidrogênio ainda estão em desenvolvimento, e desafios como a produção e distribuição eficiente do hidrogênio continuam sendo temas de pesquisa e investimento para promover sua adoção mais ampla em diversos setores econômicos.

2.1.3. Obtenção de hidrogênio

A obtenção de hidrogênio pode ocorrer de diversas formas, seja de ocorrência natural (H_2 geológico) ou por meio de processos físico-químicos ou bioquímicos, de modo que os processos produtivos para a sua obtenção podem ser divididos e classificados em: produção a partir de combustíveis fósseis (como a reforma a vapor e a gaseificação), produção através da decomposição da água (eletrolise) e a produção via biológica (como a biofotólise e a fermentação).

Sendo assim, a Figura 5 apresenta possíveis rotas de produção e utilização do hidrogênio enquanto vetor energético, salientando, assim, a versatilidade do combustível, que pode ser produzido através de diversos insumos e processos.

Figura 5. Possíveis rotas para a produção e utilização de hidrogênio como vetor energético.



Fonte: Oliveira (2022).

2.1.3.1. Reforma a vapor

É o método mais utilizado atualmente para a produção em larga escala de hidrogênio. Nesse processo industrial, o metano (gás natural) é aquecido a cerca de 900°C e misturado com vapor d'água, resultando na produção de hidrogênio e monóxido de carbono por meio de uma reação endotérmica que requer altas temperaturas. A reação ocorre de acordo com a equação 1, levando a uma razão molar H₂/CO igual a três. O monóxido de carbono formado, por sua vez, reage com o vapor de água, gerando mais hidrogênio através da equação 2. Embora a reação de deslocamento gás-água seja exotérmica, ambas as reações ocorrem simultaneamente (Barbosa, 2020).

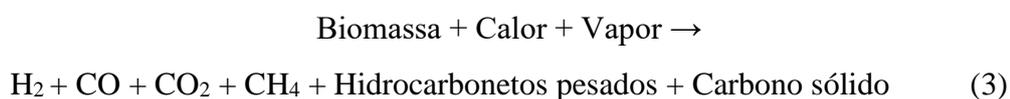


A reforma a vapor do metano é uma tecnologia estabelecida e eficiente que tem desempenhado um papel importante na oferta de hidrogênio para a indústria. No entanto, é importante destacar que a demanda e a produção de hidrogênio estão sujeitas a mudanças, à

medida que novas aplicações e tecnologias relacionadas ao hidrogênio limpo e renovável estão em desenvolvimento, impulsionando a transição para uma economia de baixo carbono.

2.1.3.2. *Gaseificação*

A gaseificação é um processo em que o carvão, ou outras formas de biomassa sólida, como, por exemplo, resíduos agrícolas, produtos de florestas, madeira, são convertidos em um gás de síntese através da reação com oxigênio ou vapor d'água em temperaturas elevadas, conforme a equação 3 (Barbosa, 2020). Esse gás de síntese é uma mistura de hidrogênio (H₂), monóxido de carbono (CO) e outros componentes, como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e outros de gases.



A gaseificação pode potencialmente converter a matéria orgânica, no entanto um dos principais problemas associados à gaseificação de biomassa é a formação de alcatrões durante o processo. Alcatrões são compostos orgânicos complexos e densos que podem se formar como subprodutos indesejados, e eles podem causar problemas na operação dos reatores e envenenar os catalisadores utilizados no processo (IEA, 2019)

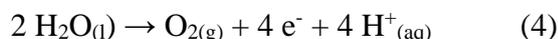
Embora a gaseificação de carvão seja uma técnica estabelecida para a produção de hidrogênio e outros gases úteis, é importante destacar que esse processo também pode gerar subprodutos indesejáveis, como o dióxido de carbono, que é um importante gás de efeito estufa. Portanto, o controle e a redução das emissões de CO₂ durante a gaseificação são essenciais para mitigar seu impacto ambiental.

2.1.3.3. *Eletrólise*

A produção de hidrogênio por meio da eletrólise consiste na separação das moléculas de água em hidrogênio e oxigênio, através da aplicação de corrente elétrica, tendo em vista que se trata de uma reação de oxirredução não espontânea, na qual precisa da energia elétrica para dissociação dos compostos (Carvalho, 2017). A eletrólise da água ocorre em uma célula eletrolítica, que consiste em dois eletrodos (um ânodo e um cátodo) imersos em uma solução

aquosa de eletrólito ou em água pura. Quando uma corrente elétrica é aplicada à célula, ocorrem as seguintes reações nos eletrodos (equações 4 e 5):

- No ânodo (+): A oxidação da água produz oxigênio molecular (O_2) e íons hidrônio (H^+):



- No cátodo (-): A redução gera hidrogênio molecular (H_2):



Ainda de acordo com Carvalho (2017), a eletrólise é um processo caro, tendo em vista a necessidade de uma grande quantidade de energia para quebrar a ligação da água, pois é considerada uma ligação forte. Porém, esse método é uma das principais tecnologias utilizadas para a produção de hidrogênio a partir de fontes de energia renovável, como a energia solar ou eólica, sem a emissão direta de dióxido de carbono (CO_2).

Considerando que a eletrólise demanda energia para produzir hidrogênio, é importante destacar a discussão sobre a viabilidade desse processo, uma vez que ela depende principalmente do tipo de energia utilizada e das condições específicas de cada caso. É verdade que a eletrólise da água requer energia para a produção de hidrogênio, o que pode suscitar questionamentos sobre sua eficiência energética.

No entanto, a viabilidade da eletrólise da água é especialmente relevante quando a eletricidade utilizada é proveniente de fontes de energia renovável, como a energia solar, eólica, hidrelétrica ou outras formas de energia limpa. Nesses casos, a eletrólise se torna uma maneira eficaz de armazenar energia renovável em forma de hidrogênio. O excesso de eletricidade gerada por fontes renováveis em períodos de baixa demanda pode ser utilizado para realizar a eletrólise, produzindo hidrogênio que pode ser armazenado para ser usada posteriormente quando a demanda de eletricidade for maior ou quando as fontes renováveis não estiverem gerando eletricidade suficiente.

Além da discussão sobre a fonte de energia utilizada, é igualmente importante ressaltar a relevância do tipo de água empregado no processo de eletrólise. A água é um recurso essencial para a vida humana e sua disponibilidade é limitada.

De acordo com o Panorama do hidrogênio no Brasil elaborado por Oliveira (2022), a possibilidade de usar água do mar como alternativa em áreas costeiras tem sido considerada. Entretanto, atualmente, o uso de água do mar na eletrólise apresenta desafios, como danos corrosivos aos equipamentos e a produção de cloro como subproduto indesejado, o que pode

interferir no processo e exigir tratamentos adicionais para evitar a contaminação do hidrogênio produzido.

A corrosão dos eletrodos e outras partes do sistema eletrolítico pode ser agravada pelo alto teor de sais e minerais presentes na água do mar. Essa corrosão pode reduzir a vida útil dos equipamentos e aumentar os custos de manutenção.

Nesse contexto, é importante continuar a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias que permitam a utilização eficiente e sustentável de diferentes fontes de água para a eletrólise, bem como considerar o uso consciente e responsável dos recursos hídricos, levando em conta a disponibilidade e a preservação desse recurso vital para o meio ambiente e a vida humana.

2.1.3.4. *Produção biológica do hidrogênio – biofotólise*

A produção biológica de hidrogênio ocorre através do uso de micro-organismos, sendo o rendimento do processo geralmente baixo em comparação com outros métodos convencionais. Apesar disso, esse processo contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa em comparação com outros métodos de produção de hidrogênio (Sivaranjani *et al.*, 2022).

Apesar do baixo rendimento, a produção biológica de hidrogênio é uma alternativa interessante do ponto de vista sustentável, uma vez que contribui para a mitigação dos impactos ambientais causados pela emissão de gases de efeito estufa. Essa característica torna o processo biológico uma opção relevante na busca por fontes mais limpas e ecologicamente responsáveis de produção de hidrogênio, mesmo que seja necessário aprimorar sua eficiência para torná-lo mais competitivo em relação a outros métodos convencionais.

Existem diversas tecnologias para mecanismos biológicos de produção de hidrogênio, incluindo biofotólise, fermentação e a produção híbrida, que se trata de uma combinação de rotas metabólicas (Azwar *et al.*, 2014). Cada tecnologia disponível para produção de hidrogênio tem suas vantagens e desafios específicos, e a escolha da produção depende de diversos fatores, como disponibilidade de matéria prima, eficiência energética e custos.

A biofotólise é um processo em que a luz atua sobre um sistema biológico, promovendo a degradação do substrato, geralmente a água, e resultando na formação de hidrogênio molecular. Esse fenômeno é viabilizado pela ação fotossintética de organismos como algas verdes e cianobactérias. Esses micro-organismos possuem sistemas fotossintéticos

denominados de fotossistemas, que lhes permitem capturar a energia solar (Machado, 2016). Ao realizar a fotossíntese, esses organismos conseguem separar a água em hidrogênio e oxigênio, liberando o hidrogênio como produto. Esse processo é uma importante abordagem na busca por fontes sustentáveis de hidrogênio, utilizando a luz solar como energia renovável para a produção do gás.

Há dois tipos principais de biofotólise: a direta e a indireta. A biofotólise direta é um processo biológico que permite converter energia proveniente da luz solar em energia química na forma de hidrogênio (equação 6), utilizando-se principalmente sistemas de micro-algas fotossintetizantes. O crescimento fotossintético é dependente de CO₂ e de água e para que a produção de hidrogênio ocorra é necessário que o sistema opere em fotoperíodo (Souza, 2017).



Por sua vez, a biofotólise indireta é realizada por cianobactérias e assim como a biofotólise direta depende de um período com incidência de luz e um período de escuro, esses micro-organismos utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

Logo, a produção de hidrogênio por biofotólise pode ser considerada sustentável, uma vez que utiliza água e gás carbônico como principais substratos, contribuindo para a captura de poluentes atmosféricos. No entanto, esse processo enfrenta algumas limitações, como a inibição de enzimas na presença de oxigênio, baixa eficiência fotoquímica, dependência de iluminação constante e alto gasto energético (Torres, 2018).

2.1.3.5. *Produção biológica do hidrogênio – fermentação*

A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando sistemas biológicos tem despertado grande interesse, principalmente devido à sua maior eficiência em comparação a outros processos biológicos. Esse método permite a geração contínua e sustentada de hidrogênio, uma vez que não depende da presença de luz para ocorrer, ao contrário dos processos fotobiológicos (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

A fermentação é um processo biológico que pode utilizar uma ampla variedade de matérias primas orgânicas, apresentando um grande potencial para a valorização de resíduos, e consequente viabilidade econômica, além da baixa emissão de carbono. Sendo assim, a

produção de hidrogênio via fermentação é uma alternativa promissora, explicitando seu caráter competitivo e sustentável.

É importante destacar que, embora a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia apresente diversas vantagens, também há desafios a serem superados, como a necessidade de otimizar as condições do processo e a seleção de micro-organismos mais eficientes para aumentar a produção de hidrogênio e tornar esse método competitivo em relação a outras formas de produção. No entanto, essa abordagem tem mostrado grande potencial como uma alternativa promissora na busca por fontes sustentáveis e eficientes de hidrogênio.

