

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

ADRIELLE SILVA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA DA VINHAÇA
DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO DE BAIXO
CARBONO**

SÃO CRISTÓVÃO (SE)
2026

ADRIELLE SILVA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA DA VINHAÇA
DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO DE BAIXO
CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Diego Fonseca Bispo.

Coorientadora: Dr^a. Samia Tássia Andrade Maciel.

SÃO CRISTÓVÃO
2026

ADRIELLE SILVA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ESCURA DA VINHAÇA
DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO DE BAIXO
CARBONO**

Dissertação de Mestrado aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais da Universidade Federal de Sergipe, em 24 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Diego Fonseca Bispo
(PPGECIA/UFS)

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Samia Tássia Andrade Maciel
(PRH/UFS)

Membro Interno Titular: Prof^a. Dr^a. Andrea Noveli
(PPGECIA/UFS)

Membro Externo Titular: Prof. Dr. Oscar Fernando Herrera Adarme
(UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me direcionou, sustentou e guiou, para que eu chegasse até esse momento. Agradeço a minha mãe, Maria Bernadete, meu irmão, Jackson e meu noivo, Lucimário, pelo apoio de sempre, por me sustentar e encorajar nos dias difíceis, mostrando que era possível conseguir, com dedicação e esforço, mesmo quando eu duvidava que daria certo, muito obrigada pelo incentivo e carinho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Fonseca Bispo e a minha coorientadora, Dr^a. Samia Tássia Andrade Maciel, pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa, pelos conhecimentos compartilhados e pela orientação acolhedora, estando sempre disponíveis a me escutar, ajudar e orientar ao longo deste trabalho.

Agradeço a banca examinadora, composta pela Prof. Dr^a. Andrea Noveli e pelo Dr. Oscar Fernando Herrera Adarme, muito obrigada por aceitarem colaborar para a melhoria deste trabalho.

Agradeço a Prof. Dr^a. Lisiane dos Santos Freitas e ao Prof. Dr. Silvânio Silvério Lopes da Costa, por permitirem o acesso aos seus laboratórios para execução deste estudo. Agradeço ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) e a Técnica Raquel pelo espaço disponibilizado e por me ajudar e contribuir para este estudo. Muito obrigada a todos pela colaboração neste trabalho.

Agradeço ao Sergipe Parque Tecnológico (SergipeTec), por fornecer estrutura e infraestrutura para a realização deste trabalho. Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), pelo financiamento para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço enormemente aos meus amigos Maria Itamara, Iasmim, Rennan, Silvia, Larissa, Mayara, Thiago, Odeanny, Crislaine, Rodrigo e muitos outros, pela ajuda, apoio, compressão, carinho e por sempre acreditarem que eu conseguiria, muito obrigada por todo incentivo. Agradeço a todos que compõem o Laboratório de Análises Cromatográficas (LAC), que me acolheram no grupo e com quem pude aprender e compartilhar conhecimentos em muitos momentos. Saibam que o apoio e parceria de todos vocês foram essenciais para a concretização desse sonho.

RESUMO

A produção de energia sustentável ganhou destaque na atualidade devido a intensificação das mudanças climáticas frente ao uso predominante dos combustíveis fósseis. Mediante esse cenário, a transição energética para uma matriz composta majoritariamente por fontes renováveis tem aumentado, e entre os caminhos seguidos para essa mudança destaca-se a produção de hidrogênio, considerada uma fonte limpa de energia e um vetor energético promissor, especialmente quando produzido a partir de resíduos orgânicos por processos biotecnológicos. O presente estudo teve como objetivo otimizar o processo de fermentação escura visando a maximização da produção fermentativa de hidrogênio a partir do uso da vinhaça da cana-de-açúcar como substrato e lodo de esgoto como inóculo. Foram aplicados pré-tratamentos para potencializar a atividade dos microrganismos produtores de hidrogênio e maximizar a disponibilidade de açúcares facilmente fermentáveis no sistema reacional. O substrato foi submetido a um pré-tratamento ácido auxiliado por ultrassom (pH, temperatura e tempo de sonicação) e o lodo de esgoto a um pré-tratamento ácido/térmico e incubação por 24 horas (pH- 3,0 e incubação a 55°C), ambos os resíduos foram caracterizados quanto aos parâmetros físico-químicos. As fermentações foram processadas em um biorreator anaeróbio de 7,5L, sendo delineado um planejamento fatorial (2^3) das variáveis a serem otimizadas, pH, temperatura e proporção volumétrica de substrato/inóculo. A quantificação dos gases foi realizada por um cromatógrafo gasoso (GC-TCD/FID) a partir do método cromatográfico desenvolvido e validado nesse estudo. Os resultados obtidos atestaram o elevado potencial energético da vinhaça, decorrente da alta carga de matéria orgânica biodegradável, bem como a eficiência do pré-tratamento no aumento da biodegradabilidade e disponibilidade de açúcares. A partir do planejamento fatorial as condições otimizadas para as variáveis foram: pH- 5,5; temperatura-55°C; proporção volumétrica de substrato/inóculo- 50%, proporcionando uma produção máxima de $1104,4 \text{ N mL H}_2 \text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$. Através do ensaio de validação sobre as condições otimizadas foi obtida uma produção máxima específica de $1158,6 \text{ N mL H}_2 \text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$ e uma produção acumulada de $3267,6 \text{ N mL H}_2 \text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$ ao longo do processamento da reação. Esses resultados demonstram que a integração entre os pré-tratamentos e condições otimizadas das variáveis operacionais potencializam o processo de fermentação escura e maximizam a produção de hidrogênio, e que a rota proposta pode ser considerada como uma alternativa complementar à rota convencional de produção de hidrogênio.

PALAVRAS-CHAVE: Sustentabilidade, transição energética, bio-hidrogênio, energia limpa, fermentação anaeróbia.

ABSTRACT

Sustainable energy production has gained prominence in recent years due to the intensification of climate change resulting from the predominant use of fossil fuels. In this context, the transition toward an energy matrix composed mainly of renewable sources has increased, and among the pathways pursued for this shift, hydrogen production stands out. Hydrogen is considered a clean energy source and a promising energy carrier, especially when produced from organic residues through biotechnological processes. The present study aimed to optimize the dark fermentation process in order to maximize fermentative hydrogen production using sugarcane vinasse as the substrate and sewage sludge as the inoculum. Pretreatments were applied to enhance the activity of hydrogen-producing microorganisms and to maximize the availability of readily fermentable sugars in the reaction system. The substrate was subjected to an acid pretreatment assisted by ultrasound (pH, temperature, and sonication time), while the sewage sludge underwent an acid/thermal pretreatment followed by incubation for 24 hours (pH 3.0 and incubation at 55 °C). Both residues were characterized in terms of their physicochemical parameters. Fermentations were carried out in a 7.5 L anaerobic bioreactor, and a factorial experimental design (2³) was employed to optimize the variables pH, temperature, and substrate/inoculum volumetric ratio. Gas quantification was performed using a gas chromatograph (GC-TCD/FID) based on the chromatographic method developed and validated in this study. The results confirmed the high energy potential of vinasse, resulting from its high load of biodegradable organic matter, as well as the efficiency of the pretreatment in increasing biodegradability and sugar availability. Based on the factorial experimental design, the optimized conditions for the variables were: pH 5.5, temperature 55 °C, and substrate/inoculum volumetric ratio of 50%, resulting in a maximum hydrogen production of 1104.4 N mL H₂ L⁻¹ substrate. Through the validation assay conducted under the optimized conditions, a maximum specific hydrogen production of 1158.6 N mL H₂ L⁻¹ substrate and an accumulated hydrogen production of 3267.6 N mL H₂ L⁻¹ substrate were obtained throughout the reaction process. These results demonstrate that the integration of pretreatments and optimized operational conditions enhances the dark fermentation process and maximizes hydrogen production, indicating that the proposed route can be considered a complementary alternative to the conventional hydrogen production pathway.

Keywords: Sustainability, energy transition, biohydrogen, clean energy, anaerobic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação do hidrogênio por escala de cores e rotas tecnológicas de produção.	21
Figura 2- Intensidade de emissão de carbono associada às rotas tecnológicas de produção de hidrogênio.	23
Figura 3- Valor de produção (bilhões de reais) da cana-de-açúcar no Brasil no ano de 2024.	27
Figura 4- Valor de produção (milhões de reais) da cana-de-açúcar no estado de Sergipe no ano de 2024.	28
Figura 5- Coleta da vinhaça da cana-de-açúcar na Usina Pinheiro (A) e armazenamento em freezer a -20°C no NEREES (B).	49
Figura 6- Sistema completo do biorreator anaeróbio.	60
Figura 7- Ilustração da bag utilizada para o armazenamento de gás acumulado no biorreator durante o processamento dos ensaios.	65
Figura 8- Cromatógrafo gasoso da Shimadzu modelo GC- TCD/FID 2014.	66
Figura 9- Sensor MPX5700AP utilizado para o monitoramento da pressão no sistema reacional.	72
Figura 10- Diagrama de Pareto para representação dos efeitos das variáveis e das suas interações no pré-tratamento ácido por ultrassom da vinhaça da cana-de-açúcar.	82
Figura 11- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando pH e temperatura.	83
Figura 12- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando pH e tempo.	84
Figura 13- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando temperatura e tempo.	85
Figura 14- Gráfico comparativo das amostragens realizadas durante os ensaios 5 e 6.	90
Figura 15- Perfil cromatográfico do TCD (A) e FID (B) dos padrões de gases utilizados no desenvolvimento do método cromatográfico.	91
Figura 16- Gráfico comparativo da produção diária de hidrogênio durante as amostragens realizadas nos ensaios do planejamento experimental.	99
Figura 17- Perfil cromatográfico da produção de hidrogênio e metano nas alíquotas retiradas do ensaio 1 do planejamento experimental.	100
Figura 18- Diagrama de Pareto para representação dos efeitos das variáveis e das suas interações no processo fermentativo.	104
Figura 19- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito da proporção de inóculo, pH e sua interação sobre a produção de hidrogênio.	106
Figura 20- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito da temperatura, proporção de inóculo e sua interação sobre a produção de hidrogênio.	107
Figura 21- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito do pH, temperatura e sua interação sobre a produção de hidrogênio.	109
Figura 22- Gráfico ilustrativo da produção diária e acumulada de hidrogênio durante as amostragens realizadas no ensaio de validação.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação de resultados obtidos para a produção de hidrogênio em diferentes estudos por meio da fermentação anaeróbia da vinhaça da cana-de-açúcar.....	35
Tabela 2- Fatores e níveis do planejamento experimental Box-Bhenken aplicado.....	49
Tabela 3- Matriz experimental do planejamento Box-Bhenken (3^3).....	50
Tabela 4- Parâmetros e métodos de análise utilizados nas caracterizações das amostras.	52
Tabela 5- Condições experimentais dos ensaios preliminares.....	62
Tabela 6- Fatores e níveis do planejamento fatorial (2^3) aplicado.	63
Tabela 7- Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 das bateladas do biorreator.....	64
Tabela 8- Configuração geral do método cromatográfico desenvolvido.....	68
Tabela 9- Resultados da caracterização do teor de sólidos na vinhaça e lodo de esgoto.	74
Tabela 10- Resultados da caracterização da vinhaça e lodo de esgoto quanto aos parâmetros de DBO e DQO.....	76
Tabela 11- Resultados da análise elementar da vinhaça da cana-de-açúcar.	78
Tabela 12- Planejamento experimental Box-Bhenken das variáveis estudadas e as concentrações de açúcares obtidas.	80
Tabela 13- ANOVA do modelo obtido para a concentração de açúcares redutores totais presentes na vinhaça após tratamento por ultrassom.....	81
Tabela 14- Condições experimentais dos ensaios preliminares realizadas no reator com os valores percentuais de hidrogênio e metano produzidos.	87
Tabela 15- Coeficientes de correlação e testes do modelo gerado das curvas analíticas.	92
Tabela 16- Modelos de regressão linear das curvas de calibração analíticas: testes estatísticos dos coeficientes angulares e lineares.	94
Tabela 17- Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas de calibração analíticas.	95
Tabela 18- Testes de repetibilidade dos analitos para diferentes faixas de concentrações no intervalo da faixa linear de trabalho.	96
Tabela 19- Testes de precisão intradiária (repetibilidade) dos analitos para diferentes faixas de concentrações no intervalo da faixa linear de trabalho.	97
Tabela 20- Produção de hidrogênio ($N\text{ mL}_{H_2}\text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$) quantificados nas amostras de gás nos ensaios do planejamento experimental.	98
Tabela 21- Resultados obtidos para a produção máxima de hidrogênio nos ensaios do planejamento fatorial.	102
Tabela 22- ANOVA do modelo obtido para produção de hidrogênio nos ensaios do planejamento fatorial 2^3	103
Tabela 23- Resultados obtidos para a produção diária e acumulada de hidrogênio durante as amostragens do ensaio de validação.	111

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Reação de metabolização da glicose pela rota do acetato.	33
Equação 2- Reação de metabolização da glicose pela rota do butirato.	33
Equação 3- Reação de metabolização da glicose pela rota do etanol.....	33
Equação 4- Reação de metabolização do hidrogênio pela rota das bactérias homoacetogênicas.....	34
Equação 5- Reação de metabolização da glicose e hidrogênio pela rota do propionato.	34
Equação 6- Fórmula para a determinação do teor de sólidos totais.	53
Equação 7- Fórmula para determinação do teor de sólidos totais fixos.	53
Equação 8- Fórmula para determinação do teor de sólidos totais voláteis.....	54
Equação 9- Fórmula para determinação do teor de sólidos suspensos totais.	54
Equação 10- Fórmula para determinação do teor de sólidos dissolvidos totais.	54
Equação 11- Fórmula para determinação do teor de umidade.	55
Equação 12- Fórmula para determinação do teor de alcalinidade das amostras.	56
Equação 13- Fórmula para determinação da concentração de DBO em mg L^{-1}	57
Equação 14- Fórmula para calcular a seletividade do método.	70
Equação 15- Fórmula para o cálculo do limite de detecção.	70
Equação 16- Fórmula para o cálculo do limite de quantificação.	70
Equação 17- Lei dos gases ideais para o cálculo do número de mols de H_2 produzido durante os ensaios.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ART- Açúcares redutores totais

CCS- Captura e Armazenamento de Carbono

CCUS- Captura, Utilização e Armazenamento de Carbono

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

DA- Digestão Anaeróbia

DBO- Demanda Bioquímica de Oxigênio

DESO- Companhia de Saneamento de Sergipe

DQO- Demanda Química de Oxigênio

EPE- Empresa de Pesquisa Energética

ETE- Estação de tratamento de esgoto

FE- Fermentação Escura

FID- Detector de Ionização de Chama

GC- Cromatografia Gasosa

GEE- Gases de efeito estufa

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEA- International Energy Agency

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD- Limite de Detecção

LQ- Limite de Quantificação

ODS- Objetivos do desenvolvimento sustentável

ONU- Organização das Nações Unidas

TCD- Detector de Condutividade Térmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	17
3.1. Transição energética no contexto dos ODS 7 e 13	17
3.2. Hidrogênio: um combustível sustentável e versátil	20
3.3. Biomassa: fonte potencial na produção sustentável de hidrogênio	24
3.4. Vinhaça da cana-de-açúcar e seu potencial de recuperação energético	26
3.5. Lodo de esgoto sanitário como fonte de microrganismos	30
3.6. Digestão anaeróbia: etapas, mecanismos e fatores relevantes	31
3.7. Produção de hidrogênio a partir da vinhaça da cana-de-açúcar.....	34
3.8. Fatores que influenciam a produção de hidrogênio por fermentação escura.....	38
3.8.1. pH.....	39
3.8.2. Temperatura.....	39
3.8.3. Tipo de substrato	40
3.8.4. Tipo de inóculo e tratamentos	41
3.9. Pré-tratamentos da biomassa no processo de fermentação escura.....	42
3.9.1. Pré-tratamentos físicos	43
3.9.2. Pré-tratamento químico	45
3.9.3. Pré-tratamento Biológico	46
4. METODOLOGIA	48
4.1. Coleta e armazenamento do substrato.....	48
4.2. Pré-tratamento do substrato	49
4.3. Inóculo e pré-tratamento	51
4.4. Caracterização físico-química do substrato e inóculo	51
4.4.1. Determinação do pH.....	52
4.4.2. Determinação de sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos	52
4.4.3. Determinação de umidade	55
4.4.4. Determinação da alcalinidade total	55
4.4.5. Determinação da Demanda Química de oxigênio (DQO)	56

4.4.6. Determinação Demanda Bioquímica de Oxigênio	57
4.4.7. Análise elementar	58
4.4.9. Teor de açúcares totais	58
4.5. Descrição do biorreator	59
4.6. Ensaios preliminares	60
4.7. Planejamento experimental estatístico dos ensaios.....	63
4.8. Cromatografia gasosa.....	66
4.8.1. Método cromatográfico desenvolvido.....	67
4.8.2. Validação do método	69
4.8.3. Quantificação do hidrogênio produzido	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1. Caracterização físico-química da vinhaça da cana-de-açúcar e lodo de esgoto ..	73
5.1.1. pH.....	73
5.1.2. Alcalinidade total.....	73
5.1.3. Sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos	74
5.1.4. Umidade	75
5.1.5. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e Demanda química de oxigênio (DQO).....	75
5.1.6. Açúcares totais.....	76
5.1.8. Análise elementar	77
5.2. Pré-tratamento ultrassônico da vinhaça da cana-de-açúcar	79
5.3. Análise dos efeitos dos pré-tratamentos do inóculo e substrato na produção de hidrogênio nos ensaios preliminares	86
5.4. Validação do método cromatográfico desenvolvido	91
5.4.1. Linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade do método desenvolvido.....	92
5.4.2. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas de calibração analítica	95
5.4.3. Precisão e Repetibilidade do método desenvolvido	95
5.5. Otimização da produção de hidrogênio	97
5.5.1. Análise do efeito das etapas da digestão anaeróbia na produção de hidrogênio nos ensaios do planejamento experimental	97
5.5.2. Efeito das variáveis pH, temperatura e proporção do inóculo sobre a produção de hidrogênio.....	101
6. CONCLUSÃO	114

7. PERSPECTIVAS FUTURAS	116
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICES	127

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm causado diversos impactos ao planeta, sendo essas alterações decorrentes principalmente das atividades antropogênicas. Ao observar a matriz energética global é perceptível que o consumo de energia em sua maioria é proveniente dos combustíveis fósseis, que são as principais fontes de emissão de gases de efeito estufa, a exemplo do dióxido de carbono (CO_2), o qual intensifica o aquecimento global (Vatalis; Avlogiaris; Tsalis, 2022).

Diante dos impactos que essas emissões acarretam, torna-se necessária a busca pela reestruturação da matriz energética global, visando assim uma transição energética mundial, saindo do uso dos combustíveis fósseis para energias de fontes renováveis, e buscando a descarbonização dos sistemas energéticos (Lasekann; Tavares, 2021; Vatalis; Avlogiaris; Tsalis, 2022; Lazaro; Soares, 2024).

Nesse contexto, a transição energética é fundamental e permite remodelar o consumo de energia, buscando fontes renováveis, sendo esse um caminho sustentável que mitigará os impactos ambientais (Bashir *et al.*, 2023). Para tal ação, é necessário buscar fontes de energias renováveis, as quais podem ser provenientes de energia solar, eólica, hídrica e biomassa (Losekann; Tavares, 2021).

Dentre as formas de energias limpas citadas, a biomassa é considerada uma alternativa atual e de grande potencial para a produção de bioenergia, levando-se em consideração sua alta disponibilidade no planeta, viabilidade econômica, biodegradabilidade e “impacto zero” no ciclo do carbono. Em virtude das suas emissões serem biogênicas, sendo o carbono removido da atmosfera para a produção da biomassa, esse processo torna-se parte da sua ciclagem natural, o que difere das fontes fósseis, que geram elevadas emissões de CO_2 e outros poluentes na atmosfera (Losekann; Tavares, 2021; Nair; Agrawal; Verma, 2022).

A relevância do uso da biomassa na produção de bioenergia é evidenciada pela sua versatilidade com diversas aplicações, que incluem a produção de biocombustíveis como etanol, biogás, biodiesel e bio-hidrogênio (Moustakas; Parmaxidou; Vakalis, 2020). A utilização da biomassa pode ser proveniente de diversas atividades humanas, a exemplo dos resíduos agroindustriais, os quais podem ser reaproveitados na geração de energia,

apresentando um papel significativo para a redução da emissão de carbono. Haja visto que estes resíduos são muitas vezes descartados no meio ambiente sem nenhum tratamento, gerando poluição e contaminação do meio. Sua utilização como fonte de energia proporcionará uma recuperação energética e direcionamento correto do resíduo (Nair; Agrawal; Verma, 2022).

Em decorrência dos diversos impactos que os resíduos podem acarretar, tem-se buscado meios de valorização da biomassa, visando seu tratamento e redução dos danos ambientais. Dentre as bioenergias que são decorrentes da utilização da biomassa, é possível destacar a importância do hidrogênio, considerado uma das principais formas de reestruturar a matriz energética global, uma vez que é a única forma de energia limpa totalmente livre de carbono (Nair; Agrawal; Verma, 2022).

A produção de hidrogênio pode ocorrer através de vários processos utilizando os resíduos de biomassa, sejam processos termoquímicos como a gaseificação, pirólise e liquefação, e/ou processos bioquímicos como a fotofermentação, biofotólise, eletrólise microbiana e fermentação escura (Nair; Agrawal; Verma, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024). A partir das rotas de produção mencionadas, a fermentação escura, encontra-se em processo de implementação. No entanto, seu uso tem despertado o interesse biotecnológico, sendo buscada formas de otimizar o processo, já que ao longo da etapa fermentativa, o hidrogênio é produzido (Nair; Agrawal; Verma, 2022; Malet *et al.*, 2023).

Neste cenário, o presente estudo propõe a otimização do processo de fermentação escura da vinhaça da cana-de-açúcar em sua etapa intermediária, considerada etapa fermentativa, evitando o prosseguimento para as etapas de acetogênese e metanogênese, em que ocorre a conversão do hidrogênio e ácido acético em biogás, contribuindo assim para a gestão sustentável e eficiente dos resíduos agroindustriais gerados.

Reduzindo assim a poluição ambiental, o que proporcionará a recuperação energética dos resíduos e permitirá a descarbonização dos diversos setores, alinhando-se aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentáveis (ODS), em seus objetivos 7 e 13, que tem como metas a produção de energia limpa e acessível, e a tomada de ações contra as mudanças climáticas, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar o processo de fermentação escura para produção de hidrogênio de baixo carbono a partir da vinhaça da cana-de-açúcar inoculada com lodo de esgoto.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o substrato (vinhaça da cana-de-açúcar) e o inóculo (lodo de esgoto) utilizados na fermentação escura quanto aos parâmetros físico-químicos;
- Desenvolver e validar um método cromatográfico, no cromatógrafo gasoso (GC-TCD/FID) para avaliação qualitativa e quantitativa dos gases gerados;
- Avaliar a influência da aplicação de pré-tratamentos ao substrato e inóculo para potencializar a produção de hidrogênio;
- Investigar os efeitos das variáveis pH, temperatura e proporção volumétrica de substrato/inóculo sobre a produção de hidrogênio;
- Determinar as condições ótimas para maximizar a produção de hidrogênio no processo fermentativo;

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1. Transição energética no contexto dos ODS 7 e 13

Mundialmente, observa-se que a transição energética é um eixo central no que se refere à descarbonização dos diversos setores, tendo como princípio tornar a matriz energética global mais sustentável e com a maior parte da sua estrutura composta por fontes energéticas renováveis (Neofytou; Nikas; Doukas, 2020; Lazaro; Soares, 2024).

Esses fatores irão contribuir diretamente para a mitigação dos impactos ambientais causados pelas mudanças climáticas e, conseqüentemente, ocorrerá a redução das altas emissões de gases de efeito estufa. Assim será possível garantir que o aumento médio da temperatura do planeta não exceda 2 °C, planejando sobretudo que esta limite-se a 1,5 °C, sendo esse um compromisso assumido pelos líderes mundiais na COP26 (Tzeremes; Dogan; Alavijeh, 2023; Razzaq *et al.*, 2023).

Nesse sentido, é importante considerar que a transição para fontes de energias renováveis vai além de reduzir as emissões de carbono, envolvendo também utilizar tecnologias mais sustentáveis de produção de energia. Esta deve ser considerada, sobretudo, como uma mudança de paradigma, visto que irá envolver a modificação geral na estruturação de todo o sistema político, econômico, social e ambiental (Neofytou; Nikas; Doukas, 2020; Lazaro; Soares, 2024).

Abrangendo desde mudanças de políticas e regulamentações públicas a mudanças em questões sociais, reestruturando a produção de energia com matéria-prima renovável, buscando atender as demandas de toda uma população, garantindo que os grupos menos favorecidos socioeconomicamente tenham acesso a esse novo sistema energético sustentável (Lazaro; Soares, 2024; FGV, 2024).

A partir deste cenário, para atingir todas essas esferas no desenvolvimento energético sustentável, é necessário encontrar o equilíbrio dentro dos sistemas econômico, social e ambiental, apresentando-se como um grande desafio da transição energética representado pelo chamado “trilema energético”, que se baseia na segurança, equidade energética e sustentabilidade ambiental, sendo esses os pilares para uma transição bem sucedida, buscando sistemas de energia descarbonizados, descentralizado e digitalizados (Khan *et al.*, 2021; Lazaro; Soares, 2024; FGV, 2024).

O primeiro desafio do trilema energético refere-se à segurança energética, que tem por fundamento assegurar à sociedade o acesso à energia confiável, estável, acessível e sustentável. Os países devem apresentar a capacidade de atender as demandas atuais e futuros de energia, com um sistema de infraestrutura confiável e resiliente nesse fornecimento (Khan *et al.*, 2022; Lazaro; Soares, 2024; FGV, 2024). O segundo desafio é a equidade energética, a qual fundamenta-se em proporcionar a sociedade, o acesso universal e igualitário à energia, em condições acessíveis e confiáveis para todos, seja para fins comerciais ou domésticos (Khan *et al.*, 2022; Lazaro; Soares, 2024; FGV, 2024).

O último desafio, é a sustentabilidade ambiental, que vai ao encontro dos demais desafios e visa sobretudo reduzir os impactos ambientais causados pelas produções não sustentáveis de energias a base de fontes fósseis e seus usos. Essa dimensão em específico, visa mitigar as emissões de carbono que contribuem para o aquecimento global e crise climática, defendendo assim, a implementação de sistemas energéticos ecológicos minimizando esses efeitos (Khan *et al.*, 2022; Lazaro; Soares, 2024; FGV, 2024).

A transição energética não será algo uniforme ou linear e necessitará de empenho e gerenciamento para o seu desenvolvimento, visando a garantia do acesso universal e seguro à energia, de modo sustentável. Para tal, é notório que a integração entre órgãos governamentais, centros de pesquisas, empresas e sociedade, será mandatório para realizar uma reestruturação da matriz energética para fontes renováveis, tanto dentro de um determinado país como também entre países (FGV, 2024).

O cenário mundial de consumo de energia é majoritariamente dependente dos combustíveis fósseis e seu consumo acarreta o agravamento das mudanças climáticas (Losekann; Tavares, 2021; Bashir *et al.*, 2023), principalmente, devido às grandes emissões de gases de efeito estufa (GEE), a exemplo do dióxido de carbono (CO₂), que intensificam o aquecimento global (Goldemberg, 2023). No entanto, ao voltar um olhar para o Brasil, o país apresenta uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo, com aumento significativo na oferta interna de fontes renováveis, como a biomassa, energia eólica e solar (EPE, 2024).

A composição da matriz energética brasileira, é representada por 49,1% de fontes renováveis em sua estrutura, sendo 12,1% provenientes de energia hidráulica, 2,6% de eólica, 1,7% de solar, 16,9% de biomassa da cana-de-açúcar, 8,6% de lenha e carvão vegetal e 7,2% licor preto e outros renováveis. No entanto, observa-se também que grande

parte ainda é formada por fontes não renováveis, em que 35,1% é proveniente do petróleo e seus derivados, 9,6% corresponde ao gás natural, 4,4% ao carvão mineral, 1,2% de urânio e 0,6% de outros não renováveis, o que demonstra ainda a necessidade de transição energética para uma composição com prioridade de fontes renováveis (EPE, 2024).

Nesta perspectiva, o Brasil tem grande potencial para tornar sua matriz energética mais sustentável, levando-se em consideração que o país é uma potência agrícola, apresentando uma grande disponibilidade de biomassa advinda do setor agrícola/agroindustrial. A grande quantidade de resíduos gerados, pode ser convertida em fontes de energia limpa e renovável, realizando assim a recuperação energética e promovendo a geração de produtos de valor agregado, o que terá contribuição direta na redução de emissão de gases de efeito estufa (Stabile *et al.*, 2020; Nogueira; Capaz; Lora, 2021; Hai *et al.*, 2023).

O alinhamento da perspectiva da transição energética com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) desenvolvido pela Organização das Nações Unidas (ONU), apresentam como propósito atingir de maneira integrada as três dimensões do desenvolvimento sustentável, sendo elas a dimensão social, econômica e ambiental. Abordando questões voltadas para erradicação da fome e pobreza, bem-estar e saúde humana, educação de qualidade para todos, igualdade social, dignidade humana e crescimento econômico, inovação e desenvolvimento sustentável de forma igualitária, produção energética eficiente e sustentabilidade ambiental (ONU, 2015; Elavarasan *et al.*, 2023).

Dois desses objetivos, encontram-se alinhados com a transição energética e redução das mudanças climáticas, os objetivos 7 e 13, respectivamente. O ODS 7 busca assegurar energia limpa, confiável e acessível para todos e o ODS 13 propõe ações e medidas urgentes para combater as mudanças climáticas e seus impactos, alinhando-se a busca de uma matriz energética global sustentável (ONU, 2015).

Dessa maneira, é possível estabelecer uma relação direta entre os ODS 7 e 13 e a busca por uma transição energética sustentável, visto que o ODS 7 é considerado a meta que se baseia na ação, e o ODS 13 a meta baseia-se na consequência, caminhando juntos rumo a produção energética sustentável e combate as mudanças climáticas (Elavarasan *et al.*, 2023).

3.2. Hidrogênio: um combustível sustentável e versátil

O hidrogênio é considerado uma fonte de energia promissora, é o único combustível que apresenta uma composição livre de carbono e que ao final do processo de combustão irá produzir água como subproduto. Esse biocombustível torna-se um vetor energético essencial para reconstrução da matriz energética, tornando-a sustentável e cumprindo as metas de redução da emissão de gases de efeito estufa. Além disso, possibilita a descarbonização de setores industriais, que emitem altas quantidades de dióxido de carbono (Nogueira; Capaz; Lora, 2021; Nair; Agrawal; Verma, 2022; Dermuhl; Riedel, 2023).

A produção de hidrogênio é diversificada, podendo ser gerado por fontes primárias de energia, como fontes fósseis, a exemplo do gás natural, e por fontes renováveis, como energia solar e biomassa (FGV, 2023; Garlet *et al.*, 2024). No que se refere a suas propriedades, o hidrogênio é o elemento mais abundante do universo, embora raro em forma molecular na Terra, e que em temperatura e pressão normal é altamente inflamável (BNDS, 2022). Além disso, é pouco solúvel em água, inodoro, incolor, insípido, apresenta um ponto de ebulição de -253°C e ponto de fusão de -259°C , com uma densidade de $0,08374 \text{ kg m}^{-3}$ e a sua capacidade de calor específico é de $14,85 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Bondarenko *et al.*, 2022; BNDS, 2022).

O hidrogênio ainda apresenta um grande coeficiente de difusão, baixa toxicidade e alta condutividade térmica, o que o torna um excelente condutor de calor e transportador de energia (Bondarenko *et al.*, 2022). Por ser considerado o elemento mais leve existente, o hidrogênio possui a maior densidade energética em termos de massa em relação aos combustíveis comuns, o que o torna um produto relevante nos processos químicos e industriais (BNDS, 2022).

Um dos desafios enfrentados em suas aplicações, está associado a baixa densidade energética do gás hidrogênio em termos de volume, no qual o gás necessita de elevado volume para seu armazenamento. Cerca de 1 kg de hidrogênio ocupa 12 mil litros, demonstrando empecilhos nos aspectos relacionados ao transporte, armazenamento e sua utilização como fonte energética (BNDS, 2022). No entanto, o hidrogênio é altamente aplicável a diversos fins, podendo ser utilizado em: usinas de energia; na indústria siderúrgica; alimentícia para a hidrogenação de óleos e gorduras; farmacêutica; elétrica;

empresas de transporte e gás; de produção de amônia; de combustíveis de aviação; entre outras (Bondarenko *et al.*, 2022; FGV, 2023; Garlet *et al.*, 2024).

É considerado um elemento versátil e de grande importância na cadeia energética global e na descarbonização dos sistemas de produção de energia (Ivanenko *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2024). Com base nessa perspectiva, para se obter e utilizar o hidrogênio de modo que contribua efetivamente para a descarbonização da matriz energética, é importante que sua fonte de energia primária e tecnologia de produção sejam sustentáveis, proporcionando, deste modo, a minimização da emissão de gases de efeito estufa pela rota de produção (EPE, 2022; Ajanavic; Sayer; Haas, 2022).

Partindo desses requisitos, inicialmente foi elaborado um sistema de classificação para a produção de hidrogênio, na qual baseia-se em cores atribuídas às tecnologias de produção e impactos ambientais acarretados, considerando as fontes de energias e as emissões de carbono durante o processo de produção (BNDS, 2022). A categorização por cores evidencia a variedade de rotas tecnológicas disponíveis para a produção de hidrogênio, cada uma com impactos ambientais distintos.

A produção pode ocorrer por meio da eletrólise, reforma a vapor do metano, gaseificação, pirólise, por processos fotoquímicos e bioquímicos, além de decorrer da utilização de fontes fósseis e/ou fontes renováveis (Incer-Valverde *et al.*, 2023). A Figura 1 apresenta a classificação do hidrogênio por cores e suas diferentes rotas de produção.

Figura 1- Classificação do hidrogênio por escala de cores e rotas tecnológicas de produção.

Cor	Resumo do processo de produção do hidrogênio
Preto	Gaseificação do carvão mineral (antracito ¹) sem CCUS ²
Marrom	Gaseificação do carvão mineral (hulha ³) sem CCUS
Cinza	Reforma a vapor do gás natural sem CCUS
Azul	Reforma a vapor do gás natural com CCUS
Turquesa	Pirólise do metano ⁴ sem gerar CO ₂
Verde	Eletrólise da água com energia de fontes renováveis (eólica/solar)
Musgo	Reformas catalíticas, gaseificação de plásticos residuais ou biodigestão anaeróbica de biomassa ou biocombustíveis com ou sem CCUS
Rosa	Fonte de energia nuclear
Amarelo	Energia da rede elétrica, composta de diversas fontes
Branco	Extração de hidrogênio natural ou geológico

Fonte: EPE, 2022

Na Figura 1, rotas convencionais para a produção de hidrogênio por meio da reforma a vapor do gás natural sem e com “captura, utilização e armazenamento de carbono” (CCUS), são representadas pelas cores cinza e azul, correspondentemente. Tecnologias associadas ao sistema de CCUS ocasionam um menor impacto ambiental, uma vez que emitem menores quantidades de carbono se comparadas as tecnologias sem CCUS oriundas de fontes fósseis (Ajanavic; Sayer; Haas, 2022; BNDS, 2022; Incer-Valverde *et al.*, 2023).

