UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

LÉO CRISTHIAN PENA SILVA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DE CO-FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA E HIDROLISADO HEMICELULÓSICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MISTURA

Recife
2025
LÉO CRISTHIAN PENA SILVA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DE CO-FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA E HIDROLISADO HEMICELULÓSICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MISTURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra

Coorientador (a): Me. Henrique Honorato de Souza

Recife

2025

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

Silva, Léo Cristhian Pena.
Produção de biohidrogênio a partir de co-fermentação da vinhaça e hidrolisado hemicelulósico em diferentes concentrações de mistura / Léo Cristhian Pena Silva. - Recife, 2025.
50 : il., tab.

Orientador(a): Emmanuel Damilano Dutra
Cooorientador(a): Herique Honorato de Souza
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2025.
9,65.
Inclui referências.

1. fermentação escura. 2. biorrefinaria. 3. bioenergia. 4. resíduos agroindustriais. 5. consórcio microbiano. 6. biocombustíveis. I. Dutra, Emmanuel Damilano. (Orientação). II. Souza, Herique Honorato de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

LÉO CRISTHIAN PENA SILVA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DE CO-FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA E HIDROLISADO HEMICELULÓSICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MISTURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 21/03/2025

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Allan de Almeida Albuquerque

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Às fontes de fomento à ciência no Brasil – CNPq e PROPESQI –, que me proporcionaram a experiência de atuar como cientista. A todo o grupo da PROAES, pelas assistências estudantis, que me permitiram permanecer em Pernambuco e concluir minha graduação na área que amo.

Ao meu orientador, Emanuel Damilano Dutra, por aceitar me guiar nessa jornada, pelos aconselhamentos e por receber a mim e ao meu grupo de pesquisa com tanta generosidade no LABEMA.

Não poderia deixar de mencionar a Profa. Bruna Soares Fernandes, minha antiga orientadora de PIBIC e amiga. Profa. Bruna, obrigado por acreditar em mim como pesquisador, por me guiar nessa trajetória e por toda a paciência. Carrego você como uma grande mentora e amiga.

Agradeço ao meu melhor amigo e irmão de alma, Paulo Gomes. Sem você, minha vinda a Pernambuco não teria acontecido. Sou eternamente grato a você e à sua família pela receptividade, pelo carinho e pelo amor. Graças a você, construí uma trajetória linda em um estado completamente diferente do meu, onde conheci pessoas fundamentais para meu crescimento pessoal.

Ao meu namorado e melhor amigo, Paulo “Dias”, com quem sou uma pessoa melhor e mais completa. Obrigado pelo amor, paciência, conselhos e por acreditar em mim mais do que eu mesmo. Te amo.

Ao grupo BioValue, onde construí laços de amizade e muito conhecimento enquanto trilhávamos juntos um caminho árduo em nossas pesquisas. A Henrique, por topar ser meu coorientador, amigo para todas as horas e um cientista incrível em quem me espelho. À mestre Rebeca, por toda a ajuda e paciência com minhas dúvidas, além da amizade genuína. A Renan, pelo companheirismo no laboratório e na vida, sorte de quem tem você como amigo. A Vanessa, por estar ao meu lado desde o início da IC, sempre otimista e leal. A Eduarda, pelas boas risadas, pelas conversas de “gateiros” e pela parceria na bancada. A Maria Luisa, por todo o carinho e empatia comigo desde o começo. A Mislane, pelas boas conversas e pela troca de conhecimentos. A Kaline, por compartilhar seus aprendizados, apoio e ser uma boa para gatinhos também.

A todos os meus amigos de Pernambuco, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro: sem essa rede de amizade, eu não teria tido forças para enfrentar uma mudança tão

grande. Sou imensamente grato a cada um de vocês por acreditarem em mim e me tornar alguém mais forte. A Eduardo Bressan e Pedro Rosalba, pelas calls diárias no Discord: encontrei em vocês uma amizade que rompeu as fronteiras da internet. Obrigado pelo encorajamento, pela grande paciência comigo e pelo apoio incondicional. Estarei sempre aqui por vocês.

À minha família, meu alicerce de amor e apoio incondicional. Especialmente às mulheres da minha vida, que sempre serão fonte de inspiração e força. À minha mãe e melhor amiga, Cristina, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Ao meu pai, Leandro, por confiar no meu potencial. Aos meus avós e avôs – Jussara, Vada, Adão e Tarugo. À minha avó especial, vó Marlene, uma guerreira em quem me espelho. Às minhas tias, Cristiane e Vanessa, por cuidarem tão bem de mim. Ao meu irmão, Ainran, por quem busco sempre evoluir, para poder ajudá-lo e aconselhá-lo.

Agradeço à minha banca avaliadora por aceitarem meu convite para este momento tão especial: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra, Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler e Prof. Dr. Allan de Almeida Albuquerque.

Por fim, mas não menos importante, às minhas gatas, que estão comigo nos melhores e piores momentos. Caribe e Medusa, amo vocês de um jeito impossível de mensurar.

RESUMO

Pernambuco, um dos maiores produtores de etanol do Nordeste, enfrenta desafios com o acúmulo de subprodutos como vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Este estudo avaliou a produção de biohidrogênio (H_2) via fermentação escura, utilizando vinhaça e hidrolisado hemicelulósico (HH) em diferentes proporções (0-100% HH) e cargas orgânicas (7 a 17 gDQO/L), com inóculos termicamente tratados (90°C/10 min): lodo UASB e mistura de lodo de lagoa + lodo de reator anaeróbio em escala piloto que trata resíduos de alimentos (“Chicão”). O lodo UASB destacou-se em alta carga (17 gDQO/L), registrando 75,32% de H_2 no biogás e 177,53 NmL H_2/gSTV, sendo a monofermentação de vinhaça mais promissora. Já a mistura lodo de lagoa + "Chicão" alcançou 398,81 NmL H_2/gSTV em baixa carga (7 gDQO/L), mas sua eficiência caiu para 296,50 NmL H_2/gSTV em alta carga, devido à presença de materiais inertes. A relação C:N (~20:1) e o pré-tratamento térmico (que teve papel de inibir as arqueias metanogênicas.) foram críticos para otimizar a produção. Este estudo demonstrou que a monofermentação de vinhaça com lodo UASB é uma estratégia promissora para produção de H_2, enquanto a cofermentação com HH demanda ajustes operacionais. O estudo reforça o potencial de biorrefinarias integradas, porém destaca a necessidade de automação e escalonamento para aplicação industrial.

Palavras-chave: fermentação escura; biorrefinaria; resíduos agroindustriais; consórcio microbiano; pré-tratamento térmico; eficiência energética.

ABSTRACT

Pernambuco, one of the largest ethanol producers in the Northeast of Brazil, faces challenges with the accumulation of by-products such as vinasse and sugarcane bagasse. This study evaluated the production of biohydrogen (H_2) via dark fermentation, using vinasse and hemicellulosic hydrolysate (HH) in different proportions (0-100% HH) and organic loads (7 to 17 gCOD/L), with thermally treated inocula (90°C/10 min): UASB sludge and a mixture of lagoon sludge + pilot-scale anaerobic reactor sludge treating food waste ("Chicão"). The UASB sludge stood out at high load (17 gCOD/L), recording 75.32% H_2 in the biogas and 177.53 NmL H_2/gVTS, with vinasse monofermentation being more promising. The lagoon sludge + "Chicão" mixture achieved 398.81 NmL H_2/gVTS at low load (7 gCOD/L), but its efficiency dropped to 296.50 NmL H_2/gVTS at high load, due to the presence of inert materials. The C:N ratio (~20:1) and thermal pretreatment (which played a role in inhibiting methanogenic archaea) were critical to optimizing production. This study demonstrated that vinasse monofermentation with UASB sludge is a promising strategy for H_2 production, while co-fermentation with HH requires operational adjustments. The study reinforces the potential of integrated biorefineries but highlights the need for automation and scaling for industrial application.

Keywords: dark fermentation; biorefinery; agro-industrial waste; microbial consortium; thermal pretreatment; energy efficiency.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**9**
2	**OBJETIVOS**	**11**
3	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	**12**
3.1	SETOR SUCROENERGÉTICO BRASILEIRO	12
3.2	VINHAÇA	13
3.3	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	14
3.4	HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	15
3.5	DIGESTÃO ANAERÓBIA	16
3.6	FERMENTAÇÃO ESCURA	17
3.7	BIOHIDROGÊNIO	19
3.8	COFERMENTAÇÃO ANAERÓBICA	20
4	**METODOLOGIA**	**20**
4.1	SUBSTRATOS	21
4.2	INÓCULOS (LODO)	21
4.2.1	*LODO DE LAGOA*	*22*
4.2.2	*LODO "CHICÃO"*	*23*
4.2.3	*LODO UASB*	*24*
4.3	TRATAMENTO TÉRMICO DO INÓCULO	24
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E INÓCULO	25
4.5	PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO: METODOLOGIA EXPERIMENTAL	26
4.6	ANÁLISE DOS GASES E MEDIÇÃO DE PRESSÃO	28
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**29**
5.1	PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO: CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS	32
5.2	PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO NOS DIFERENTES INÓCULOS	35
5.3	PRODUÇÃO COMPARATIVA DE H_2: LODO UASB VS. LODO DE LAGOA + "CHICÃO"	41
6	**CONCLUSÃO**	**42**
6.1	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	43
7	**REFERÊNCIAS**	**44**

1. INTRODUÇÃO

No contexto nordestino, Pernambuco se destaca entre os principais produtores de etanol, atividade que gera subprodutos como a vinhaça e o bagaço de cana-de-açúcar em escala significativa. Conforme dados do Sindicato da Indústria do Açúcar e do Álcool de Pernambuco (Sindaçúcar - PE), a safra 2022/2023 registrou 363 milhões de litros de etanol, resultando na geração anual de aproximadamente 3,5 bilhões de litros de vinhaça – resíduo líquido produzido na proporção de 10 a 14 litros por litro de etanol. O descarte inadequado desse efluente pode comprometer ecossistemas, devido à sua alta carga orgânica e potencial de contaminação de solos e corpos hídricos.

Além da vinhaça, outro subproduto é o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo sólido obtido na moagem, que corresponde a cerca de 250-280 kg por tonelada processada. Embora tradicionalmente utilizado para cogeração de energia, pesquisas recentes exploram seu potencial em processos como a biodigestão anaeróbia, visando à produção de biocombustíveis (COELHO, 2018; BERGMANN et al., 2018; FOLHA DE PERNAMBUCO, 2024). Diante desse cenário, o desenvolvimento de tecnologias capazes de converter esses resíduos em recursos energéticos, reduzindo impactos ambientais, torna-se estratégico, com ênfase em soluções baseadas em processos biológicos de alta eficiência.

Essa busca por eficiência energética ganha ainda mais relevância quando se considera o potencial do bagaço para a produção de etanol de segunda geração (2G). Entretanto, sua biomassa lignocelulósica apresenta alta resistência à degradação natural, demandando a aplicação de pré-tratamentos específicos que auxiliem na separação de seus constituintes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Como consequência desse processo, gera-se duas frações: uma sólida, direcionada à produção do etanol 2G, e outra líquida, denominada hidrolisado hemicelulósico. Embora a fração líquida seja rica em compostos orgânicos e tenha potencial para a geração de biogás, ela apresenta limitações, como o baixo teor de nutrientes (ADARME et al., 2019; RIBEIRO et al., 2017; SILVA et al., 2013; ZHANG, 2019).

Diante desse desafio, conforme discutido por Agarwal et al. (2023), o pré-tratamento hidrotérmico tem mostrado resultados promissores na biodigestão do hidrolisado, pois reduz a presença de compostos inibidores que podem comprometer o desempenho do processo. Vale ressaltar que o hidrolisado hemicelulósico (HH) é

obtido durante os pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana, que podem incluir o uso de ácidos em diferentes concentrações, explosão a vapor ou auto-hidrólise. Essas técnicas têm como objetivo isolar os principais componentes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) e converter a celulose em açúcares fermentáveis, como glicose e xilose, essenciais para a produção de etanol (MORAES et al., 2015; ADARME et al., 2019).

Paralelamente ao aproveitamento do bagaço, outra frente de pesquisa envolve a vinhaça, resíduo líquido gerado em grandes volumes pelo setor sucroenergético. Sua composição rica em matéria orgânica, com altos níveis de carbono e nitrogênio, torna-a um substrato promissor para processos de fermentação anaeróbica. Contudo, sua aplicação como fertilizante via fertirrigação, prática comum no setor agrícola, pode levar a problemas ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa (GEE) e a contaminação de lençóis freáticos (COELHO, 2018).