No processo fermentativo para a produção de hidrogênio, os micro-organismos, como bactérias anaeróbicas, degradam compostos orgânicos, como açúcares, para produzir o gás. A fermentação de biomassa apresenta um notável potencial para produzir hidrogênio a partir de resíduos agrícolas ou industriais, contribuindo para uma abordagem sustentável.

O processo de fermentação anaeróbia para a produção de metano é desenvolvido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Paz, 2022). Porém, em processos de produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia, o objetivo é maximizar a produção de hidrogênio, minimizando a formação de metano na etapa de metanogênese, por meio do controle cuidadoso das condições do processo e da seleção de micro-organismos apropriados para otimizar a eficiência do processo.

Na primeira fase do processo fermentativo, as bactérias hidrolíticas desencadeiam a produção de enzimas extracelulares capazes de degradar compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídeos, transformando-os em materiais dissolvidos. Esses materiais dissolvidos são permeáveis às membranas das bactérias fermentativas, permitindo que sejam incorporados e metabolizados no interior das células durante a etapa de acidogênese (Sá; Cammarota; Leitão, 2014; Machado, 2016).

Na fase acidogênica, as bactérias fermentativas absorvem os produtos solúveis gerados durante a hidrólise e os metabolizam dentro das células bacterianas, convertendo-os em compostos mais simples. Esses compostos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 , H_2 e há formação de novas células bacterianas (Torres, 2018).

A maioria dos carboidratos é degradada rapidamente, o que os torna uma excelente fonte energética para o processo. No entanto, essa degradação rápida pode levar ao acúmulo excessivo dos produtos da fase acidogênica, resultando em uma diminuição do pH do meio.

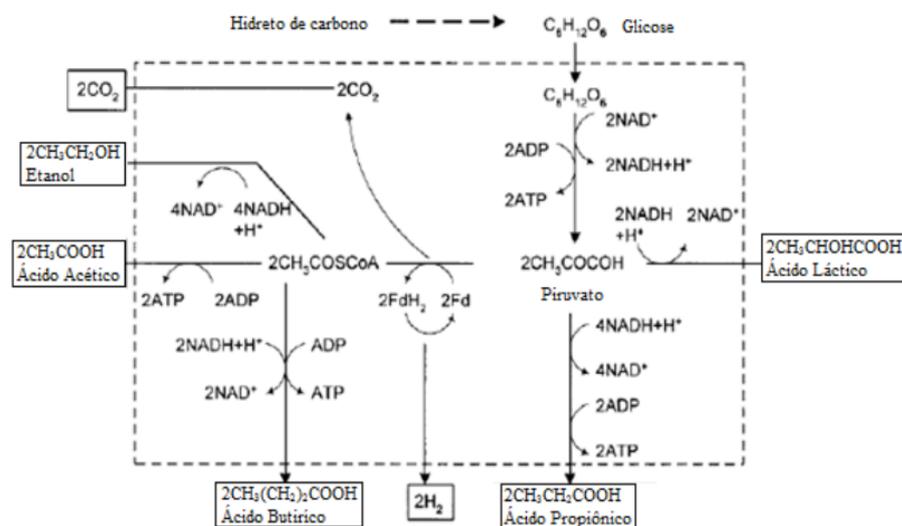
Isso pode levar à inibição do processo e eventual falência dele, uma vez que o ambiente ácido pode prejudicar o funcionamento das bactérias e comprometer a eficiência da produção de hidrogênio.

A fase da acetogênese é outra etapa importante do processo, que ocorre após a fase da acidogênese. De acordo com Fonseca (2016), nessa etapa, os produtos metabólicos da acidogênese, como os ácidos orgânicos voláteis (como ácido acético e ácido butírico) e álcoois, são convertidos em hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2).

De acordo com Machado (2016), o rendimento de hidrogênio ao final do processo depende da rota metabólica seguida pelos micro-organismos e dos subprodutos gerados. A degradação e conversão de polímeros complexos, como carboidratos, em hidrogênio ocorrem por meio de uma série de reações bioquímicas. Inicialmente, materiais ricos em carboidratos são hidrolisados em moléculas de açúcar por meio de processos biológicos ou pelo uso de tecnologias de pré-tratamento. Os açúcares resultantes (por exemplo, moléculas de glicose) então passam por uma sequência de reações bioquímicas (Bundhoo; Mohee, 2016).

Ainda que diferentes carboidratos possam ser empregados no processo fermentativo, a representação da rota metabólica utilizando glicose é amplamente aceita na literatura. Isto posto, a Figura 6 mostra de maneira simplificada as reações bioquímicas até que hidrogênio e/ou metabólitos sejam produzidos.

Figura 6. Possíveis rotas metabólicas da fermentação de carboidratos.



As reações da fermentação podem ser divididas em duas etapas: glicólise e redução do ácido pirúvico, que ocorrerão no citoplasma celular (SOUZA, 2017). Durante a primeira etapa ocorre a oxidação da glicose que passará por uma série de reações dando origem ao ácido pirúvico. Neste estágio, também ocorre a formação de 2 ATPs e a liberação de quatro elétrons e quatro íons H^+ . Dos quatro íons H^+ , dois ficam livres no citoplasma, enquanto os outros dois, juntamente aos quatro elétrons, serão capturados pelo dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD^+) e formarão o NADH, conforme representado na Equação 7.



Conforme Bundhoo e Mohee (2016), o piruvato é o principal produto intermediário da fermentação e pode ser oxidado anaerobicamente a acetil coenzima A (acetil-CoA) por meio de duas rotas possíveis: a via do piruvato liase (PFL) ou a via do piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). A escolha entre essas duas vias dependerá da cultura bacteriana empregada.

Na rota do piruvato liase, o piruvato é degradado pela ação da coenzima A (CoAH) que origina a acetil-CoA e o formiato (Equação 8), que em condições ácidas ativará a liase de hidrogênioformiato (FHL), sendo o ácido fórmico convertido em CO_2 e H_2 (Equação 9).



Na rota do piruvato ferredoxina reductase (PFOR), o piruvato é oxidado pela ação da coenzima A (CoA-H), resultando na formação de acetil-CoA e oxidação da ferredoxina (Fd_{ox}), produzindo CO_2 (conforme Equação 10). Simultaneamente, a ferredoxina reductase (Fd_{red}) reduz os íons H^+ a H_2 , e ela mesma é oxidada a Fd_{ox} (conforme Equação 11). Esses processos são essenciais para a produção de acetil-CoA a partir do piruvato e estão envolvidos em rotas metabólicas anaeróbicas.



O NADH residual formado como um subproduto da conversão de glicose em piruvato, pode ser reoxidado para produzir H_2 conforme as Equações 12, 13 e 14. No entanto, o rendimento desta reação depende do produto. Se o produto é ácido acético, 4 mols de H_2 por mol de glicose poderão ser formados. Se o etanol for produzido junto com o ácido acético a

produção será de 2 mols de H₂ por mol de glicose. O mesmo rendimento pode ser observado caso o ácido butírico seja o produto (Souza, 2017).



É importante destacar que as rotas fermentativas raramente atingem os rendimentos teóricos máximos descritos para a produção de energia. Isso ocorre porque parte dos substratos metabólicos é desviada para a manutenção e crescimento do micro-organismo, ou ainda, é utilizada em vias metabólicas que não resultam na formação de hidrogênio ou outros produtos energéticos.

Os micro-organismos frequentemente priorizam a utilização de substratos para garantir sua sobrevivência e crescimento, o que pode reduzir a eficiência da produção de energia ou outros produtos fermentativos. Além disso, existem perdas energéticas durante as reações metabólicas, o que também contribui para o rendimento inferior ao teórico.

Essas considerações são relevantes para o desenvolvimento e otimização de processos fermentativos para a produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse industrial, buscando maximizar o rendimento energético e a eficiência das rotas metabólicas.

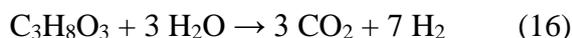
A sacarose representa uma promissora fonte de carbono com grande potencial a ser explorado nas rotas de produção de hidrogênio. Isso se deve ao fato de que, teoricamente, a fermentação da sacarose pode gerar até 8 mols de H₂ por mol de sacarose (conforme Equação 15). Essa característica torna esse substrato altamente atrativo para a produção de hidrogênio de forma eficiente.



Uma das principais vantagens de utilizar a sacarose como substrato é a possibilidade de reduzir os custos com a matéria-prima, uma vez que ela pode ser obtida a partir de resíduos da indústria sucroalcooleira. Essa abordagem valoriza os subprodutos dessa indústria e contribui para uma produção mais sustentável de hidrogênio, aproveitando materiais que antes seriam descartados.

Outra fonte de carbono de grande potencial para a produção de hidrogênio é a glicerina, subproduto da indústria de biodiesel. Seu aproveitamento para gerar hidrogênio é

particularmente atraente, visto que a razão de hidrogênio por molécula de glicerina é de 7:1, conforme mencionado por Almeida em 2011, como representado na Equação 16.



2.1.4. Classificação das fontes de hidrogênio

Nos últimos anos, tem sido adotada uma classificação de cores para distinguir diferentes fontes de produção de hidrogênio (IEA, 2019). A produção de hidrogênio a partir de fontes fósseis é categorizada em três cores: preto, a partir do carvão; cinza, a partir do gás natural; e marrom, a partir de lignite. É importante ressaltar que todas essas formas de produção geram altas emissões de CO₂ para a atmosfera.

Ainda conforme (IEA, 2019), o hidrogênio azul é o termo utilizado para descrever o hidrogênio produzido a partir de combustíveis fósseis, no entanto, suas emissões de CO₂ são significativamente reduzidas pelo uso de CCUS (Carbon Capture, Utilization, and Storage). Nesse processo, o CO₂ é capturado antes de ser emitido ou retirado diretamente do ar e, em seguida, é armazenado de forma permanente em reservatórios geológicos, ou utilizado de maneira que proporcione reduções equivalentes de emissões. Isso pode incluir a integração química do CO₂ em materiais duradouros, contribuindo para reduzir o efeito estufa e na mitigação das mudanças climáticas.

Em contraste, o hidrogênio verde, produzido a partir de fontes renováveis (particularmente, energias eólica e solar) via eletrólise da água, é considerado uma opção de baixo carbono, pois não gera emissões de CO₂ durante sua produção. A promoção do hidrogênio verde é fundamental para reduzir o impacto ambiental da produção de hidrogênio e para impulsionar uma transição energética mais sustentável e ecologicamente consciente (IEA, 2019).

O termo hidrogênio branco designa o hidrogênio natural ou geológico, geralmente encontrado em depósitos subterrâneos. Já o hidrogênio turquesa corresponde àquele que é produzido por craqueamento térmico do metano, sem gerar CO₂, sendo considerada uma forma de produção de baixo carbono. Conforme a EPE (2021b), há ainda o hidrogênio rosa, produzido a partir de energia nuclear.

Por fim, o hidrogênio musgo para se referir ao hidrogênio a partir de biomassa ou biocombustíveis, com ou sem captura de carbono, através de reformas catalíticas, gaseificação ou biodigestão anaeróbica (EPE, 2021b).

Essa classificação por cores visa destacar a origem do carbono associada à produção de hidrogênio, permitindo uma melhor compreensão do impacto ambiental de cada método. Vale salientar que a diversidade de fontes de hidrogênio contribui para um futuro sustentável, oferecendo opções para reduzir as emissões de carbono e avançar em direção a uma economia de energia limpa e renovável.