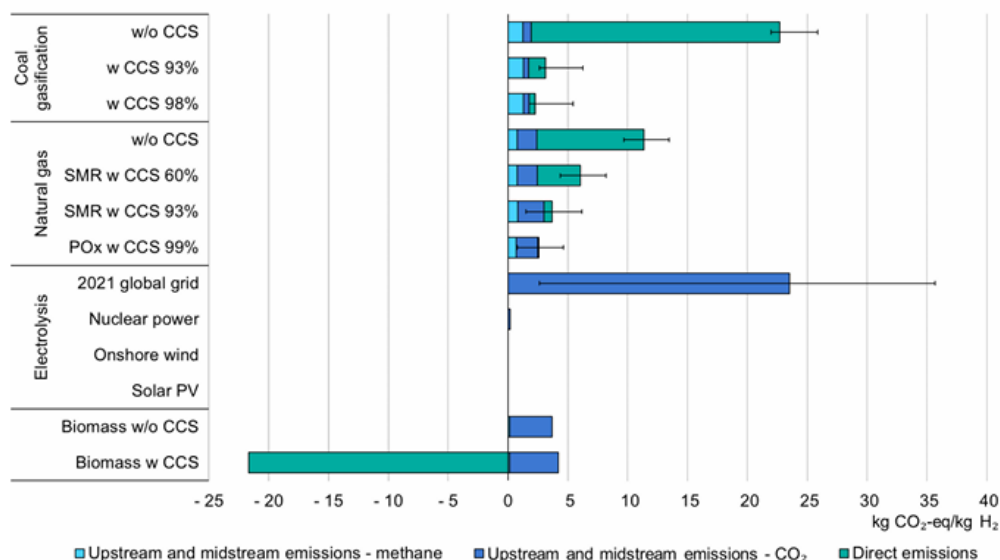
Além disso, processos consolidados por meio de fontes renováveis, como é o caso da eletrólise da água alimentada por energia solar e/ou eólica, é representada na cor verde, nomeando-se “hidrogênio verde” (Ajanavic; Sayer; Haas, 2022; Incer-Valverde *et al.*, 2023). Vale destacar que o “hidrogênio verde musgo” refere-se a uma rota em desenvolvimento, representando uma forma de tratamento ecológico da biomassa. Possibilitando durante o processo, a geração de energia sustentável como o hidrogênio e outros biocombustíveis, com ou sem a CCUS através de processos de reformas catalíticas, gaseificação ou processos biológicos, como a digestão anaeróbia (Nair; Agrawal; Verma, 2022).

Entretanto novas designações foram estabelecidas para descrever os impactos das diversas rotas de produção de hidrogênio em termos de suas emissões, substituindo a classificação tradicional baseada em cores. Permitindo a realização de uma quantificação coerente em termos das reduções das emissões de carbono pelas rotas de produção (FGV, 2023; IEA, 2023). Sendo assim determinado pela International Energy Agency (IEA, 2023) que o termo “Hidrogênio de Baixo Carbono” fosse adotado, na busca por uma abrangência maior em relação as reduções das emissões de carbono pelas rotas de produção.

O uso do termo “Hidrogênio de Baixo Carbono” relaciona não somente as rotas de produção, mais também, considera os combustíveis e taxa de captura e armazenamento de carbono (CCS) dentro desse processo. Mensurando as emissões diretas, ocasionadas durante o processo de produção do hidrogênio, e emissões indiretas voltados a fonte de energia primária utilizada no processo de conversão e transporte do hidrogênio, seja a partir do gás natural ou da eletricidade. Com esse propósito, foram estabelecidas as intensidades de emissões para as diferentes rotas, definindo assim um critério de aceitação

para considerar o hidrogênio produzido, como sustentável e de baixa emissão (FGV, 2023; IEA, 2023). A Figura 2 apresenta as emissões de carbono referentes as rotas de produção de hidrogênio.

Figura 2- Intensidade de emissão de carbono associada às rotas tecnológicas de produção de hidrogênio.



Fonte: IEA, 2023

Na Figura 2 observa-se que as produções realizadas através da reforma a vapor do metano pelo gás natural sem CCS podem emitir cerca de 11 kg CO₂-eq/kg H₂. A gaseificação do carvão sem CCS tem emissões totais que variam entre 22-26 kg CO₂-eq/kg H₂. A rota da eletrólise da água, por sua vez, tem sua emissão condicionada as emissões indiretas da geração e transporte de eletricidade para o processo de produção, podendo emitir 24 kg CO₂-eq/kg H₂ quando se utiliza a intensidade média global atual de CO₂ que é 460 g CO₂-eq/kWh (IEA, 2023).

Nesse cenário, é possível perceber que a eletricidade advinda de fontes renováveis, seja de hidrelétricas, solar fotovoltaica ou eólica não tem emissões diretas de carbono e quando utilizada em rotas como a da eletrólise como alimentação, não emite carbono. Por fim, é possível destacar também as rotas de produção que utilizam biomassa, seja com ou sem a CCS, que apresentam baixas emissões, cerca de 4 kg CO₂-eq/kg H₂, apresentando potencial para emissões negativas de carbono de forma direta através da sua rota de produção. Desse modo, foi adotada a intensidade de emissão de carbono por rota

de produção, como forma de universalizar o que é considerado como hidrogênio sustentável, em substituição a classificação por cores (IEA, 2023).

3.3. Biomassa: fonte potencial na produção sustentável de hidrogênio

A biomassa tem um grande potencial para a geração de energia sustentável e renovável, sendo considerada uma importante fonte de crescimento para o futuro adentrando tanto o mercado nacional quanto internacional. Proporcionando uma mudança significativa da matriz energética, diversificação das fontes renováveis e contribuição para mitigação das emissões de GEE (Moustakas; Parmaxidou; Vakalis, 2020; Silva *et al.*, 2021).

Em geral a biomassa é definida como a quantidade total de matéria orgânica biodegradável presente em um produto/resíduo, podendo ser de origem natural ou decorrente das atividades humanas e, quando usada para fins energéticos, apresenta três classificações principais, sendo essas: biomassa florestal; biomassa agrícola; biomassa de rejeitos urbanos e industriais (Silva *et al.*, 2021; Nair; Agrawal; Verma, 2022).

A biomassa florestal é proveniente de produtos ou resíduos que advém das florestas, estando nessa categoria as biomassas lenhosas que são, em geral, culturas dedicadas para fins energéticos, à exemplo da lenha e do carvão vegetal utilizados como combustíveis aquecedores. A biomassa agrícola, relaciona-se aos resíduos ou subprodutos agrícolas, pecuários e agroindustriais. Esta biomassa apresenta em sua composição teores de lipídios, amido, carboidratos e celulosas que podem ser convertidos em biocombustíveis por processos químicos ou biológicos à exemplo da cana-de-açúcar utilizada na produção de etanol e eletricidade (Silva *et al.*, 2021; Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

Por fim, tem-se a biomassa proveniente de rejeitos urbanos e industriais que são advindas de resíduos sólidos ou líquidos urbanos que se encontram no esgoto ou lixo, como plásticos, vidros, papelão, resíduo alimentar, resíduo vegetal, alguns metais, entre outros e, ao separá-los, estes podem ser utilizados para fins energéticos, assim como os resíduos provindos das atividades agroindustriais (Silva *et al.*, 2021; Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

Assim sendo, o tipo de biomassa, bem como a sua composição química irá influenciar no tipo de biocombustível gerado, já que este pode ser classificado em biocombustível de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. Apresentando como diferencial a não geração de aumento de emissões de GEE na atmosfera, já que o dióxido de carbono emitido é de origem biogênica (Mahapatra *et al.*, 2021; Sikiru *et al.*, 2024).

Em resumo, os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis gerados a partir da matéria orgânica advinda de fluxos de resíduos, pecuária, culturas agrícolas e florestais, resíduos sólidos e líquidos, com potencial de substituir combustíveis de origem fóssil, apresentando diversas finalidades de uso e podendo ser utilizado em sua forma pura ou como aditivo (Malode *et al.*, 2021; Mahapatra *et al.*, 2021).

Perante ao exposto, observa-se na literatura que os biocombustíveis de primeira geração são aqueles em que as culturas são dedicadas a produção de biocombustíveis, como a cana-de-açúcar, trigo, arroz, lenha, dentre outros, para produzir etanol. Os biocombustíveis de segunda geração, por sua vez, surgiram do processamento de diversas matérias-primas, incluindo neste grupo os resíduos agroindustriais, resíduos de esgoto, resíduos sólidos, entre outros, que podem ter como finalidade a produção de biocombustíveis como bioetanol, biodiesel, biometanol, biogás e bio-hidrogênio (Malode *et al.*, 2021; Nair; Agrawal; Verma, 2022; Sikiru *et al.*, 2024).

Para a terceira geração, tem-se como matéria-prima a biomassa provinda das algas, fungos e bactérias. E a quarta geração, fundamenta sua produção a partir de organismos geneticamente modificados (Malode *et al.*, 2021; Nair; Agrawal; Verma, 2022; Sikiru *et al.*, 2024). Ao analisar a importância da biomassa como fonte de energia essencial para a descarbonização da matriz energética, as projeções apontam que até o ano de 2030 cerca de 60% do consumo mundial de energia renováveis será proveniente de energia de biomassa (Tleubergenova; Han; Meng, 2024).

Dessa maneira, é essencial o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de energia limpa, visando a uso de resíduos que irão minimizar os impactos ambientais (Nair; Agrawal; Verma, 2022). Nesse sentido, dentre as formas de aproveitamento da biomassa, é destacada a produção de hidrogênio, como fonte de energia sustentável, proporcionando o tratamento e reaproveitamento de resíduos de forma ecológica. A produção de hidrogênio a partir da biomassa está em ascensão, e sua

produção pode ser realizada por meio de processos biológicos, com ou sem dependência da luz (Goren; Dincer; Khalvati, 2024).

Dentre os processos com dependência da luz, é possível destacar a fotofermentação e a biofotólise que produzem ao final o hidrogênio e dióxido de carbono (Saravanan *et al.*, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024). Para os métodos biológicos sem dependência da luz é possível destacar a fermentação escura. A fermentação escura é um processo fermentativo que ocorre a partir da degradação da matéria orgânica, na ausência de oxigênio, para produzir ácidos graxos voláteis (AGV), dióxido de carbono e hidrogênio (Saravanan *et al.*, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024; Goren; Dincer; Khalvati, 2024).

Este método é composto por etapas de hidrólise e acidogênese da matéria orgânica e, quando combinados as etapas de acetogênese e metanogênese, compõe o processo de digestão anaeróbia (Saravanan *et al.*, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024; Goren; Dincer; Khalvati, 2024). É considerado um método vantajoso devido a possibilidade de aplicar uma vasta gama de resíduos na produção de hidrogênio (Saravanan *et al.*, 2022).

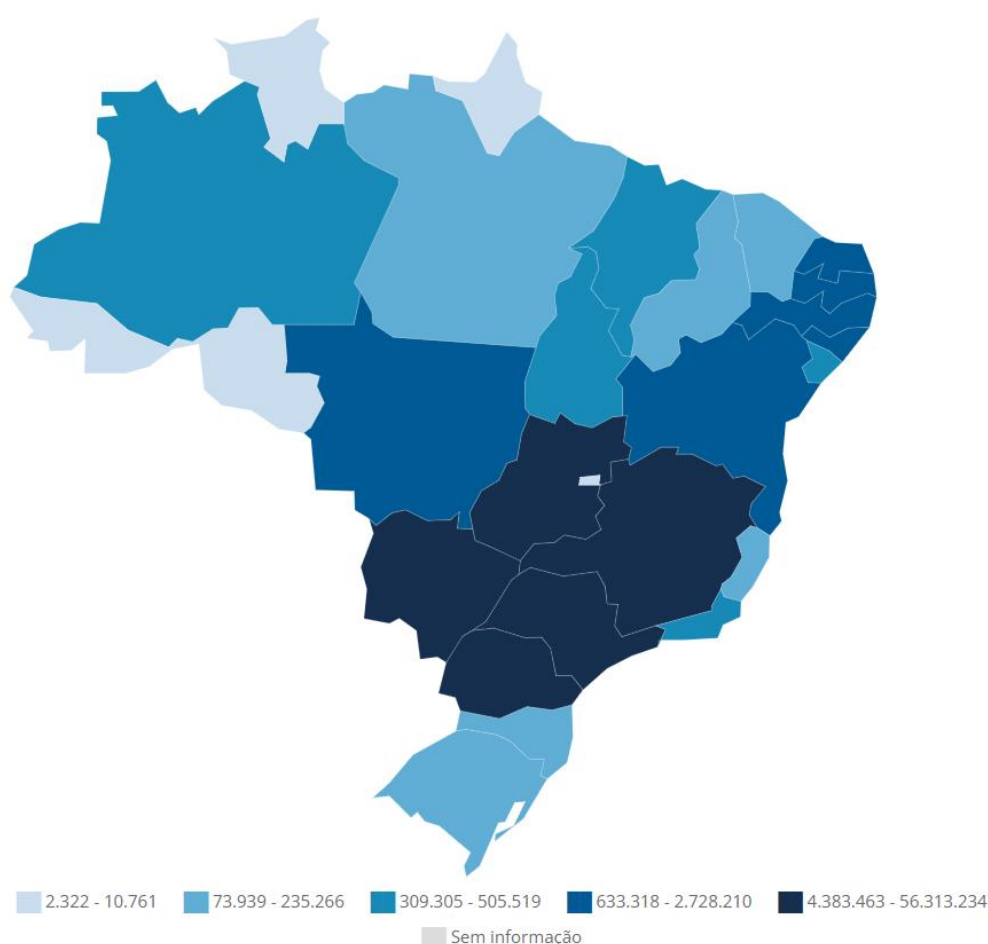
3.4. Vinhaça da cana-de-açúcar e seu potencial de recuperação energético

No Brasil, o setor sucroalcooleiro possui relevante importância econômica, uma vez que a cana-de-açúcar ocupa a segunda posição em valor de produção, sendo considerada a principal cultura agrícola do país em termos de volume produtivo. A partir do manejo dessa cultura são obtidos vários produtos de valor agregado como o álcool, açúcar e bioeletricidade (IBGE, 2024). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de cana-de-açúcar em 2024 foi, aproximadamente, de 759.662.482 milhões de toneladas, apresentando valor de produção de 104,97 bilhões de reais, ficando atrás somente da soja com valor de produção de 260,23 bilhões de reais (IBGE, 2024).

A produção da cana-de-açúcar permeia grande parte do território brasileiro, sendo São Paulo (418.569.112 milhões de toneladas), Minas Gerais (83.764.720 milhões de toneladas), Goiás (80.995.596 milhões de toneladas), Mato Grosso do Sul (52.499.052 milhões de toneladas) e Paraná (34.505.828 milhões de toneladas) os maiores produtores. Em 2024, a produção conjunta das regiões mencionadas totalizou 670.334.308 milhões de toneladas, correspondendo a 88,24% da produção nacional de cana-de-açúcar. Os

11,76% restantes foram provenientes dos demais estados da federação que, em conjunto, produziram cerca de 89.328.174 milhões de toneladas (IBGE, 2024). A Figura 3 ilustra a distribuição do valor da produção de cana-de-açúcar nas diferentes regiões do país no referido ano.

Figura 3- Valor de produção (bilhões de reais) da cana-de-açúcar no Brasil no ano de 2024.

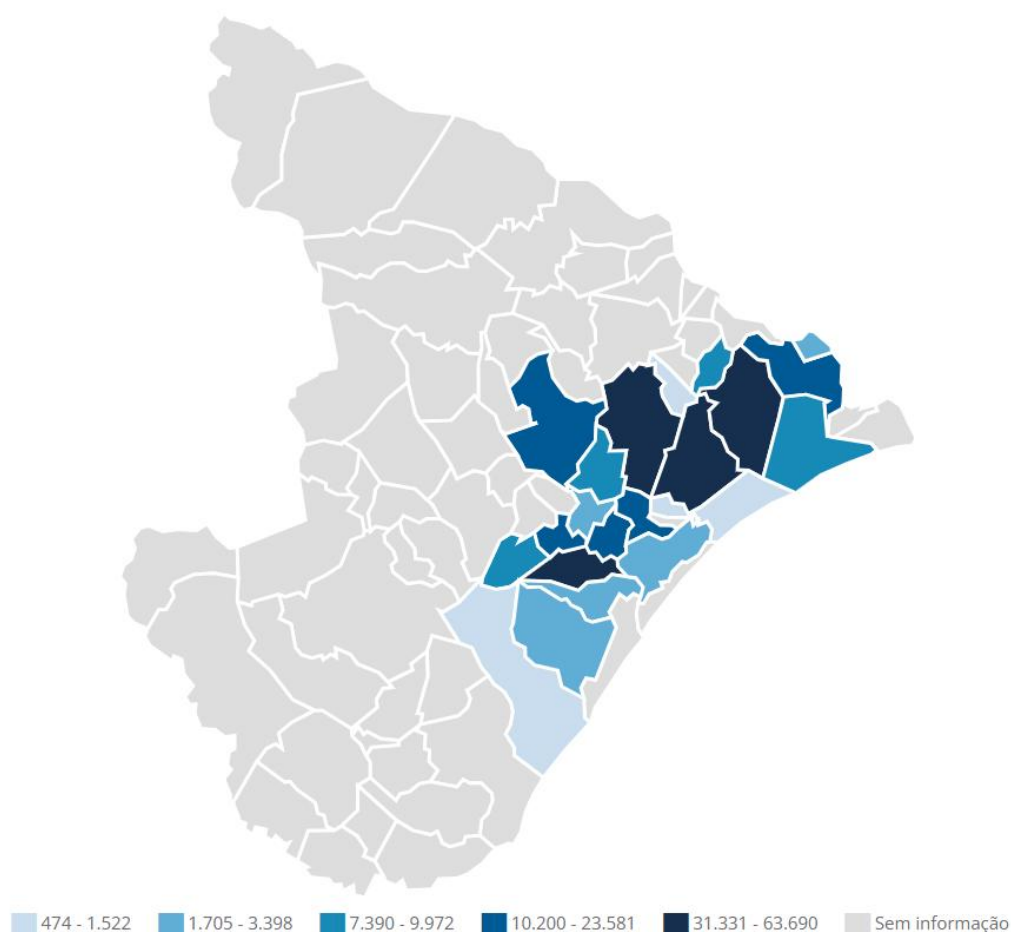


Fonte: IBGE, 2024

Ao dar ênfase ao estado de Sergipe, o menor da federação em extensão territorial, observa-se uma produção considerável de cana-de-açúcar, produzindo cerca de 2.753.407 milhões de toneladas em 2024. Esse volume corresponde a um valor de produção de R\$ 309,30 milhões, o que evidencia sua relevância na economia do estado. A cana-de-açúcar ocupa a primeira posição em termos de quantidade produzida e a terceira posição entre os produtos agrícolas de maior valor de produção em Sergipe, sendo superada apenas pelo milho em grãos (R\$ 1,06 bilhões) e pela laranja (R\$ 718,59 milhões). Nesse contexto, analisando a produção geral em Sergipe, os municípios de Laranjeiras, Japoatã,

Japaratuba e Capela são os maiores produtores (IBGE, 2024). Na Figura 4 foi ilustrado um mapa de Sergipe com o valor da produção de cana-de-açúcar nas diferentes regiões do estado no ano de 2024.

Figura 4- Valor de produção (milhões de reais) da cana-de-açúcar no estado de Sergipe no ano de 2024.



Fonte: IBGE, 2024

O resultado desta grande produção também é responsável pela geração de grandes quantidades e diversidade de resíduos advindos do seu processamento, como o bagaço, água de lavagem, palha da cana, torta de filtro, melaço e vinhaça (Rogeri *et al.*, 2023; Volpi *et al.*, 2024). Dentre os resíduos mencionados, a vinhaça destaca-se como principal subproduto do processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol. Para cada litro de etanol produzido cerca de 10 a 15 litros de vinhaça são gerados (Ramos; Silva, 2020; Nadaleti; Lourenço, 2021; Silverio *et al.*, 2021).

Segundo dados da Empresa de Pesquisa Energética (EPE), o volume de vinhaça gerado no Brasil em 2023, atingiu a marca que variou entre 295 à 442,5 bilhões de litros (EPE, 2024). Em Sergipe, a produção de etanol na safra 2023/2024, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), foi de 139.400 mil litros, gerando assim, cerca de 1.394.000 milhão à 2.085.000 milhões de litros de vinhaça ao ano (CONAB, 2023).

A vinhaça apresenta alto potencial poluidor, acarretando prejuízos para o meio ambiente quando descartada incorretamente e é composta, principalmente, por água (93%), matéria orgânica e nutrientes (7%) (Sica *et al.*, 2020; Mikucka; Zielińska, 2020). No geral, a vinhaça possui uma coloração marrom escura e odor característico, exibindo uma alta concentração de matéria orgânica, representada pela sua alta demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos orgânicos (Bettani *et al.*, 2019; Nadaleti; Lourenço, 2021; Rashidi *et al.*, 2024).

Para além disso, este resíduo também apresenta elevada acidez, no qual o pH varia entre 3 e 5; alto teor de enxofre, nitrogênio, fósforo, potássio, ácidos orgânicos e açúcares redutores- glicose e frutose - e açúcares não redutores, como a sacarose (Bettani *et al.*, 2019; Nadaleti; Lourenço, 2021; Rashidi *et al.*, 2024). Apesar desse potencial poluidor alarmante, a principal aplicação da vinhaça é seu uso nas plantações de cana-de-açúcar como fertilizante, devido ao seu alto teor de enxofre, nitrogênio, fósforo, potássio (Nadaleti; Lourenço, 2021).

Entretanto, essa destinação pode acarretar sérios danos ao meio ambiente, já que o efluente não passa por um tratamento prévio para a redução da carga orgânica, podendo ocasionar a lixiviação de íons para os aquíferos subterrâneos e superficiais, gerando o acúmulo de íons e nutrientes no solo, o que é ambientalmente prejudicial (Nadaleti; Lourenço, 2021).

Mediante a esse contexto, normas para a disposição desse resíduo foram estipuladas, como a Norma P4. 231/2015, regulamentada pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que estabelece os locais proibidos para a disposição da vinhaça, bem como os estudos que devem ser realizados referentes a avaliação da qualidade das águas subterrâneas e dos solos próximos aos locais de deposição. Além de apresentar as características composicionais que este resíduo deve dispor para poder ser utilizado como biofertilizante nas plantações (CETESB, 2015).

De maneira alternativa, buscando a destinação correta desse efluente, é possível utilizar as características poluidoras da vinhaça como uma fonte importante para a sua conversão em bioenergia, que trará diversos benefícios, proporcionando um destino adequado ao resíduo que causa diversos impactos ambientais, bem como a redução da sua carga orgânica nesse processo, possibilitando seu uso final como biofertilizante. Transformando assim, um passivo ambiental em produtos de alto valor agregado, contribuindo significativamente para a economia circular (Mikucka; Zielińska, 2020; Rogeri *et al.*, 2023).

3.5. Lodo de esgoto sanitário como fonte de microrganismos

O Brasil apresenta um déficit na coleta e tratamento do esgoto sanitário, sendo que o principal meio de atendimento aos domicílios rurais e urbanos no país é através da rede geral de esgoto ou pluvial, correspondendo a cerca de 66,5% desses domicílios. As fossas sépticas compreendem cerca de 15,6% e 17,9% apresentam descarte incorreto em fossas rudimentares, vala, rio, lago, mar e outros destinos, o que contribui para a poluição ambiental e aumenta o risco a saúde pública (Brasil, 2019).

Em 2020, o Brasil apresentou na área urbana uma coleta de esgoto de 63,2%, sendo necessário o aumento e expansão desse atendimento a toda a população. Ao focar em regiões do país é visto que esse índice diminui, sendo que a região Nordeste apresenta apenas 39,3% de rede coletoras de esgoto. Em Sergipe, a capital Aracaju se destaca, com um serviço de coleta de esgoto com índice próximo a média nacional com 53,5%. Sendo importante destacar que em Sergipe a coleta de esgoto é baixa com um índice de 32,5%, sendo observada uma grande carência dessa rede de coleta e tratamento no estado, o que ocasiona riscos ambientais e a saúde humana (Conceição, Mendonça, Albuquerque, 2023).

O descarte do esgoto sanitário *in natura* pode gerar sérios danos ambientais, sendo considerado uma das principais fontes de poluição dos corpos hídricos, já que apresenta uma alta carga orgânica. A presença do esgoto no ambiente aquático provoca um desequilíbrio da microbiota do meio, contribuindo para o processo de eutrofização. Com o aumento da demanda de oxigênio pelos microrganismos para a degradação da matéria orgânica, o que afeta a fauna e flora do ambiente aquático, e contribui para proliferação de algas no meio, decorrente da alta taxa de nutrientes (SNIS, 2021).

Além do meio aquático, o descarte de esgoto sanitário sem tratamento adequando também gera a contaminação do solo, tanto pela matéria orgânica, quanto pelos elementos inorgânicos (metais), substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos, o que pode inviabilizar o uso do solo e contribui para veiculação de doenças (Cezarini *et al.*, 2024). Nesse sentido cresce a necessidade de tratamento do esgoto, visando fornecer melhores condições socioambientais a população, crescendo a necessidade de sistemas descentralizados de tratamento de esgoto (SNIS, 2021; Conceição, Mendonça, Albuquerque, 2023).

A partir do tratamento do esgoto é possível adequá-lo as diretrizes ambientais para descarte, seguindo normativas ambientais como a Resolução CONAMA nº357 de 17 de março de 2005, que dispõe de diretrizes ambientais para o lançamento de efluentes, definindo as condições adequadas do resíduo para a manutenção das condições ambientais (Brasil, 2005). Além disso, o tratamento do esgoto sanitário tem potencial para a recuperação energética, já que o subproduto gerado, o lodo de esgoto, apresenta ainda elevada concentração de matéria orgânica e uma comunidade microbiana diversificada, possibilitando a degradação da matéria orgânica complexa de resíduos (Cezarini *et al.*, 2024).

Esse subproduto apresenta grande potencial para reaproveitamento em processos bioquímicos, como a fermentação anaeróbia. A atividade metabólica dos microrganismos presentes no lodo possibilita a conversão da matéria orgânica em produtos como o biogás e subprodutos como os ácidos orgânicos e hidrogênio. Dessa forma, o aproveitamento energético do lodo de esgoto representa uma alternativa sustentável, aliando o tratamento adequado do esgoto sanitário, à mitigação de impactos ambientais do seu descarte incorreto e produção de energia, promovendo a economia circular no setor de saneamento básico.

3.6. Digestão anaeróbia: etapas, mecanismos e fatores relevantes

A digestão anaeróbia (DA) é um processo anaeróbio, predominantemente, biológico, apresenta um funcionamento complexo, por meio da ação dos microrganismos, que transformam a matéria orgânica em energia renovável, como o biogás (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022; Moustakas; Parmaxidou; Vakalis, 2020). Esse processo tem sido empregado no gerenciamento dos resíduos orgânicos, resíduos agrícolas, lamas de esgoto,

resíduos de pecuária, águas residuais, resíduos agroindustriais, entre outros (Moustakas; Parmaxidou; Vakalis, 2020; Hai *et al.*, 2023).

O processamento da digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas fundamentais (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), em virtude da presença de um consórcio de diferentes microrganismos que realizam a conversão da matéria orgânica no decorrer de cada etapa (Mateus *et al.*, 2020; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022). A primeira etapa desse processo é a hidrólise, a qual é responsável pela decomposição das moléculas de polissacarídeos, proteínas e lipídios que estão contidos nos resíduos em moléculas menores, como açúcares de cadeia curta, aminoácidos e ácidos graxos, sendo estas moléculas orgânicas solúveis (Kumar; Samadder, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Essa ação é realizada pelas bactérias hidrolíticas, as quais na presença de água realizam a quebra das moléculas em unidades menores. Esta etapa apresenta importância significativa, pois pode limitar a quantidade de produto formado, já que a depender da complexidade na composição estrutural do substrato, a hidrólise irá se processar de forma lenta (Kumar; Samadder, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

A segunda etapa é a acidogênese, etapa em que uma nova cepa bacteriana, formada por bactérias fermentativas, utiliza as moléculas simples formadas na etapa de hidrólise como substrato para a formação de ácidos orgânicos (butírico, propiônico e acético), álcoois, óxidos de nitrogênio, sulfeto de hidrogênio, dióxido de carbono e hidrogênio (Kumar; Samadder, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

A acetogênese, terceira etapa, tem como microrganismos essenciais, as bactérias homoacetogênicas. Essa etapa é considerada crítica para o processo, devido as bactérias acetogênicas presentes estabelecerem uma relação de sintrofia com as demais bactérias, o que gera um deslocamento no equilíbrio da reação, provocando a conversão dos ácidos orgânicos em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022; Hajizadeh *et al.*, 2022).

Por fim, a etapa da metanogênese, realiza a conversão dos produtos da acetogênese (acetato, CO₂ e H₂) em biogás, composto majoritariamente de CH₄ e CO₂. Essa etapa apresenta como microrganismos predominantes as arqueas metanogênicas, que seguem duas vias metabólicas no consumo dos produtos formados anteriormente para a produção do biogás. A primeira via, é caracterizada pelo consumo do acetato pelas

arqueas metanogênicas acetoclásticas e, na segunda, o consumo do hidrogênio e dióxido de carbono através da ação das arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (Kumar; Samadder, 2020; Park *et al.*, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Portanto, a digestão anaeróbia pode ser considerada como uma rota alternativa e complementar para a produção de hidrogênio, por meio das etapas fermentativas, que incluem a hidrólise e acidogênese, nas quais também são produzidos os ácidos graxos voláteis (AGV) e dióxido de carbono (Ivanenko *et al.*, 2024). A produção de hidrogênio é estimulada por microrganismos que tem como princípio a realização da hidrólise, ou seja, a quebra dos açúcares em piruvato, durante o processo de degradação do substrato, por meio da glicólise. Nesse processo, além do piruvato, também se tem a formação da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e duas moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP), que por meio da ação de enzimas é convertido em hidrogênio e AGV (Ivanenko *et al.*, 2024; Goren; Dincer; Khalvati, 2024).

O rendimento da produção de hidrogênio tem dependência direta com as rotas metabólicas fermentativas seguidas pelos microrganismos e seus produtos formados, como os AGVs. Analisa-se que teoricamente o rendimento máximo de hidrogênio em processos fermentativos é de 4 mol H₂ e 2 mol de acetato a cada 1 mol de glicose, quando esta é metabolizada por completo através da via do acetato (Equação 1) (Ribeiro *et al.*, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

A segunda rota que tem grande relevância nessa produção, é a rota do butirato (Equação 2), em que ao metabolizar a glicose é possível ter um rendimento de 2 mol de H₂ por mol de glicose, formando 1 mol de butirato. A terceira via é a do etanol (Equação 3) na qual se tem a formação de 2 mol de H₂ por mol de glicose e uma mistura de 1 mol de acetato e 1 mol de etanol (Ribeiro *et al.*, 2022; Ivanenko *et al.*, 2024; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Equação 1- Reação de metabolização da glicose pela rota do acetato.



Equação 2- Reação de metabolização da glicose pela rota do butirato.



Equação 3- Reação de metabolização da glicose pela rota do etanol.

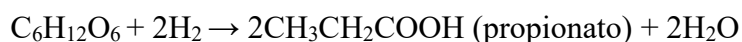


Além das rotas metabólicas que favorecem o rendimento de hidrogênio, existem rotas metabólicas que desfavorecem esse rendimento, como a rota das bactérias homoacetogênicas (Equação 4), em que se tem a metabolização do H_2 e CO_2 para a formação do acetato, bem como a rota do propionato (Equação 5), caracterizada pela metabolização da glicose e do H_2 formando o propionato (Ribeiro *et al.*, 2022; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Equação 4- Reação de metabolização do hidrogênio pela rota das bactérias homoacetogênicas.



Equação 5- Reação de metabolização da glicose e hidrogênio pela rota do propionato.



3.7. Produção de hidrogênio a partir da vinhaça da cana-de-açúcar

Estudos recentes têm demonstrado um interesse crescente na exploração da rota fermentativa para a produção de hidrogênio, por meio da utilização de diferentes substratos e consórcios microbianos, especialmente em processos de codigestão e digestão anaeróbia em sistemas de um e dois estágios. Diante desse panorama, foi apresentado, na Tabela 1, alguns estudos encontrados na literatura para a produção de hidrogênio após uma revisão de pesquisas que empregaram a vinhaça da cana-de-açúcar como substrato em processos fermentativos, destacando as condições operacionais adotadas e as variações observadas nos resultados obtidos.

Tabela 1- Comparação de resultados obtidos para a produção de hidrogênio em diferentes estudos por meio da fermentação anaeróbia da vinhaça da cana-de-açúcar.

Substrato	Pré-tratamento (substrato)	Condições operacionais	Produção de hidrogênio	Referência
Vinhaça	ST	pH- 5,0 a 7,5; Temperatura- 55° C;	2.074 N mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹	Fuess; Zaiat; Nascimento, 2019
Vinhaça	ST	Reator acidogênico: pH- 5,0 a 5,5; Temperatura- 55°C;	1.300 N mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹	Ramos; Silva, 2020
Vinhaça	ST	pH- 5,0; 6,0; 7,0; Temperatura- 37°C	821,34 mL H ₂	Magrini <i>et al.</i> , 2021
Vinhaça	Físico-químico e diluição (para 5000 mg DQO L ⁻¹)	pH- 4,5 a 5,2; Temperatura- 30 °C e 55°C	6.420 N mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹	Rego <i>et al.</i> , 2022
Vinhaça	ST	pH- <5,0 a 8,5; Temperatura- 55°C;	4.545 N mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹	Rogeri <i>et al.</i> , 2023
Codigestão da vinhaça e torta de filtro;	ST	pH- 5,0 a 5,5; Temperatura- 55°C;	95 N mL H ₂ g ⁻¹ VS _{removido}	Volpi <i>et al.</i> , 2024
Codigestão da vinhaça e bagaço da cana-de-açúcar	Ácido	pH- 4,5 a 6,5; Temperatura- 37°C e 55° C	110,79 N mL H ₂ L ⁻¹ reator. h	Rashidi <i>et al.</i> , 2024
Codigestão da vinhaça e células de levedura de cerveja	ST	pH- 5,5; Temperatura- NI	43,7 mL H ₂ g ⁻¹ SV _{adicionado}	Nualsri <i>et al.</i> , 2024

ST- Sem tratamento; NI- Não informada;

Fonte: Autora, 2026

Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) avaliaram a produção de bio-hidrogênio a partir da fermentação escura da vinhaça de cana-de-açúcar, sob condições termofílica em um reator anaeróbico de leito estruturado (AnSTBR), cujo objetivo foi monitorar a influência do controle de pH sobre as vias metabólicas presentes no sistema. Para isso, os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de 55 °C variando o pH da vinhaça

entre 5,0 e 7,5. Os resultados demonstraram que o controle do pH entre 5,0 e 5,5 foi essencial para possibilitar condições favoráveis para a produção de hidrogênio, com a máxima produção de 2074 N mL H₂. L⁻¹.d⁻¹. Além disso, foi identificado três vias metabólicas principais que estão associadas ao pH do sistema, sendo elas: a produção de lactato (pH < 5,0), produção de hidrogênio e butirato (pH 5,0–5,5) e produção de hidrogênio com redução de sulfato (pH > 6,0).