Nesse contexto, surge o biohidrogênio (H_2) como alternativa estratégica, produzido via fermentação escura, com alto poder calorífico (142 MJ/kg) e potencial para mitigar emissões de carbono, uma vez que sua combustão gera apenas água e energia térmica (SAZALI, 2020; YANG et al., 2014). No entanto, sua cadeia produtiva não é totalmente neutra: etapas como o pré-tratamento térmico de substratos (vinhaça e hidrolisado hemicelulósico) demandam energia, gerando impactos indiretos. A solução para esse impasse, conforme destacado por Volpi et al. (2024), está na co-fermentação desses resíduos, que otimiza a relação C:N e supera limitações como a presença de inibidores (ex.: furfural no hidrolisado), graças à ação de consórcios microbianos adaptados que convertem matéria orgânica em H_2 com eficiência. Essa integração entre processos biológicos e aproveitamento de subprodutos industriais reforça o papel do biohidrogênio como pilar de uma biorrefinaria sustentável, alinhada à economia circular.

O uso da biomassa da indústria sucroenergética na geração de energia renovável apresenta benefícios notáveis, incluindo custos de implantação mais baixos em comparação com outras fontes de energia limpa, além de contribuir para a sustentabilidade dos recursos convencionais de produção energética (RAO et al., 2010). Apesar de haver muitos estudos sobre a digestão anaeróbia de subprodutos do setor, ainda existem lacunas importantes, especialmente no que diz respeito à combinação da vinhaça com o hidrolisado hemicelulósico no mesmo processo de digestão (BAÊTA et al., 2016; ADARME et al., 2019).

A utilização de consórcios microbianos mistos na fermentação escura é estratégica para otimizar a produção de biohidrogênio, especialmente em substratos complexos como vinhaça e hidrolisado hemicelulósico. Esses consórcios combinam a atividade sinérgica de bactérias fermentativas (ex.: Clostridium spp.), arqueias acidogênicas e microrganismos facultativos, que atuam em diferentes etapas da degradação da matéria orgânica. A diversidade microbiana permite maior adaptabilidade a variações de pH, carga orgânica e presença de inibidores (ex.: furfural), além de suprimir arqueias metanogênicas indesejadas – um desafio crítico em processos de fermentação escura (LEVIN et al., 2006; MOHANAKRISHNA et al., 2024).

Estudos demonstram que consórcios enriquecidos termicamente (ex.: pré-tratamento a 90°C por 10 minutos) aumentam a dominância de esporulantes como *Clostridium* (MAINTINGUER et al., 2008). Essa abordagem, aliada à complementaridade nutricional dos substratos, posiciona os consórcios mistos como núcleo central deste trabalho, alinhando-se a tendências globais de biorrefinarias integradas.

As investigações realizadas no Laboratório de Bioenergia e Meio Ambiente (LABEMA) concentram-se no desenvolvimento de consórcios microbianos que sejam capazes de processar concentrações elevadas de vinhaça e HH. A cofermentação desses resíduos, avaliada sob diferentes condições, juntamente com o uso de fermentação escura em batelada sequencial, ainda é pouco abordada na literatura. Este projeto buscou explorar esses elementos, focando na otimização dos processos de fermentação escura por meio da combinação de vinhaça e hidrolisado hemicelulósico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biohidrogênio por diferentes consórcios microbianos de cultura mista, utilizando vinhaça e hidrolisado hemicelulósico em diferentes concentrações de mistura e cargas orgânicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho de diferentes inóculos (lodo UASB versus a combinação de lodo de lagoa com lodo de reator anaeróbio em escala piloto que trata resíduos de poda e restos de comida) na produção de biohidrogênio.
- Investigar o efeito de distintas proporções de mistura entre vinhaça e hidrolisado hemicelulósico sobre a eficiência da fermentação escura.
- Caracterização dos substratos e inóculos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SETOR SUCROENERGÉTICO BRASILEIRO

O setor sucroalcooleiro desempenha um papel fundamental na economia brasileira, representando 2% do PIB nacional e consolidando o Brasil como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FRENTE PARLAMENTAR DA AGROPECUÁRIA, 2023). Nesse contexto, o setor sucroenergético brasileiro se destaca pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, promovendo práticas sustentáveis que contribuem para a substituição de combustíveis fósseis na geração de energia.

Os combustíveis fósseis, por sua vez, não são renováveis e possuem características prejudiciais ao meio ambiente, sendo responsáveis pela emissão de gases de efeito estufa (GEEs), os quais intensificam as mudanças climáticas. A abordagem de biorrefinaria de resíduos surge como uma solução para esses desafios, ao promover uma bioeconomia circular sustentável. Essa estratégia visa o aproveitamento de resíduos para a geração de bioenergia e a produção de bioprodutos, alinhando-se aos princípios da sustentabilidade e inovação tecnológica (LEONG et al., 2021; RIBEIRO et al., 2024; TOMASINI et al., 2023).

O etanol pode ser classificado como de primeira ou segunda geração. O etanol de primeira geração (1G) é produzido a partir de matérias-primas básicas, como a cana-de-açúcar, enquanto o etanol de segunda geração (2G) é obtido a partir dos subprodutos gerados durante o processo de produção do etanol 1G (OLIVEIRA et al., 2020). Um dos subprodutos mais conhecidos nesse contexto é a vinhaça, cuja

geração alcança cerca de 10 a 14 litros para cada litro de etanol produzido (HOARAU et al, 2018).

A vinhaça é comumente utilizada como fertilizante, por meio da fertirrigação de campos agrícolas. No entanto, esse uso pode gerar problemas ambientais, como o acúmulo excessivo de nutrientes no solo e a lixiviação, que pode contaminar corpos d'água. De forma alternativa, a vinhaça pode ser empregada para a produção de biogás por meio do processo de digestão anaeróbia, oferecendo uma solução ambientalmente sustentável para o aproveitamento desse resíduo (ADARME et al. 2019; HOARAU et al. 2018).

3.2 VINHAÇA

A vinhaça é um resíduo de coloração marrom escura, com baixo pH (entre 3,5 e 5), que apresenta alta complexidade devido à presença de compostos orgânicos e inorgânicos em concentrações elevadas. Sua composição inclui compostos fenólicos, como os ácidos húmico e tânico, melanoidinas, caramelo e componentes furfurais, que contribuem para sua coloração intensa e dificultam sua degradação. Para cada 1 litro de etanol produzido, são gerados de 10 a 14L de vinhaça. (REIS et al. 2015; SINDAÇÚCAR - PE)

Além disso, a vinhaça é caracterizada por uma alta demanda química de oxigênio (DQO), podendo atingir até 140 g/L, e possui odor desagradável. É rica em nutrientes como nitrogênio (até 4,2 g/L), fósforo (até 3,0 g/L) e potássio (até 17,5 g/L). Suas características específicas variam de acordo com a matéria-prima utilizada na produção. (HOARAU et al., 2018)

A vinhaça tem sido amplamente empregada na fertirrigação de plantações de cana, atuando como fonte de fertilizantes naturais. Contudo, essa prática está associada a impactos ambientais, como a contaminação de lençóis freáticos, alterações na qualidade do solo e emissões de gases de efeito estufa, como metano e óxido nitroso, durante seu armazenamento e transporte (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A digestão anaeróbica surge como uma alternativa eficiente para reduzir esses impactos, transformando a matéria orgânica da vinhaça em energia renovável e biofertilizantes. Além de conter elementos-traço essenciais para o desenvolvimento microbiano, a vinhaça apresenta grande potencial para integrar sistemas de digestão

anaeróbica, funcionando tanto como solução ambiental quanto como estratégia para agregar valor à cadeia produtiva da cana-de-açúcar, favorecendo a diversificação e a sustentabilidade no contexto das biorrefinarias. (REIS et al. 2015; HOARAU et al. 2018; JANKE et al., 2016)

3.3 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos subprodutos mais abundantes da indústria sucroalcooleira. Essa biomassa lignocelulósica é amplamente produzida no Brasil e desempenha um papel relevante na geração de energia em biorrefinarias. Embora uma parte significativa seja queimada em caldeiras para atender às demandas energéticas internas dessas indústrias, o volume gerado excede a demanda da usina, levando a estudar alternativas para lidar com este subproduto.

Atualmente o bagaço é utilizado como substrato na produção de etanol 2G, entretanto o processo demanda etapas de pré-tratameto para separação da hemicelulose da celulignina. A fração hemicelulósica do bagaço apresenta resistência à degradação natural, o que limita sua conversão direta em etanol. Na produção de etanol de segunda geração, o bagaço de cana é utilizado como matéria-prima. No entanto, devido à necessidade de pré-tratamentos como hidrólise ácida ou hidrotérmica, a produção desse biocombustível ainda é limitada em comparação ao etanol de primeira geração. Como subproduto desse processo, gera-se o hidrolisado hemicelulósico (HH), cujo destino final precisa ser estudado para viabilizar sua aplicação sustentável. Uma alternativa promissora para seu aproveitamento é a digestão anaeróbia, que permite a conversão do HH em biohidrogênio e outros bioprodutos, integrando-se a processos de biorrefinaria (VIVIAN et al., 2022; JOPPERT et al., 2017; SILVA et al., 2013).

O bagaço de cana tem se destacado como uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, devido à sua elevada concentração de celulose e à ampla disponibilidade. Para viabilizar a produção eficiente de bioetanol, o pré-tratamento é uma etapa fundamental. Esse processo visa remover a lignina, que é altamente recalcitrante, e aumentar a acessibilidade da celulose às enzimas utilizadas na hidrólise. O bagaço é submetido a etapas sequenciais de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação, sendo que as duas últimas etapas geralmente ocorrem

simultaneamente, um processo conhecido como sacarificação e fermentação simultâneas (SUN et al., 2004).

Entre os métodos de pré-tratamento, o pré-tratamento hidrotérmico destaca-se por promover a hidrólise da hemicelulose e a desestruturação parcial da lignina, aumentando a acessibilidade da celulose e liberando açúcares fermentescíveis para a digestão anaeróbia. Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico pode ser utilizado na formação de biohidrogênio por meio da fermentação escura, também conhecida como fermentação acidogênica de biomassa lignocelulósica (ESKICIOGLU et al., 2017).

3.4 HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O hidrolisado hemicelulósico (HH), também conhecido como licor de pentoses, é um subproduto líquido obtido durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar. Esse processo promove a solubilização da fração hemicelulósica, liberando açúcares como xilose, arabinose e pequenas quantidades de glicose, que podem ser utilizados como substratos em diversos processos biotecnológicos. No entanto, a composição do HH também inclui compostos inibitórios, como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácidos orgânicos, que podem dificultar a aplicação direta em processos fermentativos, especialmente devido ao impacto negativo no crescimento microbiano (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; TOMASINI et al., 2023; DIAS et al., 2013).

No contexto de biorrefinarias, o HH representa um recurso valioso para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Sua utilização na digestão anaeróbica, por exemplo, pode gerar biohidrogênio, um combustível sustentável, além de metano. Nessas condições, os açúcares presentes no HH são metabolizados por microrganismos durante a fase acidogênica, gerando subprodutos como ácidos graxos voláteis, que servem como intermediários para a produção de gás metano na etapa subsequente (TOMASINI et al., 2023).

A integração do HH em processos de co-fermentação anaeróbica, como no caso da vinhaça, potencializa o aproveitamento de resíduos agroindustriais, promovendo a sustentabilidade do setor sucroenergético. Apesar dos desafios associados à presença de inibidores, estratégias como detoxificação e seleção de microrganismos adaptados vêm sendo desenvolvidas para superar essas limitações, reforçando o papel do HH como uma importante matéria-prima para tecnologias de

produção de energia renovável (TOMASINI et al., 2023; DIAS et al., 2013; BAÊTA et al., 2016).