2.2. MICRO-ORGANISMOS

A abordagem biológica para a produção de hidrogênio representa uma notável opção para obter uma fonte limpa e sustentável de energia. Isto posto, cabe salientar que algumas bactérias possuem a notável capacidade de realizar fermentação anaeróbia, um processo metabólico que pode levar à produção de hidrogênio.

Diversos micro-organismos têm a capacidade de gerar hidrogênio, desde que possuam as enzimas hidrogenase ou nitrogenase, uma vez que estão envolvidas na oxidação do NADH produzido via glicólise. Estes micro-organismos podem ser classificados como mesofílicos ou termofílicos, aeróbios, facultativos ou anaeróbios. Pode-se citar como exemplos desses micro-organismos: como bactérias da classe *Clostridia*, além de gêneros como *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Alcaligenes* e *Bacillus* (Fernandes, 2008).

A produção de hidrogênio por meio de fermentação utilizando bactérias possibilita uma produção contínua e em ritmo sustentado, uma vez que não está sujeita à inibição pela falta de iluminação. Além dessa vantagem, os micro-organismos fermentativos demonstram maior eficácia na produção de hidrogênio em um intervalo de tempo reduzido, quando comparados aos micro-organismos envolvidos nos processos fotobiológicos (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

Ainda de acordo com Sá, Cammarota e Ferreira-Leitão (2014), diversas cepas bacterianas têm sido empregadas na produção de hidrogênio a partir de uma ampla gama de substratos distintos. Para processos em larga escala, por exemplo, para facilitar o controle e a operação, pode-se utilizar culturas mistas, uma vez que o processo pode ser conduzido em meios não estéreis, resultando na diminuição dos custos globais. Essa redução de custos pode ser acentuada ao empregar culturas mistas originárias de fontes naturais, como solo, lodo de

esgoto, excrementos de animais ou resíduos orgânicos. No entanto, vale ressaltar que a desvantagem associada ao uso de culturas mistas, em termos da viabilidade econômica do processo de produção de H₂, está relacionada à presença, que é sempre provável, de microorganismos consumidores de H₂, tais como arqueias metanogênicas, bactérias homoacetogênicas, e bactérias redutoras de sulfato e nitrato.

Por sua vez, as vantagens associadas ao uso de culturas bacterianas puras incluem a seletividade precisa do substrato, a habilidade de modificar o metabolismo mediante ajustes nas condições de crescimento, obtenção de rendimentos elevados de H₂ e minimização de subprodutos indesejados. No entanto, é importante considerar que culturas bacterianas puras são suscetíveis à contaminação, o que frequentemente demanda a implementação de condições assépticas, resultando em um aumento nos custos globais do processo (Sá; Cammarota; Leitão, 2014).

As bactérias do gênero *Enterobacter* são gram-negativas, mesófilas e anaeróbias facultativas, o que significa que podem crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Algumas espécies desse gênero têm potencial biotecnológico, como a *Enterobacter aerogenes*, dada a sua capacidade de produzir hidrogênio como subproduto da fermentação anaeróbica, sendo explorada em pesquisas sobre produção de biocombustíveis.

De acordo com Zhang *et al.* (2011), a bactéria *Enterobacter aerogenes* tem vantagens no processo fermentativo por seu crescimento ocorrer na ausência de oxigênio, e não ser inibido pelo hidrogênio, além de ter alta taxa de crescimento e produção de hidrogênio, bem como ter um desempenho em temperaturas entre 25 e 40°C.

2.3. SUBSTRATOS

O processo de fermentação também viabiliza a utilização de uma ampla variedade de resíduos como substratos, incluindo materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos provenientes da indústria sucroalcooleira, entre outros. Dentro desse cenário, a produção de hidrogênio através da fermentação anaeróbica emerge como uma alternativa altamente atrativa tanto do ponto de vista técnico quanto ambiental.

O Nordeste do Brasil é uma das regiões do país com uma importante tradição na produção de cana-de-açúcar e na indústria sucroalcooleira. A produção de açúcar e álcool na região tem sido uma atividade econômica significativa ao longo dos anos, contribuindo para a

geração de empregos, renda e desenvolvimento local. De acordo com o Vidal (2019), no estudo realizado pelo Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste (ETENE) do Banco do Nordeste do Brasil (BNB), Alagoas e Pernambuco, que são os maiores produtores de cana-de-açúcar do Nordeste.

Portanto, fica evidente a abundância dos substratos cana-de-açúcar e sacarose na região, o que torna a produção de hidrogênio via biológica viável com o uso desses recursos disponíveis. Essa oportunidade de aproveitar a matéria-prima local contribui não apenas para o setor sucroalcooleiro, mas também para a busca de fontes de energia sustentáveis.

O caldo de cana é o insumo base da indústria sucroalcooleira, trata-se de um líquido viscoso amarelo esverdeado de composição química variável, é composto de aproximadamente 70 % de água, 15 % de açúcares, cuja maior parte corresponde à sacarose, 13 % de fibras e 2 % de impurezas (Menezes, 2018).

A utilização de caldo de cana como substrato para a produção de hidrogênio pode ser economicamente viável devido a disponibilidade e baixo custo da matéria, a alta concentração de açúcares fermentáveis, como a sacarose, é uma fonte rica e metabolizável para a bactéria, além da presença de diversos outros nutrientes no meio. Ademais, existe a possibilidade da integração com a indústria sucroalcooleira, que facilita a implementação do processo.

Conforme Paz (2022), a sacarose contribui significativamente para a produção de hidrogênio, fato que pode ser atribuído à concentração de açúcar, tendo em vista que é um dissacarídeo composto por glicose e frutose, o que a torna uma fonte de carbono para a bactéria fermentadora.

Outra indústria de grande importância para o mercado brasileiro é a de produção de biodiesel, de acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2020), os principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol obtido a partir de cana-de-açúcar e o biodiesel, produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis.

A produção de biodiesel gera a glicerina como subproduto, esse resíduo possui alto potencial poluidor, caso seja descartada no meio ambiente, uma vez que em contato com rios e lagos se comporta como sabão, mas devido a insolubilidade se precipita na água, dificultando a oxigenação (Chagas, 2012).

A produção de biodiesel é a atividade industrial que mais gera glicerina no mercado nacional. A glicerina possui aplicações bastante versáteis e é utilizada em diversos setores. A glicerina bruta (contendo 80% de glicerol) é principalmente utilizada para destilação, mas também encontra aplicações em resinas, nutrição animal, ésteres e fertilizantes. Por outro lado, a glicerina refinada (com pureza superior a 99,5%) é direcionada para produtos farmacêuticos, cosméticos, resinas, tabaco, cuidados pessoais e na indústria alimentícia. No entanto, ela é comercializada a preços baixos devido à sua alta oferta (Pinheiro, 2011).

A glicerina é um tri-álcool com 3 carbonos cujo nome sistemático (União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC) é 1,2,3-propanotriol, logo pode ser utilizada como fonte de carbono para a fermentação anaeróbia e consequente produção de hidrogênio. Evidenciando a viabilidade no aproveitamento desse resíduo, mostra-se um potencial substrato para a produção de hidrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A princípio realizou-se pesquisas da literatura relacionada ao tema em artigos provenientes de periódicos, monografias e dissertações na base Scielo, Google Acadêmico e Periódico Capes, com o intuito de abranger uma ampla gama de fontes acadêmicas e permitir a busca de informações relevantes sobre a produção de hidrogênio via biológica.

Posteriormente, iniciou-se os experimentos e as análises no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia Ambiental e no Laboratório de Cromatografia Instrumental do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A metodologia proposta para o presente trabalho pode ser dividida nas seguintes etapas:

- Esterilização dos reatores e seringas.
- Preparação dos meios e esterilização.
- Replique da bactéria *Enterobacter aerogenes*.
- Preparação do inóculo e inoculação do meio.
- Análise da produção de hidrogênio e etanol.

3.1. ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES

Os reatores utilizados no presente estudo consistiram em frascos tipo de penicilina de 60mL, que foram devidamente limpos e tamponados utilizando algodão hidrófobo, conforme exposto na Figura 7, para posterior esterilização em um forno de Pasteur a 180°C por aproximadamente duas horas.

Figura 7. Reatores tamponados para esterilização em forno de Pasteur.



Fonte: Autora (2023).

As seringas, por sua vez, são utilizadas como dispositivos de armazenamento e medição do volume de gás produzido durante a fermentação, essas não precisaram ser esterilizadas porque foram utilizadas seringas lacradas comercialmente estéreis. O deslocamento do êmbolo indica a produção de gás gerado pela atividade microbiana no meio de fermentação.

3.2. PREPARAÇÃO DO MEIO

As soluções nutrientes foram preparadas tomando como base a composição proposta por SÁ (2011), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Composição das soluções nutrientes utilizadas.

Componente	Concentração (g/L)	Finalidade
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	2,025	Tampão
NH ₄ HCO ₃	0,025	
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,005	Macronutriente
ZnCl ₂	0,005	
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0,005	
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,005	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	0,015	
CaCl ₂	0,05	
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,005	
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,1	Micronutriente
NaCl	0,01	
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,05	
H ₃ BO ₃	0,05	

Fonte: SÁ, 2011 (Adaptado).

Ademais, os substratos utilizados como fonte de carbono para o micro-organismo foram glicerina e sacarose nas seguintes concentrações: 25, 50, 75, 100 e 125 g/L. Também foi utilizado o substrato de caldo de cana, sem tratamento e com tratamento de filtração. Todos os componentes foram medidos com o auxílio de uma balança analítica modelo FA-2104N da Celtac.

A filtração é um método físico de separação de misturas heterogêneas, tendo em vista que o caldo de cana possui diversas impurezas, realizou-se a filtração utilizando gazes para reter algumas dessas partículas.

Tendo em vista o volume dos reatores, foi feito o cálculo das quantidades necessárias de cada componente sabendo que deve ser preenchido 80% do volume total para a solução, ou seja, 48mL, e que 10% são destinados ao inóculo (4,8mL). Então, os reatores foram hermeticamente fechados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.1. Análise do pH

O pH de cada meio foi aferido antes da fermentação mediante o uso do medidor de pH modelo mPA210 da MS TECNOPON Instrumentação. E, após a fermentação, o pH foi medido por meio de fitas de indicador de pH.

3.2.2. Análise do teor de sacarose do caldo de cana

O teor de sacarose no substrato caldo de cana foi determinado utilizando o instrumento Sugar Refractometer (ATC) modelo K52-032 da KASVI que possui um ranger de 1 a 32 % BRIX e resolução de 0,2% BRIX.

3.3. REPLIQUE DO MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado 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.

No procedimento, a replicação da bactéria foi realizada em meio de ágar nutritivo utilizando tubos de ensaio. Para isso, uma alça de platina foi utilizada juntamente com um bico de Bunsen.

Inicialmente, a alça de platina foi submetida a um processo de flambagem para esterilização, sendo exposta à chama até ficar incandescente. Esse processo de aquecimento intenso visa eliminar quaisquer agentes microscópicos presentes na alça, garantindo a esterilidade.

Após a flambagem, a alça de platina foi resfriada para evitar danos ao meio de cultura e ao micro-organismo. Com a alça devidamente resfriada, foi feita a coleta da bactéria. Em seguida, fez-se o replique no meio de cultura contido em tubos de ensaio para depositar o micro-organismo.

Os tubos armazenados em uma estufa a 35°C por 24 horas, visando favorecer seu crescimento.