Ramos e Silva (2020) buscaram avaliar a viabilidade da produção de hidrogênio e metano utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico, em condição termofílica, através de um reator anaeróbico de dois estágios de leito fluidizado. Os reatores apresentavam um volume total de 1980 cm³, sob temperatura de 55 °C, pH entre 5,0-5,5, com vinhaça diluída (5.000 - 10.000 mg DQO L⁻¹) e utilizando como inóculo, o lodo granular proveniente de um reator termofílico. O lodo foi submetido a pré-tratamento térmico (10 minutos a 90°C, seguido de banho de gelo até a temperatura de 25°C) para a eliminação das bactérias metanogênicas, os resultados indicaram um rendimento de hidrogênio de 1300 mL H₂. dia⁻¹. L⁻¹.

O estudo desenvolvido por Magrini *et al.* (2021) avaliaram o efeito de diferentes pré-tratamentos térmicos do inóculo para a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis (AGVs), por meio do processo de fermentação escura utilizando como substrato a vinhaça da cana-de-açúcar. Para tal, foi empregada a vinhaça pura (100%) e também diluída em água destilada, nas concentrações de 30%, 50% e 70%, e para fonte microbiana foi escolhido o lodo granular. Foram empregados três métodos de pré-tratamento térmico ao inóculo: T1 (90 °C por 10 minutos), T2 (105 °C por 120 minutos) e T3 (121 °C por 20 minutos) para a inibição dos organismos consumidores de hidrogênio. Além disso, os autores investigaram o efeito do pH inicial ajustando-o para 5, 6 e 7 nas fermentações. Os resultados indicaram que o pré-tratamento T1, juntamente com vinhaça não diluída e pH inicial de 6, proporcionou a maior produção de hidrogênio 821,34 mL e um rendimento de 4,75 mmol H₂/g DQO.

Rego *et al.* (2022) estudaram a produção de hidrogênio a partir da vinhaça pré-tratada, por meio do processo de digestão anaeróbia, buscando ajustar as condições para melhorar o desempenho na etapa fermentativa, reduzindo progressivamente o tempo de retenção hidráulica (TRH) para 8, 6, 4, 2 e 1 hora, sob temperaturas de 30° C e 55°C; e pH entre 4,5 e 5,2. A vinhaça foi submetida a pré-tratamento físico-químico, que consistiu no processo de coagulação, floculação e sedimentação, seguido de diluição a 5000 mg

DQO L⁻¹. Os experimentos foram realizados em reatores anaeróbicos de leito fluidizado operados em condições mesofílicas (30 °C), com volume de 0,78 L e lodo granular; como também, em condições termofílicas (55 °C), com volume de 1,53 L e água residuária de matadouros de aves, ambas condições passaram por pré-tratamento térmico. Os resultados evidenciaram que o TRH de 2 horas proporcionou maiores taxas de produção de hidrogênio, alcançando uma produção de 270 mL H₂ dia⁻¹ no reator mesofílico e 6420 mL H₂ dia⁻¹ no reator termofílico.

Rogeri *et al.* (2023) buscaram estratégias para controlar o pH durante a fermentação escura da vinhaça, visando aumentar a produção de hidrogênio e reduzir o sulfato, além de entender a distribuição dos metabólitos formados. Os autores utilizaram três reatores AnSTBR de 1,9 L cada, operados a 55°C, aplicando dois tipos de vinhaça, uma advinda da mistura do suco e melaço e outra somente do melaço. Os reatores foram inoculados a partir da fermentação natural da vinhaça, ajustando-se o pH da mesma para 6,5 e submetendo-a a fermentação termofílica por 3 dias. Em consequente, a vinhaça foi recirculada nos três reatores por 5 dias até estimular a ligação dos microrganismos aos reatores. Após o período de inoculação dos reatores, cada um deles foi alimentado com vinhaça em pH ajustados com agentes alcalinizantes, sendo: R1- o pH ajustado para 6,5 com NaOH e NaHCO₃; R2- pH entre 6,5-8,5 com NaOH; R3- pH <5,0 sem ajuste. Foi observado a maior produção de hidrogênio proveniente da vinhaça do melaço submetida a condição R2, obtendo 4545 mL⁻¹ H₂ L⁻¹ d⁻¹.

Volpi *et al.* (2024) avaliaram a produção de hidrogênio por meio da codigestão de dois resíduos advindos do processamento da cana-de-açúcar, sendo eles a vinhaça e torta de filtro. Neste trabalho foram realizados cinco testes de ensilagem da torta de filtro antes da codigestão com a vinhaça, com intuito de quebrar as ligações presentes nas estruturas que constitui o substrato. Os testes tiveram duração de 0, 20, 40, 80 e 100 dias, sob temperatura de 25°C. Nesse processo, o inóculo (água residuária do abatedouro de aves) foi submetido a pré-tratamento ácido (pH ajustado para pH 3,0 com HCl 1 mol L⁻¹, por 24h a 55°C e, por fim, ajuste do pH para 5,0 com NaOH 1 mol L⁻¹). A maior produção de hidrogênio foi de 95 N mL H₂ g VS⁻¹ controlando o pH entre 5,0 – 5,5 e temperatura em 55°C, considerando o período de ensilagem de 40 dias.

Rashidi *et al.* (2024) investigaram a produção de hidrogênio a partir da codigestão anaeróbica da vinhaça e bagaço da cana-de-açúcar com o lodo de uma estação de tratamento de esgoto. Os substratos foram submetidos a uma hidrólise ácida, o bagaço da

cana-de-açúcar foi acidificado com H_2SO_4 25% e a vinhaça com H_2SO_4 0,25%, em seguida foram conduzidos a 121°C e $1,5 \text{ Kg cm}^2$ por 60 minutos na autoclave, utilizando diferentes proporções entre os substratos (1:0, 1:15, 1:30, 1:45 e 0:1 g de bagaço/mL de vinhaça), após esse processo filtrasse o resíduo sólido. A codigestão dos substratos como lodo foi conduzida em reator de bancada de 500 mL, sob variações de pH inicial (4,5 a 6,5) e em condições termofílica de 55°C . A melhor condição de hidrólise dos substratos foi observada na proporção 1:15 g de bagaço/mL de vinhaça, que proporcionou a maior concentração de açúcares hidrolisados de 10,03 g/L de substrato, bem como a maior taxa volumétrica de produção de hidrogênio com um valor de $110,79 \text{ N mL H}_2 \text{ L}^{-1} \cdot \text{h}$.

Nualsri *et al.* (2024) propuseram a produção de hidrogênio e metano por meio da codigestão anaeróbica de vinhaça e células de leveduras residuais de cervejaria (SBY), comparando os processos em uma e duas etapas. A fonte microbiana utilizada foi o lodo anaeróbio, o qual foi submetido pré-tratamento térmico (105°C por 90 minutos). No processo de produção de hidrogênio, foram otimizadas as proporções de vinhaça para SBY e a concentração de cinzas volantes (usada como tampão). Para a vinhaça e SBY foram consideradas as seguintes proporções: 10:0% (v/p); 9:1% (v/p); 8:2% (v/p); 7:3% (v/p), com a proporção de cinzas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% (p/v), respectivamente. A proporção ideal de vinhaça para SBY foi de 7:3% (v/p) com 0,4% (p/v) de cinzas volantes, resultando em um rendimento máximo de hidrogênio de $43,7 \text{ mL H}_2/\text{g}$ de SV adicionados.

3.8. Fatores que influenciam a produção de hidrogênio por fermentação escura

O processo de fermentação escura (FE) é dependente de diversos fatores, que irão afetar a estabilidade do sistema e consequentemente a produção de hidrogênio, sendo necessária a manutenção de condições ideais durante o processo, para uma maximização da produção de hidrogênio. Dentre os fatores relevantes para a produção de hidrogênio, pode-se destacar: potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, tipo de substrato, tipo de inóculo e tratamentos, tempo de retenção hidráulica, taxa de carregamento orgânico, entre outros.

3.8.1. pH

O pH é amplamente reconhecido como um dos principais fatores que influenciam o desempenho do processo fermentativo, apresentando um papel essencial na manutenção da estabilidade do sistema e no rendimento máximo de hidrogênio. A faixa adequada de pH interfere diretamente nas reações químicas presentes no meio reacional, pois contribui para aumentar a ação metabólica de diferentes grupos de microrganismos sobre o substrato, bem como auxilia no crescimento microbiano e produção de enzima no meio (Saravanan *et al.*, 2022). Durante a fase fermentativa os microrganismos presentes demonstram preferência pelo meio ácido, condição na qual é possível inibir a atividade de microrganismos consumidores de H₂, como as bactérias metanogênicas, já que estas desenvolvem-se melhor em meios alcalinos (Kumar; Samadder, 2020; Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022).

Nesse sentido, para o desenvolvimento do processo fermentativo que contribuam para a produção de hidrogênio existem faixas ideais de pH que devem ser mantidas nos sistemas reacionais para que as condições essenciais de sobrevivência destes microrganismos sejam mantidas. A fase fermentativa tem como intervalo de pH ideal que varia entre 4,0 e 6,0 em que se tem a predominância da formação de hidrogênio e AGV, como ácido acético e butírico, já nas fases da acetogênese e metanogênese os microrganismos consumidores de hidrogênio tem suas faixas ideais entre 6,5 e 8,5 (Kumar; Samadder, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022).

3.8.2. Temperatura

A temperatura também é considerada um fator fundamental no processo fermentativo, por influenciar diretamente no crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos, na degradação do substrato e na formação de subprodutos no meio reacional. Além disso, tem influência no equilíbrio termodinâmico do sistema, na diversidade microbiana, na estabilidade do processo e nas diversas reações bioquímicas que ocorrem. A faixa de temperatura na qual o sistema é operado, é de extrema importância, pois definirá os grupos de microbianos que irão predominar, bem como as rotas metabólicas que estes seguirão (Saravanan *et al.*, 2022; Ram; Rani; Kumar, 2024).

A temperatura dos sistemas fermentativos anaeróbios pode ser classificada em três categorias: Psicrofílica (15°C - 25°C); Mesofílica (25°C a 45°C); Termofílica (45°C a

65°C); Hipertermófila ($\geq 80^\circ \text{C}$). Essas faixas determinam quais microrganismos terão maior predominância e atividade no processo, já que diferentes grupos microbianos respondem de maneira distinta às variações térmicas, podendo ser favorecidos ou inibidos em determinadas condições de temperatura (Yao *et al.*, 2020; Cremonez *et al.*, 2021; Saravanan *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, foi verificado que condições mesófilas proporcionam uma maior diversidade e atividade microbiana que favorece a estabilidade do sistema e diminui o acúmulo de AGV. Em contraste, as condições termofílicas, diminuem a diversidade microbiana, bem como limitam a atividade de alguns microrganismos, como os metanogênicos que consomem o H_2 , devido ao aumento na taxa de degradação do substrato e aumento na formação de compostos tóxicos que podem inibir sua ação (Kumar; Samadder, 2020).

3.8.3. Tipo de substrato

A composição do substrato tem importância significativa, uma vez que este representa a fonte nutricional responsável por fornecer os nutrientes adequados para o crescimento dos microrganismos dentro do sistema e contribui no processamento das reações bioquímicas. Os substratos apresentam em sua composição uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos essenciais para os processos fermentativos. No geral, sua composição é rica em macronutrientes como as proteínas, carboidratos, lipídios e micronutrientes, como magnésio, níquel e fósforo (Cremonez *et al.*, 2021; Saravanan *et al.*, 2022).

Estes nutrientes influenciam positivamente a produção de hidrogênio, contribuindo na multiplicação dos microrganismos no sistema e nas rotas metabólicas que transformam o substrato em hidrogênio (Cremonez *et al.*, 2021; Saravanan *et al.*, 2022). Os resíduos utilizados como substrato apresentam componentes essenciais ao desenvolvimento dos microrganismos, como carboidratos, lipídios e proteínas. Os carboidratos atuam como fonte de açúcares facilmente fermentáveis, que tem influência positiva no sistema, servindo como fonte de carbono e energia, ajudando no crescimento microbiano (Cremonez *et al.*, 2021; Ram; Rani; Kumar, 2024).

Os lipídios também são fonte de carbono e de energia para os microrganismos, no entanto, podem interferir no desenvolvimento do processo, uma vez que por serem compostos de cadeia longa, quando em excesso, podem retardar o processo de hidrólise, sendo necessário passar por uma etapa de pré-tratamento. Já as proteínas, atuam como fontes essenciais de nitrogênio para o sistema, corroborando no desenvolvimento celular dos microrganismos e na atividade enzimática no meio (Cremonez *et al.*, 2021; Ram; Rani; Kumar, 2024).

3.8.4. Tipo de inóculo e tratamentos

O inóculo exerce papel fundamental no desenvolvimento da fermentação anaeróbia, pois constitui a fonte de microrganismos responsáveis pela degradação do substrato e sua conversão em hidrogênio. De modo geral, diferentes consórcios microbianos podem ser empregados na fermentação de uma ampla variedade de substratos, podendo ser utilizadas culturas mistas, culturas puras e microrganismos isolados. Esses consórcios são determinantes para a eficiência do processo, especialmente na produção e rendimento de hidrogênio (Martinez-Burgos *et al.*, 2022; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Os microrganismos comumente associados à produção de hidrogênio são as espécies dos gêneros *Clostridium*, como *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*, reconhecidas por sua elevada atividade fermentativa, potencial de conversão e rendimento de hidrogênio (Martinez-Burgos *et al.*, 2022). Por outro lado, o uso de culturas mistas, também tem apresentado um bom desempenho na produção de hidrogênio, devido à presença de uma alta variedade de bactérias com funções metabólicas complexas e características fisiológicas distintas, proporcionando um ambiente de interações entre esses microrganismos (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Essas interações definem a rota de ação dos microrganismos e, consequentemente, os produtos que serão originados, podendo ocorrer de maneira cooperativa ou não cooperativa, pois a sintrofia entre as bactérias possibilita o aumento da produtividade. No entanto, a variedade de microrganismos no inóculo misto, caso seja identificada a presença de microrganismos consumidores, pode ocasionar a redução na produção de

hidrogênio. Com isso, a necessidade da realização de pré-tratamentos para inibir os microrganismos consumidores deve ser considerada (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Dentre as opções de pré-tratamento, é possível destacar o uso de altas temperaturas e baixos valores de pH, pois estes parâmetros distinguem as bactérias metanogênicas das acidogênicas, nos quais as bactérias acidogênicas são capazes de formar endósporos que proporcionam resistência e contribuem para a sobrevivência delas em condições desfavoráveis, como em condições extremas de pH e temperatura (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Magrini *et al.* (2021) estudaram os efeitos de três métodos diferentes de pré-tratamento térmico do inóculo sobre a produção final de hidrogênio e ácidos graxos voláteis. Na 1ª condição de pré-tratamento realizado foi considerado um aquecimento a 90°C do inóculo por 10 minutos; na 2ª condição, aquecimento do inóculo a 105°C e por 2 horas; e, na 3ª condição, aquecimento do inóculo a 121°C por 20 minutos. Através das condições mencionadas, os autores relataram a obtenção da produção máxima de hidrogênio de 821,34 mL de H₂, utilizando a 1ª condição de pré-tratamento do inóculo.

Volpi *et al.* (2024) submeteram o lodo do reator anaeróbio do abatedouro de aves, utilizada como inóculo no processo fermentativo, a um pré-tratamento ácido com solução de ácido clorídrico (HCl 1 mol L⁻¹) em que o pH foi ajustado para 3,0 durante 24h a uma temperatura controlada de 55°C, seguido de outro ajuste, para pH 5,0 com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol L⁻¹). Finalizado o ajuste, foi realizada a codigestão dos substratos, no qual foi atingido uma produção máxima de hidrogênio de 95 N mL H₂ g VS⁻¹.

3.9. Pré-tratamentos da biomassa no processo de fermentação escura

O aumento da eficiência na produção de bioenergia a partir de biotecnologias como a fermentação escura necessita, muitas vezes, de etapas preliminares que contribuam para aumentar a disponibilidade e biodegradabilidade dos resíduos utilizados como substrato, melhorando assim a produção de energias de fontes renováveis como biogás, biometano e, atualmente, o hidrogênio (Atelge *et al.*, 2020; Kumar; Samadder, 2020; Nava-Valente *et al.*, 2023).

Neste sentido, observa-se uma crescente adoção de métodos de pré-tratamento como etapa preliminar aos processos bioquímicos, buscando acelerar o processo de hidrólise, transformando a estrutura complexa dos resíduos em uma matriz mais acessível para a digestão. Esses métodos promovem o aumento da ação dos microrganismos sobre a fração orgânica do substrato, aumento da solubilidade da matéria orgânica, diminuição da formação de substâncias tóxicas no processo, aumento da disponibilidade de açúcares redutores no meio reacional, entre outros (Atelge *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2023).

Diante disso, existe uma gama de métodos de pré-tratamento que podem ser utilizados para melhoria dos substratos para os processos fermentativos. No entanto, a seleção dos métodos de pré-tratamento deve ser fundamentada em critérios específicos, como o tipo de substrato, a composição inicial da biomassa e as características desejadas do produto final. Isso se deve ao fato de que, embora essa etapa possa aumentar a disponibilidade da biomassa para a ação microbiana, ela também pode resultar em sua degradação, uma vez que cada método possui um mecanismo de ação distinto sobre a estrutura da biomassa (Atelge *et al.*, 2020).

Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em físicos, químicos e biológicos. Além disso, existem os pré-tratamentos combinados, os quais consistem na integração de dois ou mais métodos com o intuito de potencializar a modificação da estrutura do substrato, visando à melhoria de sua digestibilidade (Banu *et al.*, 2019; Nava-Valente *et al.*, 2023; Maroldi *et al.*, 2024).

3.9.1. Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos caracterizam-se por realizar uma mudança na estrutura física do substrato, promovendo variações de temperatura e pressão sobre a biomassa, que contribuem para aumentar a acessibilidade, disponibilidade de açúcares e reatividade da biomassa. Consequentemente, esta etapa aumenta a atividade dos microrganismos sobre o substrato (Shukla *et al.*, 2023; Maroldi *et al.*, 2024). Ao aumentar a área superficial do substrato, tornando a fração orgânica mais acessível, também melhora a homogeneização do substrato com o consórcio microbiano, a diminuição da viscosidade e a redução da quantidade de sobrenadante durante o processo de fermentação (Shukla *et al.*, 2023).

Este método apresenta como vantagem a não adição de compostos químicos, bactérias, fungos ou enzimas ao processo e o aumento do rendimento do produto final. Contudo, tem como desvantagem o acréscimo no consumo de energia durante o processo, tornando o custo de produção mais elevado. Existem diferentes técnicas de pré-tratamentos físicos, a exemplo de pré-tratamentos mecânicos, irradiação por micro-ondas, térmicos e ultrassônicos (Atelge *et al.*, 2020).

Dentre os tipos mencionados, destaca-se o pré-tratamento ultrassônico, cujo princípio é baseado na propagação de ondas sonoras com baixas frequências na faixa de 20 a 40 kHz, processando-se através da formação de zonas de compressão e rarefação, que acarretam a formação de regiões de alta pressão, gerando a compressão das moléculas e, também, regiões de baixa pressão com o afastamento das mesmas (Atelge *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2023).

Os processos de compressão e rarefação formam microbolhas no substrato, as quais implodem em segundos, fenômeno conhecido como cavitação. A cavitação promove alta vibração no meio, gerando um aumento de energia e formação de calor que romperá as ligações existentes na composição estrutural dos resíduos, aumentando a transferência de massa e reduzindo o tamanho da partícula (Banu *et al.*, 2019; Atelge *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2023).

Nessa atividade, a pressão e temperatura ao redor das microbolhas aumentam, atingindo cerca de 500 bar e 5000 K, respectivamente, ocasionando o afastamento entre as moléculas que compõe a estrutura do substrato, desintegrando sua estrutura (Maroldi *et al.*, 2024). O processo de desestruturação dos componentes do substrato também é acompanhado da formação de íons hidrogênio (H^+) e radicais hidroxilas (OH^-) que contribuem no processo de degradação do substrato, por auxiliarem na oxidação da matéria orgânica (Banu *et al.*, 2019; Atelge *et al.*, 2020).

Outra técnica a ser destacada é o pré-tratamento térmico cuja ação atua diretamente sobre a estrutura do resíduo e possibilita o aumento da biodegradabilidade do mesmo, pois ao aplicar calor sobre o substrato ocorre o rompimento das ligações químicas, tornando seus componentes mais solúveis e propensos ao processo de digestão anaeróbia (Banu *et al.*, 2019). Esse fator aumenta a taxa de fermentação e, quando processado em altas temperaturas, contribui também na inibição da ação de bactérias

patogênicas, elevando o rendimento do produto final (Banu *et al.*, 2019; Atelge *et al.*, 2020).

3.9.2. Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico tem sua ação baseada no uso de produtos químicos que agem diretamente na estrutura dos resíduos, quebrando as ligações químicas e formando estruturas menos complexas, com cadeias menores, mais acessíveis e reativas, favorecendo o aumento da biodegradabilidade do resíduo e a diminuição do tempo de retenção hidráulica do processo fermentativo, aumentando a eficiência do processo (Atelge *et al.*, 2020; Maroldi *et al.*, 2024). Esta técnica apresenta diferentes processos, como tratamentos por ozonização, organossolventes, solventes eutéticos, alcalinos e ácidos (Atelge *et al.*, 2020; Shukla *et al.*, 2023; Maroldi *et al.*, 2024).

Dentre as técnicas de pré-tratamento químico, destacam-se o pré-tratamento ácido, no qual os principais reagentes utilizados são: ácido sulfúrico (H_2SO_4); ácido acético (CH_3COOH); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido clorídrico (HCl). E o pré-tratamento alcalino em que geralmente aplica-se hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), amônia líquida e hidróxido de sódio (NaOH) (Banu *et al.*, 2019; Shukla *et al.*, 2023; Maroldi *et al.*, 2024).

Ambas as técnicas são usadas com o intuito de aumentar a eficiência da digestão anaeróbia, visto que ao se utilizar ácidos no tratamento de resíduos ocorre um aumento na solubilidade dos compostos e melhora a etapa de hidrólise, enquanto o tratamento alcalino, por sua vez, provoca uma diminuição na polimerização da biomassa, aumentando a área superficial interna e intensificando as quebras das ligações dos compostos de cadeia longa em compostos de cadeia menor (Banu *et al.*, 2019).

Mahmoodi-Eshkaftaki e Mockaitis (2022) descreveram em seu estudo uma técnica de otimização da produção de bio-hidrogênio, utilizando a xilose e o lodo granular anaeróbio como fonte de carbono e de microrganismos, correspondentemente, para os processos fermentativos. Foram avaliados diversos fatores para otimizar a produção, como tempo de digestão, pressão relativa de biogás, concentração de ácidos graxos voláteis e pré-tratamento. A partir dos fatores analisados, foi verificado que o pré-tratamento ácido do lodo granular (condicionamento do lodo em pH 3,0 utilizando HCl ,

por 24 horas) proporcionou o melhor resultado, em que foi alcançada uma produção de 10,2 mmol L⁻¹ de H₂.

No estudo desenvolvido por Nam (2023) foi investigada a produção de hidrogênio a partir do pré-tratamento alcalino de resíduos alimentares. Para tal finalidade, foi aplicado ao substrato uma solução de hidróxido de potássio (KOH) em diferentes pH (11,5; 12,0; 13,0; 13,5) e temperatura 35 °C, mantida constante, tendo como intuito aumentar a biodegradabilidade dos resíduos, aumentando a produção de hidrogênio. Os autores constataram que em pH 13 houve uma maior liberação de carboidratos solúveis e proteínas, sendo mais favorável para a produção de hidrogênio, atingindo uma produção de 163,8 mL H₂ g⁻¹ VS/h.

3.9.3. Pré-tratamento Biológico

Os pré-tratamentos biológicos, diferente dos anteriormente mencionado, não fazem uso de temperatura, pressão ou produtos químicos, e também não apresentam a formação de compostos indesejados. No entanto, para a sua implementação é necessário alto controle do processo, visto que no seu desenvolvimento são utilizadas enzimas, bactérias ou fungos que precisam de condições ideais para decompor a estrutura complexa do substrato (Kumar; Samadder, 2020; Maroldi *et al.*, 2024). Este tratamento se processa de forma lenta e requer uma fonte de carbono para proporcionar energia na sua atividade, a exemplo dos carboidratos fermentáveis, já que esse método se desenvolve através do crescimento desses organismos no substrato (Banu *et al.*, 2019).

Sheekh *et al.* (2023) utilizaram em seu estudo para melhorar a produção de hidrogênio a biomassa de microalgas e nesse processo foram testados três tipos de pré-tratamentos dessa biomassa: pré-tratamento termoquímico utilizando ácido sulfúrico (0,5; 1; 1,5; 2,0%) em proporção 1:10, 1 g de biomassa/10mL de solução; pré-tratamento biológico, em que foi utilizada a *Trichoderma harzianum* Ps-2 como fonte de enzimas hidrolíticas, para a conversão dos açúcares complexos da biomassa em açúcares simples; e testou também o pré-tratamento biológico potencializado com nanopartícula de Mg-Zn Fe₂O₄-NPs. A partir das análises realizadas as produções máximas de hidrogênio obtidas através dos pré-tratamentos foram 1.520 mL H₂ L⁻¹ em 72 horas, 2.645 mL H₂ L⁻¹ em 48 horas e 3.254 mL H₂ L⁻¹ em 48 horas respectivamente. Demonstrando que os pré-

tratamentos biológicos sem ou com o uso de nanopartícula mostraram-se mais eficientes na conversão dos açúcares e aumento da produção de hidrogênio.

4. METODOLOGIA

A presente pesquisa é de natureza experimental e teve como objetivo investigar o potencial da digestão anaeróbia na produção de hidrogênio a partir do uso da vinhaça da cana-de-açúcar como substrato e lodo de esgoto como inóculo. Para esse desenvolvimento, foram estudadas as variáveis que influenciam a produção de hidrogênio, como a proporção entre o substrato e inóculo, temperatura e pH. Também foi realizado o pré-tratamento do substrato, para aumentar a disponibilidade da matéria orgânica biodegradável e o pré-tratamento do inóculo, para a inativação de microrganismos consumidores de hidrogênio, buscando o aumento da eficiência na produção de hidrogênio.

Nesse sentido, os tópicos a seguir versaram sobre: coleta e armazenamento do substrato (item 4.1); planejamento experimental e pré-tratamento do substrato (item 4.2); inóculo e pré-tratamento (item 4.3); caracterização físico-química do substrato e inóculo (item 4.4); descrição do biorreator (item 4.5); ensaios preliminares (item 4.6); planejamento experimental estatístico dos ensaios (item 4.7); cromatografia gasosa (item 4.8).

4.1. Coleta e armazenamento do substrato

O substrato utilizado nesse estudo foi a vinhaça da cana-de-açúcar, cedida pela Usina São José do Pinheiro, localizada no Povoado Pinheiros, s/n, Zona Rural da cidade de Laranjeiras/SE. A vinhaça utilizada foi produzida no fundo da primeira coluna de destilação do vinho durante o processo de obtenção do etanol. A coleta da vinhaça foi realizada no dia 24 de janeiro de 2025, utilizando dois galões de polipropileno de 50 L, coletando um volume total de 100 L de substrato. A vinhaça apresentava uma temperatura entre 70 à 80 °C. O substrato foi transportado ao Núcleo de Energias Renováveis e Eficiência Energética de Sergipe (NEREES), localizado no Sergipe Parque Tecnológico (SergipeTec) e, em seguida, o volume da vinhaça foi fracionado em frascos de plásticos de 5 L e armazenado em freezer a uma temperatura de -20°C para manutenção de suas características, também foram reservadas porções de 50 mL em frascos de vidro âmbar para caracterizações posteriores, ilustrado na Figura 5.

Figura 5- Coleta da vinhaça da cana-de-açúcar na Usina Pinheiro (A) e armazenamento em freezer a -20°C no NEREES (B).



(A)



(B)

Fonte: Autora, 2026

4.2. Pré-tratamento do substrato

Para melhorar a disponibilidade de açúcares facilmente fermentáveis no substrato foi realizado um pré-tratamento ácido com um equipamento de ultrassom da marca UNIQUE, com uma frequência ultrassônica de 37 kHz, promovendo um processo de hidrólise ácida do resíduo. Para essa finalidade, foi delineado um planejamento fatorial Box-Bhenken (3^3), ou seja, com três fatores e três níveis, em que as variáveis independentes foram pH, temperatura e tempo, tendo como variável dependente o teor de açúcares redutores totais (ART). Nesse planejamento foi realizado a replica apenas dos pontos centrais. As Tabelas 2 e 3 apresentam os fatores e níveis do planejamento Box-Bhenken e a matriz experimental delineada para o estudo, respectivamente.

Tabela 2- Fatores e níveis do planejamento experimental Box-Bhenken aplicado.

Fatores estudados	Unidades	Níveis das variáveis		
		-1	0	+1
pH	-	2,0	3,5	5,0
Temperatura	°C	30	55	80
Tempo	Minutos	10	20	30

Fonte: Autora, 2026

Tabela 3- Matriz experimental do planejamento Box-Bhenken (3^3).

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	2	30	20
2	5	30	20
3	2	80	20
4	5	80	20
5	2	55	10
6	5	55	10
7	2	55	30
8	5	55	30
9	3,5	30	10
10	3,5	80	10
11	3,5	30	30
12	3,5	80	30
13 (C)	3,5	55	20
14 (C)	3,5	55	20
15 (C)	3,5	55	20

Fonte: Autora, 2026

O pré-tratamento foi realizado utilizando um volume de 40 mL de vinhaça para cada condição. Para o ajuste do pH foi utilizado ácido clorídrico (HCl) com 36 % de pureza ou uma solução de hidróxido de sódio (NaOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$). Após essa correção, a amostra foi submetida ao tratamento por ultrassom, conforme as condições apresentadas nas Tabelas 2 e 3. Ao término do tratamento, a vinhaça foi neutralizada com solução de NaOH, $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água destilada. Posteriormente foi realizada a análise de espectrofotometria no UV-VIS para quantificação dos açúcares da vinhaça após o pré-tratamento, em um comprimento de onda de 540 nm, através do método do ácido 3,5-

Dinitrosalicílico (DNS), utilizando como padrão para a construção da curva de calibração a glicose, conforme (Apêndice A).

4.3. Inóculo e pré-tratamento

O lodo de esgoto, inóculo deste estudo, foi cedido pela Estação Municipal de Tratamento de Efluentes (ETE) da Companhia de Saneamento de Sergipe (DESO), localizada na Barra dos Coqueiros, Aracaju/SE. O lodo foi coletado de um digestor anaeróbio de fluxo ascendente (DAFA) em um galão polipropileno de 50 L, sendo a primeira coleta realizada no dia 30 de julho de 2024 e a segunda coleta no dia 24 de fevereiro de 2025, após a coleta o inóculo foi transportado para o NEREES, e refrigerado em uma geladeira de laboratório, com a temperatura em 3°C, para a manutenção de suas características.

O lodo foi submetido a um pré-tratamento ácido e térmico, juntamente com a aclimação deste com o substrato, de acordo com a metodologia adaptada do estudo desenvolvido por Volpi *et al.* (2024). Esse processo consistiu em fracionar o lodo em erlenmeyers de 250 mL de acordo com o volume final desejado e, em seguida, adicionar 12 mL de vinhaça a cada recipiente, buscando fornecer nutrientes ao meio e aclimatá-lo com o substrato. Em consequente, o pH do lodo foi ajustado para 3,0 utilizando uma solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ e incubado a 55°C, durante um período de 24h em uma incubadora Shaker da marca LUCADAMA modelo LUCA-222, com uma agitação constante de 100 rpm. Após o período de incubação foi verificado o pH do lodo e ajustou-se para 5,0 com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹.

4.4. Caracterização físico-química do substrato e inóculo

A caracterização da vinhaça e do lodo de esgoto foi realizada quanto aos seguintes parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH); sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos; teor de umidade; alcalinidade total; Demanda Química de Oxigênio (DQO); Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Ademais, a vinhaça foi submetida também a análise elementar (CHN) e teor de açúcares totais. Esses procedimentos seguiram os métodos de análises apresentados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4- Parâmetros e métodos de análise utilizados nas caracterizações das amostras.

Parâmetros	Metodologia	Método de análise
pH	Standard Methods 4500-H	Potenciométrico
Sólidos Totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos (g L ⁻¹)	Standard Methods 2540	Gravimétrico
Umidade (%)	ASTM D-1762	Gravimétrico
Alcalinidade total (mg L ⁻¹)	Standard Methods 2320	Titulometria de neutralização
DQO (mg L ⁻¹)	Standard Methods 5220	Colorimétrico.
DBO (mg L ⁻¹)	Standard Methods 5210	DBO ₅
Açúcares redutores (g L ⁻¹)	Sumner	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)
CHN (%)	ASTM D-5291	-

Fonte: Autora, 2026

4.4.1. Determinação do pH

A determinação pH foi realizada a partir do método potenciométrico, seguindo a metodologia do Standard Methods 4500-H (APHA, 2012). A análise ocorreu por medição direta com equipamento pHmetro da marca MS TecnoPON modelo bancada/ portátil. Antes de realizar a leitura das amostras foi realizada a calibração do equipamento, com as soluções tampões de pH (4 e 7), e posteriormente foi efetuada a análise das amostras e registrado o pH.

4.4.2. Determinação de sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos

A determinação de sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos, foi realizada seguindo a metodologia do Standard Methods 2540 (APHA, 2012). Inicialmente foi realizada a calcinação das cápsulas de porcelana em um forno mufla a 550° C por 15 minutos. Após resfriar em dessecadores, as cápsulas foram pesadas, assim como, os

papéis filtros utilizados na análise de sólidos suspensos. Em seguida, foi realizada a filtragem das amostras, e, subsequentemente, foi realizada a aferição da massa do recipiente com as amostras.

As amostras foram levadas à estufa à 105 ° C por 24 horas, após essa etapa aguardou-se o resfriamento das cápsulas em um dessecador e aferiu-se a massa do recipiente com a amostra seca. Posteriormente, as cápsulas com as amostras secas em estufa, que não foram filtradas, foram levadas a aquecimento de 550° C por 2 horas em forno mufla. Finalizado o tempo, aguardou-se o resfriamento das cápsulas até a temperatura ambiente e foi realizada a aferição da massa das cápsulas com a amostra após a calcinação. Estas determinações foram realizadas em triplicata e o teor de sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos foram determinados, respectivamente, conforme as Equações 6, 7, 8, 9 e 10 apresentadas abaixo.