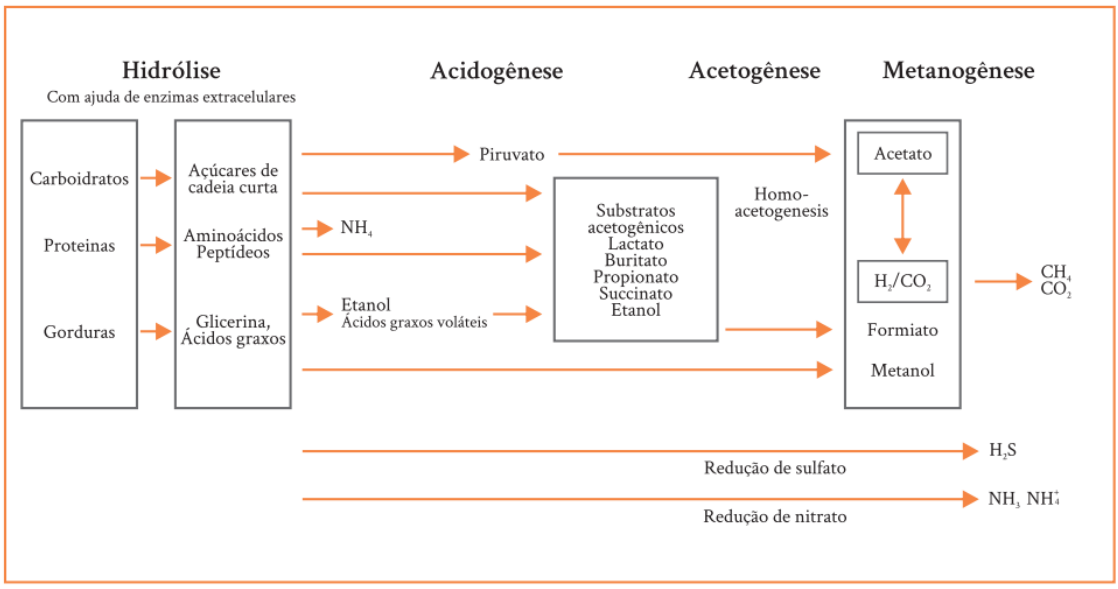
3.5 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo biológico que transforma matéria orgânica em biogás, composto principalmente por metano e dióxido de carbono, e ocorre na ausência de oxigênio. Esse processo utiliza resíduos orgânicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, vinhaça e hidrolisado hemicelulósico (HH), sendo uma alternativa sustentável para o reaproveitamento desses materiais no setor sucroenergético. Ele depende de uma comunidade microbiana diversificada que atua de forma sintrófica, sendo dividido em quatro fases principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (BAÊTA et al., 2016).

Cada etapa envolve diferentes grupos de microrganismos, que desempenham papéis específicos e requerem condições ambientais adequadas para assegurar a eficiência do processo. Na fase de hidrólise, macromoléculas complexas, como proteínas, lipídios e carboidratos, são quebradas em moléculas menores e solúveis. Em seguida, ocorre a acidogênese, na qual esses produtos são convertidos em ácidos orgânicos voláteis (AGVs), como ácido acético e butírico, além de hidrogênio e dióxido de carbono. Na acetogênese, os AGVs de cadeia longa são transformados em compostos mais simples, como acetato, H_2 e CO_2, preparando os substratos para a última etapa, a metanogênese. Durante a metanogênese, arqueas metanogênicas convertem acetato, hidrogênio e dióxido de carbono em metano, um biocombustível com alto valor energético (KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019).

O processo oferece vantagens significativas, como a redução de resíduos orgânicos e a produção de energia renovável. No entanto, é sensível a fatores como pH, temperatura e presença de inibidores, o que exige um controle rigoroso das condições operacionais para maximizar a eficiência e estabilidade do sistema. A digestão anaeróbica é amplamente reconhecida como uma tecnologia promissora para o tratamento de resíduos e a produção sustentável de biocombustíveis, alinhando-se às demandas por energia renovável e manejo responsável de resíduos agroindustriais. (KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019).

Figura 1 – Esquema exemplificando as etapas da digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Deublein e Steinhauser (2011).

3.6 FERMENTAÇÃO ESCURA

A fermentação escura é uma tecnologia biológica promissora para a produção de hidrogênio, destacando-se pela alta eficiência na conversão de resíduos orgânicos ricos em carboidratos, especialmente biomassa lignocelulósica. Esse processo ocorre na ausência de oxigênio e luz, com microrganismos anaeróbios degradando compostos orgânicos para gerar biohidrogênio. Além de ser uma alternativa sustentável e de baixo custo energético, a eficiência da fermentação depende de fatores como o teor de carboidratos do substrato e o pH do sistema. Apesar dos desafios relacionados à formação de subprodutos inibitórios, avanços como o pré-tratamento de substratos e a otimização de biorreatores vêm aprimorando a produtividade. (AHMAD et al., 2024)

A eficiência da fermentação escura está diretamente relacionada à composição e dinâmica das comunidades microbianas presentes no sistema. Microrganismos do gênero *Clostridium* desempenham um papel central no processo, destacando-se pela capacidade de realizar fermentação acidogênica e converter açúcares em hidrogênio e ácidos orgânicos. No entanto, a presença de microrganismos competidores, como metanogênicos e homoacetogênicos, pode comprometer a eficiência do processo, uma vez que consomem o hidrogênio produzido. Estratégias como pré-tratamentos térmicos ou químicos têm sido amplamente aplicadas para enriquecer comunidades

produtoras de biohidrogênio e reduzir populações microbianas indesejadas, contribuindo para a estabilidade e a produtividade do sistema. (MONTOYA-ROSALES et al., 2022)

Para a realização da fermentação escura, o tratamento térmico prévio do inóculo é uma ótima alternativa, uma vez que inibe arqueias metanogênicas responsáveis por consumir o hidrogênio produzido e convertê-lo em metano (CH4), permitindo, assim, o acúmulo de H_2 no sistema (TOMASINI; FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2023). Para obter H_2 como produto final, o processo de digestão anaeróbica é interrompido antes da metanogênese, etapa em que as arqueias metanogênicas atuam na produção de metano. Por serem sensíveis a altas temperaturas, essas arqueias podem ser inativadas por meio de um pré-tratamento térmico do lodo. Essa estratégia permite direcionar o metabolismo do consórcio microbiano, favorecendo a geração de hidrogênio em vez de metano (WEBSTER et al., 2016). Outros fatores operacionais, como a composição do substrato, a temperatura e o pH, também desempenham um papel crucial na eficiência do processo. Substratos ricos em carboidratos, como a vinhaça, apresentam grande potencial, especialmente quando submetidos a pré-tratamentos que aumentam a disponibilidade de açúcares fermentáveis.

A manutenção de condições ideais no sistema, como pH entre 5,0 e 6,0, é essencial para favorecer as vias metabólicas produtoras de hidrogênio e evitar a formação de subprodutos inibitórios. Microrganismos facultativos, como *Enterobacter sp.* e *Klebsiella sp.*, também desempenham um papel relevante ao removerem o oxigênio residual, criando um ambiente propício para os anaeróbios obrigatórios. Além disso, o uso de tecnologias como biorreatores com alta retenção de biomassa e consórcios microbianos otimizados tem se mostrado eficaz na melhoria da produtividade e na superação de desafios associados à fermentação escura (DAHIYA et al., 2020; MONTOYA-ROSALES et al., 2022).

A produção de biohidrogênio por fermentação escura não apenas oferece uma solução para o reaproveitamento de resíduos orgânicos, como também apresenta vantagens ambientais ao reduzir as emissões de gases de efeito estufa. Apesar dos desafios ainda existentes, como a formação de subprodutos inibitórios e a necessidade de otimização em larga escala, os avanços em estratégias microbianas, tecnologias de biorreatores e tratamentos de substratos têm demonstrado grande potencial para aumentar a viabilidade desse processo. Sua produção a partir de fontes

renováveis, como biomassa e resíduos agroindustriais, reforça sua relevância estratégica no contexto global de transição energética. Assim, a fermentação escura desempenha um papel fundamental nesse cenário, evidenciando como tecnologias biológicas podem contribuir para a geração de energia limpa e a mitigação de impactos ambientais. (CAMACHO et al., 2022)

3.7 BIOHIDROGÊNIO

Como alternativa energética sustentável, a produção de hidrogênio a partir de processos biológicos vem se destacando. Em especial, a fermentação escura utiliza microrganismos anaeróbios para converter resíduos orgânicos em hidrogênio gasoso. Embora esse combustível possua alta densidade energética e seja tradicionalmente considerado ecológico por supostamente gerar apenas água na combustão, estudos relativos à digestão escura evidenciam uma produção de ácidos graxos voláteis (AGVS), intermediários da digestão anaeróbica. (INTANOO et al., 2012; TOMASINI et al., 2023).

Diante do crescente interesse por fontes renováveis de energia, o biohidrogênio se apresenta como uma solução promissora para a transição energética sustentável. Além da fermentação escura, processos termoquímicos como a gaseificação da biomassa também demonstram potencial para a produção de hidrogênio renovável, destacando-se pela viabilidade econômica e pela possibilidade de utilização de resíduos orgânicos diversos. No entanto, desafios como a eficiência do processo, o custo da biomassa e a necessidade de infraestrutura para armazenamento e transporte de hidrogênio ainda precisam ser superados para sua ampla implementação. Estudos indicam que o avanço de tecnologias híbridas, combinando rotas biológicas e termoquímicas, pode aumentar a eficiência da conversão e viabilizar economicamente a produção sustentável de biohidrogênio. Assim, investimentos contínuos em pesquisa e inovação são essenciais para consolidar essa alternativa energética, reduzindo a dependência de combustíveis fósseis e mitigando impactos ambientais. (BALAT & KIRTAI, 2010)

3.8 COFERMENTAÇÃO ANAERÓBICA

A cofermentação anaeróbica surge como uma solução para os desafios da fermentação de um único resíduo, promovendo um ambiente mais equilibrado para a microbiota e reduzindo a formação de compostos inibitórios. No setor sucroenergético, a combinação de diferentes substratos melhora a estabilidade do processo e maximiza a produção de biogás, sendo essencial conhecer e ajustar fatores como pH, temperatura e tempo de retenção hidráulica. Entre os resíduos com potencial para esse processo, a vinhaça e o hidrolisado hemicelulósico, subprodutos da produção de etanol, vêm ganhando destaque. Seu aproveitamento na cofermentação não só minimiza impactos ambientais, mas também melhora a eficiência energética e reduz desperdícios na cadeia produtiva (ADARME et al., 2022; ZHANG et al., 2023).

Estudos demonstram que esses substratos possuem um grande potencial para a produção de hidrogênio e metano, apesar de desafios técnicos. O hidrolisado hemicelulósico, obtido por pré-tratamento ácido ou hidrotérmico do bagaço de cana, mostrou bons rendimentos de H_2, mas a presença de compostos furânicos pode impactar negativamente o processo (TOMASINI et al., 2023; BAÊTA et al., 2016). Já a vinhaça, quando combinada com outros substratos, como torta de filtro e bagaço de cana, pode melhorar a conversão microbiana e a produção de biogás (VOLPI et al., 2024; RASHIDI et al., 2024). No entanto, ainda há uma lacuna de pesquisas focadas na cofermentação escura desses resíduos, o que reforça a necessidade de investigações adicionais para otimizar seu uso na bioenergia.

4 METODOLOGIA

Neste capítulo, descrevem-se os métodos e materiais utilizados nos estudos sobre produção de biohidrogênio, conduzidos em um sistema de quatro bateladas sequenciais. Para fins de análise comparativa, foram selecionadas a primeira e a última bateladas do experimento, designadas como Ensaio I e Ensaio II, respectivamente.

As atividades experimentais foram realizadas em duas instalações distintas: o Laboratório de Bioenergia e Meio Ambiente (LABEMA), localizado no Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e o

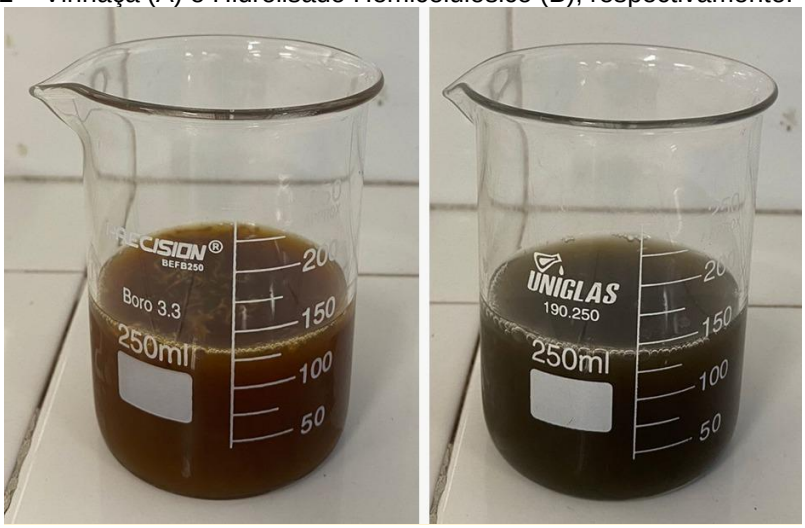
Laboratório de Petroquímica (LPQ), integrante do Instituto de Pesquisa em Petróleo e Energia (LITPEG), também associado à UFPE.

4.1 SUBSTRATOS

O subproduto vinhaça utilizado nos ensaios foi adquirido da Usina Petribu S.A., localizada em Lagoa do Itaenga (PE), e preservado em freezer a -18°C até sua análise química e emprego nas etapas experimentais.

Quanto ao hidrolisado hemicelulósico (HH), este foi obtido por meio de uma cooperação técnica entre a Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a UFPE, coordenada pela Prof.ª Sarita Cândida Rabelo. O material derivou de um processo de hidrólise térmica aplicado ao bagaço de cana, executado em um equipamento de aço inoxidável sob temperatura de 190°C, com carga sólida correspondente a 10% da massa total. Após o pré-tratamento, o componente líquido do HH foi filtrado, submetido à criopreservação (-18°C) e reservado para aplicações subsequentes.