3.4. PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DO MEIO

A preparação da suspensão do inóculo foi feita utilizando 10% v/v, essa proporção é importante para garantir uma quantidade adequada de micro-organismos para assegurar resultados confiáveis nos experimentos.

Além disso, o inóculo foi preparado com uma escala 0,5 McFarland. Essa escala é uma técnica usada para padronizar a densidade óptica de suspensões bacterianas, varia de 0,0 a 4,0, sendo que 0,5 McFarland é uma referência comumente utilizada para a preparação de suspensões bacterianas em laboratórios, indicando a turbidez da suspensão.

Desse modo, fez-se a inoculação da *Enterobacter aerogenes* nos meios, sendo introduzidos 4,8mL de suspensão em cada reator utilizado no experimento, cada um contendo 48mL de meio de cultivo (Figura 8).

Figura 8. Reactores com 80% do volume útil ocupado com meio e inóculo.



Fonte: Autora (2023).

Cabe salientar que os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, que variava entre 25°C e 30°C.

3.5. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A análise cromatográfica permite a separação e identificação de componentes em amostras. Essa técnica envolve a passagem de uma mistura através de uma fase estacionária, onde os diferentes componentes interagem de maneira distinta, resultando em sua separação com base em suas propriedades químicas.

3.5.1. Produção de hidrogênio e gás carbônico

O acompanhamento da produção de gás foi realizado por observação visual a partir do primeiro dia do processo fermentativo. Esse acompanhamento foi feito observando o deslocamento do êmbolo das seringas nos reatores, tendo em vista que o deslocamento do êmbolo indica o aumento do volume de gás gerado pela atividade microbiana no meio de fermentação (Figura 9).

Figura 9. Reatores com o êmbolo da seringa deslocado, indicando aumento do volume de gás.



Fonte: Autora (2023).

A observação visual do deslocamento do êmbolo das seringas fornece uma indicação qualitativa da produção de gás ao longo do tempo. Isso pode ser usado como um indicador inicial do progresso da fermentação e do nível de atividade microbiana.

Levando em consideração que a cromatografia gasosa é uma técnica analítica eficiente para separar e identificar os componentes de uma mistura gasosa. Então, após 26 dias de fermentação da sacarose e glicerina, e após 15 dias de fermentação do caldo de cana, a composição do gás produzido foi analisada por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo gasoso modelo 5890 SERIES II da HP HEWLETT PACKARD.

O cromatógrafo gasoso estava equipado com um detector de condutividade térmica (TCD), e a temperatura do forno foi mantida em torno de 80°C e pressão de 200kPa. Ademais, a temperatura do detector e do injetor estavam a 100°C, a coluna usada foi Porapak-N com 6 metros e diâmetro interno 1/8 polegadas com vazão 30mL/min de nitrogênio.

As amostras gasosas foram coletadas diretamente dos reatores, visando representar de forma mais precisa a composição do gás em cada análise. Essa abordagem permite uma análise direta do gás produzido, sem a necessidade de preparação adicional das amostras.

Para interpretar e quantificar os resultados obtidos, uma calibração inicial foi realizada. Nessa calibração, injetou-se um gás contendo H₂ e CO₂ em concentrações conhecidas no equipamento para verificar o tempo de saída do sinal e determinar a concentração percentual das amostras gasosas analisadas.

O tratamento dos dados obtidos foi feito no software N2000 Chromatography Data System da Science Technology (Hangzhou) Inc e no Microsoft Excel.

3.5.2. Degradação dos substratos e verificação da produção de etanol

A verificação da produção de etanol e o consumo dos açúcares foram realizadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração da Shimadzu RID-6A equipado com coluna HPX 87H Bio-Rad, a fase móvel usada foi uma solução aquosa 0,5mmol/L de H₂SO₄ com vazão 0,7mL/min.

A CLAE é uma técnica analítica utilizada para separar, identificar e quantificar componentes presentes em uma amostra líquida. Nesse caso, a CLAE foi empregada para analisar os açúcares presentes e o etanol produzido durante o processo.

O detector de índice de refração (IR) é um tipo comum de detector utilizado na CLAE. Ele é sensível às diferenças de índice de refração entre os componentes da amostra e o solvente de eluição. Quando um composto eluído pela coluna de cromatografia passa pelo detector, ocorre uma alteração no índice de refração, o que é detectado e registrado como um sinal.

Através do uso da CLAE com detector de índice de refração, é possível monitorar a degradação dos açúcares presentes no meio, bem como a produção de etanol ao longo do processo fermentativo. Essa técnica permite a quantificação precisa dos açúcares remanescentes e do etanol produzido, fornecendo informações sobre a eficiência da fermentação e o progresso do processo.

Para analisar e quantificar os resultados obtidos, foi conduzida uma etapa inicial de calibração. Durante essa calibração, foram introduzidas soluções de concentrações distintas (0,5g/L, 1g/L, 2g/L, 3g/L, 4g/L e 5g/L) de sacarose, glicose, frutose e etanol. O mesmo procedimento foi seguido para as soluções de glicerina. A partir desses passos, as curvas analíticas foram construídas e, posteriormente, as concentrações das amostras líquidas analisadas foram determinadas utilizando a equação correspondente a essas curvas.

O tratamento dos dados obtidos foi feito no software PeakSimple e no Microsoft Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados provenientes das análises cromatográficas foram separados em duas vertentes: análise de gás, na qual foi examinada a produção de hidrogênio e gás carbônico, e análise de líquido na qual foram avaliados tanto a degradação dos substratos quanto a detecção da produção de etanol.

4.1. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E GÁS CARBÔNICO

A área média obtida a partir do pico cromatográfico da amostra padrão foi registrada como 8.157.048, o que equivale a uma concentração de 20,2% em relação à quantidade molar ou 20,2% em relação ao volume da amostra. Esse valor foi adotado como ponto de referência para avaliar a concentração de hidrogênio nas amostras sujeitas à análise. Similarmente, a média da área obtida a partir do pico cromatográfico da amostra padrão de dióxido de carbono atingiu 18.531,59, correspondendo a uma concentração de 5,2% em termos molares ou 5,2% em relação ao volume da amostra.

4.1.1. Substrato sacarose: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico

A fermentação anaeróbia utilizando sacarose como substrato e com o emprego da *Enterobacter aerogenes* durou 26 dias. Durante esse período, a estabilidade do êmbolo na seringa foi monitorada, pois o deslocamento do êmbolo é um reflexo do aumento do volume de gás gerado pela atividade microbiana no meio de fermentação. A observação visual do deslocamento do êmbolo nas seringas proporcionou uma avaliação qualitativa da produção de gás ao longo do tempo. Então, ao verificar o deslocamento do êmbolo da seringa, procedeu-se com a análise do gás.

Os resultados derivados das injeções das amostras que envolveram a produção de hidrogênio através da utilização de sacarose como substrato, e que foram submetidas à análise no cromatógrafo a gás, foram apresentados na Tabela 3.

Com base nos dados coletados, é possível concluir que ao empregar a sacarose como substrato para a produção biológica de hidrogênio através da bactéria *Enterobacter aerogenes*, existe uma correlação positiva entre a quantidade de hidrogênio produzida e a geração de dióxido de carbono. Em outras palavras, quanto maior a produção de hidrogênio, maior é também a emissão de gás carbônico.

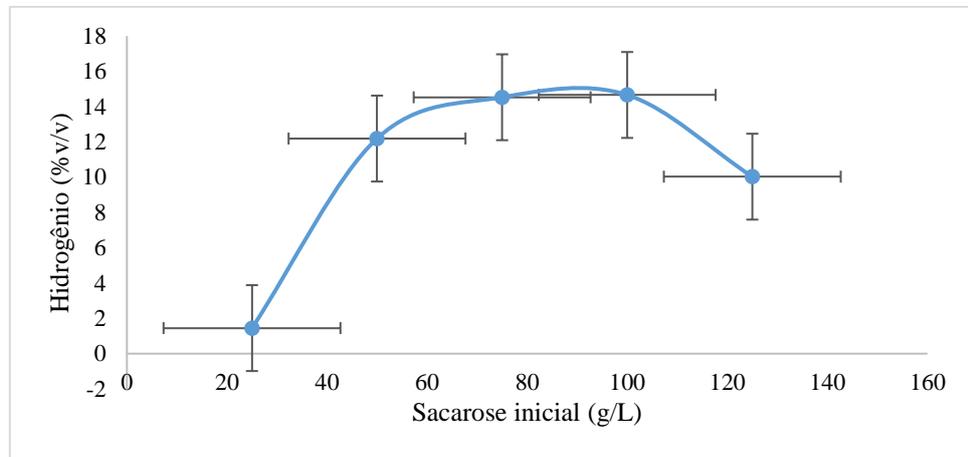
Tabela 3. Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com a sacarose.

Identificação da amostra	Concentração inicial de substrato (g/L)	Gás	Área	Concentração de hidrogênio (%mol/mol ou %v/v)
1	25	Hidrogênio	171.088,81	0,42
		CO ₂	706,20	0,20
2	25	Hidrogênio	207.163,61	0,51
		CO ₂	2.000,50	0,56
3	25	Hidrogênio	585.752,94	1,45
		CO ₂	185.199,09	51,97
1	50	Hidrogênio	157.068,50	0,39
		CO ₂	0,00	0,00
2	50	Hidrogênio	569.245,50	1,41
		CO ₂	272.448,25	76,45
3	50	Hidrogênio	4.921.005,50	12,19
		CO ₂	304.772,31	85,52
1	75	Hidrogênio	125.756,75	0,31
		CO ₂	5.307,80	1,49
2	75	Hidrogênio	5.866.855,50	14,53
		CO ₂	396.625,59	111,29
3	75	Hidrogênio	156.113,16	0,39
		CO ₂	2.832,10	0,79
1	100	Hidrogênio	473.814,50	1,17
		CO ₂	2.605,11	0,73
2	100	Hidrogênio	5.105.772,00	12,64
		CO ₂	192.284,91	53,96
3	100	Hidrogênio	5.920.832,00	14,66
		CO ₂	337.674,47	94,75
1	125	Hidrogênio	4.050.648,25	10,03
		CO ₂	447.765,50	125,64
2	125	Hidrogênio	3.165.996,75	7,84
		CO ₂	325.129,31	91,23
3	125	Hidrogênio	416.196,53	1,03
		CO ₂	281.556,09	0,70

Fonte: Autora (2023).

Selecionando os resultados mais promissores de cada amostra em relação a cada concentração testada, foi construído um gráfico que ilustra a produção de hidrogênio em função da concentração de substrato, apresentado na Figura 10. É possível notar que a curva exibe uma semelhança com uma distribuição gaussiana, apresentando um ápice na concentração de 100g/L de sacarose. Conseqüentemente, essa concentração se destaca como a mais eficaz para otimizar a geração de gás.