Equação 6- Fórmula para a determinação do teor de sólidos totais.

$$ST = \left(\frac{m_s - m_v}{V} \right) \times 1000$$

Em que:

ST= concentração de sólidos totais, em g L⁻¹;

m_s= massa da cápsula de porcelana com amostra seca na estufa, em g;

m_v= massa da cápsula de porcelana vazia, em g;

V= volume da amostra, em mL;

Equação 7- Fórmula para determinação do teor de sólidos totais fixos.

$$STF = \left(\frac{m_s - m_v}{V} \right) \times 1000$$

Em que:

STF= concentração de sólidos totais fixos, em g L⁻¹;

m_s= massa da cápsula de porcelana com amostra seca na mufla, em g;

m_v= massa da cápsula de porcelana vazia, em g;

V= volume da amostra, em mL;

Equação 8- Fórmula para determinação do teor de sólidos totais voláteis.

$$\text{STV} = \left(\frac{\mathbf{m_s} - \mathbf{m_v}}{\mathbf{V}} \right) \times 1000$$

Em que:

STV = concentração de sólidos totais voláteis, em g L⁻¹;

m_s= massa da cápsula de porcelana com amostra seca na estufa, em g;

m_v= massa da cápsula de porcelana com a amostra seca na mufla, em g;

V= volume da amostra, em mL;

Equação 9- Fórmula para determinação do teor de sólidos suspensos totais.

$$\text{SST} = \left(\frac{\mathbf{m_s} - \mathbf{m_v}}{\mathbf{V}} \right) \times 1000$$

Em que:

SST = concentração de sólidos suspensos totais, em g L⁻¹;

m_s= massa da cápsula de porcelana com o papel filtro e amostra seca na estufa, em g;

m_v= massa da cápsula de porcelana com o papel filtro, em g;

V= volume da amostra, em mL;

Equação 10- Fórmula para determinação do teor de sólidos dissolvidos totais.

$$\text{SDT} = \text{ST} - \text{SST}$$

Em que:

SDT = concentração de sólidos dissolvidos totais, em g L⁻¹;

ST= concentração de sólidos totais;

SST= concentração de sólidos suspensos totais;

4.4.3. Determinação de umidade

A determinação de umidade seguiu a metodologia adaptada da ASTM D1762, para a determinação uma massa aproximada de 15 g de amostra foi medida e acondicionada em uma cápsula de porcelana previamente seca e pesada. A cápsula foi conduzida para uma estufa aquecida a 105 ± 5 °C por um período de 24 horas, sendo retirado após este período e mantido em um dessecador até atingir a temperatura ambiente. O procedimento foi realizado em triplicata e a umidade da vinhaça em base seca foi determinada de acordo com a Equação 11.

Equação 11- Fórmula para determinação do teor de umidade.

$$\%U = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100$$

Em que:

%U= Teor de umidade em base seca, em %;

m₁ = Massa da amostra em base úmida, em g;

m₂= Massa da amostra em base seca a 105°C, em g;

4.4.4. Determinação da alcalinidade total

A determinação da alcalinidade foi realizada através da metodologia do Standard Methods 2320 (APHA, 2012). Inicialmente foi realizada a padronização da solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ utilizando o carbonato de sódio como padrão primário. Posterior a padronização, foi realizado preparo e análise do branco, utilizado para a correção de erros causados por possíveis interferentes durante as análises. Em consequente, foi realizada a determinação da alcalinidade das amostras, onde inicialmente diluiu-se as amostras 10 vezes para a vinhaça e 50 vezes para o lodo de esgoto. Posteriormente foi adicionado 25 mL das amostras diluídas com 3 gotas da solução indicadora de fenolftaleína num erlenmeyer e não foi observada alteração na coloração, caso houvesse alteração na coloração para rósea seria necessário titular a amostra com ácido sulfúrico até atingir a coloração inicial novamente.

A partir disto, seguiu-se para próxima etapa, onde foram adicionados ao mesmo erlenmeyer 3 gotas da solução indicadora de verde de bromocresol/vermelho de metila e

a solução assumiu uma coloração levemente esverdeada. Devido a mudança de coloração foi iniciada a titulação da amostra com a solução padronizada de ácido sulfúrico até o ponto final da titulação, em que foi determinado pela mudança de coloração do levemente esverdeado para avermelhada e, ao final anotou-se o volume final de ácido sulfúrico gasto, todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Para a realização da quantificação da alcalinidade total foi aplicada a Equação 12 determinada no trabalho de Kunz, Steinmetz, Amaral (2022).

Equação 12- Fórmula para determinação do teor de alcalinidade das amostras.

$$\text{Alc} = \text{M} \times \text{E} \times \left(\frac{100.000}{\text{D}} \right)$$

Em que:

Alc= Alcalinidade total, em mg CaCO₃ L⁻¹;

M= Concentração da solução de ácido sulfúrico, em mol L⁻¹;

D = Volume de amostra, em mL;

E = Volume de titulante gasto, em mL;

100.000 = Coeficiente de ajuste da unidade de medida, de mol L⁻¹ para mg L⁻¹;

4.4.5. Determinação da Demanda Química de oxigênio (DQO)

A determinação da demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada através da metodologia do Standard Methods 5220 (APHA, 2012). Inicialmente foi realizada a etapa de descontaminação dos tubos digestores, onde os materiais utilizados foram imersos em solução de ácido sulfúrico a 20% por um período de 24 horas e posteriormente enxaguados com água deionizada. Em consequente, realizou-se o processo de digestão das amostras, que ocorreu por via úmida e refluxo fechado, foram adicionados aos tubos de DQO 1,5 mL da solução digestora, 2,5 mL da amostra diluída e 3,5 mL da solução catalisadora, em seguida os tubos foram colocados no bloco digestor a uma temperatura de 150° C por 2 horas, sendo esse procedimento realizado em triplicata. Para a realização da leitura das absorbâncias das amostras no processo de determinação da concentração de DQO, foi selecionado o comprimento de onda a ser analisado (620 nm) e iniciou-se as análises. Para as obtenções dos resultados foi construída uma curva de calibração utilizando uma solução biftalato de potássio como padrão.

4.4.6. Determinação Demanda Bioquímica de Oxigênio

A determinação da DBO foi realizada a partir da metodologia Standard Methods 5210 (APHA, 2012). Primeiramente foi realizado o preparo da água de diluição, em seguida foi realizado o preparo dos frascos de DBO do 1º e 5º dia, sendo adicionado 1 mL da amostra, 1 mL de água deionizada nos frascos e completando o volume dos frascos com a água de diluição bem lentamente, garantindo que não ocorresse a formação de bolhas, o mesmo processo repetiu-se para o frasco utilizado como branco, no entanto foi adicionado 2 mL de água destilada em substituição a amostra. Nas análises do primeiro dia, foi adicionado aos frascos 1 mL de sulfato de manganês, 1 mL de iodeto de azida e 1 mL de ácido sulfúrico P.A, sendo notado que ao adicionar o iodeto de azida a solução presente no frasco ficou amarelada, indicando a presença de oxigênio, o procedimento foi realizado em duplicata.

Para análise do 5º dia, os frascos foram incubados em um ambiente longe da presença de luz e com uma temperatura de 20º C, sendo que diariamente, durante os 5 dias adicionou-se água de diluição ao redor das tampas dos frascos e no 5º dia realizou-se o mesmo processo do 1º dia. A determinação da DBO no 1º e 5º dia, foi realizada através da titulação das amostras com a solução de tiosulfato de sódio 0,025 mol L⁻¹, o ponto final foi determinado pela mudança de coloração saindo do amarelo esverdeado para o incolor, o procedimento foi realizado em duplicata. Para a determinação da concentração de DBO nas amostras utilizou-se a Equação 13 abaixo.

Equação 13- Fórmula para determinação da concentração de DBO em mg L⁻¹.

$$DBO = \left(\frac{OD_i - OD_f}{f_{amostra}} \right)$$

Em que:

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio;

f: fração volumétrica decimal de amostra utilizada;

OD_i: volume gasto de tiosulfato de sódio imediatamente após a preparação;

OD_f: volume gasto de tiosulfato de sódio após 5 dias de incubação;

4.4.7. Análise elementar

Na indicação da composição percentual dos elementos C, H e N, foi utilizado um analisador elementar Leco, Modelo CHN628, pelo método ASTM D-5291. Para determinação elementar. Os materiais e reagentes utilizados foram: analisador elementar (marca Leco, Modelo CHN628); folha de estranho; gás hélio (99,995%); gás oxigênio (99,99%); padrão de EDTA (41,0% C, 5,5% H e 9,5% N)

Para determinação da composição elementar, inicialmente, a amostra foi levada ao ultra freezer, e, posteriormente foi liofilizada. Após a remoção da água, a análise elementar da amostra foi realizada em um CHN628 da LECO e os resultados foram tratados no Software CHN628 versão 1.30. O equipamento operou com Hélio (99,995%) e Oxigênio (99,99%) com a temperatura do forno primário em 950 °C e do Afterburner em 850 °C. Outros parâmetros foram ajustados para uma melhor sensibilidade. O equipamento foi calibrado com um padrão de EDTA (41,0% C, 5,5% H e 9,5% N) usando um range de massa entre 10– 200 mg. As amostras foram analisadas medindo-se aproximadamente 50 mg em uma folha de estranho.

4.4.9. Teor de açúcares totais

A amostra de vinhaça foi analisada quanto ao teor de açúcares totais pelo método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). O procedimento utilizado foi adaptado do método desenvolvido por Sumner, baseado na capacidade do DNS de ser reduzido pela glicose. Para a análise, inicialmente foi realizada a diluição das amostras, em conseguinte foi adicionado aos tubos de ensaio 100 µL da amostra de vinhaça, 500 µL da solução de DNS e 900 µL de água destilada. Posteriormente, foram agitados em vórtex por 30 segundos e aquecidos em banho-maria a 90 °C por 5 min.

Após o referido tempo a reação foi interrompida, colocando-se os tubos em banho de gelo por 5 min, em seguida foi adicionado a cada tubo 4 mL de água destilada, para diluir a solução resultante, após esse procedimento os tubos foram agitados no vórtex por 30 segundos. Foi realizada a leitura da absorbância, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS, no comprimento de onda de 540 nm, e para a obtenção dos resultados foi utilizada uma curva de calibração, construída utilizando-se o DNS e a solução padrão de glicose.

4.5. Descrição do biorreator

O procedimento experimental dos ensaios foi desenvolvido em um biorreator de 7,5 L da marca Tecnal-BIO. O biorreator é um modelo convencional, com sistema de alimentação operado em bateladas e agitação contínua. O sistema utilizado possui módulos que controlam as variáveis do processo, sendo eles: módulo controlador Flex (TEC-BIO-FLEX); vaso de reação (TEC-BIO-VI 7,5L); controlador para o motor (TEC-BIO-LIGHT) e um banho ultratermostático (Solab).

O módulo controlador Flex funciona como uma unidade de processamento que monitora as variáveis do processo, garantindo que as condições permaneçam ideais, sendo possível ajustar e calibrar os parâmetros operacionais de forma precisa nos intervalos de interesse de cada variável. Esse módulo permite o controle dos parâmetros operacionais de temperatura, pH, nível, alívio e pressão. Além disso, apresenta quatro bombas peristálticas em sua constituição, as quais possibilitam a adição de base, ácido, antiespumante e nutriente no vaso de reação.

O vaso de reação apresenta em sua estrutura uma tampa com portas de entrada, que asseguram a conectividade com os sensores e a entrada de reagentes e nutrientes no sistema, bem como portas de amostragem para retirada de amostra gasosa e líquida. Para garantir uma agitação eficiente durante o cultivo é utilizado um controlador secundário (TEC-BIO-LIGHT), equipado com um motor de alto torque o qual conecta-se diretamente na tampa do vaso de reação e proporciona a agitação do sistema. Por fim, tem-se o banho ultratermostático que fornece o aquecimento para o processo reacional. Na Figura 6 foi apresentada a constituição geral do biorreator.

Figura 6- Sistema completo do biorreator anaeróbio.



Legenda: 1-Vaso de reação (TEC-BIO-VI 7,5L); 2- Módulo controlador Flex (TEC-BIO-FLEX); 3- Módulo controlador do motor (TEC-BIO-LIGHT); 4- Banho ultratermostático; 5- Bag (armazenamento de gás);

Fonte: Autora, 2026

4.6. Ensaios preliminares

Para definição do uso do pré-tratamento do inóculo e substrato, assim como das condições das variáveis operacionais utilizadas no delineamento experimental estatístico, foram realizados ensaios preliminares, que tiveram suas condições determinadas de acordo com o levantamento da literatura, como: Ramos e Silva (2020); Fuess, Zaiat e Nascimento (2019); Rego *et al.* (2022); Rashidi *et al.* (2024); Volpi *et al.* (2024); entre outros.

O estudo preliminar foi desenvolvido para compreender o funcionamento do biorreator anaeróbio, as condições do processo, a estabilidade das variáveis determinadas durante os ensaios, a influência de diferentes condições de inóculo e o impacto do uso do substrato pré-tratado sob a produção de hidrogênio. Foram realizados sete ensaios preliminares, em que os quatro primeiros priorizaram observar a influência do tratamento do inóculo sobre a produção de hidrogênio, o primeiro ensaio foi o controle, onde o inóculo e substrato brutos foram processados no biorreator.

No segundo e terceiro ensaio foi realizada a aclimação do inóculo com o substrato em uma incubadora shaker, em que no ensaio 2 a aclimação foi realizada com adição de substrato ao inóculo e incubação por 24h, já no ensaio 3 a incubação durou 72h e a aclimação do inóculo com substrato ocorreu a cada 24h, sendo adicionado um volume maior de substrato a cada dia, no quarto ensaio foi realizado um pré-tratamento ácido\térmico do inóculo e incubação por 24h.

Seguindo, foi executado o ensaio 5 para compreender a influência da mudança das variáveis pH, temperatura e proporção volumétrica entre substrato e inóculo sob a produção de hidrogênio, mantendo o tratamento ácido\térmico do inóculo, por ter demonstrado maior eficiência em relação as demais condições mencionadas. Foram realizados também os ensaios 6 e 7, em que foi aplicado o pré-tratamento do substrato. Além da definição das condições das variáveis e do uso do pré-tratamento, foi possível definir o quantitativo de dias dos ensaios posteriores, por meio do monitoramento constante da produção nos ensaios preliminares. As condições dos ensaios preliminares são descritas na Tabela 5.

Tabela 5- Condições experimentais dos ensaios preliminares.

Ensaio	pH	T (°C)	Proporção volumétrica substrato/inóculo (% v:v)	Tratamento do inóculo	Tratamento do substrato
1	5,0	40	30	Sem	Sem tratamento
2	5,0	40	30	Aclimação do lodo de esgoto com vinhaça por 24 h a 37°C na incubadora Shaker;	Sem tratamento
3	5,0	40	30	Aclimação e inoculação do lodo de esgoto com a vinhaça durante 72h a 37°C na incubadora Shaker;	Sem tratamento
4	5,0	40	30	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto na incubadora Shaker;	Sem tratamento
5	5,5	55	50	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto na incubadora Shaker;	Sem tratamento
6	5,5	55	50	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto na incubadora Shaker;	Tratamento ácido da vinhaça com ultrassom;
7	5,5	55	30	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto na incubadora Shaker;	Tratamento ácido da vinhaça com ultrassom;

Fonte: Autora, 2026

4.7. Planejamento experimental estatístico dos ensaios

Para o desenvolvimento dos ensaios experimentais no biorreator foi delineado um planejamento experimental, com o objetivo de proporcionar o entendimento sobre as interações existentes entre as variáveis, a influência que estas variáveis exercem no sistema e no resultado, utilizando um número mínimo de experimentos e encontrando assim as melhores condições experimentais para cada variável do processo (Neto; Scarmínio; Bruns, 2001).

Nesse contexto, para a realização do estudo das variáveis foi aplicado um planejamento fatorial 2^3 com réplica apenas do ponto central no software *Statistics* versão 14.1.0.8, sendo considerados como variáveis importantes ao estudo o pH, temperatura e proporção volumétrica de inóculo em relação ao substrato, resultando em um total de 10 experimentos, sendo o delineamento realizado com base nas análises dos ensaios preliminares realizados. Na Tabela 6 é apresentado os fatores e níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial.

Tabela 6- Fatores e níveis do planejamento fatorial (2^3) aplicado.

Códigos	Fatores estudados	Unidades	Níveis das variáveis		
			-1	0	+1
A	pH	-	5,0	5,25	5,5
B	Temperatura	°C	40	47,5	55
C	Proporção volumétrica substrato/inóculo	%v/v	30	40	50

Fonte: Autora, 2026

Na Tabela 6, o nível (-1) representa o limite inferior, ou seja, menor valor para a variável no planejamento, o nível (0) representa o valor central de cada variável e o nível (+1) representa o limite superior, maior valor para cada variável. Para a constituição dos valores dos níveis de cada variável foi definido por meio do aporte da literatura consultada e disponível sobre a temática em questão. Os valores de pH selecionados estão em um intervalo de 5,0-5,5 com um desvio de $\pm 0,1$, a temperatura em um intervalo de 40-55°C

com desvio de $\pm 1,0$ °C e a proporção de inóculo em relação ao substrato com uma faixa de 30-50%. Na Tabela 7 foi exibida a matriz experimental do planejamento fatorial delineado usado neste estudo.

Tabela 7- Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 das bateladas do biorreator.

Valores codificados				Valores não codificados		
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Proporção volumétrica substrato/inóculo (% v/v)	pH	Temperatura (°C)	Proporção volumétrica substrato/inóculo (% v/v)
1	-1	-1	-1	5,0	40	30
2	-1	-1	+1	5,0	40	50
3	-1	+1	-1	5,0	55	30
4	-1	+1	+1	5,0	55	50
5	+1	-1	-1	5,5	40	30
6	+1	-1	+1	5,5	40	50
7	+1	+1	-1	5,5	55	30
8	+1	+1	+1	5,5	55	50
9 (C)	0	0	0	5,25	47,5	40
10 (C)	0	0	0	5,25	47,5	40

Fonte: Autora, 2026

Por meio do planejamento experimental a produção de hidrogênio foi iniciada utilizando o biorreator da Tecnal-BIO com capacidade de 7,5 L, sendo o volume total dos ensaios de 4,5 L da mistura substrato/inóculo e sob constante agitação, com uma rotação de 150 rpm. O processamento dos ensaios ocorre conforme as seguintes etapas:

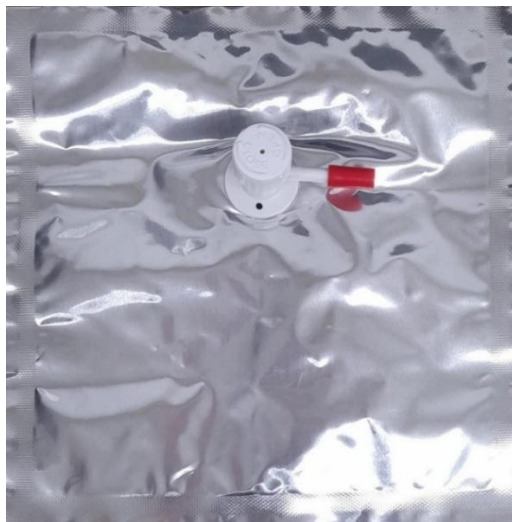
- 1) Os pré-tratamentos das amostras de vinhaça e lodo de esgoto são realizados de acordo com os procedimentos indicados nos itens 4.2 e 4.3, com os volumes indicados para cada ensaio;
- 2) A mistura do substrato e inóculo no vaso de reação é realizada seguindo a proporção indicada no planejamento experimental e o vaso de reação é fechado;
- 3) A passagem de argônio (gás inerte) é efetuada por 3 minutos dentro do vaso de reação, para garantir a ausência de oxigênio no sistema, veda-se o sistema e adiciona-se a uma das portas da tampa do vaso uma bag como parte do headspace do reator e como alívio para o sistema.

- 4) Os demais módulos do reator (Flex, banho termostatizador e o controlador do moto) são ativados;
- 5) As condições de referência do pH e temperatura no módulo controlador Flex são determinadas através da sua interface de controle e ativa-se as bombas peristálticas de ácido e base;
- 6) As bombas peristálticas são conectadas a um frasco de ácido ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$) e um frasco de base ($\text{NaOH } 2,0 \text{ mol L}^{-1}$) para o controle do pH do meio e a reação é iniciada.

Após um período de 24 horas do início do processo foram iniciadas as coletas das alíquotas de gás no reator com o auxílio de uma seringa do tipo Luer Lock de 60 mL acoplada a uma torneira de três vias e, subsequentemente, foram submetidas a análise cromatográfica para o monitoramento e quantificação da produção de hidrogênio momentâneo. Além das amostras coletadas na seringa, também foram analisados os gases contidos nas *bags* (Figura 7) que estão conectadas ao vaso de reação durante o período dos ensaios, estas bags são feitas de polietileno, alumínio e nylon e são direcionadas ao armazenando de gases de baixo peso molecular, como os produzidos durante as fermentações.

Vale ressaltar que as amostragens das alíquotas foram determinadas conforme as observações dos ensaios preliminares, sendo definido os dias principais de amostragem durante os ensaios. Cada ensaio durou um período de 10 dias (240 horas) e as alíquotas são retiradas no 1º dia (24h), 4º dia (96h), 6º dia (144h), 8º dia (192h), 10º dia (240h) evidenciando o aumento e decréscimo da produção de hidrogênio. Ao final de cada ensaio o reator passou por um processo de esterilização, retirando o digestato e higienizando o vaso de reação com água e sabão e posteriormente com álcool 70° INPM.

Figura 7- Ilustração da bag utilizada para o armazenamento de gás acumulado no biorreator durante o processamento dos ensaios.



Fonte: Autora, 2026

4.8. Cromatografia gasosa

A produção de hidrogênio foi detectada e quantificada através de um cromatógrafo gasoso (GC) da marca Shimadzu modelo GC-2014 (Figura 8) equipado com dois detectores. O Detector de Ionização por Chama (FID) e Detector de Condutividade Térmica (TCD). O detector FID foi destinado à detecção de compostos orgânicos leves, como hidrocarbonetos, a exemplo do metano, enquanto o TCD foi empregado para a quantificação de gases inorgânicos, como hidrogênio e dióxido de carbono.

Figura 8- Cromatógrafo gasoso da Shimadzu modelo GC- TCD/FID 2014.



Fonte: Autora, 2026

4.8.1. Método cromatográfico desenvolvido

No método desenvolvido para a operação do GC, foi utilizada uma coluna empacotada do tipo Carboxen 1000, para o detector TCD, com tamanho de partícula de 60\80 mesh, comprimento de 4,6 metros e diâmetro interno de 2,0 mm. Para o detector FID foi utilizada uma coluna capilar, do tipo SH-Rtx-1, com comprimento de 60,0 m, diâmetro interno de 0,53 mm e espessura de filme de 5,00 μm . A programação de aquecimento inicia em 45°C, sendo mantido por 2 minutos. Posteriormente a temperatura é elevada 25°C/ minutos até atingir 220°C, mantendo-se nessa temperatura durante 6 minutos. O sistema foi operado no modo split, com temperatura do injetor ajustada a 220 °C, utilizando o argônio (Ar) como gás de arraste e o ar sintético e hidrogênio combinados para gerar a chama do detector FID. Os demais parâmetros foram apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Configuração geral do método cromatográfico desenvolvido.

TCD	
Parâmetro	Condições
Coluna	Carboxen 1000 (4,6 m x 2,0 mm)
Temperatura do detector	220°C
Temperatura do injetor	220°C
Programação da rampa	45°C (2 min) – 25°C min ⁻¹ – 220°C (6 min)
Corrente	35 mA
Fluxo de argônio	25 mL min ⁻¹
Taxa de amostragem	40 msec
Tempo de análise	15 min
FID	
Parâmetro	Condições
Coluna	SH-Rtx-1: 100% dimetilpolisiloxano (60 m x 0,53 mm x 5,0 µm)
Pressão	25,9 kPa
Modo de injeção	Split
Razão split	2,3
Velocidade linear	15,3 cm sec ⁻¹
Fluxo de purga	3,0 mL min ⁻¹
Temperatura do detector	220°C
Temperatura do injetor	220°C
Programação da rampa	45°C (2 min) – 25°C min ⁻¹ – 220°C (6 min)
Fluxo de argônio	2,07 mL min ⁻¹
Taxa de amostragem	1,0 min
Tempo total de análise	15 min

Fonte: Autora, 2026

4.8.2. Validação do método

A validação do método cromatográfico desenvolvido seguiu as etapas determinadas na RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 e DOQ-CGCRE-008. Esses documentos dispõem de critérios e orientações para a validação de métodos analíticos (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017). A validação, foi fundamental para assegurar que o método cromatográfico desenvolvido possibilita identificar e quantificar os gases em estudo (H_2 , CH_4 e CO_2), com veracidade em seus resultados. Para esse processo, foram considerados os seguintes parâmetros de validação analítica: Linearidade; Faixa de trabalho; Sensibilidade; Seletividade; Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ); Precisão (intradiária- repetibilidade).

Para os parâmetros de linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade, a validação ocorreu a partir da construção de curvas de calibração analítica utilizando padrões gasosos de hidrogênio, metano e dióxido de carbono com uma pureza de 99,999%. Os dados foram obtidos por meio das injeções manuais desses padrões no cromatógrafo, sendo realizada entre 6-10 injeções de diferentes concentrações dos padrões, variando de 1-70% para H_2 , 1-30% para o CH_4 e 1-30% para o CO_2 , preparados e analisados em triplicata. Para o preparo das amostras padrão de diferentes concentrações, foram realizadas diluições das amostras dos gases em argônio a partir de bags para armazenamento, com o auxílio de uma seringa tipo Luer Lock de 60 mL para as coletas das amostras de gases. Para a construção das curvas, foi utilizada uma seringa Hamilton Gastight 1005 de 5 mL.

A avaliação desses parâmetros analíticos ocorreu a partir das curvas de calibração analítica, que relacionaram as concentrações reais dos analitos com as respostas analíticas individuais em cada concentração. Construindo assim, gráficos de dispersão das respostas, e realizando avaliação estatística, por meio da análise da equação da reta de regressão de Y (sinal do equipamento) em X (concentração dos analitos), avaliação da linearidade entre as variáveis através do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2) e também avaliação do grau de significância do coeficiente angular e linear do modelo de regressão.

O parâmetro de seletividade foi avaliado para garantir que o método é capaz de distinguir e quantificar cada analito (H_2 , CH_4 , CO_2) sem interferências. Assim, com base no estudo de Silva *et al.* (2021) foi utilizada a Equação 14 para esse cálculo, em que foi

considerada a resolução entre os picos dos analitos em estudo, fazendo uso da largura da base do pico de cada analito e do tempo de retenção.

Equação 14- Fórmula para calcular a seletividade do método.

$$R_s = \frac{2 \times (t_{rA} - t_{rB})}{w_A + w_B}$$

Em que, t_{rA} representada o tempo de retenção do analito A, t_{rB} tempo de retenção do analito B; w_A representa a largura da base do pico do analito A e w_B a largura da base do pico do analito B.

O LD e LQ foram determinados para cada analito em estudo a partir das Equações 15 e 16, usando o método de quantificação baseado nos parâmetros das curvas de calibração analítica, relacionando o desvio padrão estimado para a menor concentração da curva de calibração e a inclinação da curva do modelo de regressão, ou seja, coeficiente angular. Em que, o s representa a estimativa do desvio padrão da resposta do sinal da menor porcentagem do analito e o b representa o coeficiente angular da regressão na curva de calibração analítica do composto alvo (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017). Determinando assim a menor concentração detectável do analito nas amostras e a menor concentração possível de ser quantificada.

Equação 15- Fórmula para o cálculo do limite de detecção.

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{s}{b}\right)$$

Equação 16- Fórmula para o cálculo do limite de quantificação.

$$LQ = 10 \times \left(\frac{s}{b}\right)$$

Para expressar a precisão do método foi avaliada a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, por meio da dispersão entre os resultados, calculou-se os desvios padrões relativos das séries de medições e observou-se o grau de concordância dos resultados individuais. A avaliação da precisão seguiu as instruções da ANVISA (2017) e baseou-se no processo adotado por Silva *et al.* (2021) em seu estudo de validação de método cromatográfico. Foram preparadas 3 bags separadas, com concentrações

diferentes para cada analito, baixa (10%) para H₂, CO₂ e CH₄, média H₂ (40%), CO₂ (30%) e CH₄ (20%) e alta H₂ (70%), CO₂ (50%) e CH₄ (30%).

As amostras dos analitos foram injetadas em triplicata em cada concentração, e por meio do desvio padrão relativo das replicatas foi obtido o grau de precisão do método em cada faixa de concentração dos analitos. Em consequente, foram injetadas as amostras de cada bag apenas uma vez para cada concentração, e foi avaliada a precisão intradiária (repetibilidade). Foram injetadas quatro vezes cada concentração do analito em um intervalo de 1,5 h durante o dia (1; 2,5; 4; 5,5h) para cada injeção. E foi obtido no final os desvios padrões relativos para as execuções realizadas.

4.8.3. Quantificação do hidrogênio produzido

Para a quantificação do H₂, CO₂ e CH₄, os cálculos foram realizados através da lei dos gases ideais (Equação 17), que relacionou as pressões parciais de cada medição, volume de headspace do reator e a temperatura da reação, para encontrar o número de mols de H₂ e demais gases na fração gasosa, utilizando a fração molar de cada gás, a qual foi obtida a partir da porcentagem de cada composto presente no reator, obtidos por meio das curvas analíticas construídas.

Equação 17- Lei dos gases ideais para o cálculo do número de mols de H₂ produzido durante os ensaios.

$$PV = nRT$$

Em que:

P: pressão parcial (atm);

V: volume do headspace do reator (L);

n: número de mols (mol);

R: constante universal dos gases ideais (0,082057 atm L/mol K);

T: temperatura de operação do sistema (K);

Para a obtenção da pressão foi desenvolvido um sistema de monitoramento e medição, utilizando o sensor de pressão absoluta MPX5700AP (Figura 9), desenvolvido pela Motorola. O sensor apresenta ampla faixa de medição, variando entre 15-700 kPa, com conversores analógico, fornecendo um sinal proporcional a pressão aplicada. A tensão de

alimentação do sensor é de 5,0 volts e sinal de saída na faixa de 0,2-4,7 volts, com tempo de resposta de 1 milissegundo, e compensação térmica na faixa de 0-85°C, sendo a calibração deste sensor padronizada no processo de fabricação.

Figura 9- Sensor MPX5700AP utilizado para o monitoramento da pressão no sistema reacional



Fonte: Autora, 2026

A partir da lei dos gases ideais foi possível quantificar o número de mols dos compostos e, posteriormente, foi convertido esse resultado em termos de volume de H₂ (L), a partir da normalização do volume em condições normais de temperatura e pressão (CNTP), multiplicando o número de mols do gás pelo volume molar dos gases ideais que é 22,4 L, em condições ideais (0°C e 1 atm) (Hitit, Hallenbeck, 2021; Araujo *et al.*, 2023).

Por fim, a unidade de produção do H₂ foi normalizada em termos de mL_{H2} L⁻¹_{substrato}, em que a produção de cada dia de amostragem foi relacionada com o volume de substrato utilizado no processamento de cada ensaio (Hitit, Hallenbeck, 2021). A partir das respostas obtidas nos ensaios estabelecidos no planejamento experimental, os resultados foram analisados através da ANOVA com a finalidade de avaliar a significância do modelo de ajuste aplicado aos experimentos, como também a importância dos termos lineares, interativos e quadráticos. Assim, por meio da análise de variância das respostas em um intervalo de confiança de 95%, considerando o coeficiente de correlação (R²) e os valores de F e P, foi atestada a confiabilidade e significância do modelo, nesse processo de tratamento dos dados foi utilizado o Software Statistics.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química da vinhaça da cana-de-açúcar e lodo de esgoto

5.1.1. pH

A partir dos resultados obtidos para o parâmetro de pH foi visto que a vinhaça é um resíduo ácido, com um pH de 4,73 e estudos como o de Godoi *et al.* (2019) e Mikucka e Zielińska (2020), apontam valores de pH da vinhaça entre 4,0- 4,7. Por outro lado, o lodo de esgoto, conforme os estudos de Lisboa *et al.* (2022) e Sillero, Perez e Solera (2024), apresenta valores de pH que variam entre 6,0-8,0, demonstrando um caráter que vai de levemente ácido à básico, sendo o pH obtido para o lodo de esgoto de 7,64. exibindo similaridade com os estudos mencionados.

O pH tem importância fundamental nos processos fermentativos, por afetar as reações bioquímicas que ocorrem no meio, e influenciar a ação dos microrganismos, o que contribui para o processo de degradação da matéria orgânica e conversão em hidrogênio. A faixa de pH do meio tem influência direta também no crescimento dos microrganismos e na liberação de enzimas, já que cada microrganismos atua em uma faixa específica de pH que determinará sua predominância e ação (Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022; Saravanan *et al.*, 2022).

As bactérias acidogênicas, produtoras de hidrogênio, são menos sensíveis as variações de pH e apresentam uma faixa de pH entre 4,0 e 8,5 onde no meio ácido sua ação e desenvolvimento são mais predominantes, favorecendo a produção de hidrogênio. Por sua vez, as variações de pH não são benéficas para as arqueas metanogênicas, organismos consumidores de hidrogênio e produtoras de metano, pois são mais sensíveis e apresentam uma faixa de pH entre 6,7 e 7,5 (Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022; Saravanan *et al.*, 2022). Desta maneira, a manutenção do pH no sistema é importante para promover o desenvolvimento e atividade do grupo de microrganismos de interesse.

5.1.2. Alcalinidade total

A alcalinidade, também designa um importante papel na fermentação escura, representando a capacidade de tamponamento do sistema, ou seja, a capacidade de neutralizar ácidos e manter um pH adequado para a atividade microbiana, o que contribui

na estabilidade do processo (Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022, Liu *et al.*, 2025). A partir dos resultados obtidos, foi observado que a vinhaça apresentou um valor de alcalinidade de 3.782 mg CaCO₃ L⁻¹ e o lodo de esgoto de 2.701 mg CaCO₃ L⁻¹.

Esses valores evidenciam a capacidade que esses resíduos têm de tamponar o sistema e manter as suas faixas de pH estáveis, relacionando essa capacidade em termos de carbonato de cálcio presentes por litro de substrato ou inóculo, que indicará a concentração de álcalis no meio reacional. No entanto, durante a ocorrência das reações bioquímicas, a variação no pH reduz a alcalinidade no meio e prevalece a fermentação ácida, o que em rotas de produção de hidrogênio é favorável (Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022, Liu *et al.*, 2025).

5.1.3. Sólidos totais, fixos, voláteis, suspensos e dissolvidos

A partir da caracterização realizada na vinhaça e lodo de esgoto em termos dos sólidos presentes foi evidenciado que a vinhaça tem sua matéria orgânica predominantemente refletida pelos sólidos voláteis, tanto na fração dissolvida quanto suspensa, já o lodo de esgoto, por ser oriundo de atividades domésticas, tem um percentual expressivo de matéria inorgânica, associada a presença de sólidos fixos e suspensos, além de apresentar um quantitativo significativo de sólidos voláteis, como exposto na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9- Resultados da caracterização do teor de sólidos na vinhaça e lodo de esgoto.