Figura 2 – Vinhaça (A) e Hidrolisado Hemicelulósico (B), respectivamente.



Fonte: O autor (2025).

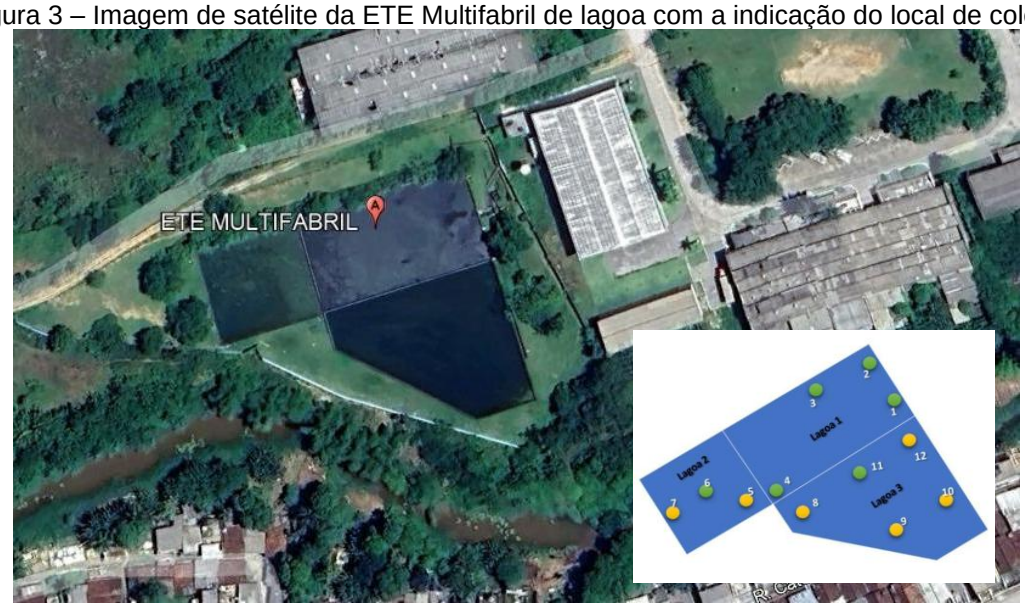
4.2 INÓCULOS (LODO)

No experimento, foram avaliados três tipos de lodo de cultura mista: (1) lodo de cervejaria (UASB), (2) lodo de lagoa e (3) lodo anaeróbio obtido de reator em escala piloto que trata restos de comida da UFPE, comumente chamado de “Chicão”. Os lodos lodo de lagoa e “Chicão” foram utilizados em uma mistura volumétrica de 1:1. A mistura volumétrica do lodo de lagoa + “Chicão” foi realizada a fim de aumentar a densidade microbiológica.

4.2.1 LODO DE LAGOA

A amostra de lodo de lagoa empregada neste estudo foi obtida da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) Multifabril de lagoa. A ETE em questão opera no tratamento de efluentes gerados por uma indústria têxtil situada em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. A coleta do material ocorreu no ponto 03 da Lagoa 01, unidade integrante da estação.

Figura 3 – Imagem de satélite da ETE Multifabril de lagoa com a indicação do local de coleta.



Fonte: Google Maps – Vista de Satélite (2025).

Diante da elevada concentração de óleos e graxas identificada no lodo UASB, adotou-se a técnica de elutriação. Esse método de purificação visa a remoção de contaminantes por meio de múltiplas etapas de sedimentação e separação de fases. O protocolo executado seguiu as etapas abaixo: o lodo foi distribuído em tubos falcon de 50 mL, submetidos a centrifugação a 8500 rpm por 10 minutos em equipamento Daiki. Após essa fase, o sobrenadante foi eliminado, e uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 9% foi incorporada ao resíduo sólido sedimentado. A mistura resultante foi agitada manualmente com auxílio de uma espátula e novamente centrifugada. Essa etapa foi replicada por três ciclos consecutivos. Por fim, o volume original da amostra foi restabelecido com a adição de água destilada.

4.2.2 LODO “CHICÃO”

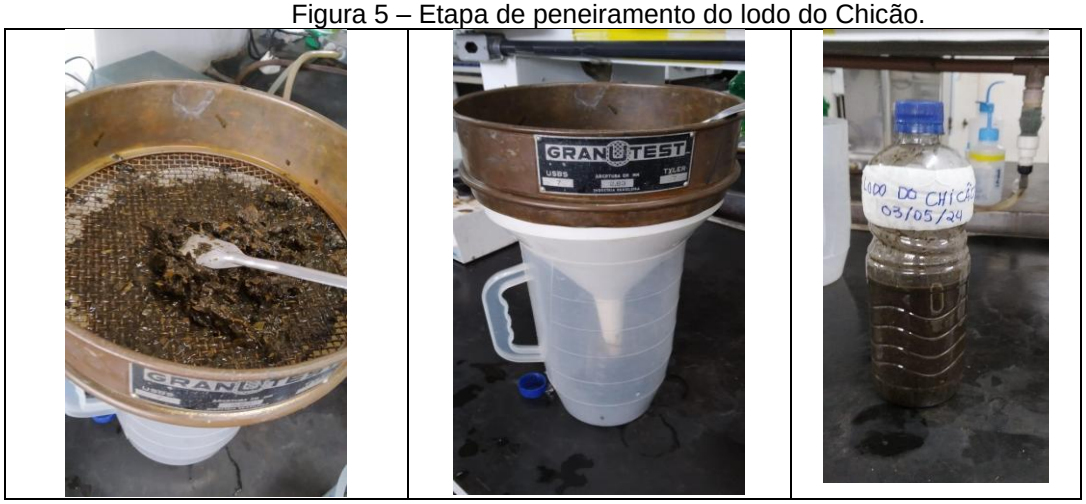
O segundo lodo é oriundo de um reator anaeróbio em escala piloto, que processa resíduos alimentícios provenientes da Universidade Federal de Pernambuco, comumente apelidado de “Chicão”. A coleta, realizada em 03/05/2024, foi efetuada a partir do fundo do reator, utilizando uma mangueira que, aproveitando o diferencial de pressão, permitiu a ascensão do líquido para a extração.

Figura 4 – Reator Anaeróbio em escala piloto na UFPE - Chicão.

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Devido ao alto teor de materiais inertes e à sua considerável granulosidade, o lodo do Chicão foi peneirado por meio de uma peneira Granutest nº7, com abertura de 2,83 mm. Em seguida, o lodo também passou pelo processo de elutriação igual ao lodo de lagoa.

Figura 5 – Etapa de peneiramento do lodo do Chicão.



Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

4.2.3 LODO UASB

Foi disponibilizado pela Cervejaria Itaipava, integrante do Grupo Petrópolis, situada no município de Itapissuma (PE). O material biológico, originário da estação de tratamento de efluentes industriais (ETE) da unidade, consistiu em lodo coletado na parte inferior de um reator de circulação interna, conforme ilustrado na Figura 6. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis de 5 litros e imediatamente armazenadas sob refrigeração, visando preservar suas propriedades microbianas para as etapas posteriores de caracterização do consórcio e execução dos ensaios laboratoriais.

Figura 6 - Vista de satélite da Estação de tratamento de água residuária da Cervejaria Itaipava - Grupo Petrópolis, localizada em Itapissuma, PE.

Fonte: Google Maps – Vista de Satélite (2025).

4.3 TRATAMENTO TÉRMICO DO INÓCULO

Para a produção de biohidrogênio, os inóculos passaram por um tratamento térmico a 90°C durante 10 minutos, com o objetivo de eliminar microrganismos não-esporulantes (MAINTINGUER et al., 2008). Em seguida, em um tubo Falcon de 50 mL, a amostra de lodo foi misturada com água Milli-Q na proporção de 1:1. Essa mistura foi submetida a um banho-maria a 90°C por 10 minutos, e posteriormente

resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. Por fim, a amostra foi armazenada em refrigerador até o momento dos ensaios.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E INÓCULO

A caracterização dos substratos – hidrolisado hemicelulósico e vinhaça – juntamente com a análise do inóculo, foi realizada no laboratório especializado LABEMA (Bioenergia e Meio Ambiente – DEN). Todos os testes seguiram os procedimentos estabelecidos pelos *Métodos Padrão da Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos analíticos utilizados na caracterização dos substratos e inóculo.

Descrição	**Métodos analíticos**	**Unidade**
pH	Eletrométrico (4500-H+B)	-
Nitrogênio Total	Titulométrico (4500-NH3 B)	mg/L
Nitrogênio Amoniacal	Titulométrico (4500-NTK B)	mg/L
Fósforo total	Colorimétrico (5220 D)	mg/L
DQO	Colorimétrico (5220 D)	mg.O_2/L
Sólidos suspensos totais, sólidos suspenso fixos e sólidos suspensos vóláteis	Gravimétrico (2540 B;D; E)	mg/L

Fonte: O autor (2025).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para as análises cromatográficas, empregando um sistema Waters ARC equipado com um detector de índice de refração (IR) operado a 35ºC, além de um detector de ultravioleta de arranjo de diodos (UV-DAD) configurado para 230 nm. Nesse procedimento, o detector IR foi usado para quantificar açúcares e ácidos orgânicos, enquanto o UV-DAD foi destinado à determinação de ácidos graxos voláteis (AGV). Todas as amostras passaram por filtração em membranas de celulose com poros de 0,22 µm antes de serem colocadas em frascos de amostragem (vials).

Foram definidas as seguintes condições para as análises: a coluna utilizada foi a Bio-Rad Aminex HPX-87H, com dimensões de 300 mm x 7,8 mm; o volume de injeção empregado foi de 10 µL; o fluxo foi estabelecido em 0,6 mL/min; tanto o forno

quanto os detectores foram mantidos a 35°C; o tempo de corrida foi de 25 minutos; e a fase móvel utilizada consistiu em H_2SO_4 a 5 mM.

No Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA) foi realizada a determinação dos níveis de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) presentes no substrato, utilizando um sistema CLAE da Shimadzu com detector UV-DAD. Para conduzir os ensaios, foram adotadas as seguintes configurações: empregou-se uma coluna C18 Shim-Pack Gws com dimensões de 150 mm por 4,6 mm, o volume de injeção foi fixado em 10 µL e o fluxo da fase móvel ajustado para 0,8 mL/min. Tanto o forno quanto os detectores operaram a 35°C durante um tempo total de corrida de 6,5 minutos, e a fase móvel consistiu em uma mistura de CH_3OH e H_2O na proporção de 60:40. Ademais, todos os reagentes utilizados eram de grau PA, e as soluções foram preparadas com água deionizada ultrapura.

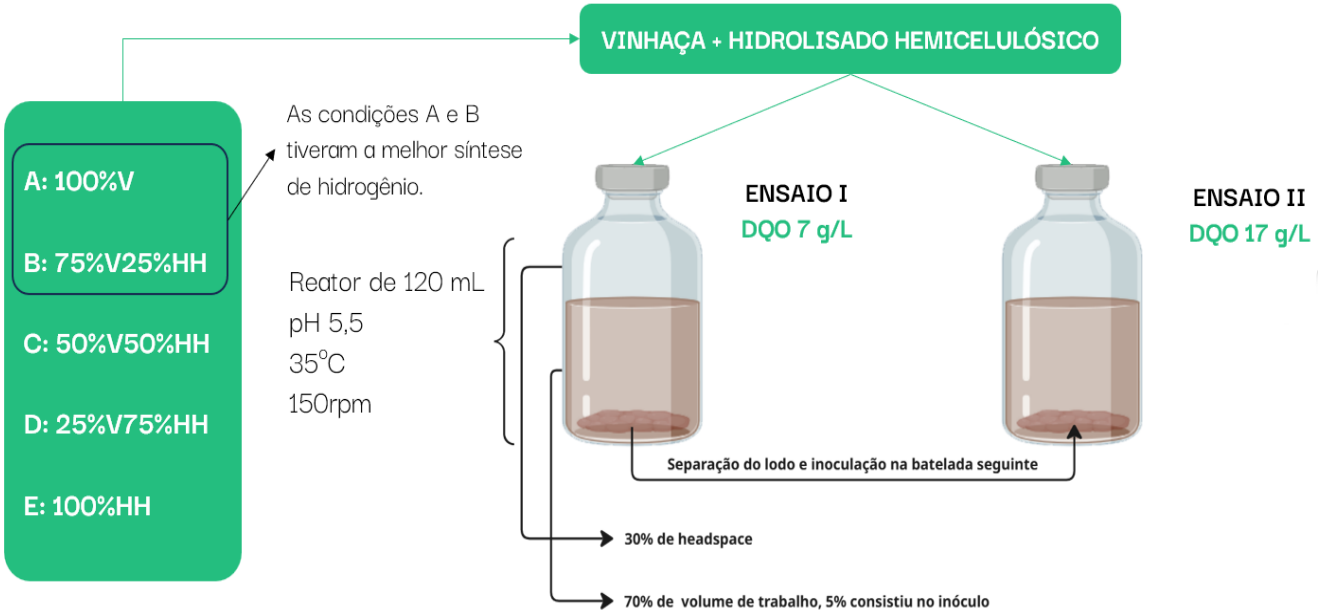
4.5 PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A revisão bibliográfica indicou parâmetros favoráveis à síntese de biohidrogênio, destacando-se o estudo de Lázaro et al. (2014), que reportou maior eficiência produtiva em condições mesofílicas com DQO de 7,1 g/L comparada a faixas entre 2 e 12 g/L. Com base nesses dados, avaliaram-se concentrações de 7 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 17 g/L de DQO para otimizar a produção de H_2 na cofermentação anaeróbia de vinhaça e hidrolisado hemicelulósico, além de avaliar o comportamento dos consórcios microbianos diante da crescente DQO. Para este estudo foram analisadas a primeira e última batelada (denominadas de ensaios I e II), com concentrações de DQO de 7 e 17 g/L, respectivamente (Figura 8).