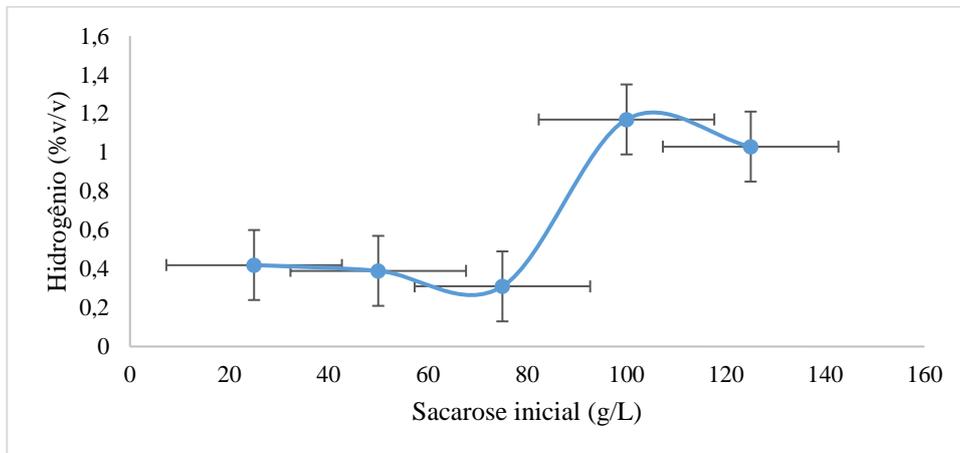
Figura 10. Relação entre a produção de hidrogênio e concentração de sacarose inicial para as amostras mais promissoras.



Fonte: Autora (2023).

Também foram selecionados os resultados menos promissores de cada amostra para cada concentração testada, e a partir desses dados, foi criado um gráfico que representa a produção de hidrogênio em relação à concentração de substrato, visualizado na Figura 11. É perceptível que a curva exibe semelhanças com uma distribuição gaussiana, e embora apresente algumas variações, ainda mostra um ponto máximo na concentração de 100g/L de sacarose. Conseqüentemente, essa concentração continua a se destacar como a mais eficaz para otimizar a produção de gás.

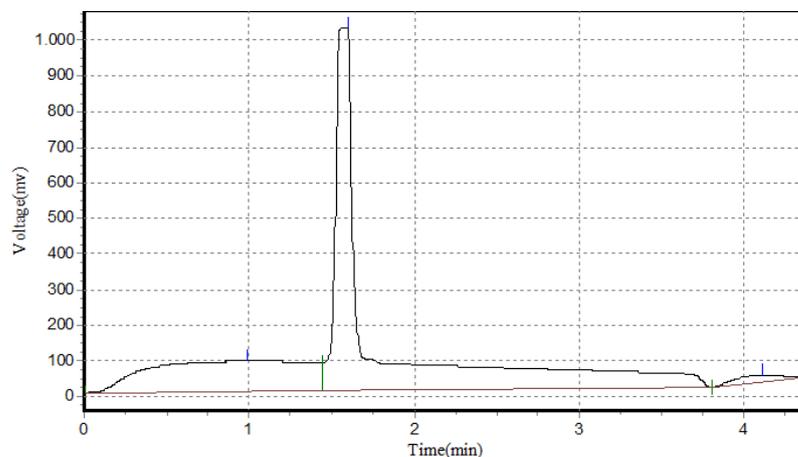
Figura 11. Relação entre a produção de hidrogênio e concentração inicial de sacarose para as amostras menos promissoras.



Fonte: Autora (2023).

A fim de proporcionar uma visualização mais clara, o cromatograma da amostra 3, que envolveu uma concentração de sacarose de 100g/L e exibiu o melhor desempenho na produção de hidrogênio, está representado na Figura 12. Na imagem, o primeiro pico corresponde ao hidrogênio, enquanto o segundo pico, notavelmente invertido, está associado ao dióxido de carbono. O eixo horizontal representa o tempo em minutos, enquanto o eixo vertical representa a voltagem em milivolts.

Figura 12. Cromatograma gasoso da amostra 3 de sacarose 100g/L.



Fonte: Autora (2023).

No cromatograma, é também perceptível uma ligeira variação na linha de base, a qual não exerce influência na interpretação dos resultados e pode ser atribuída a possíveis flutuações na rede elétrica.

Em relação ao pH do meio, antes do processo de fermentação, o pH situava-se aproximadamente em 8, indicando uma leve alcalinidade do meio. Após a conclusão da fermentação, as amostras que apresentaram resultados mais promissores demonstraram uma ligeira acidez no pH. Quanto às amostras com resultados menos encorajadores, o pH variou entre ácido e neutro.

Além disso, pode-se concluir que a produção de hidrogênio, ao empregar o substrato sacarose com uma concentração de 125g/L, possivelmente foi inibida devido ao excesso desse substrato.

4.1.2. Substrato caldo de cana: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico

Inicialmente, a avaliação do conteúdo de sacarose revelou um valor de 20°BRIX, correspondente a 200g/L de sacarose no caldo de cana. Além disso, o pH do caldo de cana antes da inoculação variou entre 6,6 e 6,8, indicando uma ligeira acidez.

A fermentação anaeróbia utilizando o caldo de cana como substrato e com o emprego da *Enterobacter aerogenes* se estendeu por 15 dias. Durante esse período, a estabilidade do êmbolo na seringa foi monitorada, uma vez que o deslocamento do êmbolo reflete o aumento do volume de gás gerado pela atividade microbiana no meio de fermentação. A observação visual do deslocamento do êmbolo nas seringas proporcionou uma avaliação qualitativa da produção de gás ao longo do tempo. Assim, ao identificar a estabilidade do êmbolo da seringa, prosseguiu-se com a análise do gás.

Os resultados obtidos a partir das injeções das amostras no cromatógrafo a gás estão apresentados na Tabela 4.

Pode-se inferir que os valores obtidos a partir da amostra de caldo de cana com 200g/L de sacarose foram inferiores aos resultados das amostras com 125g/L de sacarose, sugerindo que pode ter ocorrido uma inibição pelo substrato.

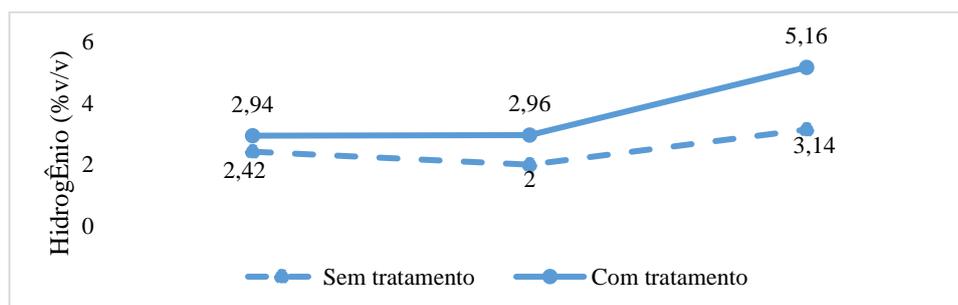
Tabela 4. Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com o caldo de cana sem e com tratamento.

Identificação da amostra	Processamento do substrato	Gás	Área	Concentração de hidrogênio (%mol/mol ou %v/v)
1	Sem tratamento	Hidrogênio	976.994,87	2,42
		CO ₂	467.834,53	131,28
2	Sem tratamento	Hidrogênio	808.045,25	2,00
		CO ₂	466.983,91	131,04
3	Sem tratamento	Hidrogênio	1.269.019,90	3,14
		CO ₂	585.592,62	164,32
1	Com tratamento	Hidrogênio	1.187.057,80	2,94
		CO ₂	550.826,62	154,56
2	Com tratamento	Hidrogênio	1.194.469,10	2,96
		CO ₂	530.313,06	148,81
3	Com tratamento	Hidrogênio	2.084.137,10	5,16
		CO ₂	596.694,06	167,43

Fonte: Autora (2023).

Para facilitar a análise, elaborou-se um gráfico para relacionar a produção de hidrogênio com os substratos de caldo de cana, tanto os tratados quanto os não tratados. Ao observar os resultados visualmente, conforme ilustrado na Figura 13, é evidente que a diferença foi minimamente relevante. Portanto, o tratamento não exerceu um impacto significativo na produção de hidrogênio, nem na geração de dióxido de carbono.

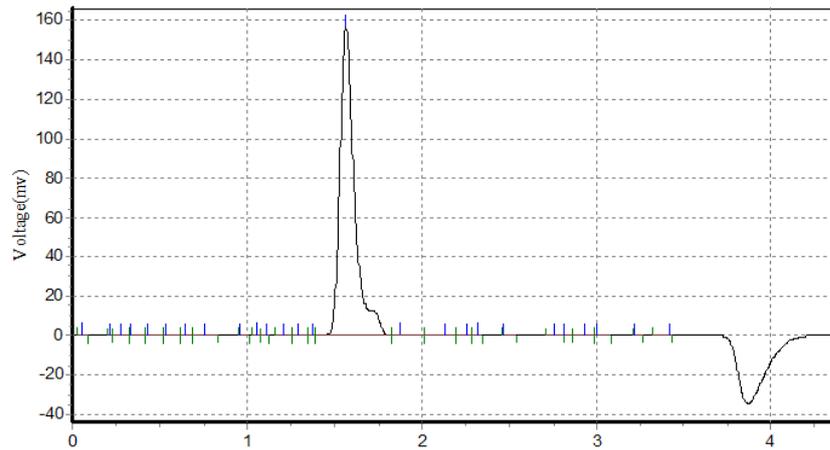
Figura 13. Relação entre a produção de hidrogênio e o tratamento do caldo de cana.



Fonte: Autora (2023).

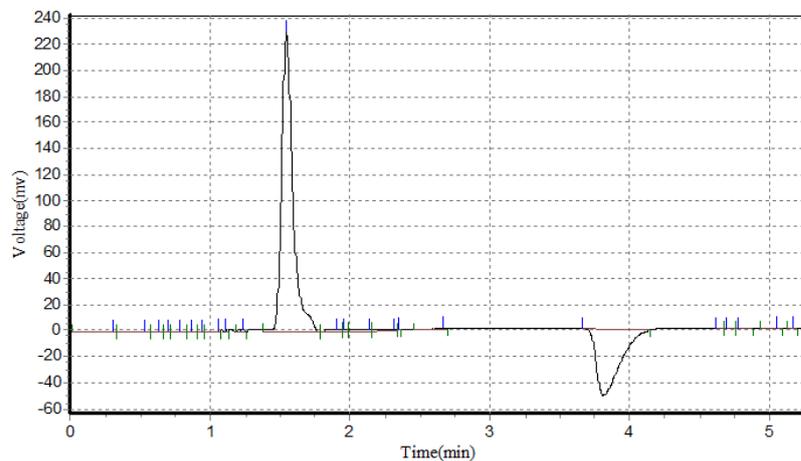
Apresentados os resultados mais promissores tanto para o caldo de cana tratado quanto não tratado, as Figuras 14 e 15 exibem os cromatogramas que ilustram os picos correspondentes ao hidrogênio e ao dióxido de carbono, respectivamente.

Figura 14. Cromatograma gasoso da amostra de caldo de cana com tratamento.



Fonte: Autora (2023).

Figura 15. Cromatograma gasoso da amostra de caldo de cana sem tratamento.



Fonte: Autora (2023).

É perceptível a similaridade entre os cromatogramas do caldo de cana com e sem tratamento, evidenciando que o tratamento não teve um efeito substancial na produção de hidrogênio, nem na formação de dióxido de carbono.

4.1.3. Substrato glicerina: análise da produção de hidrogênio e gás carbônico

Por fim, a fermentação anaeróbia utilizando glicerina como substrato e com a presença da *Enterobacter aerogenes* teve duração de 26 dias. Ao longo desse período, monitorou-se a estabilidade do êmbolo na seringa, pois o deslocamento do êmbolo reflete o aumento no volume de gás gerado pela atividade microbiana no meio de fermentação. A observação visual do deslocamento do êmbolo nas seringas permitiu uma avaliação qualitativa da produção de gás ao longo do tempo. Portanto, ao constatar a estabilidade do êmbolo na seringa, prosseguiu-se com a análise do gás gerado.