Parâmetros (g L⁻¹)	Vinhaça da cana-de-açúcar	Lodo de esgoto
Sólidos totais	45,52 ± 0,83	30,01 ± 0,84
Sólidos fixos	12,54 ± 0,49	10,08 ± 0,31
Sólidos voláteis	32,98 ± 0,35	19,93 ± 0,54
Sólidos Suspensos totais	15,80 ± 3,37	28,48 ± 0,20
Sólidos dissolvidos totais	29,72 ± 2,57	1,53 ± 0,65

Fonte: Autora, 2026

De acordo com Marafon *et al.* (2020) a vinhaça é composta por teores residuais de açúcares, etanol e compostos voláteis, sendo uma solução ácida e com alto teor de orgânicos. Nesse sentido, a mesma é composta por 93% de água, 7% de sólidos orgânicos

e minerais, em que, desta porcentagem, 75% são compostos orgânicos biodegradáveis e 25%, de minerais (Godoi *et al.*, 2019).

A vinhaça em estudo apresentou resultados similares ao reportado por Mikucka e Zielińska (2020) com obtenção de teores de sólidos voláteis na vinhaça na faixa de 38-66 g L⁻¹. O lodo de esgoto apresentou resultados menores ao reportado na literatura como o estudo de Sillero, Perez e Solera (2024), com teores de sólidos voláteis no lodo de esgoto de 28 g L⁻¹, que pode estar relacionado a composição do resíduo, referente a sua geração e coleta. Contudo, os altos valores de sólidos voláteis são essenciais por indicarem o grande potencial de conversão do resíduo, representando a matéria orgânica biodegradável disponível para degradação.

5.1.4. Umidade

A umidade representa a fração de água presente no resíduo, este parâmetro corrobora significativamente com o processo, por proporcionar a homogeneização do meio, a sobrevivência dos microrganismos, a distribuição de nutrientes e a metabolização da matéria orgânica pelos organismos. A faixa ideal de umidade para o processo de digestão anaeróbia por via úmida é entre 60-90%. A partir desta análise foi possível determinar que tanto a vinhaça quanto lodo de esgoto apresentam um teor de umidade que contribuem na sobrevivência e ação microbiana, com valores de 95,52 % e 96,94%, respectivamente (Santos Filho *et al.*, 2018).

5.1.5. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e Demanda química de oxigênio (DQO)

Os parâmetros de DBO e DQO são capazes de avaliar o potencial de biodegradação da matéria orgânica. A DBO mede a quantidade de oxigênio necessário para os microrganismos degradarem a matéria orgânica e a DQO, avalia a quantidade total de matéria orgânica oxidável, seja essa matéria biodegradável ou não, refletindo a estabilização tanto da matéria orgânica mineralizada, através da ação dos microrganismos, quanto da matéria orgânica advinda de fontes químicas (Godoi., *et al.*, 2019).

Assim sendo, o valor da DQO é sempre superior ao da DBO, pois este parâmetro relaciona todo o processo de degradação da matéria orgânica no meio. A relação entre os

valores de DBO e DQO indicará o grau de biodegradabilidade da amostra, o que fornece também o indicativo de viabilidade desse resíduo para a fermentação anaeróbia. Quando essa relação é maior que 0,5 o resíduo apresenta alta biodegradabilidade, entre 0,3 e 0,5, biodegradabilidade intermediária e quando é menor que 0,3 é caracterizado por baixa biodegradabilidade (Godoi *et al.*, 2019; Fuess; Zaiat; Nascimento, 2019). Desta forma, ao observar os resultados obtidos para a vinhaça (Tabela 10), foi verificado um grau de biodegradabilidade intermediária, já que a relação DBO/DQO foi de 0,4.

Tabela 10- Resultados da caracterização da vinhaça e lodo de esgoto quanto aos parâmetros de DBO e DQO.

Parâmetros	Vinhaça da cana-de-açúcar	Lodo de esgoto
DBO (mgO L ⁻¹)	17.591,0	264,6
DQO (mg L ⁻¹)	45.000,0	43.111, 9
Relação DBO/DQO	0,4	-

Fonte: Autora, 2026

Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) reportaram uma caracterização da vinhaça em cinco meses diferentes e encontraram valores de DBO de 19.450, 16.650, 23.182, 11.562 e 8792 mg L⁻¹ que se assemelham ao resultado encontrado neste estudo de 17.591 mg L⁻¹. Godoi, *et al* (2019) encontraram um valor médio de DBO e DQO, entre os anos de 2015-2017, em torno de 15.000 e 33.000 mg L⁻¹ respectivamente, e com um grau de biodegradabilidade de 0,45, similar ao presente estudo e demonstrando assim o alto teor de matéria orgânica da vinhaça.

Lisboa *et al.* (2022) caracterizaram o lodo de esgoto em quatro pontos de amostragem e encontraram valores de DBO de 697, 468, 183 e 122 mg L⁻¹, valores estes similares a esse estudo, com um valor de 264 mg L⁻¹. Sillero, Perez e Solera (2024) estudaram a otimização do processo de digestão anaeróbia visando a valorização integral dos resíduos. Para tal, a partir da caracterização, encontraram um valor de 48.590 mg L⁻¹ de DQO para o lodo, estando este valor bem próximo do presente estudo que encontrou para o lodo um valor aproximado de 43.111 mg L⁻¹, evidenciando a alta quantidade de matéria orgânica oxidável no resíduo.

5.1.6. Açúcares totais

A partir das análises da vinhaça foi possível obter um teor de açúcares redutores 3,51 g L⁻¹ e para os açúcares redutores totais de 4,91 g L⁻¹ representado pela hidrólise da

sacarose em glicose. O teor de açúcares redutores totais maior, refere-se ao aumento da concentração de açúcares facilmente fermentáveis, estando na mesma faixa mencionada no estudo de Fuess (2024) em que discutiram uma disponibilidade de açúcares residuais na vinhaça variando entre 3,7-8,1 g L⁻¹.

Piffer *et al.* (2022) caracterizaram três tipos de vinhaça, sendo elas de origem da produção de cachaça artesanal, vinhaça de destilaria e vinhaça de alambique artesanal, em que os teores de carboidratos totais encontrados foi de 4,9; 3,6 e 4,7 g L⁻¹. Assim, os teores obtidos de açúcares redutores e redutores totais na vinhaça indicam uma alta disponibilidade de substratos prontamente fermentáveis, o que tende a favorecer as rotas acidogênicas e a produção de hidrogênio no processo fermentativo.

Esse favorecimento reacional é ocasionado pelos carboidratos que apresentarem funções metabólicas, e são componentes estruturais de grande importância para as células, atuando como sítios ativos em células e servindo também como principal fonte de energia metabólica (Bruice, 2006). Os carboidratos de cadeias menores como a frutose, glicose, sacarose, lactose entre outros, são importantes para a conversão biológica da biomassa em ácido acético, ácido butírico e hidrogênio por serem facilmente hidrolisados. Esses açúcares facilmente fermentáveis são essenciais, por serem considerados substratos primários para os microrganismos fermentativos, servindo como fonte de alimentação e energia durante o processo (Godoi *et al.*, 2019; Fuess, 2024).

5.1.8. Análise elementar

A análise de CHNO proporcionou o entendimento da composição química da amostra, já que foram analisados os elementos presentes nas moléculas orgânicas e suas porcentagens, que são indicativos da presença de compostos importantes para a fermentação anaeróbia. Abaixo na Tabela 11 foi apresentado os resultados da análise elementar realizada na vinhaça.

Tabela 11- Resultados da análise elementar da vinhaça da cana-de-açúcar.

Parâmetros	Vinhaça da cana-de-açúcar
C (%)	29,58
H (%)	5,97
N (%)	1,09
C/N	27/1

Fonte: Autora, 2026

A partir dos resultados obtidos, foi possível comparar a composição elementar encontrada na vinhaça com estudos presentes na literatura, como o de Pereira, Pereira Neto e Tiburcio (2021) que encontraram uma composição de C, N, H e O de 17,30; 2,10; 2,11 e 8,73%, respectivamente. Ribeiro, Steinmetz e Wisbeck (2025) analisaram a vinhaça e obtiveram teores de C e N de 11,07 e 1,01% correspondentemente, estando os valores de carbono bem abaixo do teor encontrado no presente estudo que foi de 29,58%. Essa diferença composicional da vinhaça nos estudos mencionados pode estar relacionada a sua origem, visto que desde a produção da cana-de-açúcar até a produção do etanol, existem diversas etapas que influenciam na composição final deste resíduo.

Esses elementos são essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos, sendo o carbono (C) considerado a principal fonte de energia para os microrganismos, e sua porcentagem é representada na vinhaça através da composição de açúcares e lipídios. O hidrogênio (H) está presente nos compostos orgânicos e é indispensável na formação de água durante o processo, o nitrogênio (N) por sua vez está presente em proteínas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, sendo indispensável para o crescimento e a atividade dos microrganismos.

Além da importância desses componentes individualmente para o processo, a relação C/N também desempenha um papel significativo no que se refere aos sistemas fermentativos, por afetar diretamente as rotas metabólicas e as atividades dos microrganismos no meio. O equilíbrio entre esses componentes em sistemas anaeróbios permite o crescimento ideal dos microrganismos, favorecendo seu desenvolvimento e proliferação no meio, o que melhora a produção de hidrogênio, já que é um indicativo de estabilidade do sistema (Godoi *et al.*, 2019; Rashidi *et al.*, 2024).

Estudos como de Panigrahi e Dubey (2019), Kainthola, Kalamdhad e Goud (2019) e Rashidi *et al.* (2024) relatam que a faixa ideal da relação C/N para sistema de digestão

anaeróbia varia entre 20 e 40. A manutenção dessa faixa ideal é necessária, pois sistemas com alta relação C/N indicam uma menor disponibilidade de nitrogênio que é essencial para o crescimento microbiano, a baixa relação C/N também é prejudicial pois indica uma alta concentração de nitrogênio, o que provoca um acúmulo de amônia no sistema. Ao analisar essa faixa ideal foi possível perceber que a relação C/N encontrada no presente estudo está dentro da faixa ideal relatada na literatura, sendo encontrada uma relação de C/N de 27:1, considerado ideal para o crescimento dos microrganismos e para sua atividade (Panigrahi; Dubey, 2019; Kainthola; Kalamdhad; Goud, 2019).

5.2. Pré-tratamento ultrassônico da vinhaça da cana-de-açúcar

Através do pré-tratamento ácido auxiliado por ultrassom da vinhaça da cana-de-açúcar baseado no planejamento experimental foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 12, para os teores de açúcares obtidos para cada ensaio em diferentes condições experimentais.

Tabela 12- Planejamento experimental Box-Bhenken das variáveis estudadas e as concentrações de açúcares obtidas.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min)	ART (g L ⁻¹)
1	2	30	20	5,552
2	5	30	20	4,985
3	2	80	20	6,020
4	5	80	20	6,165
5	2	55	10	4,914
6	5	55	10	5,245
7	2	55	30	4,997
8	5	55	30	5,284
9	3,5	30	10	5,481
10	3,5	80	10	3,026
11	3,5	30	30	5,280
12	3,5	80	30	6,279
13	3,5	55	20	4,989
14	3,5	55	20	4,655
15	3,5	55	20	4,761
ART- Açúcares redutores totais;				

Fonte: Autora, 2026

O coeficiente de determinação (R^2) encontrado para o modelo foi 0,999 indicando uma alta correlação entre os valores observados e previstos. Apesar do modelo apresentar falta de ajuste, ela não é significativa (p -valor $>0,05$). O valor do teste F calculado para o modelo, a 5% de significância, ($F_{cal} = 397,90 > F_{tab} = 5,96$) implica que o modelo foi satisfatório para descrever os dados experimentais. Na tabela 13 foi revelado os resultados da análise da ANOVA.

Tabela 13- ANOVA do modelo obtido para a concentração de açúcares redutores totais presentes na vinhaça após tratamento por ultrassom.

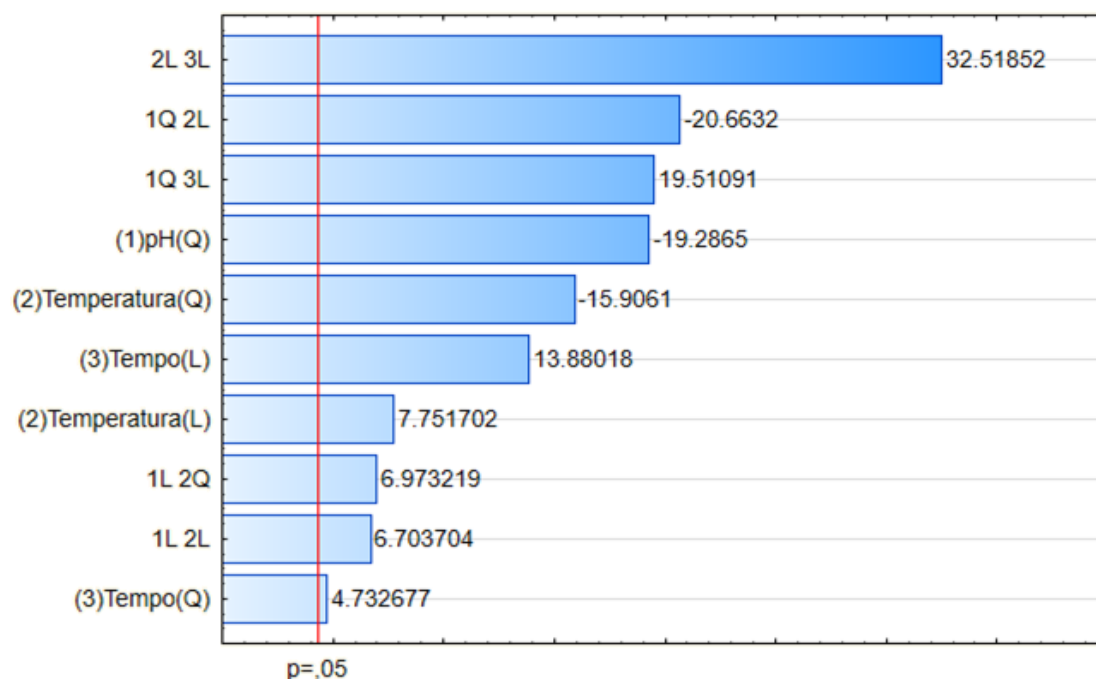
Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) pH (Q)	1,048768	1	1,048768	371,971	0,002678
(2) Temperatura (L)	0,169420	1	0,169420	60,089	0,016238
Temperatura (Q)	0,713339	1	0,713339	253,003	0,003929
(3) Tempo (L)	0,543202	1	0,543202	192,660	0,005150
Tempo (Q)	0,063152	1	0,063152	22,398	0,041863
1L 2L	0,126707	1	0,126707	44,940	0,021536
1L 2Q	0,137100	1	0,137100	48,626	0,019952
1Q 2L	1,203835	1	1,203835	426,969	0,002334
1Q 3L	1,073311	1	1,073311	380,676	0,002617
2L 3L	2,981482	1	2,981482	1057,454	0,000944
Falta de ajuste	0,002981	2	0,001491	0,529	0,654164
Erro puro	0,005639	2	0,002819	-	-
Total	8,583523	14	-	-	-

Q- Efeito quadrático; L- Efeito linear; SS- Soma quadrática; df- graus de liberdade; MS- Média quadrática;

Fonte: Autora, 2026

A partir dos dados experimentais, foi gerado o diagrama de Pareto (Figura 10) que representa a magnitude e a direção dos efeitos das variáveis sobre a resposta, em que valores positivos indicam o efeito positivo das variáveis na concentração de açúcares e valores negativos indicam a redução na concentração de açúcares pelo efeito das variáveis.

Figura 10- Diagrama de Pareto para representação dos efeitos das variáveis e das suas interações no pré-tratamento ácido por ultrassom da vinhaça da cana-de-açúcar.

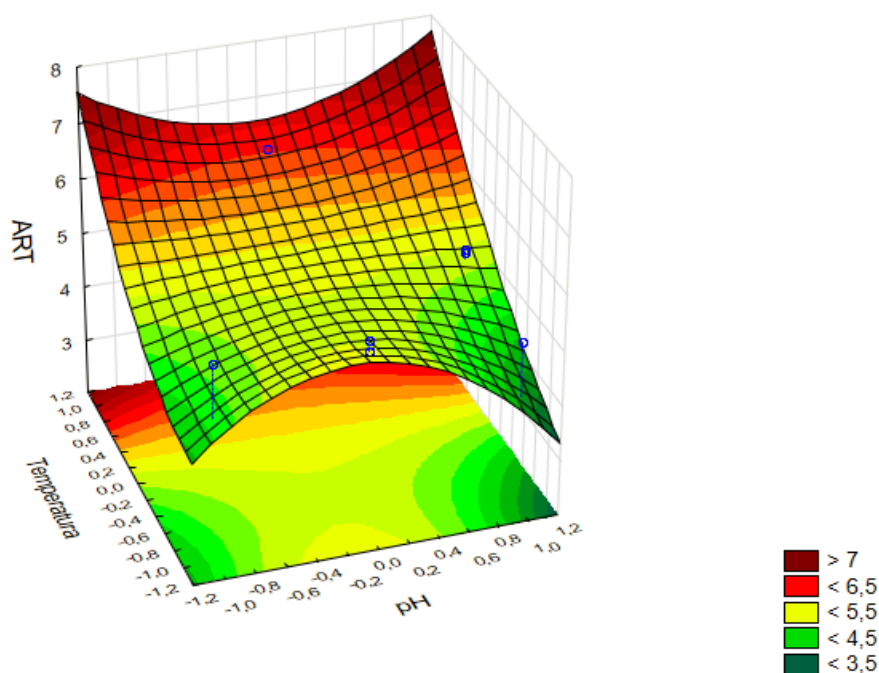


Fonte: Autora, 2026

O diagrama permite identificar, com um intervalo de confiança de 95%, que os efeitos do pH e do termo quadrático da temperatura apresentam um efeito negativo sobre a resposta, logo seu efeito diminui a disponibilidade de açúcares. Por sua vez, tempo e temperatura (linear) apresentaram efeitos positivos e significativos na resposta, aumentando essa disponibilidade de açúcares com o aumento dos seus valores.

Ao analisar os efeitos, foi percebido que a interação do tempo e temperatura (ambos lineares), bem como os efeitos principais pH (quadrático) e tempo (linear) apresentaram influência positiva sobre o aumento da concentração dos açúcares. Em contrapartida, ao analisar a interação entre pH quadrático e temperatura linear, foi avaliado uma influência negativa. Baseado nos efeitos das variáveis na concentração de açúcares foram observadas as interações entre as variáveis e suas tendências através das superfícies de respostas, apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13 abaixo.

Figura 11- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando pH e temperatura.



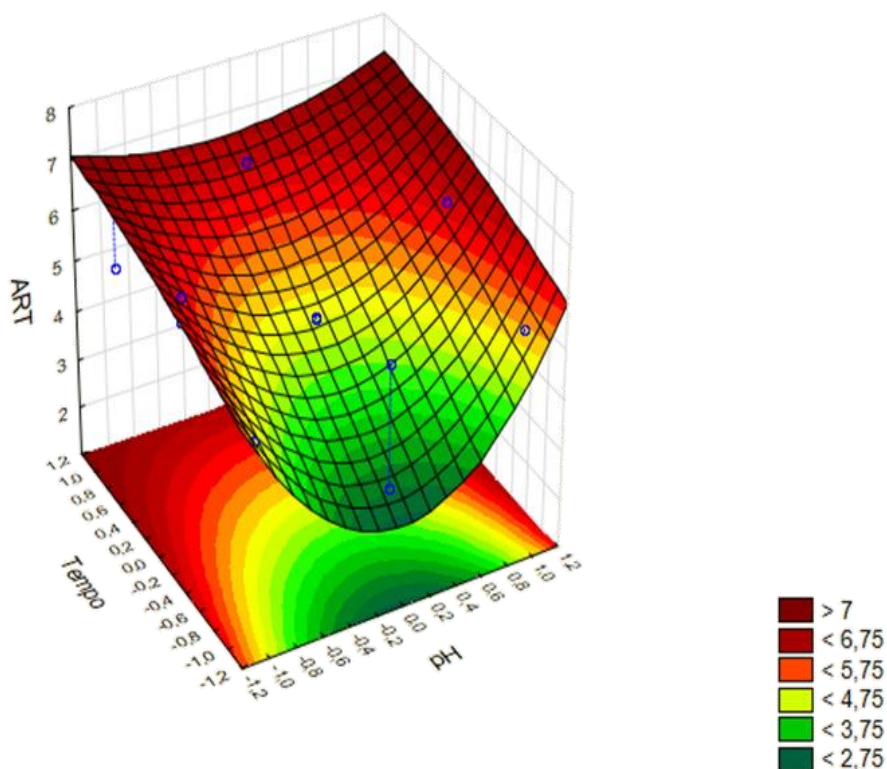
Fonte: Autora, 2026

Uma vez que, segundo o diagrama de Pareto, o tempo apresenta efeito positivo, a superfície de resposta apresentada na Figura 11 relaciona pH e temperatura, mantendo o tempo fixado em seu maior valor de 30 minutos. A partir da análise da superfície foi verificado que existe um efeito quadrático do pH sobre a concentração dos açúcares e, ainda, que o aumento da temperatura apresenta efeito positivo sobre a concentração de açúcares, ocasionando uma maior disponibilidade. Isto pode estar relacionado ao favorecimento das reações de hidrólise dos açúcares sob efeito da temperatura, pois em temperaturas altas foi possível aumentar a área superficial do substrato, deixando os açúcares mais acessíveis e disponíveis no meio, devido a ruptura das ligações que constituem a sua estrutura complexa (Shukla *et al.*, 2023).

Desse modo, utilizando o modelo gerado, foram obtidos os valores preditos para a condição 80°C, 30 min e pH 5, e para a condição 80°C, 30 min e pH 2, sendo obtido respectivamente, 6,93 g/L e 6,78 g/L de açúcares nessas condições, demonstrando que ambas as condições de pH foram favoráveis no aumento da disponibilidade dos açúcares. Contudo, a condição de pH 5 foi mais eficiente na maior temperatura e tempo de

exposição ao tratamento, o que pode estar relacionado a uma hidrólise mais eficiente dos açúcares em um meio menos ácido, diminuindo a degradação dos açúcares no tratamento.

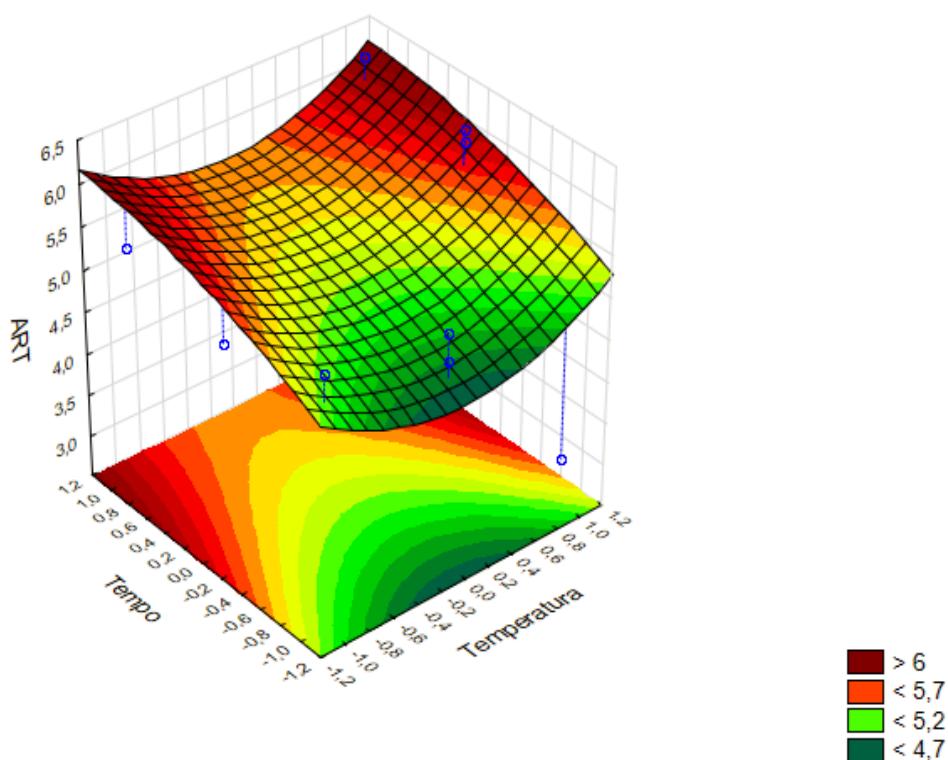
Figura 12- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando pH e tempo.



Fonte: Autora, 2026

A superfície de resposta apresentada na Figura 12 relaciona pH e tempo, mantendo a temperatura fixado em seu maior valor de 80°C. Foi observado que para todas as condições de pH, o aumento do tempo leva ao aumento da concentração de açúcares, esse fator pode estar relacionado ao maior tempo de exposição do substrato ao ultrassom, proporcionando um aumento da vibração no meio reacional, o que aumenta o rompimento das ligações e a disponibilidades dos açúcares de interesse (Banu *et al.*, 2019; Atelge *et al.*, 2020).

Figura 13- Superfície de resposta na fração aquosa do tratamento ácido por ultrassom da vinhaça relacionando temperatura e tempo.



Fonte: Autora, 2026

A superfície de resposta apresentada na Figura 13, relaciona tempo e temperatura, mantendo o pH fixado em 5,0. Assim como observado nas superfícies anteriores, foi evidenciado que a maior temperatura de tratamento, 80°C, e o maior tempo, 30 min, apresentaram maior influência no aumento na concentração de açúcares. Diante das respostas obtidas, foi concluído que a melhor condição em estudo para aumentar a disponibilidade de açúcares, foi utilizar o tempo, temperatura e pH em valores de 30 minutos, 80°C e 5, respectivamente, requerendo, desta forma, um maior tempo de tratamento em alta temperatura e com o meio ácido.

5.3. Análise dos efeitos dos pré-tratamentos do inóculo e substrato na produção de hidrogênio nos ensaios preliminares

Para compreender o funcionamento do biorreator, a influência do uso de pré-tratamento do inóculo e substrato, e variáveis em estudo (pH, temperatura e proporção de inóculo/substrato) na produção de hidrogênio, foram realizados ensaios preliminares. Através da produção de hidrogênio em cada ensaio, foi possível definir a utilização dos pré-tratamentos do inóculo e substrato. Na Tabela 14 foram apresentadas as condições experimentais dos ensaios preliminares realizadas no reator anaeróbico, bem como os rendimentos de hidrogênio e metano em cada ensaio.

Tabela 14- Condições experimentais dos ensaios preliminares realizadas no reator com os valores percentuais de hidrogênio e metano produzidos.

Ensaio	pH	T (°C)	Proporção do inóculo (v\v %)	Tratamento do inóculo	Tratamento do substrato	H ₂ (%)	CH ₄ (%)
1	5,0	40	30	Sem	Sem tratamento	< LD	0,54
2	5,0	40	30	Aclimação do lodo de esgoto com vinhaça por 24 h a 37°C;	Sem tratamento	< LD	< LD
3	5,0	40	30	Aclimação e inoculação do lodo de esgoto com a vinhaça durante 72h a 37°C;	Sem tratamento	< LQ	< LD
4	5,0	40	30	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto;	Sem tratamento	8,20	< LD
5	5,5	55	50	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto;	Sem tratamento	54,22	< LQ
6	5,5	55	50	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto;	Tratamento ácido auxiliado por ultrassom	58,25	< LQ
7	5,5	55	30	Tratamento ácido e incubação por 24h a 55°C do lodo de esgoto;	Tratamento ácido auxiliado por ultrassom	32,39	< LQ

Legenda: LD- Limite de detecção; LQ- Limite de quantificação;

Fonte: Autora, 2026

Na Tabela 14 foi evidenciado que a produção de hidrogênio nos ensaios 1, 2 e 3 não apresentaram valores detectável e/ou quantificável. Esse fato ocorreu, provavelmente, devido os ensaios fazerem uso do inóculo sem tratamento, não se tendo a inativação dos grupos de bactérias consumidoras de hidrogênio. O ensaio 1 em estudo, foi utilizado como controle, sem pré-tratamento ou aclimatação do inóculo e sem tratamento da vinhaça, o que não contribuiu para a produção de H_2 e proporcionou um ambiente adequado para a produção de metano (CH_4) com uma porcentagem de 0,54% durante seu processamento que teve duração de 10 dias. Caso a reação não tivesse sido interrompida, a digestão poderia promover o aumento da produção de metano.

Esse aumento do metano no sistema tem relação com o favorecimento dos microrganismos metanogênicos (produtores de CH_4), na temperatura em que o ensaio ocorreu, 40°C, já que essa faixa mesofílica de temperatura permite o crescimento e desenvolvimento dos organismos metanogênicos, por ser uma condição branda e está na faixa ótima de atividade destas bactérias (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Ao comparar os ensaios 2 e 3, foi evidenciado que o ensaio 3, em que ocorreu a aclimatação do inóculo com uma alimentação contínua durante três dias, apresentou uma melhor resposta em relação ao ensaio 2, pois a partir da análise cromatográfica, foi detectada a presença de H_2 . Embora a quantificação não tenha sido possível devido à concentração estar numa faixa mínima, no ensaio 2 a produção de H_2 não foi detectável.

No ensaio 4, foi perceptível a diferença na produção em relação aos demais ensaios mencionados, sendo obtida uma porcentagem de H_2 de 8,2%. Este rendimento está relacionado ao pré-tratamento ácido e ativação do inóculo, visto que a digestão foi processada nas mesmas condições dos ensaios anteriores, em termos de pH, temperatura e proporção de substrato/inóculo. No entanto, a presença do pré-tratamento ácido do inóculo contribuiu para o aumento da concentração de H_2 , por aumentar a atividade biológica dos microrganismos acidogênicos no meio Mahmoodi-Eshkaftaki; Mockaitis, 2022; Volpi *et al.* 2024).

As condições ácidas e temperaturas termofílica (45-60°C) contribuem na inibição das bactérias arqueas metanogênicas, por estas apresentarem alta sensibilidade às variações bruscas de pH e temperatura (Mahmoodi-Eshkaftaki; Mockaitis, 2022; Volpi *et al.* 2024). Ao tratar o lodo com ácido até o pH 3,0 ocorreu uma redução ou até mesmo inativação

da atividade desses microrganismos, favorecendo a presença e atividade de bactérias acidogênicas que são menos sensíveis a essas variações de pH (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

Estes organismos apresentam a capacidade de formar endósporos que proporcionam resistência as variações no meio, contribuindo para sua sobrevivência nas condições extremas do pré-tratamento. Esse fator aumentou a produção de H_2 , sendo evidenciado esse comportamento ao comparar com o ensaio 1, que não passou por nenhum tratamento do inóculo e apresentou uma produção de CH_4 de 0,5%, diferentemente do ensaio em discussão, em que a produção de CH_4 não foi quantificável (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

No ensaio 5 foi obtido um aumento considerável da porcentagem de H_2 em relação ao ensaio 4, com uma porcentagem de H_2 de 54,22%. Esse bom desempenho foi relacionado não somente ao tratamento do inóculo, como observado no ensaio 4, mas também, atribuído as mudanças nas condições das variáveis do processo. Neste ensaio foi variada a temperatura e pH, que influenciam diretamente na atividade e crescimento microbiano, gerando um impacto positivo na produção de H_2 .

O pH proporcionou um aumento nas reações bioquímicas do sistema e na ação metabólica dos microrganismos sobre o substrato, aumentando assim, a conversão da matéria orgânica em H_2 . Além disso, por ser processado em uma faixa ácida, o pH do sistema contribuiu também para a inibição dos microrganismos indesejáveis ao processo (Saravanan *et al.*, 2022; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

A temperatura também contribuiu no aumento da produção de hidrogênio, por influenciar o equilíbrio termodinâmico do sistema, cinética de crescimento microbiano e diversidade microbiana. Desta maneira, a variação na temperatura proporcionou esse aumento na produção de H_2 e inativação das bactérias consumidoras (Hai *et al.*, 2023). O uso da temperatura termofílica (55°C) neste ensaio, além de contribuir na seleção dos microrganismos de interesse, pode ter direcionado a produção de H_2 pela via metabólica de produção do acetato, a qual é responsável pelo maior rendimento de hidrogênio nos sistemas fermentativos (Mohanakrishna; Pengadeth, 2024).

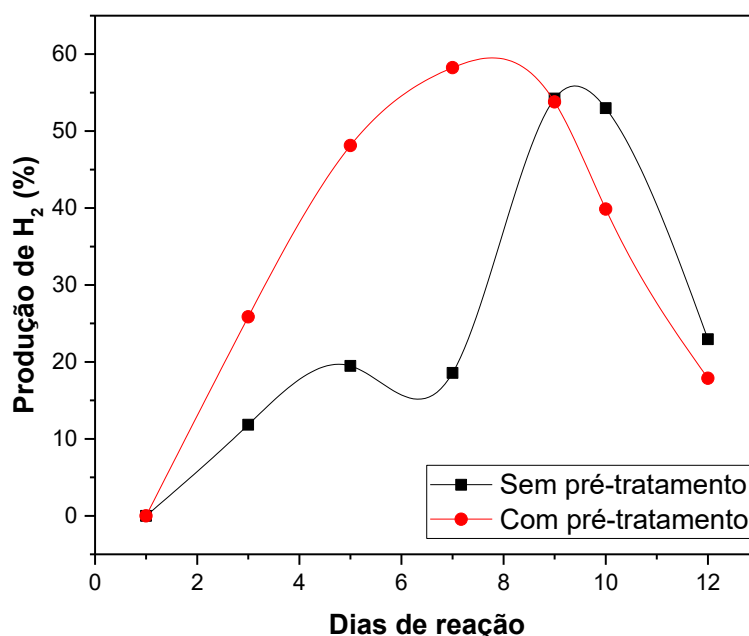
No ensaio 6, foi realizado o pré-tratamento da vinhaça e foi observado um aumento da porcentagem de H_2 em relação ao ensaio 5, sendo obtido uma porcentagem de 58,25% de H_2 . O pré-tratamento da vinhaça possibilitou o aumento da disponibilidade de açúcares e proporcionou uma pré-hidrólise do substrato, acelerando o processo fermentativo, consequentemente, acelerando a produção e aumentando o rendimento do

H₂. Possivelmente, o fato dos carboidratos e demais estruturas complexas serem hidrolisados durante o pré-tratamento da vinhaça, facilitou o acesso dos microrganismos aos nutrientes de forma mais rápida e eficiente, aumentando o crescimento e proliferação dos microrganismos no meio (Rashidi *et al.*, 2024).

O pré-tratamento da vinhaça se apresentou dentro do processo como um catalisador, acelerando a etapa fermentativa, pois no ensaio 5 a maior produção de H₂ foi alcançada no 9º dia do processamento do ensaio. Por outro lado, no ensaio 6 foi possível alcançar a maior produção de H₂ no 6º dia do processamento e, com um aumento da porcentagem de H₂ de 4,03%.

Demonstrando assim que, além de aumentar a quantidade de açúcares no meio, o pré-tratamento também contribuiu na redução do tempo de fermentação dos resíduos, atingindo o rendimento máximo de H₂ em um menor intervalo de tempo. Na Figura 14 foi apresentado um gráfico comparativo da produção de H₂ durante os ensaios 5 e 6, demonstrando a influência positiva do pré-tratamento do substrato sobre o processo fermentativo.