No primeiro ensaio I (7 g/L de DQO), testaram-se diferentes proporções dos substratos – vinhaça e HH – a fim de identificar as condições ideais de cofermentação que maximizassem a produção de hidrogênio. No ensaio subsequente, optou-se pelas duas combinações mais promissoras, denominadas condições A (1V:0HH) e B (3V:1HH), com aumento da carga orgânica para possibilitar melhor adaptação microbiana e estabilização do sistema antes de se alcançar a maior concentração de DQO no Ensaio II (17 g/L). As condições A e B se destacaram por apresentar maior síntese de hidrogênio, alinhando-se aos estudos anteriores conduzidos pelo grupo de pesquisa. Por fim, tanto o Ensaio I quanto o II foram monitorados diariamente por meio

de coletas de biogás e efluentes, sendo as coletas interrompidas ao se observar uma redução na produção de H_2.

Figura 8 - Esquema de reatores com diferentes proporções de mistura da vinhaça com o hidrolisado hemicelulósico.



Fonte: O autor (2025).

Cada reator operou com volume total de 120 mL (30% de headspace) e volume reacional de 84 mL, inoculado com 5% (v/v) de biomassa centrifugada (11000 rpm/10 min) dos ensaios A e B. No ensaio II, utilizou-se o pellet (biomassa). O pH foi ajustado para 5,5 com bicarbonato de sódio 1 mol/L ou NaOH 40%, sem adição de nutrientes. Os experimentos, conduzidos em triplicata, ocorreram em biorreatores vedados, purgados com N_2 por 2 minutos e mantidos a 35 °C e 150 rpm na incubadora Shaker SL 22 (Figura 9).

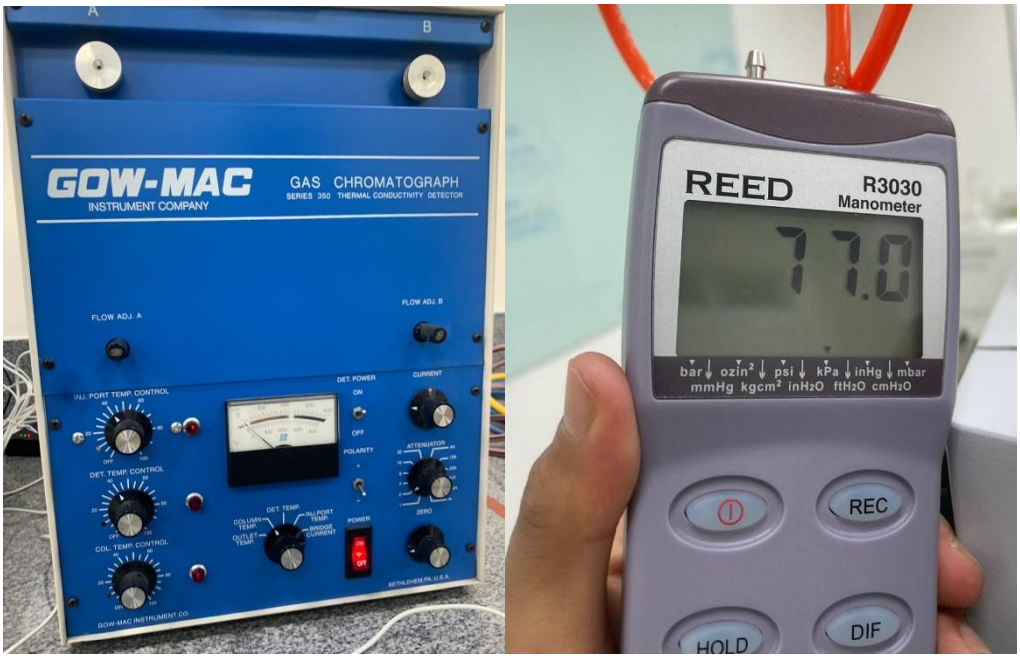
Figura 9 - Biorreatores na incubadora após preparo.

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

4.6 ANÁLISE DOS GASES E MEDIÇÃO DE PRESSÃO

O biogás proveniente dos biorreatores em diferentes intervalos diários, interrompendo-se as medições assim que se constatava queda na produção de hidrogênio. A caracterização do gás envolveu tanto a verificação da pressão interna com um medidor Reed (modelo R3030) quanto análises por cromatografia gasosa, utilizando um detector de condutividade térmica GOW-MAC (GAS Chromatography Series 350), conforme ilustrado na Figura 10. Para essa técnica, empregou-se uma coluna Carboxen 1010Plot (Supelco®, 30 m × 0,53 mm) com argônio como gás de arraste, volume de injeção de 150 µL e vazão de 5,66 mL/min. As temperaturas do injetor, do detector e do forno foram mantidas em 220 °C, 230 °C e 100 °C, respectivamente, durante 4,5 minutos de corrida, adotando-se a injeção em modo Split na proporção 5:1. As frações de N_2, CH_4, CO_2 e H_2 foram expressas em porcentagem, e as amostras foram coletadas em seringas equipadas com trava de segurança para minimizar riscos de contaminação.

Figura 10 - Cromatógrafo gasoso (A); medidor de pressão Reed utilizado para medição de gás sintetizado e pressão dos biorreatores (B).



Fonte: O autor (2025).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 apresenta a composição química da vinhaça e do hidrolisado hemicelulósico após o pré-tratamento hidrotérmico, com informações sobre suas propriedades físico-químicas. Esses dados incluem a concentração de ácidos orgânicos, carboidratos solúveis e derivados furânicos nas matérias-primas usadas para produção de biohidrogênio.

No HH obtido do bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento favoreceu a liberação de pentoses (C5), com destaque para xilooligossacarídeos (14,02 g/L) e xilose (1,24 g/L). Já na vinhaça, a sacarose foi o carboidrato mais expressivo, registrando 3,31 ± 0,27 g/L.

A presença significativa de carboidratos solúveis em ambas as matérias-primas sugere maior potencial para conversão em hidrogênio durante a fase acidogênica da fermentação (NISHIO; NAKASHIMADA, 2013). Essa etapa é crítica para otimizar a produção de bioenergia a partir de resíduos agroindustriais.

Tabela 2 - Parâmetros observados na literatura para o processo de fermentação anaeróbica.

Parâmetro		**Concentração Hidrolisado Hemicelulósico**	**Concentração Vinhaça**	**unidade**
Análises Físico-Químicas	DQO bruta	24,55 ± 0,58	25,17 ± 2,75	g/L
	DQO filtrada	13,53 ± 0,21	NM	-
	pH	3,9	5,59	-
	NTK	140,57 ± 25,8	263,17 ± 17,0	mg/L
	Nitrogênio Amoniacal	NM	14,86 ± 1,40	mg/L
	Fósforo total	NM	49,82 ± 5,10	mg/L
	Sólidos totais	12,56 ± 0,36	19,54 ± 0,08	g/L
	Sólidos fixos	0,94 ± 0,43	5,32 ± 0,59	g/L
	Sólidos voláteis	11,62 ± 0,24	14,22 ± 0,55	g/L
	Sólidos suspensos	0,74 ± 0,13	NM	g/L
	Sólidos dissolvidos	11,82 ± 0,25	NM	g/L
Íons	Cloreto	11,83	-	mg/L
	Nitrito	26,11	-	mg/L
	Nitrato	20,9	-	mg/L
	Sulfato	ND	1211,89 ± 7,12	mg/L
Ácidos	Ácido etanoico	3465,28	1799,25 ± 100,11	mg/L
	Ácido lático	418,93	4790,64 ± 6,09	mg/L
	Ácido propanóico	391,08	23,8 ± 0,28	mg/L
	Ácido acético	180	ND	mg/L
	Ácido fórmico	660	ND	mg/L
	Ácido Isobutírico	ND	2,27 ± 0,10	mg/L
	Ácido butanóico	ND	6,62 ± 0,10	mg/L
	Ácido isopropílico	ND	0,55 ± 0,02	mg/L
	Ácido pentanóico	ND	ND	mg/L
	Ácido hexanoico	ND	4,90 ± 0,02	mg/L
Açúcares	Frutose	ND	3915,86	mg/L
	Xilooligossacarídeos	14020	ND	mg/L
	Xilose	1240	ND	mg/L
	Glicose	51	ND	mg/L
	Arabinose	810	ND	mg/L
	Sacarose	ND	3314,85 ± 275,77	mg/L
	Glucose	ND	ND	mg/L
	Glicerina	ND	1133,6	mg/L
Compostos furânicos	Furfural	0,63	ND	g/L
	Hidroximetilfurfural	0,022	ND	g/L

ND – Não detectado; NM – não mensurado.

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Em pesquisa realizada por Moraes et al. (2015), o pré-tratamento hidrotérmico (190°C, 10 min) do bagaço de cana-de-açúcar, mesmo método aplicado neste estudo, resultou em um HH com 5,79 g/L de ácido acético, 0,63 g/L de ácido fórmico, DQO entre 75,8 e 109,7 g/L, além de 0,32 g/L de furfural e 0,19 g/L de HMF. O estudo também reportou que 78% dos açúcares reduzidos no HH correspondiam à xilose, indicando a solubilização eficiente da hemicelulose. Em comparação, os resultados do presente trabalho apresentaram 0,18 g/L de ácido acético (valor muito menor), 0,66 g/L de ácido fórmico (similar ao estudo anterior), DQO de 24,55 ± 0,58 g/L, 0,63 g/L de furfural (ligeiramente superior) e 0,022 g/L de HMF. Embora o furfural tenha sido mais elevado, ambos os valores se mantiveram abaixo de 1 g/L, limite crítico para inibição de processos fermentativos segundo Quéméneur et al. (2012). A menor carga orgânica e a redução expressiva de HMF destacam avanços na mitigação de subprodutos tóxicos.

A vinhaça analisada apresentou uma DQO de 24,55 ± 0,27 g/L, situando-se dentro do intervalo de 20-30 g/L reportado na literatura (Marafon et al., 2019). Em comparação ao HH, a vinhaça possui maiores concentrações de nutrientes essenciais, em especial nitrogênio (0,26 ± 0,017 g/L) e fósforo (0,049 ± 0,005 g/L). Esse perfil nutricional permite sua aplicação para corrigir carências no hidrolisado hemicelulósico, equilibrando a relação C:N e atenuando a ação de compostos inibitórios, como furfural e 5-HMF. Além disso, a vinhaça contém quantidades consideráveis de sólidos totais e voláteis, que podem ser transformados em hidrogênio durante o processo fermentativo.

Como o HH apresenta limitação na disponibilidade de nitrogênio, seu uso simultâneo com a vinhaça mostra-se estratégico para regular a razão C:N e potencializar a geração de biogás (Passos et al., 2018). Outra vantagem da cofermentação é a diluição do sulfato proveniente da vinhaça (1211,89 mg/L), o que reduz a formação de H_2S. Esse efeito se deve ao baixo teor de sulfato e à elevada fração orgânica do hidrolisado, características que contribuem para minimizar a produção de compostos sulfurados.

De acordo com Mohanakrishna (2024), microrganismos de cultura mista costumam apresentar melhor conversão de substratos em metabólitos, além de maior adaptabilidade e resistência a alterações ambientais. A tabela 3 apresenta os valores de sólidos totais (SST), sólidos fixos (SSF) e sólidos voláteis (SSV) dos inóculos utilizados no experimento. O Lodo de lagoa apresentou as maiores concentrações,

com 55,28 ± 3,78 g/L de SST e 43,74 ± 2,35 g/L de SSV, destacando-se como um inóculo com alto potencial para fermentação anaeróbica. Como parte dos experimentos, foi utilizada uma mistura em proporção 1:1 entre o Lodo de lagoa e o Lodo "Chicão", resultando em um inóculo combinado com 50,08 g/L de SST, 19,15 g/L de SSF e 31,00 g/L de SSV. Essa combinação permitiu equilibrar as características dos inóculos e avaliar seu desempenho no processo fermentativo.