Os resultados das injeções das amostras que utilizaram glicerina como substrato para a produção de hidrogênio e foram analisadas pelo cromatógrafo a gás estão listados na Tabela 5.

Apesar de percorrido o mesmo tempo de fermentação com o substrato sacarose, foi possível observar que a produção de gás utilizando o substrato glicerina foi baixa, tendo em vista os resultados obtidos e o fato de o deslocamento do êmbolo ter sido baixo, indicando que não houve uma atividade microbiana relevante utilizando esse substrato.

Ademais, com relação ao pH do meio contendo o substrato de glicerina, antes do processo de fermentação, o pH estava em torno de 8, o que indica uma leve alcalinidade. Após a fermentação, as amostras mantiveram um pH ligeiramente alcalino, o que também evidencia a baixa atividade microbiana no meio de fermentação.

Assim, com base na análise dos dados, pode-se concluir que a glicerina foi o substrato com a menor emissão de dióxido de carbono em comparação com a produção de gás utilizando sacarose e caldo de cana como substratos. Entretanto, é importante notar que a eficiência da glicerina na produção de hidrogênio foi mais baixa. Isso significa que, apesar de sua vantagem ambiental em termos de emissões, pode não ser a opção mais eficiente quando se busca uma produção substancial de hidrogênio.

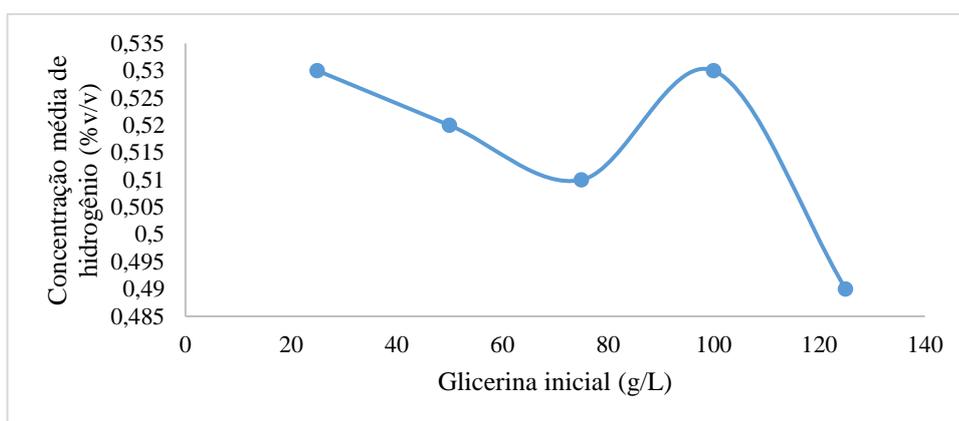
Tabela 5. Concentração de hidrogênio e gás carbônico produzidos com o substrato glicerina.

Identificação da amostra	Concentração inicial do substrato (g/L)	Gás	Área	Concentração de hidrogênio (%mol/mol ou %v/v)
1	25	Hidrogênio	207.335,70	0,51
		CO ₂	10.653,95	2,99
2	25	Hidrogênio	213.080,00	0,53
		CO ₂	5.629,55	1,58
3	25	Hidrogênio	225.239,50	0,56
		CO ₂	0,00	0,00
1	50	Hidrogênio	222.719,84	0,55
		CO ₂	2.380,60	0,67
2	50	Hidrogênio	220.828,59	0,55
		CO ₂	0,00	0,00
3	50	Hidrogênio	182.949,70	0,45
		CO ₂	5.266,20	1,48
1	75	Hidrogênio	197.448,20	0,49
		CO ₂	6.572,60	1,84
2	75	Hidrogênio	204.393,72	0,51
		CO ₂	2.782,50	0,78
3	75	Hidrogênio	209.142,03	0,52
		CO ₂	0,00	0,00
1	100	Hidrogênio	204.583,50	0,51
		CO ₂	3.572,85	1,00
2	100	Hidrogênio	219.083,61	0,54
		CO ₂	1.601,25	0,45
3	100	Hidrogênio	212.798,91	0,53
		CO ₂	0,00	0,00
1	125	Hidrogênio	195.243,89	0,48
		CO ₂	1.525,9	0,43
2	125	Hidrogênio	181.316,09	0,45
		CO ₂	818,90	0,23
3	125	Hidrogênio	212.269,09	0,53
		CO ₂	3.567,80	1,00

Fonte: Autora (2023).

Posto que os valores de produção de hidrogênio para cada concentração de glicerina foram bastante similares, um gráfico foi elaborado para mostrar as concentrações médias de produção de hidrogênio em relação à concentração de glicerina, conforme representado na Figura 16. No caso do substrato de glicerina, é possível afirmar que as variações na concentração não tiveram um efeito notável na produção de hidrogênio, nem na liberação de dióxido de carbono.

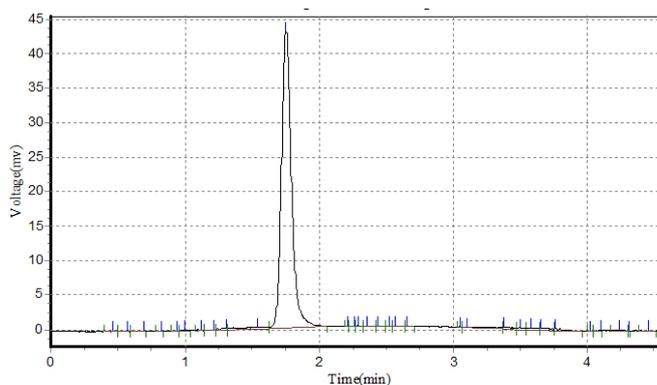
Figura 16. Relação entre a produção de hidrogênio e concentração inicial de glicerina.



Fonte: Autora (2023).

A Figura 17 apresenta o cromatograma correspondente à amostra 2, na qual a glicerina foi utilizada com uma concentração de 100g/L para a produção de hidrogênio. Nota-se de forma evidente que apenas o pico relativo ao hidrogênio se mostra distinto. Esse fenômeno ocorre devido à elevada condutividade térmica do hidrogênio, o que o torna proeminente na análise.

Figura 17. Cromatograma gasoso da amostra 2 de glicerina 100g/L.

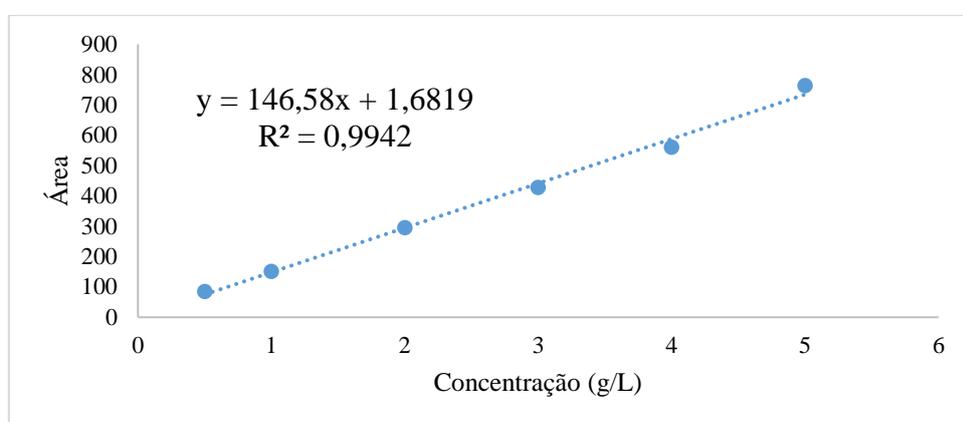


Fonte: Autora (2023).

4.2. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO E VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

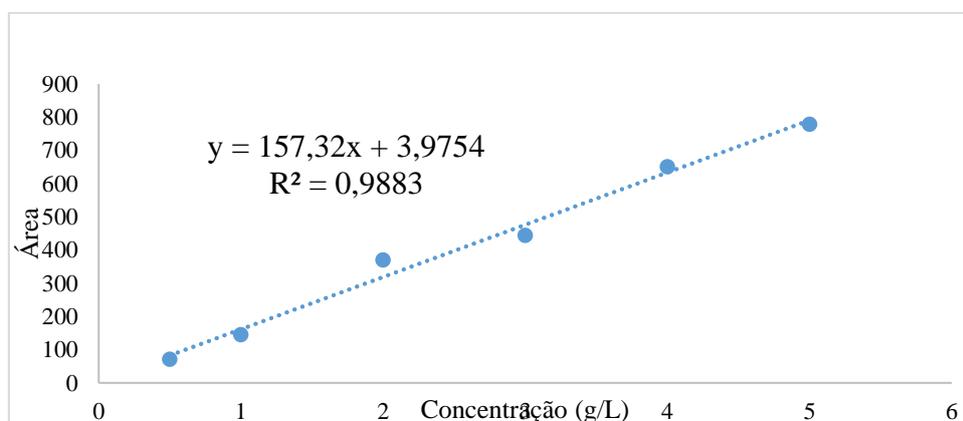
As Figuras 18 a 22 exibem as curvas analíticas para a sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerina, juntamente com suas correspondentes equações. É notável que os coeficientes de determinação (R^2) associados a essas regressões são todos superiores a 0,9. Esses valores altos de R^2 indicam que os modelos de regressão linear utilizados são apropriados para estabelecer uma relação entre a área e a concentração dos substratos.

Figura 18. Curva analítica da sacarose.

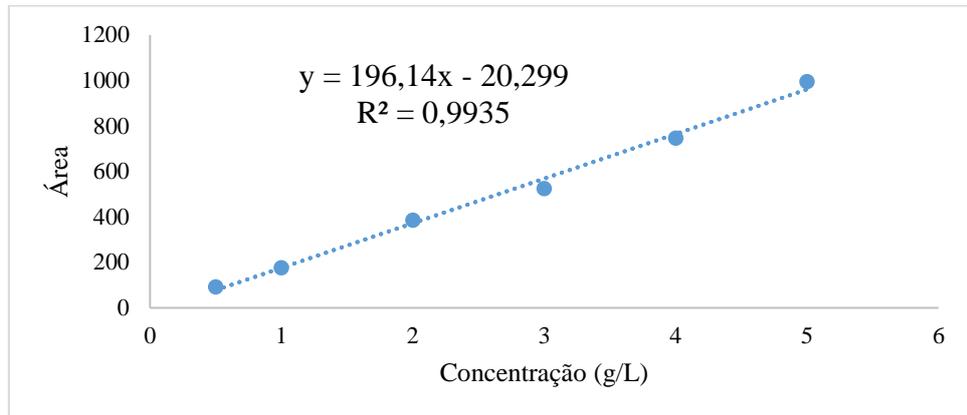


Fonte: Autora (2023).