Figura 14- Gráfico comparativo das amostragens realizadas durante os ensaios 5 e 6.



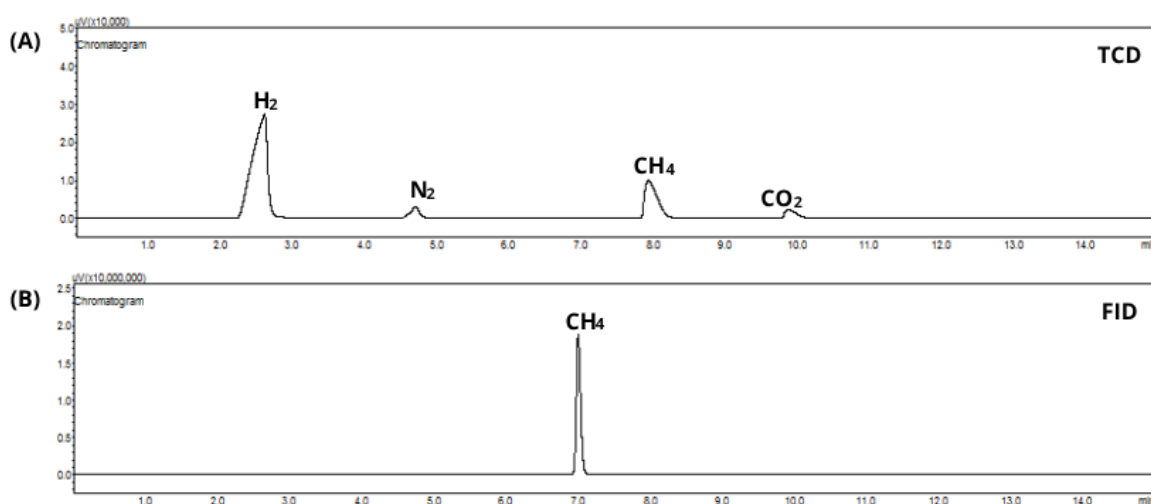
Fonte: Autora, 2026

No ensaio 7, foram mantidas as condições de pré-tratamento do inóculo e substrato, bem como do pH e temperatura nas mesmas condições do ensaio 6. No entanto, ao reduzir o volume de inóculo, para uma proporção de 30%, foi possível observar uma diminuição na porcentagem de H_2 para 32,39%. Essa diminuição pode ter sido ocasionada pelo desequilíbrio do sistema com uma menor proporção entre os microrganismos ativos e a quantidade de substrato a ser hidrolisado, podendo ter propiciado a saturação dos microrganismos com o excesso de substrato a ser digerido, proporcionando uma maior competição entre os grupos de microrganismos e a diminuição da produção do H_2 no sistema.

5.4. Validação do método cromatográfico desenvolvido

A partir do desenvolvimento do método cromatográfico foram selecionadas as condições operacionais mais adequadas para a identificação dos analitos, baseado na intensidade do sinal analítico, detecção e resolução entre os picos dos compostos alvos (H_2 , CH_4 e CO_2). A Figura 15 apresentou um perfil cromatográfico da mistura dos analitos em estudo, sobre as mesmas condições cromatográficas do método desenvolvido neste estudo.

Figura 15- Perfil cromatográfico do TCD (A) e FID (B) dos padrões de gases utilizados no desenvolvimento do método cromatográfico.



Fonte: Autora, 2026

5.4.1. Linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade do método desenvolvido

Para validar o método cromatográfico desenvolvido inicialmente foi atestada sua seletividade, por meio da resolução (R_s) entre os picos dos analitos em estudo, demonstrando assim a capacidade de identificação e quantificação dos gases, distinguindo as respostas destes de maneira seletiva. A partir das análises foram obtidos valores de resolução para o H_2 , CO_2 e CH_4 de 2,3; 6,8 e 7,1; respectivamente. Assim foi considerado que existe uma separação de 100% entre os picos, já que suas resoluções tiveram valores acima de 1,5 evidenciando a seletividade do método desenvolvido (ANVISA, 2017; Silva *et al.*, 2021).

A linearidade foi atestada por meio do coeficiente de correlação de Person (r) e pelo coeficiente de determinação (R^2) apresentado na Tabela 15, sendo esses coeficientes obtidos a partir das curvas de calibração analítica construídas para os padrões dos analitos (Apêndice B). Foram construídas duas curvas de calibração para cada analito, sendo a faixa alta de trabalho para: H_2 : 1-70%; CO_2 : 1-50%; CH_4 : 1-30%, e a faixa baixa de trabalho para todos os compostos de 1-10%. Através do coeficiente de correlação foi atestada uma alta linearidade para todas as faixas de trabalho dos analitos estudados, com valores de r e R^2 maiores que 0,99.

Tabela 15- Coeficientes de correlação e testes do modelo gerado das curvas analíticas.

Curva analítica		Matriz de correlação			Teste do modelo de regressão	
Analitos	Faixa linear de trabalho (%)	r	R^2	p-value	F	p-value
Curvas de calibração analítica de faixa alta						
H_2	0,5 ($\pm 0,1$) - 71,3 ($\pm 0,3$)	0,9984	0,9969	<0,001	1905,90567	<0,001
CO_2	1,2 ($\pm 0,1$) - 50,5 ($\pm 0,6$)	0,9997	0,9993	<0,001	6076,34469	<0,001
CH_4	1,5 ($\pm 0,2$) - 29,6 ($\pm 1,0$)	0,9977	0,9954	<0,001	1087,01274	<0,001
Curvas de calibração analítica de faixa baixa						
H_2	1,1 ($\pm 0,1$) - 10,1 ($\pm 0,1$)	0,9995	0,9989	<0,001	3749,62711	<0,001
CO_2	1,1 ($\pm 0,1$) - 10,3 ($\pm 0,5$)	0,9987	0,9974	<0,001	1551,99853	<0,001
CH_4	1,0 ($\pm 0,0$) - 10,2 ($\pm 0,3$)	0,9982	0,9964	<0,001	1107,98111	<0,001

Fonte: Autora, 2026

Os valores encontrados para o coeficiente de correlação atendem às exigências da RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, demonstrando que o método apresenta a capacidade de obter as respostas analíticas de maneira proporcional a concentração do analito, já que tem uma forte correlação positiva entre a porcentagem de analito injetada e a área cromatográfica obtida (ANVISA, 2017; Araujo *et al.*, 2023).

Por meio dos coeficientes de determinação das curvas em suas faixas alta e baixa foi possível atestar também a capacidade que o modelo apresenta de explicar seu resultado, tendo em ambas as faixas um $R^2 > 0,99$, demonstrando que o modelo explica 99% dos resultados obtidos, em termos da variável dependente (área cromatográfica) em relação a variável independente (porcentagem do analito) (Araujo *et al.*, 2023). A partir das análises dos coeficientes foi atestada a significância estatística, entre as variáveis dependente e independente, já que o p-value foi $<0,001$, indicando que a relação entre as variáveis da curva é estatisticamente significativa. Evidenciando que os pontos que compõem as curvas em toda a sua faixa de trabalho são significativamente diferentes.

Além da análise de probabilidade estatística dos coeficientes, foi realizado também o teste global do modelo (teste F) para todas as curvas construídas e, como observado na Tabela 15, os valores obtidos para esse teste foram altos e o valor de p aplicado nesse teste foi $<0,001$ em todos os casos. Revelando que o modelo de regressão é estatisticamente significativo, permitindo assim estipular que as faixas de trabalho das curvas construídas podem ser consideradas como faixas lineares de trabalho, através da proporcionalidade entre picos cromatográficos e concentração do analito (%) (INMETRO, 2016; Araujo *et al.*, 2023).

Além das análises mencionadas, foram avaliados os coeficientes lineares e angulares dos modelos de regressão das curvas para comprovar a linearidade do método, em que os coeficientes foram submetidos ao teste T para atestar se a significância é diferente de zero, obtendo assim, a influência desses coeficientes sobre o modelo. Dessa forma, foi analisado na Tabela 16 que os coeficientes angulares dos modelos de regressão foram em todas as curvas de calibração estatisticamente diferentes de zero ($p < 0,001$) e considerados significativos, conforme exigido pela RDC N° 166/2017, fortalecendo a confiabilidade da curva de calibração analítica (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

Tabela 16- Modelos de regressão linear das curvas de calibração analíticas: testes estatísticos dos coeficientes angulares e lineares.

Curva analítica		Coeficientes dos modelos			
Faixa linear de trabalho (%)	Analitos	Coeficiente angular (b)	p-value	Coeficiente linear (a)	p-value
Curvas de calibração analítica de faixa alta					
0,5 (±0,1) - 71,3 (± 0,3)	H ₂ Modelo de regressão	11463,38527 A _{H2} = 11463,38527.	<0,001	24877,98002	0,0641
1,2 (±0,1) - 50,5 (±0,6)	CO ₂ Modelo de regressão	1028,51602 A _{CO2} = 1028,51602.	<0,001	183,04679	0,6706
1,5 (± 0,2) - 29,6 (±1,0)	CH ₄ Modelo de regressão	158884,7304 A _{CH4} = 158884,7304.	<0,001	-59151,96048	0,5263
Curvas de calibração analítica de faixa baixa					
1,1 (± 0,1) - 10,1 (±0,1)	H ₂ Modelo de regressão	13616,95222 A _{H2} = 13616,95222.	<0,001	-5097,38795	0,0261
1,1 (± 0,1) – 10,3 (± 0,5)	CO ₂ Modelo de regressão	1101,88 A _{CO2} = 1101,88.	<0,001	65,5	0,7423
1,0 (± 0,0) - 10,2 (± 0,3)	CH ₄ Modelo de regressão	159773,7096 A _{CH4} = 159773,70959.	<0,001	-33427,2726	0,3530

Fonte: Autora, 2026

No que se refere a sensibilidade analítica, a qual é representada pela variabilidade na resposta do instrumento através da mudança na medida de concentração do analito, foi notório através do modelo de regressão linear por meio da análise das inclinações da reta (coeficientes angulares) a alta sensibilidade do método para todos os analitos (INMETRO, 2016). Sendo importante observar que apenas o CO₂ apresentou menor sensibilidade analítica em termos do seu valor de coeficiente angular, contudo, todas as inclinações obtiveram um valor de $p < 0,001$, se mostrando estatisticamente significativo.

Os interceptos das curvas (coeficientes lineares) também apresentaram um bom ajuste do modelo, com valores de $p > 0,05$; não diferindo significativamente de zero. Mostrando que as curvas analíticas passam próximas a origem, com exceção da curva de H₂ 10% que exibiu um leve desvio da origem, mas que não interferiu significativamente na sua faixa linear de trabalho. Demonstrando assim, a alta sensibilidade dos modelos

gerados para a quantificação dos analitos nas faixas altas e baixas determinadas (Araujo *et al.*, 2023).

5.4.2. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas de calibração analítica

A partir da quantificação dos parâmetros de LD e LQ, foi possível perceber que o método desenvolvido tem boa sensibilidade analítica, já que os resultados mostram a capacidade que este tem de detectar e quantificar concentrações baixas dos analitos. Na Tabela 17 os valores de LD e LQ encontrados em ambas as faixas foram menores ou iguais aos limites inferiores das faixas lineares de calibração avaliadas anteriormente. Demonstrando que os parâmetros avaliados por meio das curvas analíticas são estatisticamente confiáveis e que o método em estudo tem uma boa sensibilidade (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017; Araujo *et al.*, 2023).

Tabela 17- Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas de calibração analíticas.

Analitos	Curvas analíticas de faixa alta		Curvas analíticas de faixa baixa	
	LD (%)	LQ (%)	LD (%)	LQ (%)
H ₂	0,2	0,5	0,3	0,8
CO ₂	0,3	0,9	0,2	0,7
CH ₄	0,6	1,8	0,1	0,3

Fonte: Autora, 2026

5.4.3. Precisão e Repetibilidade do método desenvolvido

A precisão do método cromatográfico foi atestada por meio do parâmetro de repetibilidade, avaliando a proximidade entre os resultados obtidos para os analitos sobre as mesmas condições de operação, analista e equipamento. A análise foi realizada através dos coeficientes de variação (CV), também denominado de desvios padrões relativos, por meio das réplicas das corridas cromatográficas dos analitos em cada concentração analisada, nas faixas baixa, média e alta (ANVISA, 2017). A Tabela 18 apresentou os resultados dos testes de repetibilidade dos analitos, por meio das análises das áreas cromatográficas e tempos de retenção dos analitos.

Tabela 18- Testes de repetibilidade dos analitos para diferentes faixas de concentrações no intervalo da faixa linear de trabalho.

Analitos	Concentração dos analitos (%)	Áreas cromatográficas	Tempos de retenção (min)
Faixa baixa de trabalho			
H ₂	10	154601,3 (± 1,633,5) (1,1%)	2,492 (± 0,005) (0,21%)
CO ₂	10	11466,4 (± 225,9) (2,0%)	9,931 (± 0,004) (0,04%)
CH ₄	10	1557051,4 (± 28784,5) (1,8%)	6,994 (± 0,003) (0,04%)
Faixa média de trabalho			
H ₂	40	503266,0 (± 9114,9) (1,8%)	2,643 (± 0,013) (0,48%)
CO ₂	30	31426,1 (± 671,8) (2,1%)	9,829 (± 0,005) (0,05%)
CH ₄	20	48576991,5 (± 1380600,0) (2,8%)	6,983 (± 0,003) (0,04%)
Faixa alta de trabalho			
H ₂	70	842479,6 (± 3433,8) (0,4%)	2,734 (± 0,003) (0,10%)
CO ₂	50	54050,1 (± 2169,4) (4,0%)	9,746 (± 0,008) (0,09%)
CH ₄	30	68169080,7 (± 605498,7) (3,1%)	6,972 (± 0,003%) (0,04%)

Fonte: Autora, 2026

A partir da Tabela 18 foi verificado que os resultados obtidos atestam a precisão do método desenvolvido, já que o objetivo do teste foi avaliar a precisão dos resultados de uma mesma amostra em diferentes injeções e concentrações. Os valores de CV encontrados demonstram boa precisão, encontrando-se desvios padrões relativos menores que 4% em relação à média, atestando a precisão e confiabilidade do método em estudo já que de acordo com a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 para métodos cromatográficos um $CV \leq 5\%$ é considerado excelente (ANVISA, 2017).

Além da precisão do método, foi comprovada também a repetibilidade por meio da precisão intradiária, através das injeções dos padrões de gases em concentrações baixas, médias e altas, com um mesmo procedimento de preparo, medição e analista, variando agora o período de injeção das amostras durante um curto intervalo de tempo. Possibilitando analisar a variabilidade das respostas analíticas dos gases com as mudanças de condições experimentais.

Logo, os valores de CV obtidos foram menores que 5% para todos os analitos, com exceção do CH₄ em sua faixa alta, com um desvio padrão relativo de 5,7%, mas que ainda é aceitável por se tratar de um método instrumental. Demonstrando assim a baixa variabilidade das respostas, alta precisão e repetibilidade adequada do método (ANVISA, 2017). Na Tabela 19 foram apresentados os resultados dos testes de precisão intradiária com seus desvios padrões e coeficientes de variação.

Tabela 19- Testes de precisão intradiária (repetibilidade) dos analitos para diferentes faixas de concentrações no intervalo da faixa linear de trabalho.

Analitos	Concentração dos analitos (%)	Áreas cromatográficas
Faixa baixa de trabalho		
H ₂	10	157443,7 (± 2583,6) (1,6%)
CO ₂	10	11288,6 (± 179,6) (1,6%)
CH ₄	10	1598624 (± 18125,2) (1,1%)
Faixa média de trabalho		
H ₂	40	502925,0 (± 7453,5) (1,5%)
CO ₂	30	31095,9 (± 62,5) (0,2%)
CH ₄	20	48196732,4 (± 1546163,2) (3,2%)
Faixa alta de trabalho		
H ₂	70	840122,2 (± 29509,2) (3,5%)
CO ₂	50	51149,4 (± 1086,2) (2,1%)
CH ₄	30	72000667,0 (± 4179434,1) (5,7%)

Fonte: Autora, 2026

5.5. Otimização da produção de hidrogênio

5.5.1. Análise do efeito das etapas da digestão anaeróbia na produção de hidrogênio nos ensaios do planejamento experimental

A partir dos ensaios experimentais foi analisada a evolução reacional do processo de digestão anaeróbia para a produção de hidrogênio em cada condição experimental trabalhada em relação ao período de processamento dos ensaios. Possibilitando entender o processamento da digestão em cada etapa da reação, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, relacionando com a atividade microbiana, processo de

conversão do substrato e produção de hidrogênio. Na Tabela 20 foi apresentada a produção de hidrogênio quantificada ao longo das reações estabelecidas no planejamento experimental.

Tabela 20- Produção de hidrogênio ($\text{N mL}_{\text{H}_2} \text{L}^{-1}_{\text{substrato}}$) quantificados nas amostras de gás nos ensaios do planejamento experimental.

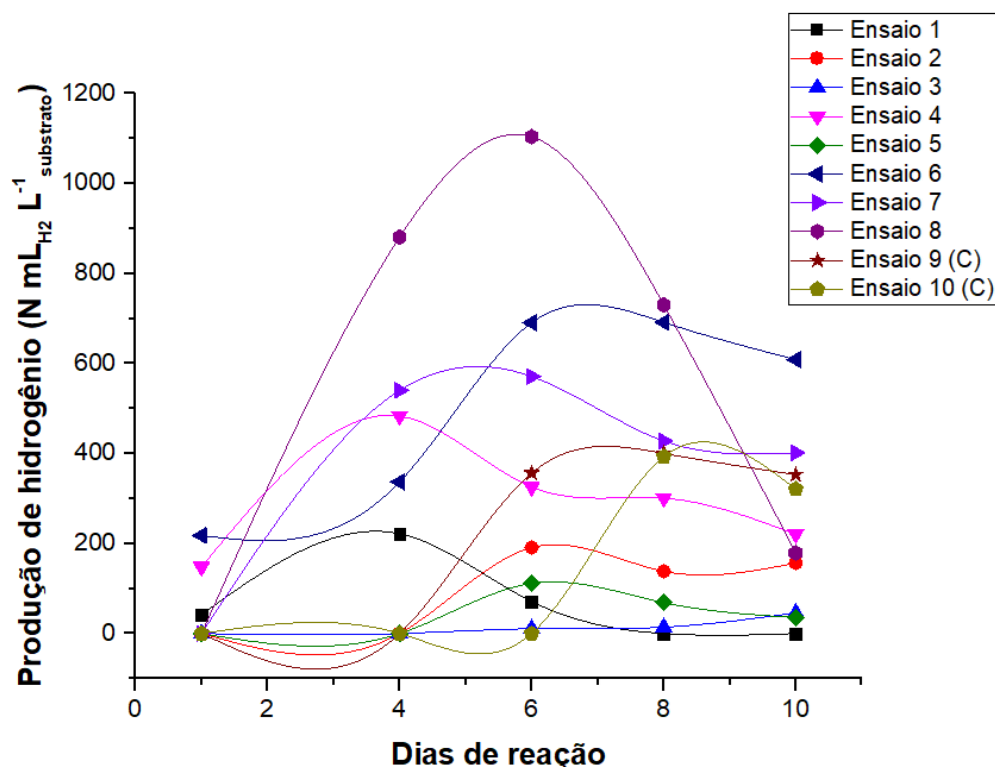
Ensaio	Produção de hidrogênio ($\text{N mL}_{\text{H}_2} \text{L}^{-1}_{\text{substrato}}$)				
	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
1	42,2	222,0	71,6	0	0
2	0	0	191,1	138,3	156,7
3	0	0	10,7	14,1	46,1
4	147,9	483,6	325,9	300,8	220,7
5	0	0	111,6	68,7	35,7
6	217,8	336,9	691,0	691,6	609,0
7	0	540,6	571,5	427,7	401,9
8	0	880,9	1104,4	730,1	179,3
9 (C)	0	0	356,6	400,1	353,1
10 (C)	0	0	0	393,4	321,1

Fonte: Autora, 2026

Ao avaliar os resultados da Tabela 20 foi visto que o início da produção de H_2 variou entre as reações, ocorrendo na maioria dos ensaios entre o 4° ou 6° dia. Estando esse comportamento relacionado a fase lag ou (fase de latência) mais prolongada dos microrganismos no sistema, necessitando de um maior tempo de adaptação ao meio reacional, para o crescimento e aumento da atividade metabólica. Esse processo de adaptação, influencia na etapa de hidrólise do substrato, retardando a conversão da matéria orgânica complexa em moléculas simples (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Posterior a etapa de latência, foi observada a fase log, caracterizada pelo crescimento exponencial da produção de hidrogênio, representando a etapa fermentativa ou acidogênica do processo, em que as moléculas simples convertidas na etapa hidrolítica são transformadas em ácidos graxos voláteis (butírico, propiônico e acético), CO_2 e H_2 pelos microrganismos (Cremonez *et al.*, 2021; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022). Na Figura 16 foram demonstradas as curvas reacionais para cada ensaio de modo a se obter uma melhor visualização dessa etapa de crescimento e produção máxima de H_2 com o avanço das reações, bem como a fase de declínio da produção nos ensaios.

Figura 16- Gráfico comparativo da produção diária de hidrogênio durante as amostragens realizadas nos ensaios do planejamento experimental.



Fonte: Autora, 2026

Através da Figura 16 foi constatado que as máximas produções diárias alcançadas nos ensaios foram entre o 6º e 8º dia de reação. Ademais foi diagnosticado 3 comportamentos distintos dentro dos ensaios em estudo, variando entre produções altas, intermediárias e baixas. Ao analisar os ensaios 6, 7 e 8 foram detectadas as maiores produções de H_2 , variando entre 570-1100 $N\ mL_{H_2}\ L^{-1}_{substrato}$, demonstrando que nesses sistemas reacionais se teve uma fase acidogênica intensa e predominante.

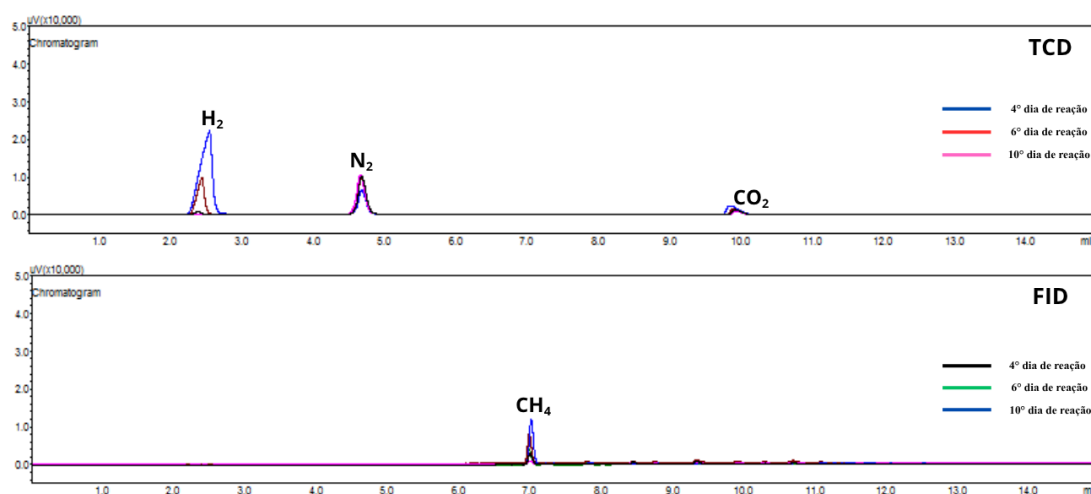
Nesses ensaios os microrganismos fermentativos apresentaram maior atividade e conversão do substrato em H_2 . Este comportamento está relacionado as condições de processamento dos ensaios, que foram trabalhados sobre condições de pH 5,5 e temperatura entre 40 e 55°C, consideradas faixas ótimas e que favorecem a atividade dos organismos acidogênicos (Kumar; Samadder, 2020; Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Para os ensaios 4, 9 e 10 por sua vez, a produção máxima obtida foi entre 350-480 $N\ mL_{H_2}\ L^{-1}_{substrato}$, nessas reações foi obtida uma produção intermediária em relação aos demais ensaios, sendo observado um equilíbrio dentro do sistema entre a produção de H_2

e início do seu consumo. O que demonstra uma atividade baixa, mais significativa das bactérias consumidoras de H_2 , levando a uma atividade considerável nas etapas acetogênicas e metanogênicas, que provoca a diminuição do H_2 mas não inibe a etapa fermentativa completamente (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022; Hajizadeh *et al.*, 2022).

Os ensaios 1, 2, 3 e 5 apresentaram baixas produções de hidrogênio, menor que $220 \text{ N mL}_{H_2} \text{ L}^{-1}_{\text{substrato}}$, sendo que esses ensaios apresentaram um comportamento mais irregular em relação aos demais, com maior tempo de fase lag e variações na produção de H_2 . Indicando uma menor atividade dos microrganismos acidogênicos e maior atividade das bactérias acetogênicas e metanogênicas, provocando a baixa produção de H_2 e aumento constante da conversão deste em CH_4 . Na Figura 17 foi apresentado o perfil cromatográfico comparativo das alíquotas do ensaio 1, que mostra o aumento do CH_4 no sistema com o prosseguimento da reação (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022; Hajizadeh *et al.*, 2022).

Figura 17- Perfil cromatográfico da produção de hidrogênio e metano nas alíquotas retiradas do ensaio 1 do planejamento experimental.



Fonte: Autora, 2026

Assim como observado no perfil cromatográfico do ensaio 1 (Figura 17), os demais ensaios também demonstraram esse declínio da produção de H_2 e aumento do CH_4 durante o processamento da reação, ainda que menos pronunciado em alguns ensaios, conforme evidenciado nos demais perfis cromatográficos dos ensaios (Apêndice C). Este comportamento pode estar relacionado a inativação incompleta dos microrganismos metanogênicos por meio do pré-tratamento ácido/térmico aplicado ao

inóculo. Sendo evidenciado pela presença de CH_4 ainda que em concentrações muito baixas, estando abaixo do limite de quantificação.

Além desse fator, a presença de diferentes rotas metabólicas de produção (rota do acetato, butirato e etanol) e consumo (rota das bactérias homoacetogênicas e propionato) de hidrogênio seguidas pelos microrganismos explicam a redução da produção de H_2 no decorrer das reações, bem como as condições de processamento de cada ensaio (Ribeiro *et al.*, 2022; Mohanakrishna; Pengadeth, 2024). Dessa maneira no tópico 5.5.2 foi discutida a influência das variáveis pH, temperatura e proporção de inóculo sobre a produção máxima de H_2 obtida nos ensaios do planejamento experimental, sendo definido a melhor condição experimental para o aumento dessa produção.

5.5.2. Efeito das variáveis pH, temperatura e proporção do inóculo sobre a produção de hidrogênio.

Os ensaios realizados a partir do planejamento experimental indicaram a viabilidade da produção de hidrogênio por meio da fermentação anaeróbia, fazendo uso da vinhaça da cana-de-açúcar como substrato inoculada com o lodo de esgoto. Assim, foram estudados os efeitos dos fatores (pH, temperatura e proporção volumétrica do inóculo) sobre a produção de hidrogênio, na busca da otimização do processo e maximização dessa produção. Na Tabela 20 foi apresentada a produção máxima de hidrogênio obtida durante as amostragens dos ensaios realizados com base nas condições do planejamento fatorial.

Tabela 21- Resultados obtidos para a produção máxima de hidrogênio nos ensaios do planejamento fatorial.

Ensaio	Variáveis			Produção máxima de Hidrogênio (N mL _{H2} L ⁻¹ substrato)
	A	B (°C)	C (v\ v %)	
1	5,00	40,0	30,0	220,0
2	5,00	40,0	50,0	191,1
3	5,00	55,0	30,0	46,1
4	5,00	55,0	50,0	483,6
5	5,50	40,0	30,0	111,6
6	5,50	40,0	50,0	691,6
7	5,50	55,0	30,0	571,5
8	5,50	55,0	50,0	1104,4
9 (C)	5,25	47,5	40,0	400,1
10 (C)	5,25	47,5	40,0	393,4

A- pH; B- temperatura; C- proporção volumétrica de substrato/inóculo;

Fonte: Autora, 2026

Com base nas produções máximas alcançadas nos ensaios foi realizada a análise ANOVA (Tabela 22) dos resultados experimentais, sendo obtido um Valor de P para o modelo maior que 0,05; indicando que a falta de ajuste do modelo não é significativa, e este é apropriado para explicar o efeito das variáveis sobre a produção de hidrogênio, conforme evidenciado através do coeficiente de determinação (R^2) e R^2 ajustado com valores de 0,9983 e 0,9923 respectivamente, indicando uma alta correlação entre as variáveis independentes e a variável resposta do modelo. O valor do R^2 determinado, indica que o modelo pode explicar 99,23% das mudanças de valores das respostas experimentais com confiabilidade, descrevendo assim o efeito individual e interativo das variáveis sobre a produção de hidrogênio.

Tabela 22- ANOVA do modelo obtido para produção de hidrogênio nos ensaios do planejamento fatorial 2³.

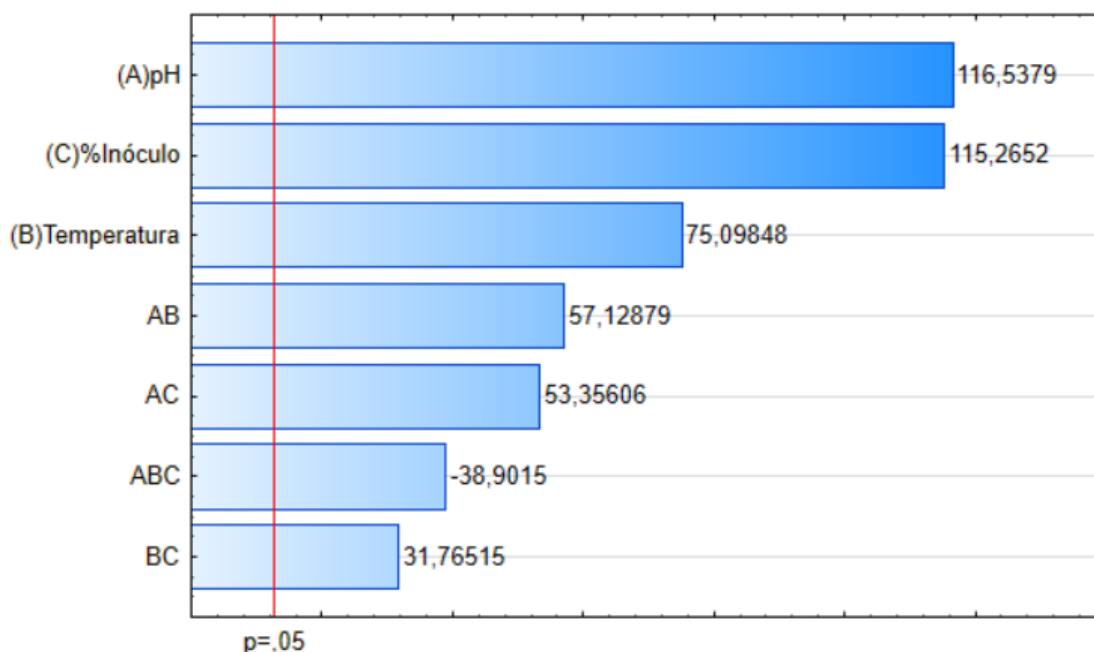
Fatores	SS	df	MS	Valor F	Valor p
A	295795,9	1	295795,9	13581,1	0,005
B	122834,5	1	122834,5	5639,8	0,008
C	289370,3	1	289370,3	13286,1	0,006
AB	71083,4	1	71083,4	3263,7	0,011
AC	62004,8	1	62004,8	2846,9	0,012
BC	21976,6	1	21976,6	1009,0	0,020
ABC	32960,3	1	32960,3	1513,3	0,016
Falta de ajuste	1516,6	1	1516,6	69,6	0,076
Erro puro	21,8	1	21,8	-	-
Total	897564,0	9	-	-	-

SS- Soma quadrática; df- graus de liberdade; MS- Média quadrática;

Fonte: Autora, 2026

Os resultados presentes na Tabela 22 mostraram que todas as variáveis em estudo (pH, temperatura e proporção de inóculo/substrato) tem efeito significativo para o modelo, já que os valores de P obtidos foram todos menores que 0,05. Assim como também a interação entre as variáveis é significativamente importante no aumento da produção de hidrogênio. A partir dessa análise, foi gerado o diagrama de Pareto (Figura 18) para uma melhor visualização da magnitude dos efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta, informando a significância das variáveis em um intervalo de confiança de 95%.

Figura 18- Diagrama de Pareto para representação dos efeitos das variáveis e das suas interações no processo fermentativo.



Fonte: Autora, 2026

A partir do diagrama foi perceptível que o pH e a proporção de inóculo apresentaram os maiores efeitos sobre a resposta, indicando que foram as variáveis mais significativas dentro do modelo, seguido pela temperatura que também apresentou um efeito positivo e significativo, contudo menor que as demais variáveis. Ao analisar o efeito interativo das variáveis foi visto que o pH e a temperatura apresentam o maior efeito interativo sobre a produção de hidrogênio, o que está relacionado a influência desses fatores na cinética de crescimento e atividade metabólica dos microrganismos no meio fermentativo, atuando de maneira sinérgica na taxa de conversão do substrato e eficiência metabólica dos microrganismos (Jing *et al.*, 2020; Rashidi *et al.*, 2024).

Ademais, a interação pH e proporção de inóculo foi altamente significativa, o que pode estar relacionado a maior atividade dos microrganismos fermentativos sobre as condições ácidas. A interação da temperatura e proporção de inóculo, embora menor, foi significativa, possivelmente, devido ao fato da temperatura influenciar diretamente na microbiota do meio, já que cada microrganismo tem uma faixa de temperatura específica para crescimento e atividade metabólica (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022).