Tabela 3 - Análises de sólidos realizadas nos lodos para caracterização.

	Lodo UASB	**Lodo de lagoa**	**Lodo "Chicão"**
SST(g/L)	55,28 ± 3,78	75,43 ± 0,72	24,87 ± 2,73
SSF (g/L)	11,54 ± 1,63	30,08 ± 1,113	8,22 ± 1,10
SSV (g/L)	43,74 ± 2,35	45,35 ± 0,74	16,65 ± 1,67

Fonte: O autor (2025).

5.1 PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO: CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Nessa etapa, foi implementada uma abordagem de batelada sequencial, com o aumento gradativo da concentração de DQO (Demanda Química de Oxigênio) em cada ciclo: 7 g/L e 17 g/L. Essa estratégia permitiu observar como a variação na carga orgânica influenciou a produção de H_2 ao longo do tempo, além de avaliar a estabilidade e a adaptabilidade do sistema sob condições crescentes.

Para facilitar a análise e interpretação das condições operacionais de cada um dos biorreatores utilizados no estudo, as Tabelas 4 e 5 apresentam detalhadamente os parâmetros experimentais aplicados ao lodo UASB, enquanto as Tabelas 6 e 7 demonstram os do lodo de lagoa + "Chicão".

ENSAIO I - LODO UASB

Tabela 4 - Condições experimentais nos biorreatores sob diferentes concentrações de substrato.

Variável	ENSAIO I					Unidade
	A (1V:0HH)	B (3V:1HH)	C (1V:1HH)	D (1V:3HH)	E (0V:1HH)	
% HH	0%	25%	50%	75%	100%	-
% Vinhaça	100%	75%	50%	25%	0%	-
DQO	7	7	7	7	7	g/L
Relação C:N	20,75	21,20	21,76	22,50	23,50	-
Razão F/M	5	5	5	5	5	gDQO/gSTV
pH após ajuste (NaOH 40%)	5,50	5,52	5,48	5,57	5,56	-
pH após desmontar os reatores	5,16 ± 0,08	5,19 ± 0,02	4,78 ± 0,14	4,92 ± 0,01	5,04 ±0,05	-

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Razão F/M – relação alimento/microrganismo.

ENSAIO II - LODO UASB

Tabela 5 - Condições experimentais nos biorreatores sob diferentes concentrações de substrato.

Variável	ENSAIO II		Unidade
	A	B	
% HH	0%	25%	-
% Vinhaça	100%	75%	-
DQO	17	17	g/L
Relação C:N	20,75	21,20	-
Razão F/M	12,14	12,14	gDQO/gSTV
pH após ajuste (NaOH 40%)	5,52	5,55	
pH após desmontar os reatores	6,4 ± 0,03	4,38 ± 0,18	-

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Razão F/M – relação alimento/microrganismo.

ENSAIO I - LODO DE LAGOA + “CHICÃO”

Tabela 6 - Condições experimentais nos biorreatores sob diferentes concentrações de substrato.

Variável	ENSAIO I					Unidade
	A (1V:0HH)	**B (3V:1HH)**	**C (1V:1HH)**	**D (1V:3HH)**	**E (0V:1HH)**	
% HH	0%	25%	50%	75%	100%	-
% Vinhaça	100%	75%	50%	25%	0%	-
DQO	7	7	7	7	7	g/L
Relação C:N	8,67	9,16	10,03	12,04	21,33	-
Razão F/M	0,590	0,550	0,498	0,433	0,345	gDQO/gSTV
pH após ajuste (NaOH 40%)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	-
pH após desmontar os reatores	4,89	4,82	4,84	4,82	4,74	-

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Razão F/M – relação alimento/microrganismo.

ENSAIO II - LODO DE LAGOA + “CHICÃO

Tabela 7 - Condições experimentais nos biorreatores sob diferentes concentrações de substrato.

Variável	ENSAIO II		Unidade
	A	B	
% HH	0%	25%	-
% Vinhaça	100%	75%	-
DQO	17	17	g/L
Relação C:N	8,67	9,16	-
Razão F/M	10,41	10,41	gDQO/gSTV
pH após ajuste (NaOH 40%)	5,52	5,55	-
pH após desmontar os reatores	6,4 ± 0,03	4,38 ± 0,18	-

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Razão F/M – relação alimento/microrganismo.

5.2 PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO NOS DIFERENTES INÓCULOS

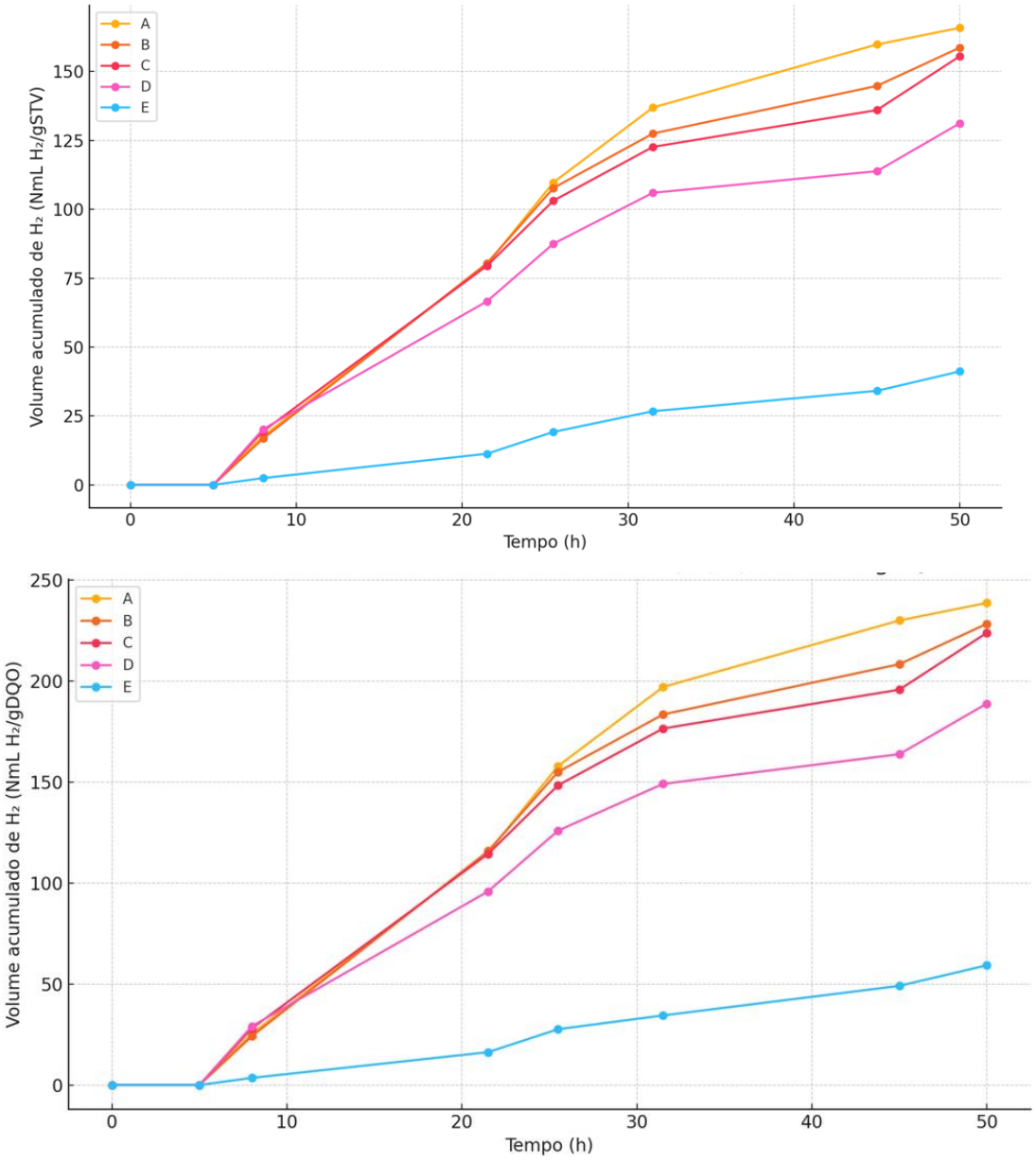
As análises cromatográficas identificaram a presença de CH_4, CO_2 e H_2 como os principais gases produzidos durante os experimentos. No entanto, não foi detectada a presença significativa de CH_4 nas amostras após a medição no cromatógrafo gasoso (GC) para nenhum dos dois inóculos utilizados, indicando que o tratamento hidrotérmico foi eficiente na inativação de microrganismos metanogênicos em ambos os casos. Essa condição reforçou o predomínio da fermentação escura na produção de bioH_2. Considerando a ausência de metano, infere-se que o CO_2 constituía o restante da composição gasosa, embora não se descarte a possível existência de outros gases em traços não detectáveis pelo método. Os compostos mencionados (CO_2 e H_2) foram os únicos quantificáveis e visualizados nas curvas analíticas do GC.

No lodo UASB, a duração dos experimentos variou significativamente, refletindo a influência da concentração de DQO na atividade microbiana. Enquanto o ensaio I foi concluído em 50 horas (2,08 dias), o ensaio II se estendeu por 168,5 horas

(7,02 dias), consequência do aumento na quantidade de matéria orgânica disponível para os microrganismos. Durante o experimento foram efetuadas medições de pressão nos reatores antes da coleta e análise das amostras gasosas no cromatógrafo, permitindo o monitoramento da produção de biogás. Essa estratégia possibilitou determinar o volume acumulado de biohidrogênio (NmL H_2/gSTV; NmL H_2/gDQO) para cada uma das condições testadas, conforme ilustrado nos gráficos abaixo.

ENSAIO I

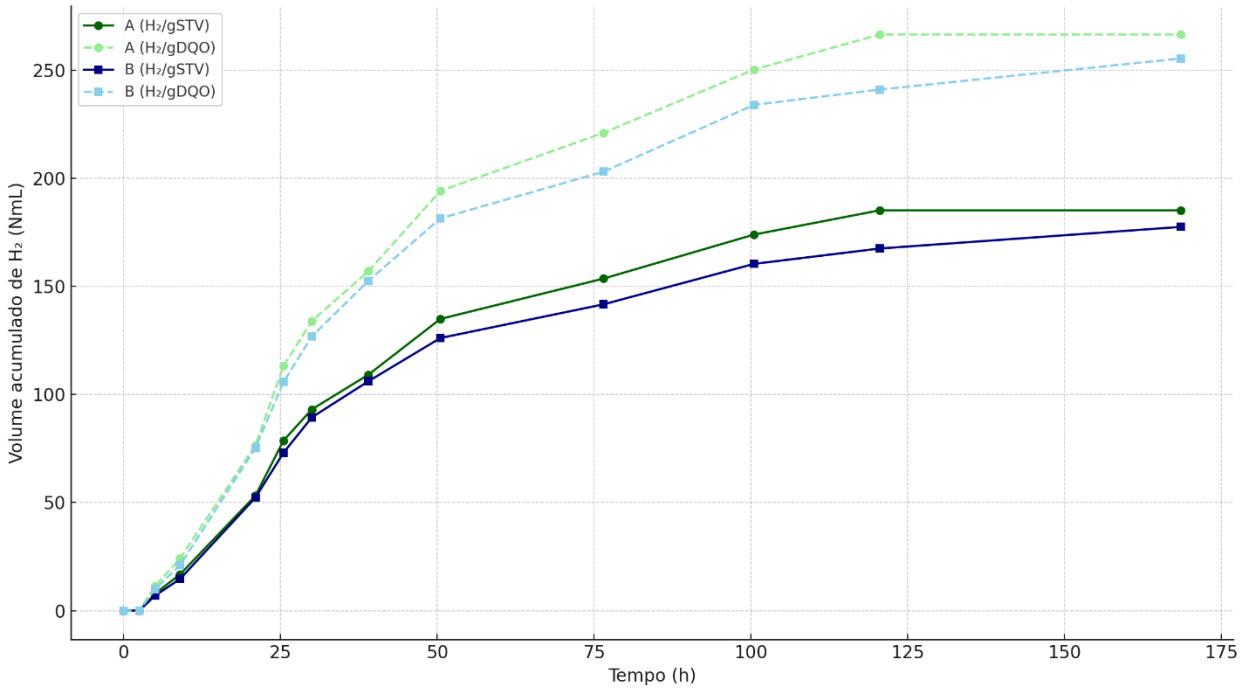
Gráfico 1 - Volume acumulado de H_2 nos tratamentos A e B, no ensaio II. - Lodo UASB



Fonte: O Autor (2025).

Conforme apresentado nos gráficos abaixo, observa-se a evolução do volume acumulado de H_2 nos tratamentos A e B ao longo do Ensaio II, evidenciando a progressão da produção de biohidrogênio ao longo do tempo.