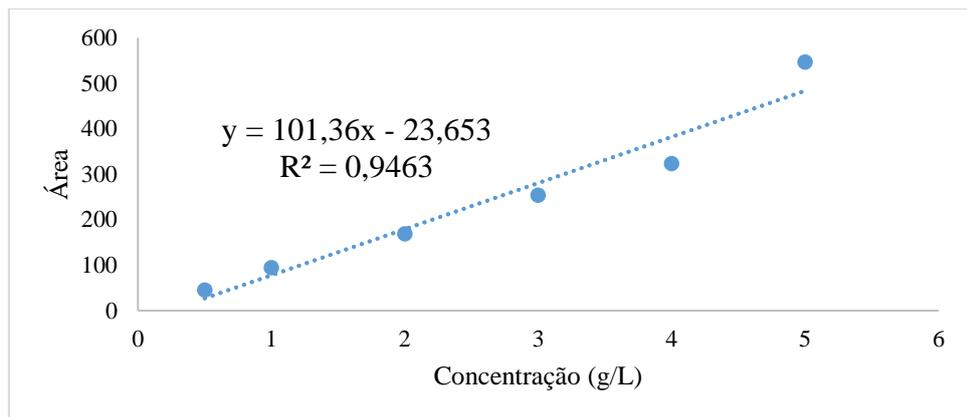
Figura 19. Curva analítica da glicose.



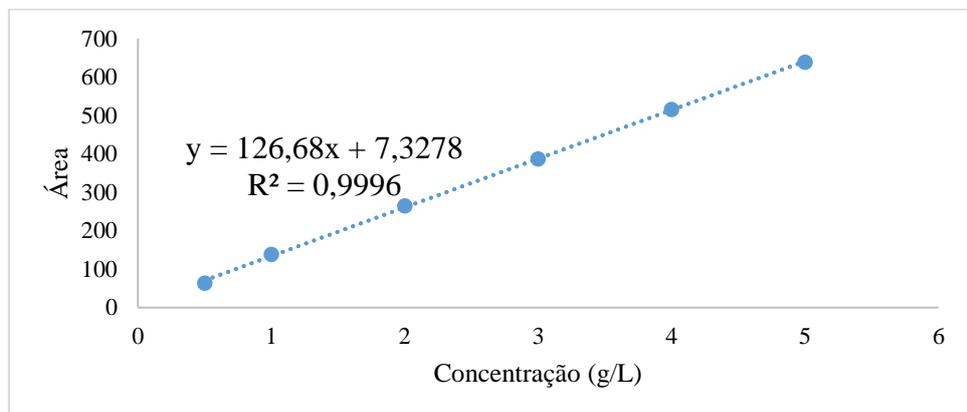
Fonte: Autora (2023).

Figura 20. Curva analítica da frutose.

Fonte: Autora (2023).

Figura 21. Curva analítica do etanol.

Fonte: Autora (2023).

Figura 22. Curva analítica da glicerina.

Fonte: Autora (2023).

Utilizando as curvas analíticas e suas equações como referência, foi possível determinar as concentrações finais dos açúcares relacionados ao processo, e avaliar se houve a produção de etanol. As avaliações foram conduzidas com base nos dados de produção de gás, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos substratos que apresentaram maior e menor produção de gás.

4.2.1. Substrato sacarose: análise da degradação e verificação da produção de etanol

Os resultados derivados das injeções que envolveram a degradação da sacarose e a produção de etanol através da utilização de sacarose como substrato após 26 dias de fermentação, e que foram submetidas à análise, foram apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração inicial e final de sacarose e concentração de etanol na análise de CLAE para o substrato sacarose.

Desempenho*	Concentração inicial (g/L)	Sacarose		Etanol	
		Área	Concentração final (g/L)	Área	Concentração final (g/L)
Superior	25	2165,490	14,76	92,495	1,15
Inferior		3618,106	24,67	0,000	0,23
Superior	50	5791,695	39,50	96,780	1,19
Inferior		6972,285	47,55	0,000	0,23
Superior	75	8317,180	56,73	337,985	3,57
Inferior		9954,230	67,90	0,000	0,23
Superior	100	11667,070	79,58	441,685	1,64
Inferior		11021,090	75,18	142,920	4,59
Superior	125	13782,030	94,01	490,420	5,07
Inferior		13911,000	94,89	501,475	5,18

*: Desempenho do substrato na produção de hidrogênio; Superior: produziu mais hidrogênio; Inferior: produziu menos hidrogênio.

Fonte: Autora (2023).

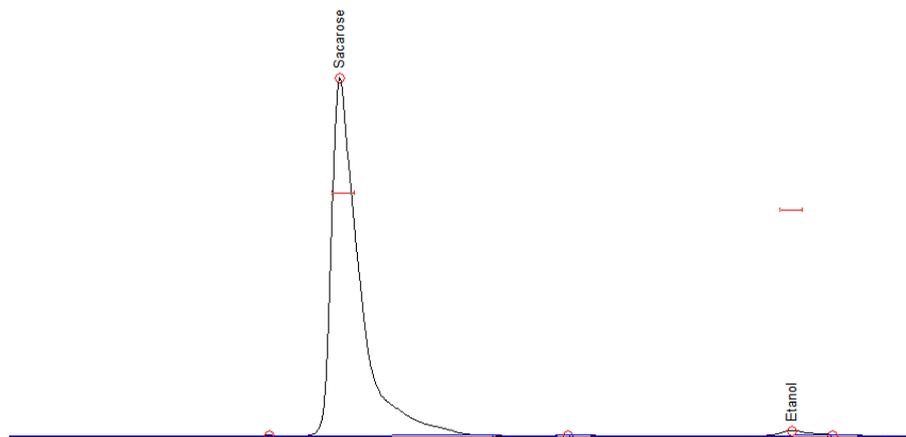
É evidente que nas amostras com um desempenho mais favorável na produção de gás, houve uma degradação mais significativa do substrato, indicada pelo valor inferior de

concentração final. Além disso, é possível deduzir que nessas amostras a produção de etanol foi mais proeminente.

Portanto, o substrato de sacarose se destaca pela produção consideravelmente maior de gás, acompanhada da produção de etanol. Outro aspecto a ser considerado remete à amostra que selecionou a concentração inicial de 100g/L de sacarose, na qual houve a maior produção de gás e produção de etanol.

Para elucidar, a Figura 23 apresenta o cromatograma correspondente à amostra de sacarose com concentração inicial de 100g/L que obteve o melhor desempenho.

Figura 23. Cromatograma líquido da amostra 3 de sacarose 100g/L.



Fonte: Autora (2023).

Observa-se de forma evidente que o pico relativo à sacarose é em maior proporção e em seguida o pico equivalente ao etanol. Esse fenômeno ocorre porque a sacarose e o etanol possuem um índice de refração diferente do solvente utilizado na cromatografia, o que permite a detecção pelo detector de índice de refração. O sinal do detector de índice de refração é influenciado pelas mudanças na concentração das amostras, permitindo sua quantificação.

4.2.2. Substrato caldo de cana: análise da degradação e verificação da produção de etanol

Os resultados provenientes das injeções que abrangeram a degradação dos açúcares presentes nas amostras após 15 dias de fermentação, utilizando caldo de cana como substrato, foram submetidos à análise e estão exibidos na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração final dos açúcares na análise de CLAE para o substrato caldo de cana.

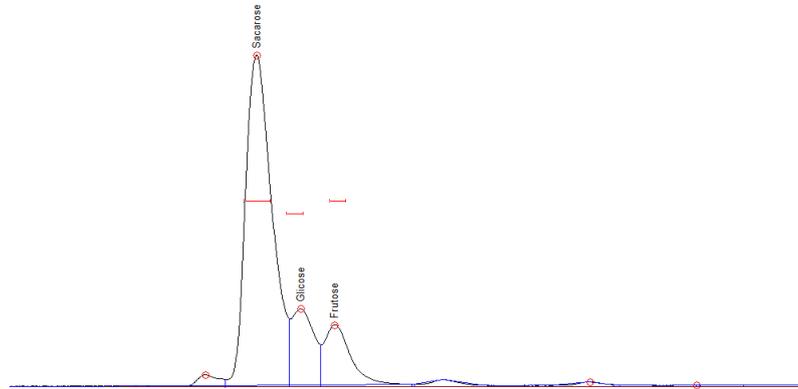
Desempenho*	Processamento	Sacarose		Glicose		Frutose	
		Área	Concentração final (g/L)	Área	Concentração final (g/L)	Área	Concentração final (g/L)
Superior	Com tratamento	16659,7	123,43	3108,6	22,59	2671,1	16,59
Inferior	Com tratamento	17142,0	116,93	3251,4	20,64	2763,7	14,19
Superior	Sem tratamento	17890,1	122,04	3338,5	21,20	2815,7	14,46
Inferior	Sem tratamento	18861,4	128,66	3256,6	20,68	2764,7	14,20

*: Desempenho do substrato na produção de hidrogênio; Superior: produziu mais hidrogênio; Inferior: produziu menos hidrogênio.

Fonte: Autora (2023).

É evidente que os efeitos da quebra dos açúcares presentes no substrato de caldo de cana foram bastante semelhantes, independentemente do tratamento empregado. Além disso, nas amostras com melhor desempenho, foi claramente observada uma maior conversão da sacarose em glicose e frutose.

Conforme representado no cromatograma apresentado na Figura 24, o qual diz respeito à amostra derivada do caldo de cana com tratamento e que demonstrou o desempenho mais eficiente na geração de gás, é possível identificar três picos distintos. O primeiro pico corresponde à sacarose, o segundo está associado à glicose e o terceiro é atribuído à frutose. Portanto, destaca-se que a produção de etanol não foi detectada com o uso do caldo de cana como substrato.

Figura 24. Cromatograma líquido da amostra de caldo de cana com tratamento.

Fonte: Autora (2023).

4.2.3. Substrato glicerina: análise da degradação e verificação da produção de etanol

Por fim, os resultados oriundos das injeções que englobaram a degradação da glicerina após decorridos 26 dias de fermentação, utilizada como substrato, foram submetidos à análise e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração final da glicerina, usada como substrato, na análise de CLAE.

Desempenho*	Concentração inicial do substrato (g/L)	Área	Concentração final do substrato (g/L)
Superior	25	2699,23	21,25
Inferior		3008,15	23,69
Superior	50	5504,36	43,39
Inferior		5525,57	43,56
Superior	75	748,70	5,85**
Inferior		8578,00	67,66
Superior	100	12470,09	98,38
Inferior		12613,68	99,51
Superior	125	13597,91	107,28
Inferior		14604,43	115,23

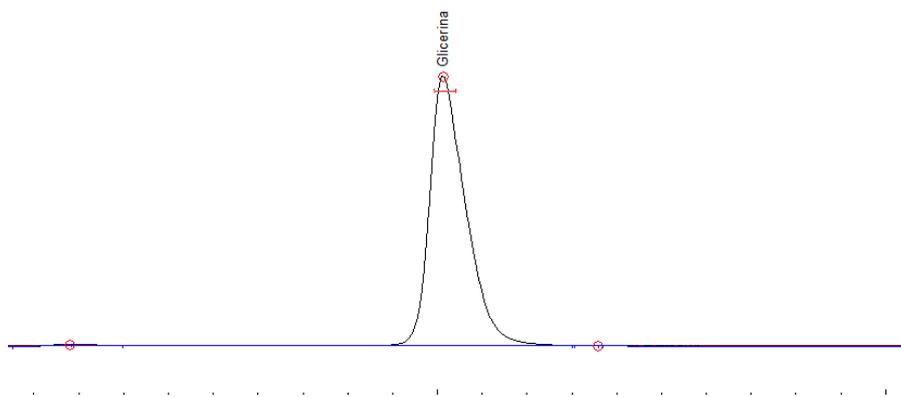
*: Desempenho do substrato na produção de hidrogênio; Superior: produziu mais hidrogênio; Inferior: produziu menos hidrogênio.