Por fim, foi observado que a interação entre pH, temperatura e proporção de inóculo apresentou efeito negativo sobre a produção de H₂, indicando que a interação

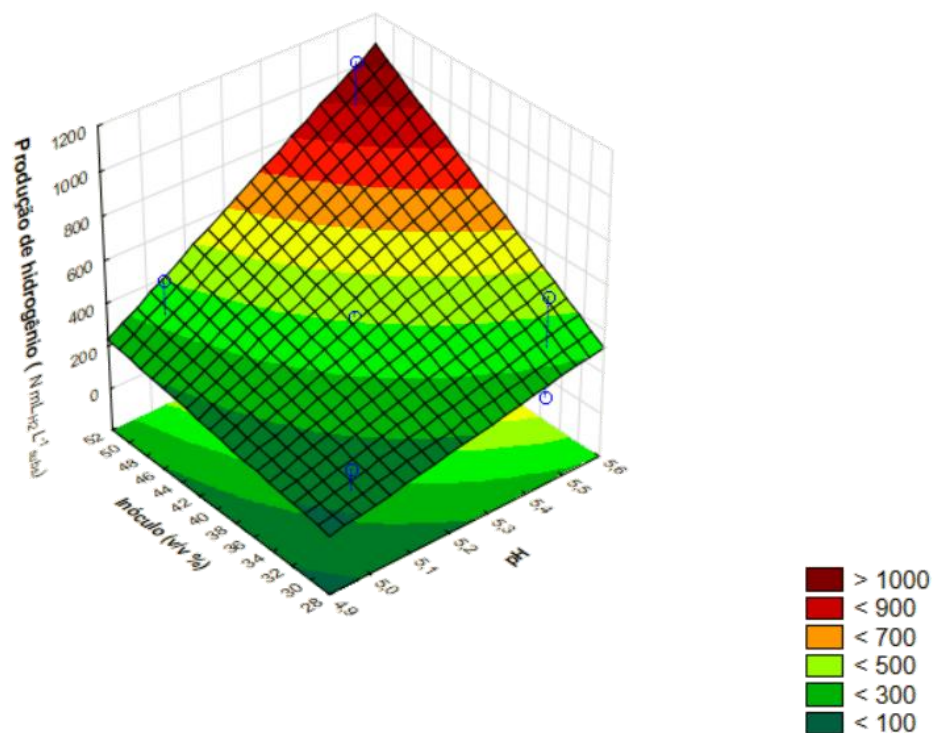
simultânea desses fatores reduz a resposta (produção de H_2) em algum nível do processo. Baseado na significância das variáveis e suas interações sobre a produção máxima de hidrogênio demonstradas através da ANOVA e do diagrama de Pareto, foram geradas superfícies de resposta e mapas de contornos para melhor compreensão e estudo dos efeitos das interações entre as variáveis e suas tendências no processo fermentativos em diferentes condições.

Na Figura 19 foi apresentada a superfície de resposta e mapa de contorno da interação entre pH e proporção de inóculo, sendo observado que o aumento do pH e proporção de inóculo levam ao aumento da produção de hidrogênio. Quando o pH foi 5,5 e a proporção de inóculo 50%, a produção atingiu o valor máximo ($> 1000 \text{ N mL}_{H_2} \text{ L}^{-1} \text{ substrato}$). Este comportamento pode ser explicado pelo maior crescimento e atividade biológica dos microrganismos fermentativos em pH 5,5 e em alta proporção de inóculo, o que aumenta a degradação e conversão da matéria orgânica do substrato em H_2 (Mishra *et al.*, 2019; Rashidi *et al.*, 2024).

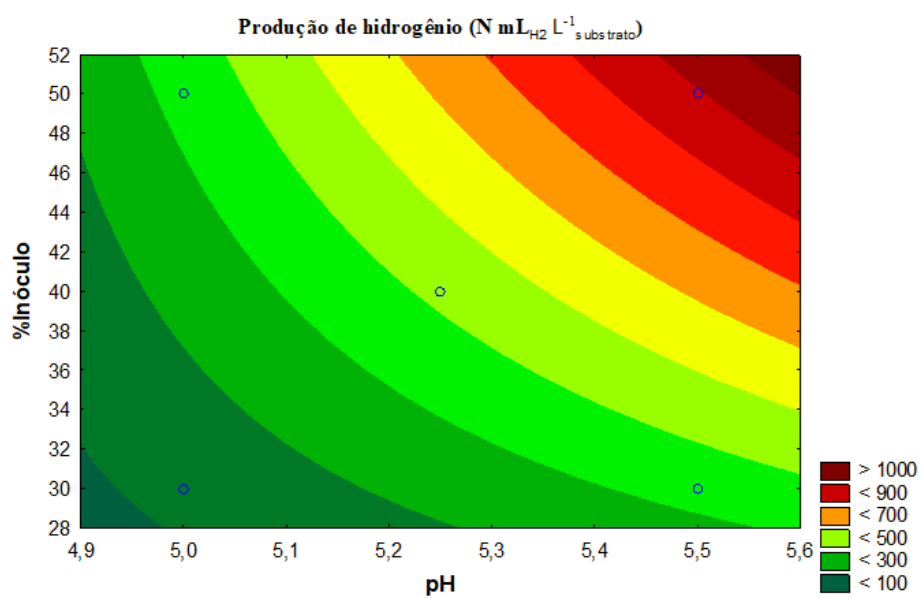
Em contrapartida, para pH 5,0 foi observada uma redução dessa produção, pois mesmo variações pequenas de pH provocaram efeitos sobre a microbiota do meio, afetando a fisiologia e reduzindo a atividade metabólica das bactérias, efeito esse atribuído a acidificação intensificada do meio e ao acúmulo de AGVs (Mishra *et al.*, 2019). A acidificação do meio foi constatada quando uma menor proporção de inóculo em qualquer pH foi estudado, em que um efeito negativo foi promovido, devido à alta proporção de substrato em relação ao inóculo, reduzindo a atividade microbiana, dificultando a transferência de massa no sistema, o que acarretou na elevação do tempo da fase lag e retardou a etapa de fermentação, afetando a produção de H_2 (Jing *et al.*, 2020; Rashidi *et al.*, 2024; Elerakey *et al.*, 2025).

Figura 19- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito da proporção de inóculo, pH e sua interação sobre a produção de hidrogênio.

(A)



(B)

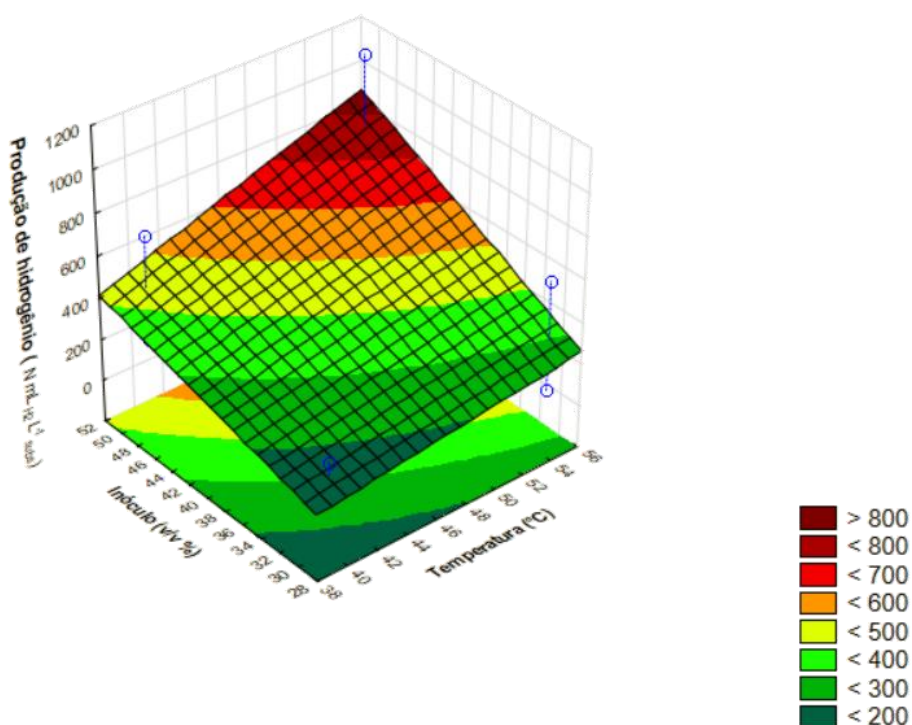


Fonte: Autora, 2026

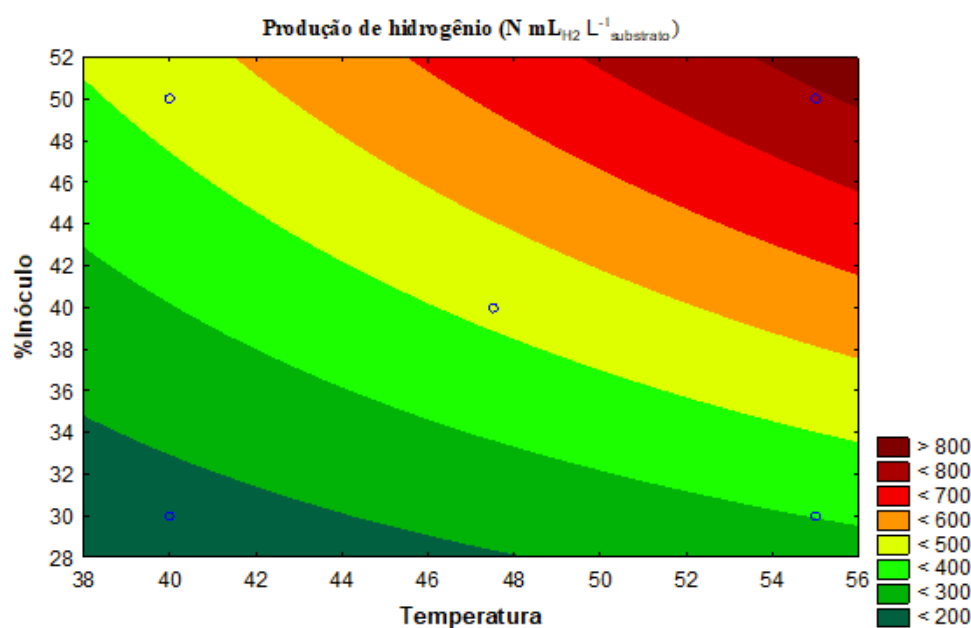
O efeito interativo entre a temperatura e a proporção de inóculo sobre a produção de H_2 foi apresentada na Figura 20, sendo percebido que o aumento da temperatura e da proporção de inóculo proporcionaram o aumento da produção de H_2 , e mesmo em proporções menores de inóculo, o aumento da temperatura leva ao aumento da produção. Isso pode ser justificado pois a temperatura exerce grande influência sobre o equilíbrio termodinâmico e reações bioquímicas do sistema, afetando a diversidade, cinética de crescimento microbiano e atividade metabólica da microbiota do meio sobre o substrato aumentando a produção (Rashidi *et al.*, 2024; Elerakey *et al.*, 2025). Quando a temperatura foi 55°C e a proporção de inóculo 50% a produção atingiu o valor máximo ($> 800 \text{ N mL}_{H_2} \text{ L}^{-1} \text{ substrato}$).

Figura 20- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito da temperatura, proporção de inóculo e sua interação sobre a produção de hidrogênio.

(A)



(B)

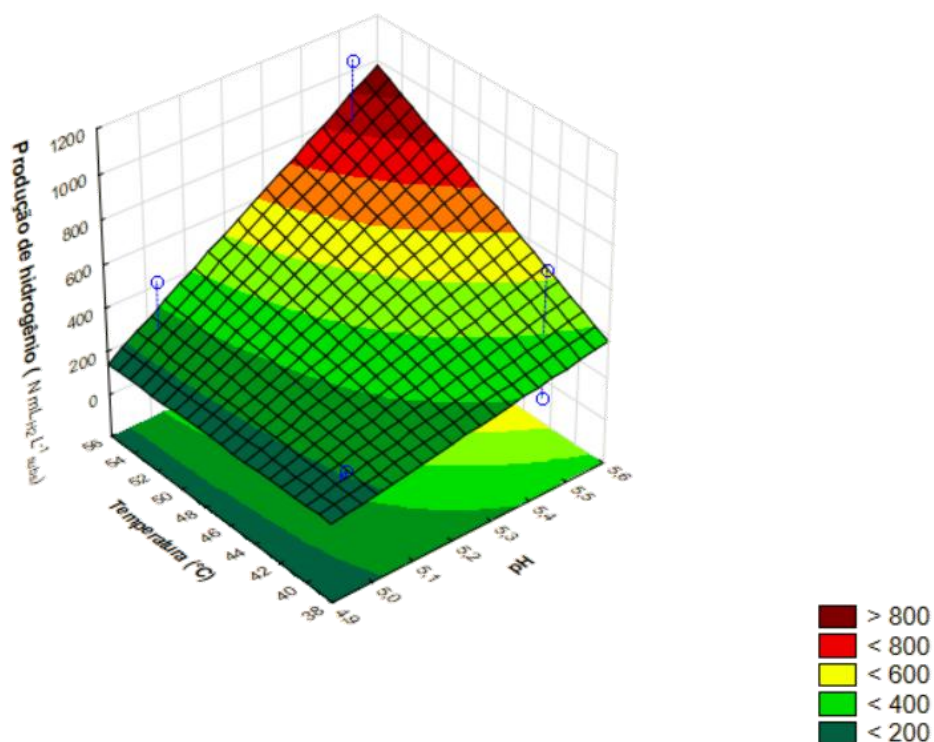


Fonte: Autora, 2026

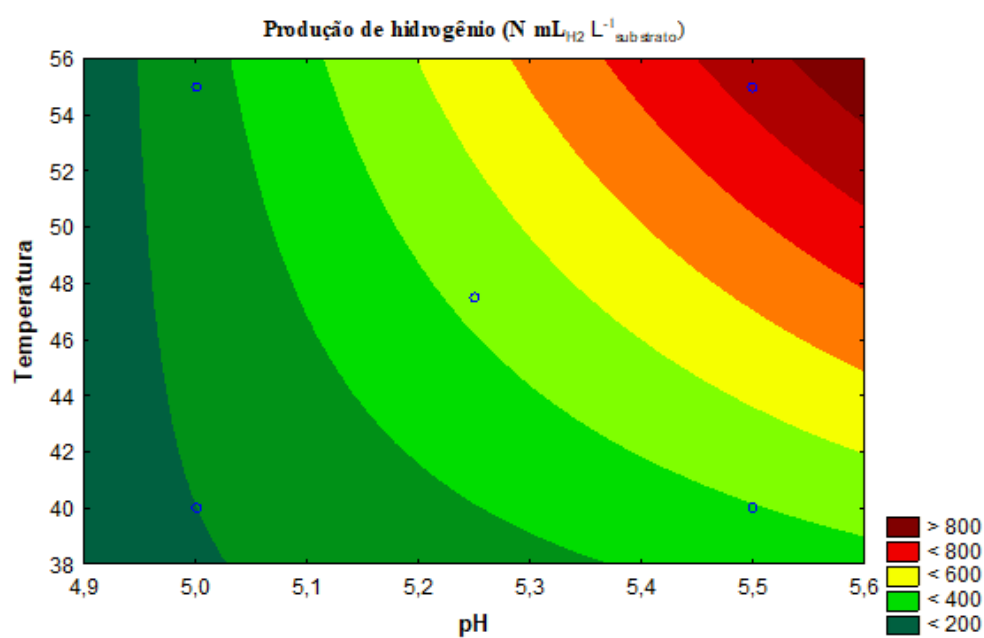
O efeito da interação entre o pH e a temperatura também foi avaliado como mostrado na Figura 21. Foi verificado que a digestão anaeróbica quando submetida a pH 5,0 ou 5,5 e temperatura de 40°C, não favoreceu a produção de H₂, enquanto que o aumento da temperatura para 55°C, em qualquer faixa de pH, aumentou a produção de H₂, conforme discutido previamente. Fato este, provavelmente, justificado devido à diminuição da atividade dos microrganismos acidogênicos (produtores de H₂) sobre condições mesofílicas (40°C) e menores pH (5,0), por influenciar na cinética de crescimento dos microrganismos, atividade metabólica e estabilidade das comunidades microbianas no sistema (Toledo-Cervantes *et al.*, 2020; Eng *et al.*, 2022; Elerakey *et al.*, 2025).

Figura 21- Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) do efeito do pH, temperatura e sua interação sobre a produção de hidrogênio.

(A)



(B)



Fonte: Autora, 2026

A temperatura afetou diretamente a volatilidade e solubilidade dos gases no sistema e, ao considerar a lei de Henry e relacionar com as observações da Figura 21, foi possível entender que a maior temperatura proporcionou a elevação na produção de hidrogênio por favorecer a sua volatilidade e aumentar sua concentração na fração gasosa do sistema durante o processo fermentativo (Toledo-Cervantes *et al.*, 2020; Rashidi *et al.*, 2024).

Assim nas condições mesófilas, por se processar em menor temperatura, se tem um menor teor do hidrogênio na fase gasosa e uma maior solubilidade deste na fase líquida, o que além de diminuir a concentração do hidrogênio no sistema, também aumenta a sua disponibilidade para ser consumido no processo reacional (Toledo-Cervantes *et al.*, 2020; Rashidi *et al.*, 2024). Dessa forma quando o pH foi 5,5 e a temperatura de 55 °C, foi atingido o valor máximo de produção ($>800 \text{ N mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ substrato}$).

O estudo de Toledo-Cervantes *et al.* (2020) corrobora para a elucidação do resultado obtido, em que os autores avaliaram o comportamento da produção de hidrogênio em condições mesofílicas (35-37 °C) e termofílicas (55°C) utilizando a vinhaça de tequila, e tiveram como resultado uma maximização da produção de H_2 sobre a temperatura termofílica, com um rendimento de $750 \text{ N mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ vinhaça}$, contra $647 \text{ N mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ vinhaça}$ sobre condições mesofílicas, ambos em um pH 5,5; sendo considerado o pH ótimo para o processo.

Volpi *et al.* (2024) chegaram a conclusões semelhantes em seu estudo de codigestão da vinhaça da cana-de-açúcar e torta de filtro, em que a produção máxima alcançada foi de $95 \text{ N mL H}_2 \text{ g VS}^{-1} \text{ removidos}$, trabalhando com um pH ótimo entre 5 e 5,5 e a uma temperatura de 55°C. Esses resultados demonstram concordância com as análises realizadas sobre os efeitos das interações das variáveis no rendimento de hidrogênio, e atestam que a partir das condições otimizadas a produção de H_2 superou alguns resultados já reportados na literatura para este resíduo.

Visto que, sobre as condições otimizadas de pH 5,5 e temperatura 55°C, utilizando uma proporção de 50% de inóculo foi alcançada uma produção máxima de H_2 de $1104,4 \text{ N mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ substrato}$. Este valor foi maior do que o alcançado nos estudos mencionados anteriormente, já que ao converter o resultado obtido em termos dos sólidos voláteis removidos no processo, essa produção também é consideravelmente maior que a

produção alcançado no estudo de Volpi *et al.* (2024), tendo uma produção de 1487,9 N mL H₂ g VS⁻¹_{removidos}.

O valor de produção máxima de hidrogênio previsto pelo modelo foi de 1098,7 ($\pm$ 58,5) N mL_{H2} L⁻¹_{substrato}, sobre condições ótimas de pH 5,5; temperatura de 55°C e proporção volumétrica de inóculo de 50%. Para validar essas condições experimentais ótimas, foi realizado um ensaio de validação, em que foi obtida uma produção máxima diária de 1158,6 N mL_{H2} L⁻¹_{substrato}, estando dentro do intervalo previsto pelo modelo. Demonstrando assim, que as condições ótimas estimadas pelo modelo podem ser aplicadas de forma eficiente para a produção fermentativa de hidrogênio.

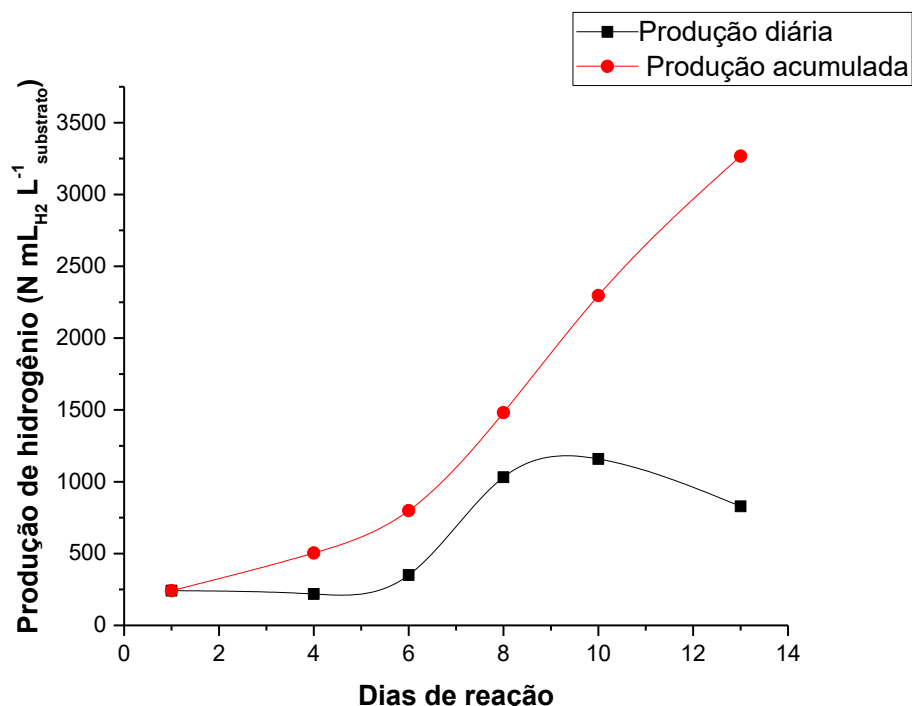
Além da produção máxima diária, durante o ensaio de validação foi analisada também a produção acumulada de hidrogênio, com intuito de entender o volume total de H₂ produzido durante o período fermentativo, bem como desempenho global do sistema de produção. Logo, durante o processamento do ensaio de validação foi obtida uma produção acumulada total de 3267,6 N mL_{H2} L⁻¹_{substrato}. Abaixo na Tabela 23 é apresentado os resultados obtidos durante o ensaio de validação, bem como a Figura 22 apresenta um gráfico ilustrativo das produções diárias e acumuladas de H₂.

Tabela 23- Resultados obtidos para a produção diária e acumulada de hidrogênio durante as amostragens do ensaio de validação.

	Produção de hidrogênio (N mL _{H2} L ⁻¹ _{substrato})					
	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 13
Produção diária	242,2	219,0	350,4	1031,8	1158,6	828,4
Produção acumulada	242,2	503,6	798,7	1481,0	2296,4	3267,6

Fonte: Autora, 2026

Figura 22- Gráfico ilustrativo da produção diária e acumulada de hidrogênio durante as amostragens realizadas no ensaio de validação.



Fonte: Autora, 2026

Assim, por meio dos resultados apresentados, foi possível observar que o ensaio apresentou um aumento considerável na produção ao longo das amostragens, sobretudo do 8º ao 10º dia de reação. Permitindo assim, visualizar novamente a dinâmica específica que cada processo fermentativo apresenta, no que se refere a fase de adaptação dos microrganismos (fase lag) e aumento da produção de hidrogênio (fase log), ocorrendo de maneira diferente em cada sistema, mesmo em condições iguais de processamento. A partir da curva de produção específica é visível a redução do H₂ a partir do 13º dia, o que representa a redução da atividade microbiana e início do consumo de hidrogênio no sistema (Kunz; Steimetz; Amaral, 2022; Hajizadeh *et al.*, 2022).

Além disso, é possível analisar também a produção acumulada, que evidencia que mesmo após o sistema atingir a produção máxima específica, a produção de hidrogênio ainda se mantém e é significativa, o que aumenta o total de hidrogênio acumulado ao final do processo. Dessa maneira, foi constatado que o sistema fermentativo apresentou concordância entre os valores previstos pelo modelo e os resultados obtidos experimentalmente, também foi comprovada a capacidade de reprodutibilidade da

produção sobre condições otimizadas por meio do planejamento experimental. Validando assim o potencial energético do processo fermentativo como rota biotecnológica complementar para a produção limpa e ecológica de hidrogênio.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a vinhaça da cana-de-açúcar apresentou características favoráveis para produção biológica de hidrogênio, já que dispõe de alto teor de matéria orgânica biodegradável, além de proporcionar os nutrientes necessários para o crescimento e atividades metabólicas dos microrganismos. O pré-tratamento ácido auxiliado por ultrassom da vinhaça mostrou-se eficiente para promover a hidrólise da estrutura complexa do substrato, aumentando a disponibilidade de açúcares nas condições ótimas do pré-tratamento: pH- 5,0; tempo de sonicação- 30 minutos e temperatura de 80°C.

Para o pré-tratamento ácido/térmico do lodo de esgoto foi observada uma importante influência no aumento da produção de hidrogênio, pois contribui na seletividade de microrganismos acidogênicos e na inativação das bactérias arqueas metanogênicas, produtoras de metano. Desta forma, a partir dos ensaios preliminares, foi constatado que o uso dos pré-tratamentos do substrato e inóculo proporcionaram um aumento na produção de hidrogênio no sistema, potencializando a produção de hidrogênio nas diferentes condições experimentais.

O método cromatográfico desenvolvido para o GC-TCD/FID possibilitou identificar e quantificar os gases formados no processo de fermentativo com confiabilidade e precisão, sendo atestado no processo de validação a alta seletividade por meio da resolução de 100% entre os picos. A partir da construção das curvas de calibração analítica para o H₂, CO₂ e CH₄ foi estabelecida a linearidade do método, obtendo um coeficiente de correlação e coeficiente de determinação acima de 0,99 para todas as curvas construídas. O método apresentou sensibilidade analítica, com valores de limite de detecção e quantificação baixos, bem como também apresentou alta precisão e repetibilidade, com coeficiente de variação $\leq 5\%$.

O planejamento experimental mostrou que todas as variáveis estudadas (pH, temperatura e proporção de inóculo) apresentaram efeito significativo sobre a produção de hidrogênio, assim como a interação entre as variáveis ($p < 0,05$). As condições ótimas determinadas pelo estudo para o processo de fermentação anaeróbia foram pH 5,5, temperatura 55°C e proporção de inóculo de 50%, proporcionando uma produção máxima específica de 1104,4 N mL H₂ L⁻¹_{substrato}. A partir do ensaio de validação sobre as condições otimizadas, foi obtida uma produção máxima específica de 1158,6 N mL_{H2} L⁻¹

¹_{substrato}, estando esse valor em concordância com o valor predito pelo modelo que foi de 1098,7 ($\pm 58,5$) N mL_{H2} L⁻¹_{substrato}.

Por meio do ensaio de validação, também foi atestado o desempenho global do sistema fermentativo, em que se obteve uma produção acumulada de hidrogênio de 3267,6 N mL_{H2} L⁻¹_{substrato}, ao longo do processamento da reação. Demonstrando que a aplicação da fermentação anaeróbia sob condições controladas representa uma alternativa viável e sustentável para a geração de bioenergia. Revelando o grande potencial do processo como rota alternativa e complementar às rotas convencionais para a produção de hidrogênio de baixo carbono, por possibilitar a conversão de um resíduo orgânico altamente poluidor, como a vinhaça da cana-de-açúcar, em biocombustível.

Aumentando significativamente o portfólio de rotas tecnológicas de produção de energia limpa e sustentável, bem como a oferta de hidrogênio de baixo carbono, o que fecha o ciclo de aproveitamento de resíduos e promove a valorização completa da vinhaça. Integrando esse processo ao conceito de economia circular, com um viés sustentável e multifuncional. Alinhando-se aos objetivos do desenvolvimento sustentável na busca de produção de energia limpa e acessível, assim como na construção de ações eficientes para mitigar as mudanças climáticas.

Portanto, o estudo experimental das variáveis apontou a otimização do sistema por meio das condições ótimas determinadas e dos pré-tratamentos do inóculo e substrato, que foram essenciais para maximizar a produção de hidrogênio. Contudo, a análise dos efeitos das variáveis também evidenciou a melhoria na produção com o aumento dos níveis das variáveis otimizadas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Assim sendo, em complementação a presente pesquisa tem-se como perspectivas futuras:

- ✓ Ampliar o planejamento experimental dos ensaios, extrapolando as condições trabalhadas até o momento para o pH, proporção volumétrica do inóculo/substrato e temperatura;
- ✓ Realizar a caracterização microbiológica do inóculo, buscando compreender a dinâmica e a diversidade das comunidades microbianas envolvidas na fermentação, bem como sua relação com as condições fermentativas e produção de hidrogênio;
- ✓ Investigar a influência de outros parâmetros operacionais, como tempo de retenção hidráulica, carga orgânica aplicada, agitação do sistema e a codigestão com outros resíduos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N°. 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre A Validação de Métodos Analíticos e dá outras Providências; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, N°. 141, jul. 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acessado em: 30 de julho de 2025.
- AJANOVIC, A; SAYER, M; HAAS, R. The economics and the environmental benignity of different colors of hydrogen. **International Journal of Energy**, v. 47, n. 57, p. 24136- 24154, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.094>.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, Ed. 22, Distrito de Columbia, Washington, 2012.
- ARAUJO, M. N; VARGAS, S. R; SOARES, L. A; TRINDADE, L. F; FUESS, L. T, ADORNO, M. A. T. Rapid method for determination of biogas composition by gas chromatography coupled to a thermal conductivity detector (GC-TCD). **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 104, n. 20, p. 8690-8707, may. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/03067319.2023.2210055>.
- ATELGE, M.R; ATABAN, A.E, RAJESH, B; DAVID, K; KAYA, M; ESKICIOGLU, C; KUMAR, G; LEE, C; YILDIZ, Y.S; UNALAN, S; MOHANASUNDARAM, RR; DUMAN, F. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>.
- BANU, J. R; MERRYLIN, J; MOHAMED USMAN, T. M; YUKESH KANNAH, R; GUNASEKARAN, M; KIM, S-H; KUMAR, G. Impact of pretreatment on food waste for biohydrogen production: A review. **International Journal of Hidrogeny Energy**, v. 49, p. 18211-18225, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.176>.
- BASHIR, M. F; PAN, Y; SHAHBAZ, M; GHOSH, S. How energy transition and environmental innovation ensure environmental sustainability? Contextual evidence from Top-10 manufacturing countries. **Renewable Energy**, v. 204, p. 697-709, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.01.049>.
- BETTANI, S. R; RAGAZZO, G. O; SANTOS, N. L; KIECKBUSCH, T. G; BASTOS, R. G; SOARES, M. R; SILVA, M. A. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carboydrate Polymers**, v. 203, p. 322-330, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.041>.
- BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **Hidrogênio de baixo carbono: oportunidades para o protagonismo brasileiro na produção de energia limpa**, 2022. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/22665/1/PRLiv_Hidrog%C3%AAnio%20de%20baixo%20carbono_215712.pdf. Acesso em: 13 de março de 2025.
- BONBARENKO, V. L; ILYINSKAYA, D. N; KAZAKOVA, A. A; KOZLOVTSEV, P. S. Hydrogen, its unique properties and applications in industry. **Chemical and Petroleum Engineering**, v. 57, n. 3, p. 1015- 1019, mar. 2022. DOI: 10.1007/s10556-022-01039-7.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 53, p. 58-63, 18 mar. 2005.

Disponível em:

https://conama.mma.gov.br/?id=450&option=com_sisconama&task=arquivo.download.

Acesso em: 16 de janeiro de 2026.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. **Plano Nacional de Saneamento Básico (PLANSAB)**. Secretaria Nacional de Saneamento. Brasília-DF, 2019.

Disponível em: <https://saneamentoinclusivo.org.br/wp-content/uploads/2023/09/plano-nacional-de-saneamento-basico-plansab-ministerio-das-cidades-secretaria-nacional-de-saneamento-ambiental-plano-nacional-de-saneamento-basico.pdf>. Acesso em: 16 de janeiro de 2026.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4º ed, São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma Técnica P4.**

231/2015. Vinhaça- Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3ª ed, 2ª versão, p. 1-15, CETESB, 2015. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/P4.231_Vinhaca_-Critérios-e-procedimentos-para-aplicacao-no-solo-agricola-3a-Ed-2a-VERSAO.pdf. Acesso em: 29 de outubro de 2024.

CEZARINI, E. C. A; PETERLI, Z; SANTIAGO, Y. C; VENTURINI, O. J. Sewage Sludge Energy Potential Assessment: Characterization Approach. **Chemical Engineering Transactions**, v. 109, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET24109042>.

CREMONEZ, P. A; TELEKEN, J. G; MEIER, T. R. W; ALVES, H. J. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, p. 111854, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111854>.

CONCEIÇÃO, M. C; MENDONÇA, L. C; ALBUQUERQUE, T. M. A. Análise de desempenho de soluções descentralizadas de esgoto de condomínios residenciais multifamiliares em Aracaju. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 19, n. 2, 2023. ISSN: 1980-0827.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: Safra 2023/24 3º levantamento**. Brasília, DF, v. 11, n. 3, p. 56, nov. 2023. ISSN: 2318-7921.

DERMUHL, S; RIEDEL, U. A comparison of the most promising low-carbon hydrogen production Technologies. **Fuel**, v. 340, p. 127478, feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127478>.

ELAVARASAN, R. M; NADARAJAH, M; PUGAZHENDHI, R; SINHA, A; GANGATHARAN, S; CHIARAMONTI, D; HOURAN, M. A. The untold subtlety of energy consumption and its influence on policy drive towards Sustainable Development Goal 7. **Applied Energy**, v. 334, p. 120698, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.120698>.

ELERAKEY, N; RASMEY, A-H. M; MOHAMMED, Y; ABOSEIDAH, A. A; HAWARY, H. Maximizing biohydrogen production from watermelon peels using *Clostridium butyricum* NE133: a statistical optimization approach with Plackett–Burman and Box–Behnken designs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 18, n. 54, p. 1-17, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02652-3>.

ENG, F; FUESS, L. T; BOVIO-WINKLER, P; ETCHEBEHERE, C; SAKAMOTO, I. K; ZAIAT, M. Optimization of volatile fatty acid production by sugarcane vinasse dark fermentation using a response surface methodology. Links between performance and microbial community composition. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v.53, p.102764, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102764>.

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. **Hidrogênio cinza: Produção a partir da reforma a vapor do gás natural**. Brasil, 2022. NOTA TÉCNICA EPE/DPG/SPG/01/2022. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados->

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis: Ano 2023**. Brasil, 2024. NOTA TÉCNICA EPE/DPG/SDB/2024/03. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-834/NT-EPE-DPG-SDB-2024-03_ACBios_Ano2023.pdf. Acesso em: 16 de abril de 2025.

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional (BEN) 2024-Relatório síntese: Ano base 2023**. 2024. Disponível em: <https://www.epe.gov.br>. Acesso em: 29 de setembro de 2024.

FGV Energia. **Hidrogênio de baixo carbono: a importância dos avanços em questões estruturantes**. N° 20, nov, 2023. ISSN 2358-5277.

FGV Energia. **Geopolítica da energia de baixo carbono e seus impactos para a transição energética no Brasil**. N° 23, p. 154, agos. 2024. ISSN 2358-5277.

FUESS, L. T; ZAIAT, M; NASCIMENTO, C. A. O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, p. 121379, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>.

FUESS, L. T. Fermentative biohydrogen production in sugarcane biorefineries: Advances, challenges and prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 49, p. 532-553, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.10.092>.

GARLET, T. B; SAVIAN, F. S; RIBEIRO, J. L. D; SILUK, J. C. M. Unlocking Brazil's green hydrogen potential: Overcoming barriers and formulating strategies to this promising sector. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 49, p. 533-570, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.09.227>.

GODOI, L. A. G; CAMILOTI, P. R; BERNARDES, A. N; SANCHEZ, B. L. S; TORRES, A. P. R; GOMES, A. C; BOTTA, L. S. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 29267–29282, aug. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>.

GOLDEMBERG, J. Trinta anos da Conversão do Clima. **Estudos avançados**, v. 37, n.107, p. 277-287, 2023. DOI: 10.1590/s0103-4014.2023.37107.016.

GOREN, A. Y; DINCER, I; KHALVATI, A. Green biohydrogen production from renewable plant-based resources: A comparative evaluation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 185, p. 947-977, mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.03.056>.

HAI, T; MISHRA, P; ZAIN, J. M; SAINI, K; KUMAR, N. M; WAHID, Z. A. Co-digestion of domestic kitchen food waste and palm oil mill effluent for biohydrogen production. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 55, p. 102965, feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102965>.