Gráfico 2 - Volume acumulado de H_2 nos tratamentos A e B, no ensaio II. - Lodo Industrial



Fonte: O Autor (2025).

A validação do modelo de regressão foi conduzida por meio da técnica ANOVA, adotando-se um intervalo de confiança de 95% para avaliar a relevância estatística, com ênfase especial na quantidade total de H_2 produzido e na comparação entre os grupos experimentais I e II.

Em seguida, implementou-se o método de comparações múltiplas de Tukey para detectar variações relevantes entre as condições testadas. Essa abordagem possibilitou a análise contrastante das médias obtidas nos grupos I (combinações A_1 e B_1) e II (combinações A_2 e B_2), considerando dois parâmetros: concentração de hidrogênio e volume total gerado de H_2. As principais diferenças observadas ao longo do processo foram compiladas na Tabela 8, permitindo uma análise comparativa dos resultados.

Tabela 8 - Volume acumulado e % de H_2, no Ensaio I e II. - Lodo UASB

	Médias	
Tratamento	**H_2 (%)**	**NmL H_2/gSTV**
A_1	55,06	165,87
B_1	56,58	158,68
A_2	71,61	185,19
B_2	75,32	177,53

Fonte: Grupo de Pesquisa. (2024).

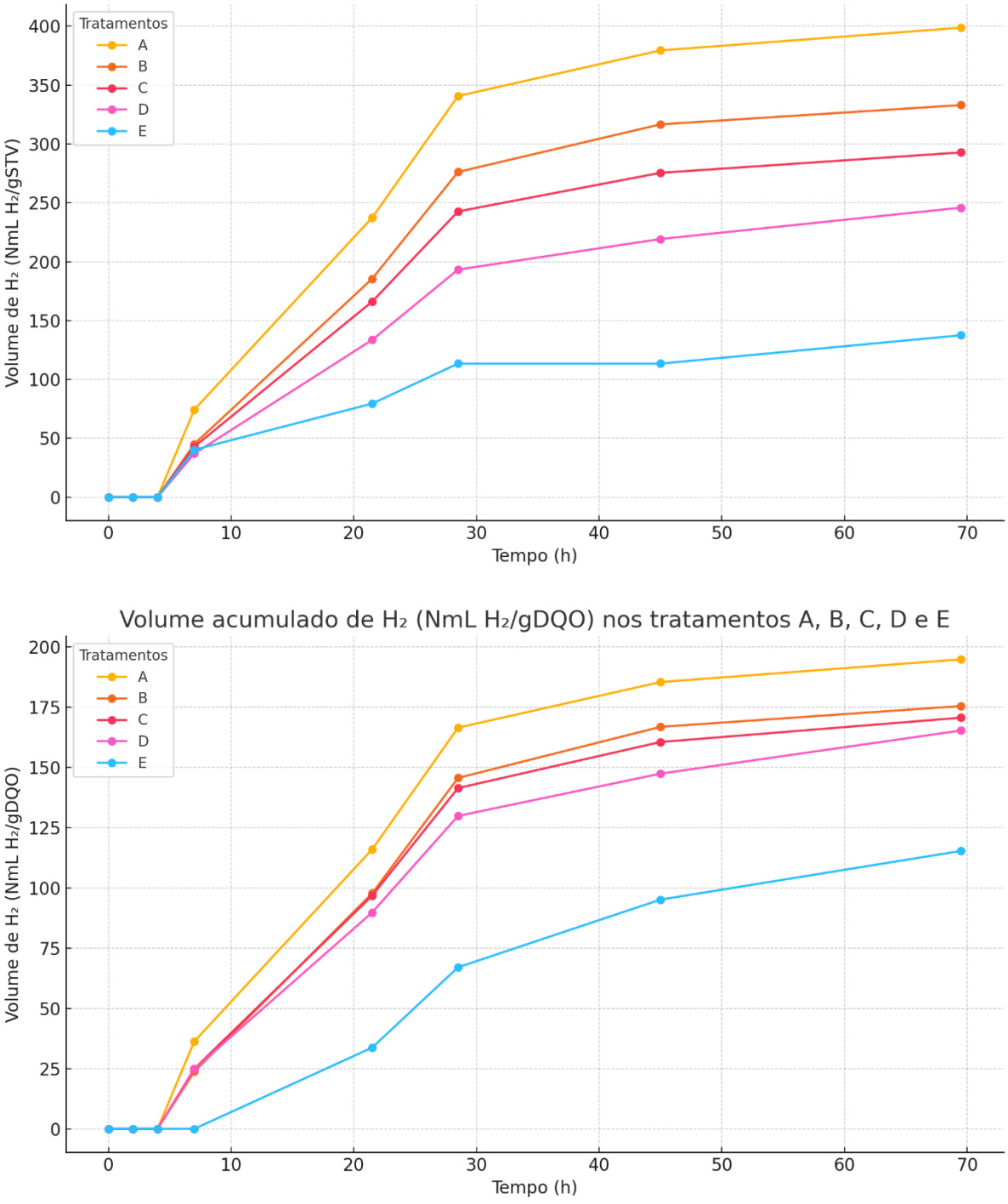
Os tratamentos A_2 e B_2 apresentaram as maiores concentrações de hidrogênio, com 71,61% e 75,32% de H_2, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre ambos. Em contrapartida, os grupos A_1 e B_1 registraram os menores índices (55,06% e 56,58%), também sem distinção relevante entre suas médias.

Acerca ao volume total de hidrogênio, os tratamentos A_2 e B_2 destacaram-se novamente, alcançando 185,19 e 177,53 NmL H_2/gSTV, respectivamente, com equivalência estatística entre si. Os valores inferiores observados em A_1 (165,87 NmL H_2/gSTV) e B_1 (158,68 NmL H_2/gSTV) reforçam a superioridade dos protocolos A_4 e B_4, tanto em eficiência produtiva quanto em capacidade de geração volumétrica, consolidando-os como as estratégias mais promissoras, reforçando a adaptabilidade do consórcio microbiano a altas cargas orgânicas.

O ensaio I da mistura do lodo de lagoa + “Chicão” teve duração de 69,5 horas (cerca de 2,9 dias), enquanto o Ensaio II se estendeu por 97,2 horas (aproximadamente 4,05 dias). O tempo menor em relação ao lodo UASB sugere que a combinação de duas culturas mistas de inóculo aumentou a diversidade microbiana no sistema, acelerando a digestão anaeróbia. Os resultados do volume acumulado de H_2 nos ensaios I e II estão apresentados nos gráficos a seguir.

ENSAIO I

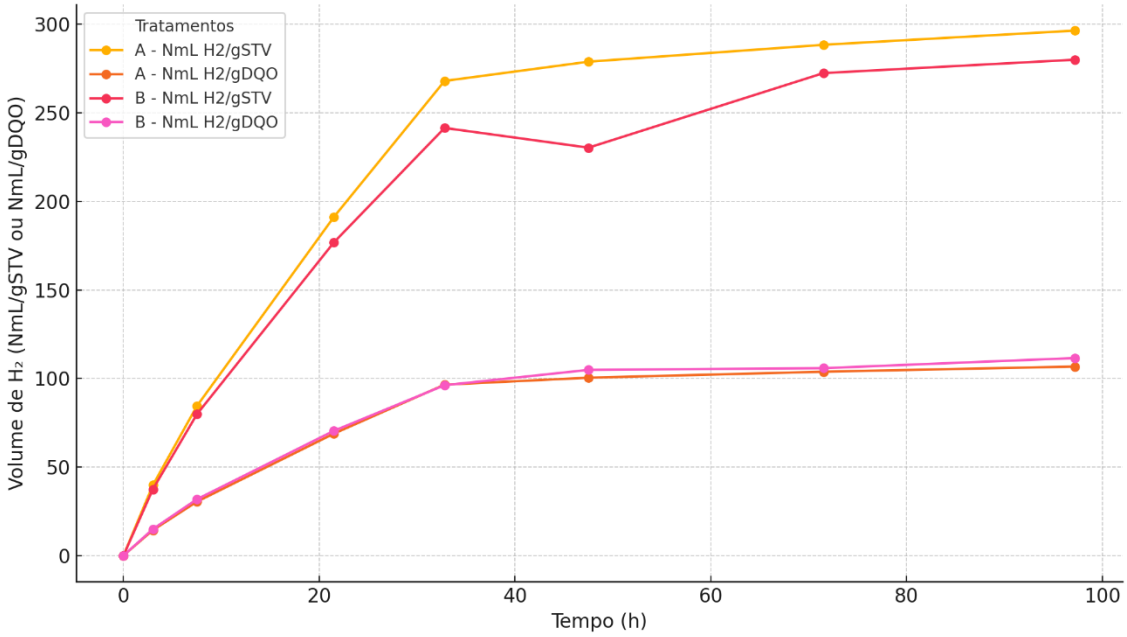
Gráfico 3 - Volume acumulado de H_2 nos tratamentos A, B, C, D e E. - Lodo Fabril + “Chicão”



Fonte: O Autor. (2025).

Conforme apresentado no Gráfico 4, observa-se a evolução do volume acumulado de H_2 nos tratamentos A e B ao longo do Ensaio II.

Gráfico 4 - Volume acumulado de H_2 nos tratamentos A e B, no ensaio II. - Lodo Fabril + “Chicão”



Fonte: O Autor. (2025).

De forma análoga ao ensaio com o lodo UASB, os dados coletados para o lodo de lagoa + "Chicão" foram submetidos a um processamento estatístico detalhado. A validação do modelo de regressão foi conduzida por meio da técnica ANOVA, com um intervalo de confiança de 95%, priorizando a análise do volume acumulado de H_2 produzido e a comparação entre os grupos experimentais I e II.

Assim como no experimento anterior, o método de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para identificar variações relevantes entre as condições testadas. Essa análise permitiu contrastar as médias obtidas nos grupos I (combinações A_1 e B_1) e II (combinações A4 e B4), avaliando tanto a concentração de hidrogênio quanto o volume total gerado de H_2. Os resultados dessa comparação estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Volume acumulado de H_2, no Ensaio I e II. - Lodo de lagoa + “Chicão”

	Médias	
Tratamento	**H_2 (%)**	**NmL H_2/gSTV**
A_1	66,37	398,81
B_1	57,43	333,09
A_4	56,88	296,50
B_4	57,34	280,06

Fonte: Grupo de Pesquisa (2024).

Os grupos A_1 e B_1 apresentaram as maiores concentrações de hidrogênio, registrando 66,37% e 57,43%, respectivamente, sem variação estatisticamente significativa entre si. Em contrapartida, os tratamentos A_2 e B_2 exibiram percentuais ligeiramente inferiores de H_2, com 56,88% e 57,34%, indicando que a mudança nas condições experimentais pode ter influenciado.

Quanto ao volume acumulado de H_2, os protocolos A_1 e B_1 novamente demonstraram melhor desempenho, atingindo 398,81 e 333,09 NmL H_2/gSTV, respectivamente. Já os ensaios A_2 e B_2 apresentaram os menores valores, com 296,50 e 280,06 NmL H_2/gSTV, evidenciando uma redução na eficiência de conversão da matéria orgânica em hidrogênio ao longo dos experimentos.

5.3 PRODUÇÃO COMPARATIVA DE H_2: LODO UASB VS. LODO DE LAGOA + "CHICÃO"

A comparação entre os inóculos revelou diferenças na produção de biohidrogênio, destacando como a carga orgânica (DQO) e a composição microbiana influenciam o desempenho fermentativo. O lodo UASB mostrou-se mais eficiente em condições de alta carga orgânica (17 g/L de DQO), alcançando 75,32% de H_2 e um volume acumulado de 177,53 NmL H_2/gSTV. Esse resultado superior pode ser explicado pela maior robustez do consórcio microbiano presente no lodo UASB, que se adaptou melhor à degradação de substratos complexos, como a vinhaça e o hidrolisado hemicelulósico, sob condições mais desafiadoras. O pré-tratamento térmico desempenhou um papel importante, inibindo arqueias metanogênicas e favorecendo microrganismos acidogênicos, como *Clostridium* spp., conhecidos por sua eficiência na produção de H_2 a partir de resíduos orgânicos (MAINTINGUER et al., 2008; TOMASINI et al., 2023). Além disso, a mono-fermentação de vinhaça no lodo UASB apresentou os melhores resultados, reforçando a eficácia desse substrato em condições de alta carga orgânica. Essa eficiência está alinhada com estudos que destacam a vinhaça como recurso rico em carboidratos e nutrientes, ideal para processos fermentativos (HOARAU et al., 2018).