** : Possível erro de instrumentação

Fonte: Autora (2023).

De maneira geral, observa-se que o substrato glicerina não sofreu uma degradação eficaz, o que é evidenciado pelas concentrações finais obtidas a partir da curva analítica estabelecida. No entanto, é relevante ressaltar que, mesmo para as concentrações de 75g/L e 125g/L, embora tenha ocorrido uma degradação substancial da glicerina, os resultados não foram acompanhados por uma produção notável de gás, conforme indicado anteriormente. Além disso, não houve formação de etanol. Esses fatos são claramente retratados no cromatograma representado na Figura 25, cujo único pico se refere à glicerina.

Figura 25. Cromatograma líquido da amostra de glicerina 75g/L.



Fonte: Autora (2023).

Portanto, ficou evidente que o substrato de sacarose alcançou a mais alta eficiência na geração de hidrogênio, especialmente na concentração inicial de sacarose de 100g/L, embora também tenha gerado proporcionalmente dióxido de carbono. Além disso, tornou-se visível a degradação do açúcar e o processo fermentativo empregado também revelou a produção de etanol.

Consequentemente, a utilização do substrato caldo de cana, por conter a sacarose, também gerou hidrogênio e gás carbônico na fermentação, o tratamento empregado não demonstrou ser decisivo para a produção. Ao contrastar os resultados obtidos, considerando a concentração inicial de 200g/L de sacarose no caldo de cana com a concentração de 125g/L de sacarose, é possível levantar a hipótese de que uma inibição na produção de gás ocorreu devido ao excesso de substrato.

O substrato glicerina, por sua vez, demonstrou vantagem ambiental em termos de emissão de gás carbônico, mas não foi a opção mais eficiente quando se busca na produção de

hidrogênio. Ficou evidente que não houve uma atividade microbiana relevante utilizando esse substrato, pois a degradação da glicerina foi baixa, o que explica a ausência de gás produzido. Além disso, não houve detecção de etanol na análise.

5. CONCLUSÃO

Nesse contexto, os resultados obtidos nos experimentos destacam claramente a capacidade da bactéria fermentativa *Enterobacter aerogenes* em gerar hidrogênio através de processos fermentativos envolvendo diferentes substratos em diferentes concentrações. Isso ressalta uma perspectiva promissora no contexto da produção de biocombustíveis, enfatizando sua natureza competitiva e ambientalmente sustentável.

O uso do substrato sacarose se sobressaiu, conduzindo a uma geração de hidrogênio, acompanhada da detecção de produção de etanol, com destaque para a concentração de 100g/L. Paralelamente, o emprego do substrato caldo de cana também demonstrou eficiência na produção de hidrogênio, embora não tenha ocorrido a formação de etanol. Essa evidência sugere a viabilidade de integração com a indústria sucroalcooleira para a geração de hidrogênio, aproveitando os resíduos originados nesse setor.

Contudo, no caso da glicerina, a degradação não se mostrou efetiva, constatando a baixa atividade microbiana nesse substrato. Logo, apesar de se destacar com a menor emissão de gás carbônico, a geração de hidrogênio foi pouco significativa e não houve produção de etanol no processo.

Assim, é possível concluir que os substratos sacarose e caldo de cana utilizados na fermentação anaeróbia com *Enterobacter aerogenes* exerceram um papel crucial na produção de gás. Isso se deve ao fato de que a bactéria decompõe as cadeias de carbono dos substratos para gerar hidrogênio.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. M. M.. **Produção de hidrogênio a partir da reforma em fase líquida do glicerol sobre catalisadores baseados em perovskitas**. Dissertação de Mestrado. Salvador, BA: UFBA, 2011.

AZWAR, M. Y.; HUSSAIN, M. A.; ABDUL-WAHAB, A. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Malásia, v. 31, p. 158-173, 2014.

BALAT, M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. **International Journal of Hydrogen Energy**. Turquia, v. 33, p. 4013-4029, 2008.

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

BÁRCIA, Giovanna Serra; COSTA, Thaysla Evellin de Queiroz; CARVALHO, Roberto Bentes de. FEL 1: projeto conceitual de uma planta de produção de amônia a partir do biometano. **Brazilian Journal Of Development**, v. 9, n. 6, p. 20086-20109, 15 jun. 2023.

BNDES, Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Hidrogênio de baixo carbono: oportunidades para o protagonismo brasileiro na produção de energia limpa. Rio de Janeiro, 2022.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis**. Brasília, 2020.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713– 6733, 2016.

CAPA, A.; GARCÍA, R.; CHEN, D.; RUBIERA, F.; PEVIDA, C.; GIL, M.V. On the effect of biogas composition on the H₂ production by sorption enhanced steam reforming (SESR). **Renewable Energy**. Espanha, v. 160, p. 575-583, 2020.

CARVALHO, G. M. **Análise da produção de hidrogênio por eletrólise sob diferentes tensões**. Trabalho de Conclusão de Curso. Caraúbas, RN: Universidade Federal Rural do Semiárido, 2017.

CHAGAS, A. L. S. Biocombustíveis. Economia de baixo carbono: avaliação de impactos de restrições e perspectivas tecnológicas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

DUARTE, Diego José Miranda; FERREIRA, Ítalo Rodolfo Costa; CRUZ, André Adriano da Silva. Tecnologia Contendo Células de Combustível a Hidrogênio no Toyota Mirai. Recife, PE: UniFG, 2023.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2021: Ano base 2020**. Rio de Janeiro, 2021a.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **Nota técnica: Bases para a Consolidação da Estratégia Brasileira do Hidrogênio**. Rio de Janeiro, 2021b.

EPE, Empresa De Pesquisa Energética. **Neutralidade de carbono até 2050: Cenários para uma transição eficiente no Brasil**. Programa de Transição Energética, 2023a.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. **ABCDEnergia**, 2023b. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/pt/ABCDEnergia>>. Acesso em: 24/06/2023.

FARIAS, Leonel Marques; SELLITO, Miguel Afonso. Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 12, n. 17, p. 01-106, 2011.

FERNANDES, Bruna Soares. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo**. Tese de Doutorado. São Carlos, SP: Escola de Engenharia de São Carlos, 2008.

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

GÖTTTFERT, Felix. **Theoretical Considerations and Experimental Observations on Heat Transfer in Hydrogen Direct Reduced Iron**. Degree Project in Materials Science and Engineering - KTH Royal Institute of Technology. Estocolmo, 2023.

GUARIEIRO, L. L. N., ANDRADE, J., 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**. Brasil, v. 33, p. 844-869, 2022.

IEA, Internacional Energy Agency. **CO₂ Emissions in 2022**. França, 2023. Disponível em: <<https://iea.blob.core.windows.net/assets/3c8fa115-35c4-4474-b237-1b00424c8844/CO2Emissionsin2022.pdf>>. Acesso em: 27/06/2023.

IEA, Internacional Energy Agency. **Net Zero by 2050: a roadmap for the global energy sector**. Paris, 2021. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/net-zero-by-2050>>. Acesso em: 27/07/2023.

IEA, Internacional Energy Agency. **The Future of Hydrogen**. Paris, 2019. Disponível em: <https://iea.blob.core.windows.net/assets/9e3a3493-b9a6-4b7d-b499-7ca48e357561/The_Future_of_Hydrogen.pdf>. Acesso em: 12/07/2023.

IEA, Internacional Energy Agency. **World Energy Outlook 2022**. Paris, 2022. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2022>>, License: CC BY 4.0 (report); CC BY NC SA 4.0 (Annex A). Acesso em: 08/06/2022.

KIM, Sang-Hyoun; KUMAR, Gopalakrishnan; CHEN, Wei-Hsin; KHANAL, Samir Kumar. Renewable hydrogen production from biomass and wastes (ReBioH₂-2020). **Bioresource Technology**, v. 331, 2021.

LIMA, T. P. R. **Viabilidade Técnico-Econômica da Produção de Metanol Via Hidrogenação do CO₂**. Trabalho de Conclusão de Curso. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2023.

MACHADO, Rafaela Gonçalves. **Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação empregando cultura pura e co-cultura**. Dissertação de Mestrado. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

MENEZES, C.A. **Produção de hidrogênio e compostos de valor agregado em reatores de leito granular expandido mesofílicos a partir do caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

NANDA, S.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Canadá, v. 50 (C), p. 925-941, 2015.

NUNES, Danilo Henrique; COELHO, Nuno Manoel Morgadinho dos Santos. Do possível reconhecimento de status de supralegalidade aos tratados internacionais em matéria ambiental: análise da ADPF nº708. **Revista Direitos Humanos e Democracia**. Editora Unijui, v. 11, n. 21, 2023.

OLIVEIRA, Paula Mayumi. **Produção de metanol através da reciclagem química de CO₂ e H₂: Combustível renovável a partir de gases de efeito estufa**. Trabalho de Conclusão de Curso. São Paulo, SP: Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2021.

OLIVEIRA, R. C. **Panorama do Hidrogênio no Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). Rio de Janeiro, 2022.

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

PEREIRA, C.A.; COELHO, P. M.; FERNANDES, J.F.; GOMES, M.H. Study of an energy mix for the production of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**. Portugal, v. 42, p. 1375-1382, 2017.

PINHEIRO, R. S. **Processos de inovação tecnológica para a glicerina produzida no processo de obtenção do biodiesel no Brasil**. Dissertação de Mestrado. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

PUGA, Mariana dos Santos. **Avanços e limitações da produção, armazenamento e transporte de hidrogênio verde**. Trabalho de Conclusão de Curso. Santos, SP: UFSP, 2023.

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, 2011.

SÁ, Lívian R. Vasconcelos de; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S.. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SANTOS, Fernando Miguel Soares Mamede dos; SANTOS, Fernando António Castilho Mamede dos. O COMBUSTÍVEL “HIDROGÉNIO”. 2004. Disponível em: <<https://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/435/1/Combust%C3%ADvel%20hidrog%C3%A9nio.pdf>>. Acesso em: 11/07/2023.

SIVARANJANI, R.; VEERATHAI, S.; JENIFER, K. Jeoly; SOWMIYA, K.; RUPESH, K.J.; SUDALAI, S.; ARUMUGAM, A.. A comprehensive review on biohydrogen production pilot scale reactor technologies: sustainable development and future prospects. **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 62, p. 23785-23820, 2023.

SOUZA, I. T. **Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia: enriquecimento nutricional e influência da luminosidade**. Dissertação de Mestrado. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

TOLMASQUIM, Mauricio T.; GUERREIRO, Amilcar; GORINI, Ricardo. Matriz energética brasileira: uma prospectiva. **Novos Estudos - Cebrap**, n. 79, p. 47-69, 2007.

TORRES, J. N. M. **Produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana de açúcar por via fermentativa anaeróbia**. Dissertação de Mestrado. Maceió, AL: UFAL, 2018.

USEPA, Environmental Protection Agency. **Economics of Biofuels**. U.S., Washington, DC, 2018. Disponível em: <<https://www.epa.gov/environmental-economics/economics-biofuels>>. Acesso em: 09/06/2023.

VIDAL, Maria de Fátima. Desempenho recente do setor sucroalcooleiro nordestino. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste (ETENE), Banco do Nordeste do Brasil (BNB), 2019.

ZHANG, Chong; LV, Feng-Xiang; XING, Xin-Hui. Bioengineering of the Enterobacter aerogenes strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 18, p. 8344-8349, 2011.