Por outro lado, a mistura de lodo de lagoa + "Chicão" teve um desempenho superior em condições de menor carga orgânica (7 g/L de DQO), registrando 66,37% de H_2 e 398,81 NmL H_2/gSTV na mono-fermentação de vinhaça. Esse resultado sugere que a combinação dos dois lodos foi mais eficiente em cargas menores,

possivelmente devido à maior diversidade microbiana e à complementaridade entre os consórcios presentes nos dois inóculos (MOHANAKRISHNA, 2024). No entanto, à medida que a carga orgânica aumentou, o desempenho da mistura lodo de lagoa + "Chicão" diminuiu, atingindo 296,50 NmL H_2/gSTV no ensaio II. Essa redução pode estar relacionada à dificuldade de adaptação dos microrganismos à alta carga orgânica e à presença de materiais inertes no lodo "Chicão", por exemplo, partículas de areia e argila podem atrapalhar a mistura uniforme do substrato, enquanto pedaços de material vegetal e resíduos plásticos podem dificultar o contato dos microrganismos com os nutrientes, comprometendo a digestão anaeróbia.

A mono-fermentação de vinhaça com lodo UASB alcançou 266,49 ± 2,68 NmL H_2/gDQO, valor 4,8 vezes maior que os 55,84 ± 2,20 NmL H_2/gDQO observados por Santos et al. (2018) em condições similares de DQO e temperatura mesofílica. Da mesma forma, a mistura lodo de lagoa + "Chicão" registrou 111,52 ± 2,20 NmL H_2/gDQO, superando os 73,4 ± 2,7 NmL H_2/gDQO de Toledo et al. (2022). Esses avanços podem ser atribuídos à otimização da relação C:N (~20:1), que reduziu a formação de subprodutos inibitórios, e ao pré-tratamento térmico, que direcionou o processo para a produção de H_2 (ADARME et al., 2019; VOLPI et al., 2024).

Dentre os reatores analisados, o B4 (lodo UASB) e o A1 (mistura lodo de lagoa + "Chicão") foram os mais eficientes, com 75,32% e 66,37% de H_2 no biogás, respectivamente. Esses valores superam os 41,8% de H_2 no biogás relatados por Toledo-Cervantes et al. (2020), que utilizaram reatores em batelada operados a 35°C, empregando lodo de UASB pré-tratado termicamente com vinhaça de tequila como substrato, reforçando a importância de estratégias térmicas para selecionar consórcios produtores de hidrogênio. A consistência entre os dados sugere que, embora as condições operacionais variem, a integração de pré-tratamentos e a seleção de substratos ricos em carboidratos (como a vinhaça) são pilares para maximizar a eficiência fermentativa (TOMASINI et al., 2023).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi investigado a produção de biohidrogênio a partir de resíduos do setor sucroenergético, focando na fermentação escura da vinhaça e na co-fermentação com hidrolisado hemicelulósico (HH). Essa abordagem visa dar um novo

uso a uma biomassa ainda pouco explorada, subprodutos da indústria sucroalcooleira em energia renovável.

O pré-tratamento hidrotérmico aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar se mostrou eficiente ao liberar xilose e xilooligossacarídeos, sem acumular níveis prejudiciais de compostos furânicos como furfural e HMF. Dessa forma, o HH comprovou seu valor como substrato complementar, embora, por si só, apresente limitações nutricionais, principalmente na oferta de nitrogênio. Em contraste, a vinhaça se destacou por sua alta carga orgânica e perfil nutricional equilibrado, elementos que impulsionam a atividade microbiana e conferem estabilidade ao processo.

A escolha do inóculo também foi determinante. Ambos os lodos, o industrial e a mistura de lodo de lagoa com “Chicão”, foram submetidos ao tratamento hidrotérmico (90°C por 10 minutos), procedimento essencial para eliminar arqueias metanogênicas. Notavelmente, o lodo UASB destacou-se em condições de alta carga orgânica (DQO 17 g/L), atingindo 75,32% de hidrogênio no biogás e 177,53 NmL H_2/gSTV, superando os resultados obtidos com o lodo de lagoa + “Chicão”.

Além disso, as condições operacionais adotadas – temperatura de 35°C, pH em torno de 5,5 e uma relação C:N próxima de 20:1 – foram fundamentais para otimizar a produção de hidrogênio. Observou-se que a monofermentação com 100% de vinhaça gerou um volume acumulado de biohidrogênio superior, enquanto a cofermentação na proporção 3V:1HH apresentou um teor de hidrogênio ligeiramente mais elevado, ainda que o rendimento global tenha sido menor. Esse contraste sugere que, apesar do HH modular positivamente a composição do biogás, a vinhaça isolada oferece vantagens operacionais e nutricionais em sistemas com altas cargas orgânicas.

Em síntese, os resultados demonstram que a integração de vinhaça e HH, aliada a estratégias operacionais específicas, pode transformar resíduos em fontes renováveis de energia, abrindo caminhos para a implementação de processos sustentáveis.

6.1 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora o estudo tenha avançado no entendimento da cofermentação de vinhaça e HH, algumas limitações merecem destaque:

1. A necessidade de investigar a dinâmica microbiana em escala molecular para identificar espécies-chave responsáveis pela produção de H_2.
2. A avaliação de condições extremas (por exemplo, cargas orgânicas superiores a 20 g/L) para testar a resiliência do sistema.
3. A realização dos experimentos em bancada, de forma manual e sem sistemas automatizados (como sensores para pH e temperatura), pode introduzir variabilidade operacional, por exemplo, nas medições de pressão e ajustes de pH, e dificultar resultados para escala industrial.

Em síntese, este trabalho consolida a viabilidade técnica da cofermentação como estratégia sustentável para a geração de biohidrogênio, oferecendo subsídios para futuras pesquisas e aplicações industriais. A continuidade dos estudos nessa área é essencial para superar desafios operacionais e consolidar o hidrogênio na matriz energética renovável.

7. REFERÊNCIAS

ADARME, O. F. H. et al. Use of anaerobic co-digestion as an alternative to add value to sugarcane biorefinery wastes. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121443, 2019.

AGARWAL, N. K. et al. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse pith for biogas production and digestate valorization to biochar. **Industrial Crops and Products**, v. 202, p. 116973, 2023.

AHMAD, A. et al. Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 335–357, 2024.

ALI, S. et al. Exploring lignocellulosic biomass for bio-methane potential by anaerobic digestion and its economic feasibility. **Energy and Environment**, v. 29, n. 5, p. 742–751, 2018.

BAÊTA, B. E. L. et al. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137–146, 2016.

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 14, p. 7416–7426, 2010.

BERGMANN, J. C. et al. Technological Advancements in 1G Ethanol Production and Recovery of By-Products Based on the Biorefinery Concept. In: **Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products**. p. 73–95, 2018.

CAMACHO, C. I. et al. Dark fermentation as an environmentally sustainable WIN-WIN solution for bioenergy production. **Journal of Cleaner Production**, v. 374, p. 134026, 2022.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use.**Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

COELHO, S. T. Tecnologias de Produção e Uso de Biogás e Biometano. São Paulo: Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo, 2018.

DAHIYA, S. et al. Renewable hydrogen production by dark-fermentation: Current status, challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124354, 2020.

DIAS, M. O. S. et al. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72–78, 2013.

DOS REIS, C. M. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498–8509, 2015.

ESKICIOGLU, C. et al. Assessment of hydrothermal pretreatment of various lignocellulosic biomass with CO_2 catalyst for enhanced methane and hydrogen production. **Water Research**, v. 120, p. 32–42, 2017.

FERNANDO HERRERA ADARME, O. et al. Biogas production by anaerobic co-digestion of sugarcane biorefinery byproducts: Comparative analyses of performance and microbial community in novel single-and two-stage systems. **Bioresource Technology**, v. 354, p. 127185, 2022.

FOLHA DE PERNAMBUCO. Cana-de-açúcar traz bons resultados para Pernambuco na safra 2022/2023. 2024.

FRENTE PARLAMENTAR DA AGROPECUÁRIA, F. Panorama Setor Sucroenergético. Disponível em: Panorama Setor Sucroenergético - FPA.

HOARAU, J. et al. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 24, p. 11–25, 2018.

INTANOO, P. et al. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 15, p. 11104–11112, 2012.

JANKE, L. et al. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10–20, 2016.

JOPPERT, C. L. et al. Energetic shift of sugarcane bagasse using biogas produced from sugarcane vinasse in Brazilian ethanol plants. **Biomass & Bioenergy**, v. 107, p. 63–73, 2017.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. do (Eds.). Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. Concórdia: Sbera; Embrapa Suínos e Aves, 2019.

LAI, Z.; ZHU, M.; YANG, X.; et al. Optimization of key factors affecting hydrogen production from sugarcane bagasse by a thermophilic anaerobic pure culture. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, p. 119, 2014. DOI: https://doi.org/10.1186/s13068-014-0119-5

LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, 15 abr. 2014.

LEONG, H. Y. et al. Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 87, 2021. DOI: 10.1186/s13068-021-01939-5.

LIAO, Y. et al. A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production. **Science**, v. 367, n. 6484, p. 1385–1390, 2020.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309-4317, 2008.

MARAFON, A. C. et al. Use of sugarcane vinasse to biogas, bioenergy, and biofertilizer production. In: Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives. Elsevier, 2020. p. 179–194.

MOHANAKRISHNA, G.; PENGADETH, D. Mixed culture biotechnology and its versatility in dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 394, p. 130286, 2024.

MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.023.

NISHIO, N.; NAKASHIMADA, Y. Manufacture of biogas and fertilizer from solid food wastes by means of anaerobic digestion. Em: **Food Industry Wastes**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 121–133.

OHEMENG-NTIAMOAH, J.; DATTA, T. Biomethane potential test reveals microbial adaptation and increased methane yield during anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100754, 2021.

OLIVEIRA, R. M. M.; NUNES, M. T. A. S.; SOUSA, R. M. S. DE. Pré-Tratamento Químico E Caracterização Do Bagaço Da Cana: Uma Perspectiva Para Produção De Etanol a Partir De Resíduos Agroindustriais / Chemical Pre-Treatment and Characterization of Sugarcane Bagasse: a Perspective for Ethanol Production From Agroindus. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 87865–87879, 2020.

PASSOS, F. et al. Anaerobic co-digestion of coffee husks and microalgal biomass after thermal hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 49–54, 2018.

QUÉMÉNEUR, M. et al. Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 14, p. 10639–10647, 2012.

RAO, P. V. et al. Biogas generation potential by anaerobic digestion for sustainable energy development in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 7, p. 2086–2094, 2010.

RAZO-FLORES, E.; MONTOYA-ROSALES, J. de J. Usando micróbios para produzir hidrogênio a partir do lixo. **Unesp Para Jovens**, 10 jul. 2024. Disponível em: https://parajovens.unesp.br/usando-microbios-para-produzir-hidrogenio-a-partir-do-lixo/.

RASHIDI, M. et al. Biohydrogen production from co-digestion of sugarcane vinasse and bagasse using anaerobic dark fermentation. **Bioresource Technology Reports**, p. 101793, 2024.

RIBEIRO, A. R. et al. Evaluation of the effect of increasing the organic load in the thermophilic co-fermentation of sugarcane industry by-products on hydrogen, ethanol and lactic acid generation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 57, p. 549–561, 2024.

RIBEIRO, F. R. et al. Anaerobic digestion of hemicellulose hydrolysate produced after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in UASB reactor. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1108–1113, 2017.

SANTOS, L. C. dos et al. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 601–612, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.037.

SAZALI, N. Emerging technologies by hydrogen: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 38, p. 18753-18771, 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.05.070.

SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. In: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53378.

SINDAÇÚCAR - Sindicato da Indústria do Açúcar e do Etanol no Estado de Pernambuco. Notícia Estatística. Disponível em: http://www.sindacucar.com.br/noticia-estatistica/.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

TOLEDO-CERVANTES, A. et al. Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 19, p. 11000–11010, 3 abr. 2020.

TOMASINI, M.; FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 27, p. 9971–9987, 29 mar. 2023.

VIVIAN, M. A. et al. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e suas potencialidades para geração de energia e polpa celulósica. **Madera y Bosques**, v. 28, n. 1, 2022.

VOLPI, M. P. C. et al. Biohydrogen and methane production via silage-based dark co-fermentation using vinasse and filter cake. **Bioresource Technology Reports**, v. 27, p. 101927, 2024.

WEBSTER, T. M. et al. Anaerobic microbial community response to methanogenic inhibitors 2-bromoethanesulfonate and propynoic acid. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 4, p. 537–550, 2016.

WU, L. et al. Upgrading biogas produced in anaerobic digestion: Biological removal and bioconversion of CO_2 in biogas. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111448, 2021.

ZHANG, C. Lignocellulosic Ethanol: Technology and Economics. In: *Alcohol Fuels - Current Technologies and Future Prospect. p. 1–21, 2019.

ZHANG, Y. et al. Anaerobic fermentation of organic solid waste: Recent updates in substrates, products, and the process with multiple products co-production. **Environmental Research**, v. 233, p. 116444, 2023.