HAJIZADEH, A; MOHAMADI-BAGHMOLAEI, M; SAADY, N. M. C; ZENDEHBOUDI, S. Hydrogen production from biomass through integration of anaerobic digestion and biogas dry reforming. **Applied Energy**, v. 309, p. 118442, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2021.118442>.

HITIT, Z. Y; HALLENBECK, P. C. Analytical procedures, data reporting and selected reference values for biological hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 147, p.106014, feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106014>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Pesquisa em Geografia e Estatística. **Produção de cana-de-açúcar**. 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cana-de-acucar/br>. Acessado em: 28 de outubro de 2025.

IEA. International Energy Agency. **Global Hydrogen Review 2023**. 2023, p. 174. Disponível em: <https://www.iea.org/corrections>. Acessado em: 25 de agosto de 2025.

INCER-VALVERDE, J; KORAYEM, A; TSATSARONIS, G; MOROSUK, T. “Colors” of hydrogen: Definitions and carbon intensity. **Energy Conversion and Management**, v. 291, p.117294, sep. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.117294>.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008; 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQCGCRE-8_05.pdf. Acessado em: 30 de julho de 2025.

IVANENKO, A. A; LAIKOVA, A. A; ZHURAVLEVAA, E. A; SHEKHURDINA, S. V; VISHNYAKOVA, A. V; KOVALEV, A. A; KOVALEV, D. A; TRCHOUNIAN, K. A; LITTI, Y. V. Biological production of hydrogen: From basic principles to the latest advances in process improvement. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 55, p. 740-755, feb. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.11.179>.

JING, Y; LI, F; LI, Y; JIN, P; ZHU, S; HE, C; ZHAO, J; ZHANG, Z; ZHANG, Q. Statistical optimization of simultaneous saccharification fermentative hydrogen production from corn stover. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p.428-438, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1739405>.

KAINTHOLA, J; KALAMDHAD, A. S; GOUD, V. V. A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. **Process Biochemistry**, v. 74, p. 81-90, sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.023>.

KHAN, I; HOU, F; IRFAN, M; ZAKARI, A; LE, H. P. Does energy trilemma a driver of economic growth? The roles of energy use, population growth, and financial development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 146, p. 111157, aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111157>.

KHAN, I. ZAKARI, A; ZHANG, J; DAGAR, V; SINGH, S. A study of trilemma energy balance, clean energy transitions, and economic expansion in the midst of

environmental sustainability: New insights from three trilemma leadership. **Energy**, v. 248, 123619, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2022.123619>.

KUMAR, A; SAMADDER, A. R. Performance evaluation of anaerobic digestion technology for energy recovery from organic fraction of municipal solid waste: A review. **Energy**, v. 197, p. 117253, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117253>.

KUNZ, A; STEINMETZ, R. L. R; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 2a ed. Concórdia-Santa Catarina, SC, Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2022. 211 p.

LAZARO, L. L. B; SOARES, R. S. The energy quadrilemma challenges - Insights from the decentralized energy transition in Brazil. **Energy Research & Social Science**, v. 113, p. 103533, mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.erss.2024.103533>.

LISBOA, A. D. S; SILVA, L. A; GINORIS, Y. P; SOUZA, M. A. A. Combined compact anaerobic reactors and lamella settlers for decentralized sewage treatment. **Water Practice & Technology**, v. 17, n. 1, p. 191- 203, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2166/wpt.2021.097>.

LIU, Z; FOONG, S.Y; ZHANG, Y; LI, Y; HU, B; LIEW, R.K; LAM, S. S; AI, F; LIU, Z; ZHU, F; WANG, W; ZHOU, X; TAO, J; ZHANG, Z. Proactive detection, prediction, and control of instabilities in anaerobic digestion systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 224, p. 116101, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.116101>.

LOSEKANN, L; TAVARES, A. **Transição energética e potencial de cooperação nos BRICS em energias renováveis e gás natural**. Brasília: Ipea, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.38116/td2680>.

MAGRINI, F. E; ALMEIDA, G. M; SOARES, D. M; FUENTES, L; ECTHEBEHERE, C; BEAL, L. L; SILVEIRA, M. M; PAESI, S. Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 2443-2456, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00687-0>.

MAHAPATRA, S; KUMAR, D; SINGH, B; SACHAN, P. K. Biofuels and their sources of production: A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. **Energy Nexus**, v. 4, p. 100036, dec. 2021: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100036>.

MAHMOODI-ESHKAFTAKI, M; MOCKAITIS, G. Structural optimization of biohydrogen production: Impact of pretreatments on volatile fatty acids and biogas parameters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, p. 7072- 7081, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.12.088>.

MALET, N; PELLERIN, S; GIRAULT, R; NESME, T. Does anaerobic digestion really help to reduce greenhouse gas emissions? A nuanced case study based on 30 Mcogeneration plants in France. **Journal of Cleaner Production**, v. 384, p. 135578, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135578>.

MALODE, S. J; PRABHU, K. K; MASCARENHAS, R. J; SHETTI, N. P; AMINABHAVI, T. M. Recent advances and viability in biofuel production. **Energy**

Conversion and Management: X, v. 10, p. 100070, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2020.100070>.

MARAFON, A.C; SALOMON, K. R; AMORIM, E. L. C; PEITER, F. S. Use of sugarcane vinasse to biogas, bioenergy, and biofertilizer production. **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**, p. 179–194, aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00010-X>.

MAROLDI, W.V; FERNANDES, I. A. A; DEMEZUC JUNIOR, B; PEDRO, A. P; MACIEL, G. M; HÁMINIUK, C. W. I. Waste from the food industry: Innovations in biorefineries for sustainable use of resources and generation of value. **Bioresource Technology**, v. 413, p. 131447, sep. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131447>.

MARTINEZ-BURGOS, W. J; NASCIMENTO JUNIOR, J. R; MEDEIROS, A. B. P; HERRMANN, L. W; SYDNEY, E. B; SOCCOL, C. R. Biohydrogen Production from Agro-industrial Wastes Using *Clostridium beijerinckii* and Isolated Bacteria as Inoculum. **BioEnergy Research**, v. 15, p. 987-997, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10358-1>.

MATEUS, S; CARVALHEIRA, M; CASSIDY, J; FREITAS, E; OEHMEN, A; REIS, M. A. M. Two-stage anaerobic digestion system treating different seasonal fruit pulp wastes: Impact on biogas and hydrogen production and total energy recovery potential. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105694, oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105694>.

MIKUCKA, W; ZIELINSKA, M. Distillery Stillage: Characteristics, Treatment, and Valorization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 770–793, may. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03343-5>.

MISHRA, P; AMEEN, F; ZAID, R. M; SINGH, L; WAHID, Z. A; ISLAM, M. A; GUPTA, A; NADHARI, S. A. Relative effectiveness of substrate-inoculum ratio and initial pH on hydrogen production from palm oil mill effluent: Kinetics and statistical optimization. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 276-283, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.317>.M

MOHANAKRISHNA; G; PENGADETH, D. Mixed culture biotechnology and its versatility in dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 394, p. 130286, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130286>.

MOUSTAKAS, K; PARMAXIDOU, P; VAKALIS, S. Anaerobic digestion for energy production from agricultural biomass waste in Greece: Capacity assessment for the region of Thessaly. **Energy**, v. 191, p. 116556, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116556>.

NADALETI, W. C; LOURENÇO, V. A. A mathematical, economic and energetic appraisal of biomethane and biohydrogen production from Brazilian ethanol plants' waste: Towards a circular and renewable energy development. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, p. 27268-27281, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.05.214>.

NAIR, L. G; AGRAWAL, K; VERMA. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. **Energy Nexus**, v. 6, p. 1000086, may. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100086>.

NAM, J. Y. Optimum Conditions for Enhanced Biohydrogen Production from a Mixture of Food Waste and Sewage Sludge with Alkali Pretreatment. **Energies**, v. 13, n. 7, p. 1-13, apr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/en16073281>.

NAVA-VALENTE, N; HERMÁNDEZ-AGULLAR; ALVARADO-LASSMAN; MÉNDEZ-CONTRERAS, J. M. Effect of Acid Pretreatment on the Anaerobic Codigestion of Sewage Sludge, Chicken Litter, and Sugarcane Waste (SCW) for Biogas Production. **BioEnergy Research**, v. 16, p. 1889-1901. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10533-y>.

NEOFYTOU, H; NIKAS, A; DOUKAS, H. Sustainable energy transition readiness: A multicriteria assessment index. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, p. 109988, june. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109988>.

NETO, B. B; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2º edição, Campinas, São Paulo: Unicamp, 2001.

NOGUEIRA, L. A. H; CAPAZ, R. S; LORA, E. S. Bioenergia no Brasil: onde estamos e quais nossos horizontes. **Revista Brasileira de Energia**, v. 27, n.3, agos. 2021. DOI: 10.47168/rbe.v27i3.640.

NUALSRI, C; ABDUL, P. M; IMAI, T; REUNGSANG, A; SITTIJUNDA, S. Two-Stage and One-Stage Anaerobic Co-digestion of Vinasse and Spent Brewer Yeast Cells for Biohydrogen and Methane Production. **Molecular Biotechnology**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-023-01015-3>.

ONU. **Indicadores Brasileiros para os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável**. Brasília, DF, 2015.

PANIGRAHI, S; DUBEY, B. K. A critical review on operating parameters and strategies to improve the biogas yield from anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable Energy**, v. 143, p. 779-797, dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.040>.

PARK, M-J; KIM, J-H; LEE, Y-H; KIM, H-M; JEONG, D-W. System optimization for effective hydrogen production via anaerobic digestion and bioga steam reforming. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 30188 – 30200, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.027>.

PEREIRA, R; PEREIRA NETO, A. M; TIBURCIO, R. S. Vinhaça de Cana-de-açúcar: Análise do seu Uso como Combustível Alternativo. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 1, p. 82-86, jul. 2021. Doi: <https://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20210103>.

PIFFER, M. A; OLIVEIRA, C. A; BOVIO-WINKLER, P; ENG, F; ETCHEBEHERE, C; ZAIAT, M; NASCIMENTO, C. A. O; FUESS, L. T. Sulfate- and pH-driven metabolic flexibility in sugarcane vinasse dark fermentation stimulates biohydrogen evolution, sulfidogenesis or homoacetogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, p. 31202-31222, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.039>.

RAM, C; RANI, P; KUMAR, A. Recent developments in biohydrogen production from wastewater: A review. **Biocatalysis and Biotransformation**, n. 42, n. 1, p. 1-18, 2024. DOI: 10.1080/10242422.2023.2181046.

RAMOS, L. R; SILVA, E. L. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 5239-5251, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.025>.

RASHIDI, M; ALAVI, N; AMERREH, F; RAFIEE, M; AMANIDAZ, N; PARTOVI, K; MOSANEFI, S; BAKHSHOODEH, R. Biohydrogen production from co-digestion of sugarcane vinasse and bagasse using anaerobic dark fermentation. **Bioresource Technology Reports**, v. 25, p. 101793, feb. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101793>.

RAZZAQ, A; SHARIF, A; OZTURK, I; AFSHAN, S. Dynamic and threshold effects of energy transition and environmental governance on green growth in COP26 framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 179, p. 113296, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113296>.

REGO, G. C; FERREIRA, T. B; RAMOS, L. R; MENEZES, C. A; SOARES, L. A; SOKAMOTO, I. K; VARESCHE, M. B. A; SILVA, E. L. Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. **Biomass Conversion and Biorrefinery**, v. 12, p. 5527-5541, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00984-8>.

RIBEIRO, J. C; MOTA, V. T; OLIVEIRA, V. M; DACANAL, G. C; ZAIAT, M. Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of sugarcane vinasse without buffers in mesophilic and thermophilic conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, p. 1585-1596, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.7003>.

RIBEIRO, G. R; STEINMETZ, R. L. R; WISBECK, E. Biogas production from solid residues generated in bioethanol production using banana biomass. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 29, n. 3, p. e282355, 2025. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v29n3e282355>.

ROGERI, R. C; FUESS, L. T; ENG, F; BORGES, A. V; ARAUJO, M. N; DAMIANOVIC, M. H. R. Z; SILVA, A. J. Strategies to control pH in the dark fermentation of sugarcane vinasse: Impacts on sulfate reduction, biohydrogen production and metabolite distribution. **Journal of Environmental Management**, v. 325, p. 116495, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116495>.

SANTOS FILHO, D. A; OLIVEIRA, L. R. G; SCHIRMER, W. N; SOBRINHO, M. A. M; JUCÁ, J. F. T; VASCONCELOS, T. L. Avaliação da produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos e glicerina residual. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 3, n. 2, p. 260-266, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5380/biofix.v3i2.59938>.

SARAVANAN, A; KUMAR, P. S; ARON, N. S. M; JEEVANANTHAM, A; KARISHMA, S; YAASHIKAA, P. R; CHEW, K. W; SHOW, P. L. A review on bioconversion processes for hydrogen production from agro-industrial residues. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, p. 37302-37320, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.055>.

SHEEKH, M. E; ELSHOBARY, M; ABDHLLAH, E; ABDEL-BASSET, R; METWALLY, METWALLY. Application of a novel biological-nanoparticle pretreatment to *Oscillatoria acuminata* biomass and coculture dark fermentation for

improving hydrogen production. **Microbial Cell Factories**, v.22, n. 34, p. 1-18, feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02036-y>.

SHUKLA, A; KUMAR, D; GIRDHAR, M; KUMAR, A; GOYAL, A; MALIK, T; MOHAN, A. Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: distinct and integrated approaches. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 13, n. 44, p. 1-33, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02295-2>.

SICA, P; CARVALHO, R; DAS, K. C; BAPTISTA, A. S. Biogas and biofertilizer from vinasse: making sugarcane ethanol even more sustainable. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 22, p. 1427-1433, apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01029-y>.

SIKIRU, S; ABOIOYE, K. J; ADEDAYO, H. B; ADEBUKOLA, S. Y; SOLEIMANI, H; ANAR, M. Technology projection in biofuel production using agricultural waste materials as a source of energy sustainability: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 200, p. 114535, aug. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114535>.

SILLERO, L; PEREZ, M; SOLERA, R. Optimisation of anaerobic co-digestion in two-stage systems for hydrogen, methane and biofertiliser production. **Fuel**, v. 365, p. 131186, feb. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131186>.

SILVA, S. P; COSTA, A. S. V; SANTOS, S. L. B; LAIA, M. L. A importância da biomassa na matriz energética brasileira. **Revista Pensar Acadêmico**, v. 19, n. 2, p. 557-583, set. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.21576/pa.2021v19i2.2306>.

SILVA, V. M; PESSOA FILHO, J. S; SOUSA, R. M. F; CARVALHO, S. R; BORGES, V. L; FERREIRA, C. R. N; STARLING, M. C. V. M; TROVÓ, A. G. A Gas Chromatography Method for Simultaneous Quantification of Inorganic Gases and Light Hydrocarbons Generated in Thermochemical Processes. **Journal of the Brazilian Chemical society**, v. 00, n. 00, p. 1-8, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210015>.

SILVERIO, M. S; CALEGARI, R. P; LEITE, G. M. F. L; PRADO, L. M. L. M; MARTINS, B. C; SILVA, E. A; PIOTROVSKI NETO, J; GOMIG, A; BAPTISTA, A. S. Vinasse from the Brazilian lignocellulosic ethanol process: chemical composition and potential for bioprocesses. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering (BIOENG)**, v. 15, n. 1, p. 42-68, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2021v15n1p42-68>.

SNIS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico Temático: Serviços de Água e Esgoto- Visão geral**. Brasília, 2021, 91p. Disponível em: https://www.gov.br/cidades/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/saneamento/snis/produtos-do-snis/diagnosticos/DIAGNOSTICO_TEMATICO_VISAO_GERAL_AE_SNIS_2021.pdf. Acesso em: 16 de janeiro de 2026.

STABILE, M. C. C; GUIMARÃES, A. L; SILVA, D. S; RIBEIRO, V; MACEDO, M. N; COE, M. T; PINTO, E; MOUTINHO, P; ALENCAR, A. Solving Brazil's land use puzzle: Increasing production and slowing Amazon deforestation. **Land Use Policy**, v. 91, p. 104362, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.104362>.

TLEUBERGENOVA, A; HAN, B. C; MENG, X. Z. Assessment of biomass-based green hydrogen production potential in Kazakhstan. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 49, p. 349-355, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.08.197>.

TOLEDO-CERVANTES, A; VILLAFÁN-CARRANZA, F; ARREOLA-VARGAS, J; RAZO-FLORES, E; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O. Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, V. 45, p. 11000-11010, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.051>.

TZEREMES, P; DOGAN, E; ALAVIJEH, N. K. Analyzing the nexus between energy transition, environment and ICT: A step towards COP26 targets. **Journal of Environmental Management**, v. 326, p 116598, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116598>.

VATALIS, K. I; AVLOGIARIS, G; TSALIS, T. A. Just transition pathways of energy decarbonization under the global environmental changes. **Journal of Environmental Management**, v. 309, p. 114713, fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114713>.

VOLPI, M. P. C; ADARME, O. F. H; ARAÚJO, M. F; BELLA, T. R; PROCÓPIO, P.F; ABREU, L. G. F; CARAZOLLE, M. F; PEREIRA, G. A. G; MOCKAITS, G. Biohydrogen and methane production via silage-based dark co-fermentation using vinasse and filter cake. **Bioresource Technology Reports**, v. 27, p. 101927, aug. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101927>.

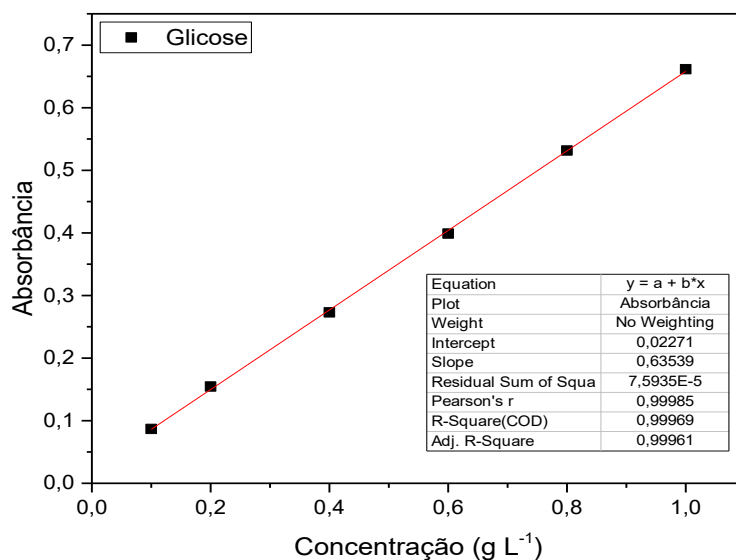
WEI, S; SACCHI, R; TUKKER, A; SUH, S; STEUBING, B. Future environmental impacts of global hydrogen production. **Energy & Environmental Science**, v. 17, p. 2157- 2172, jan. 2024. DOI: 10.1039/d3ee03875k.

YAO, Y; HUANG, G; CHUNJIANG, NA; CHEN, X; ZHANG, P; XIN, X; SHEN, J; AGNEW, J. Anaerobic digestion of livestock manure in cold regions: Technological advancements and global impacts. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109494, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109494>.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Curva de calibração construída para quantificação dos açúcares no pré-tratamento ácido auxiliado por ultrassom da vinhaça a cana-de-açúcar.

Figura A1- Curva de calibração da glicose



APÊNDICE B- Curvas de calibração analítica construídas para realização da quantificação dos gases gerados no processo de digestão anaeróbia.

Figura B1- Curva de calibração analítica do hidrogênio 70%.

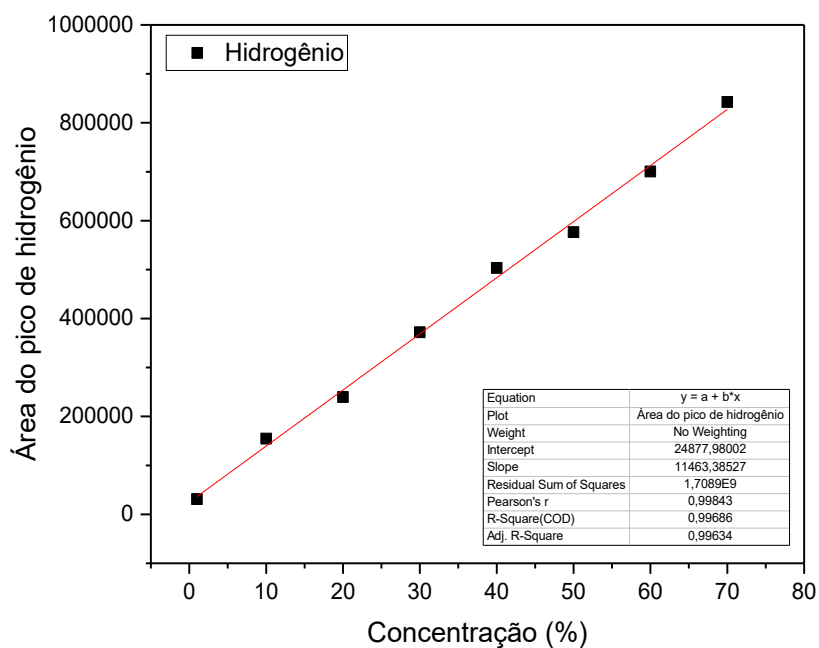


Figura B2- Curva de calibração analítica do hidrogênio 10%.

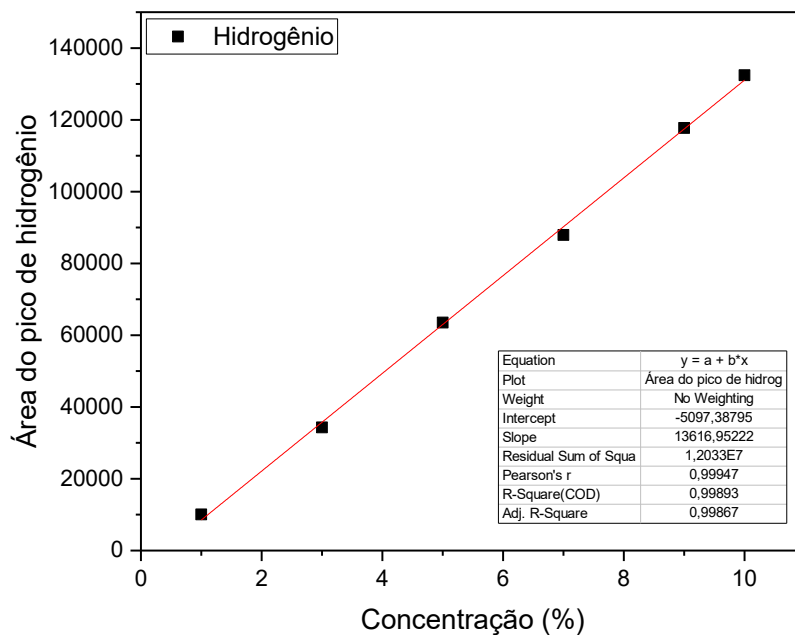


Figura B3- Curva de calibração analítica do metano 30%.

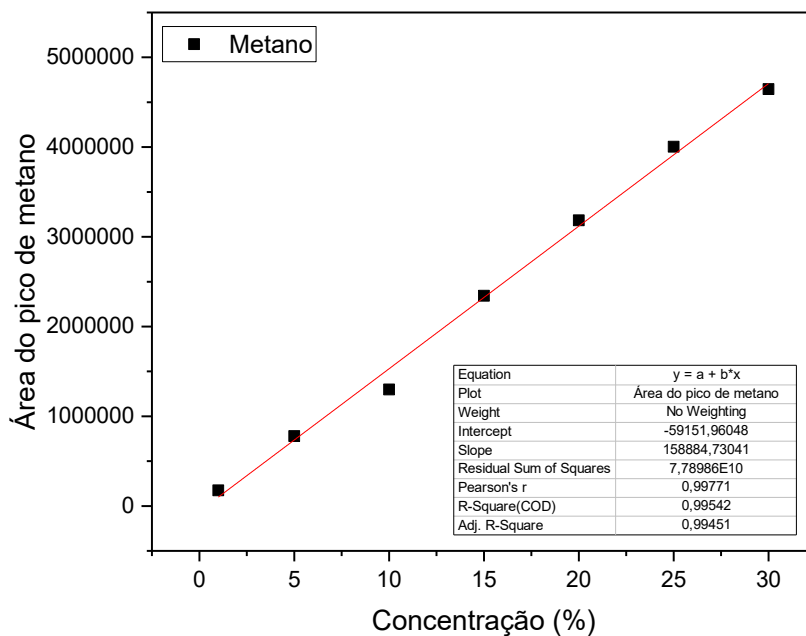


Figura B4- Curva de calibração analítica do metano 10%.

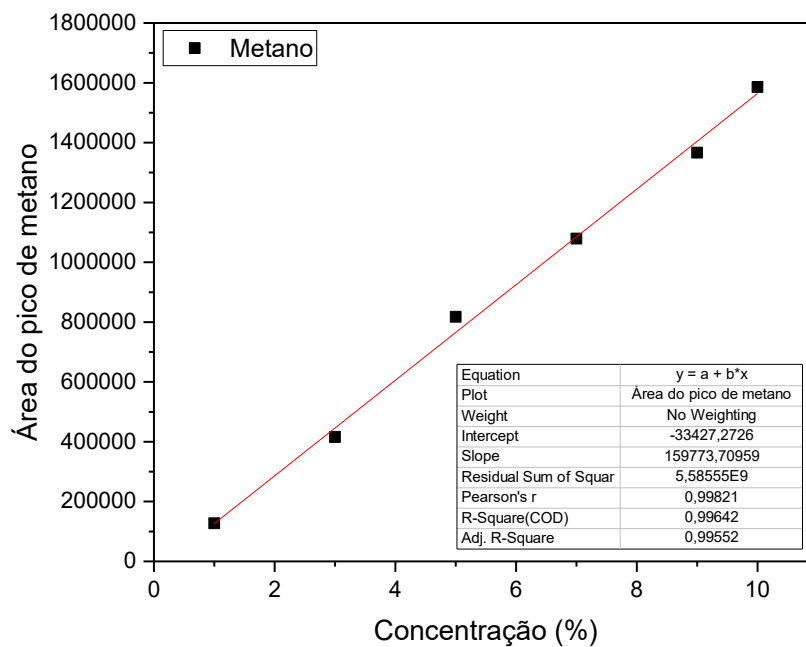


Figura B5- Curva de calibração analítica do dióxido de carbono 50%.

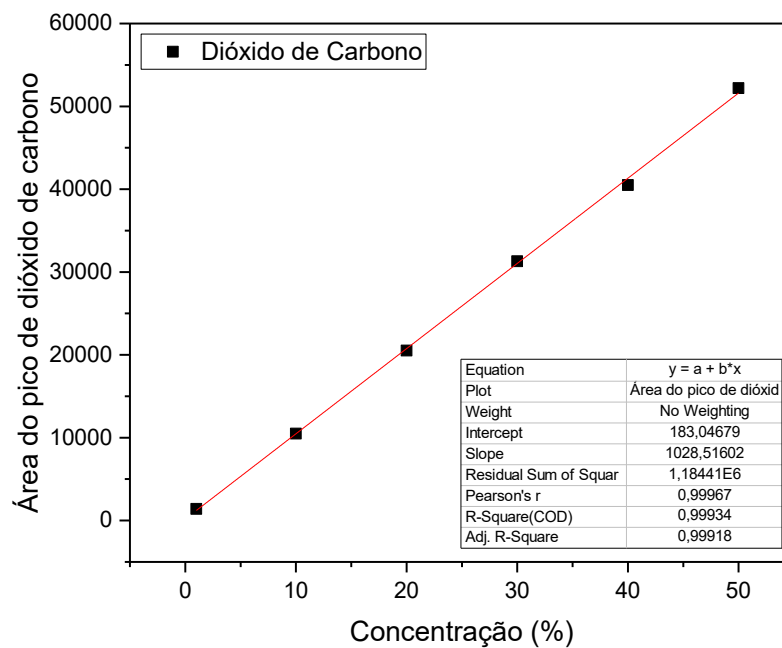
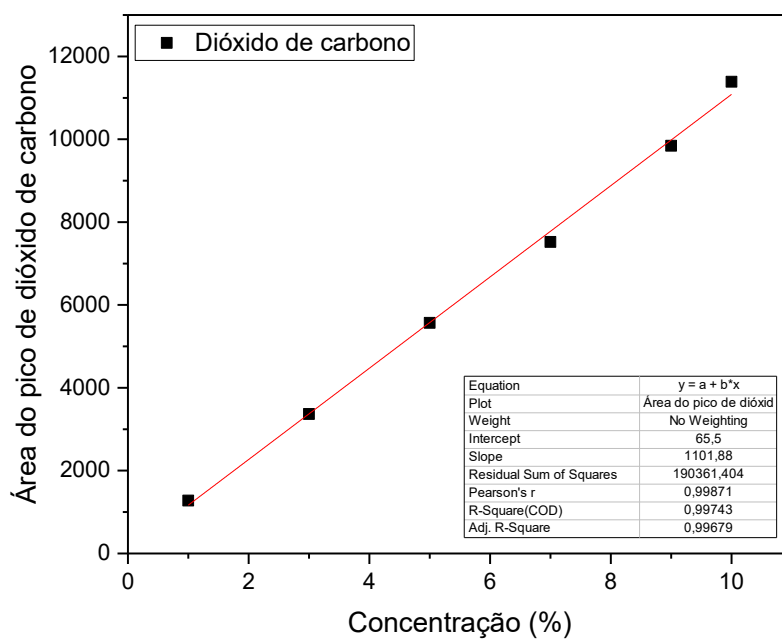


Figura B6- Curva de calibração analítica do dióxido de carbono 10%.



APÊNDICE C- Perfis cromatográficos comparativos das alíquotas retiradas durante os ensaios realizados no planejamento experimental.

Figura C1- Perfil cromatográfico do ensaio 2 do planejamento experimental.

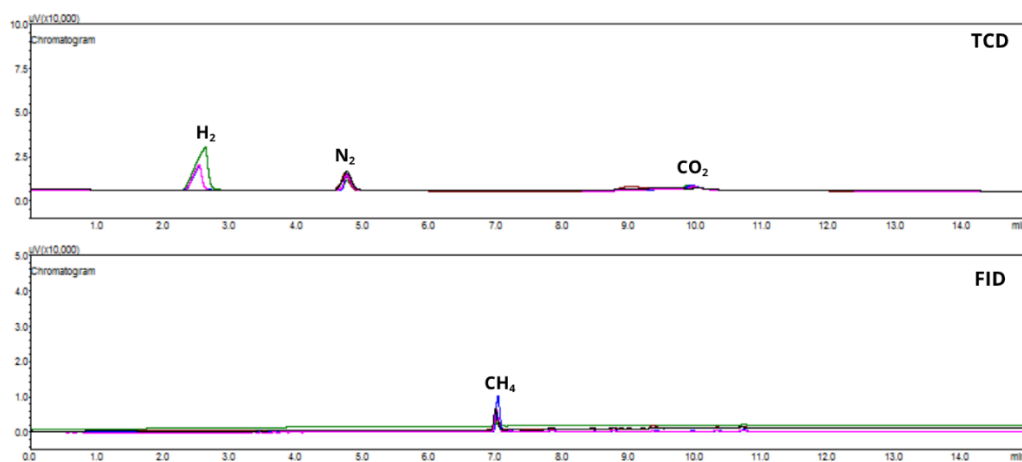


Figura C2- Perfil cromatográfico do ensaio 3 do planejamento experimental.

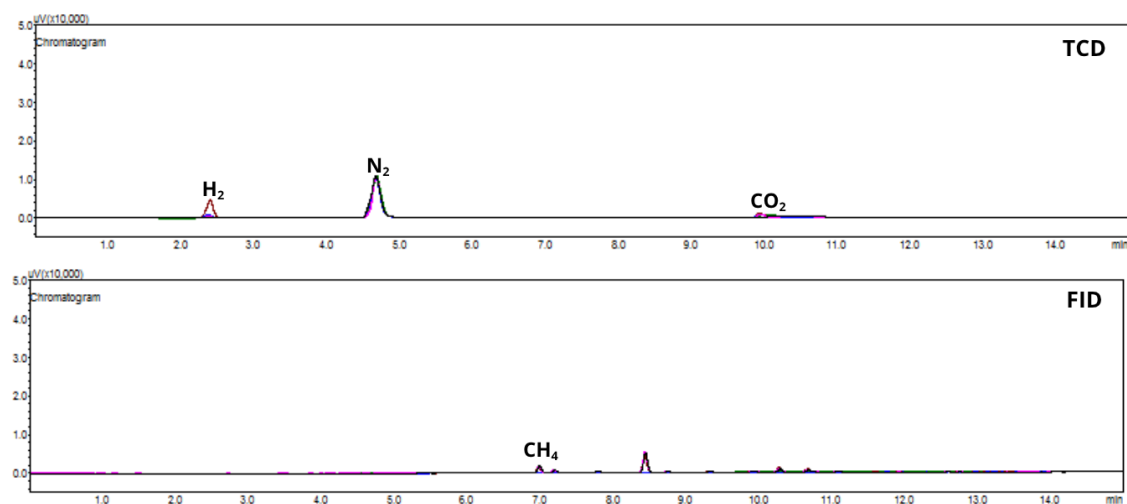


Figura C3- Perfil cromatográfico do ensaio 4 do planejamento experimental.

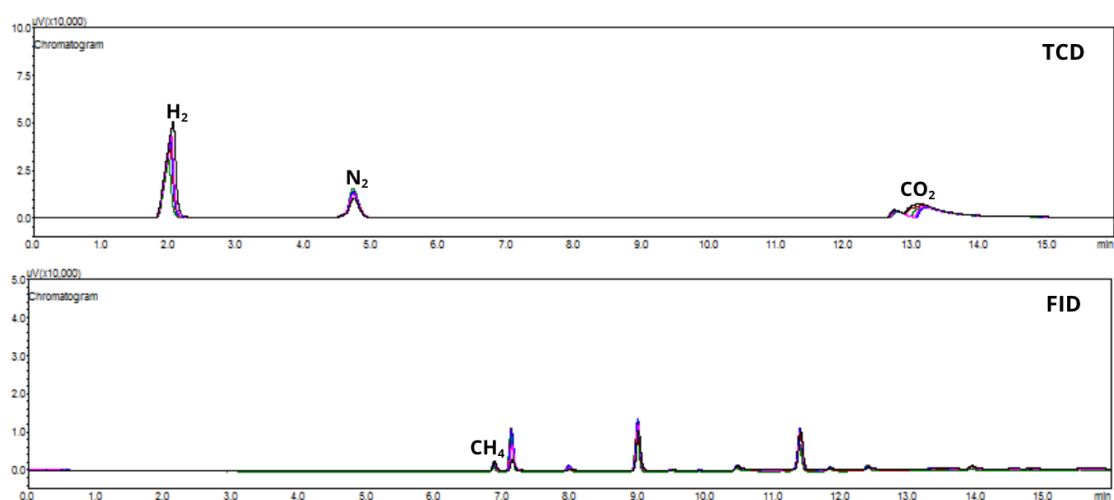


Figura C4- Perfil cromatográfico do ensaio 5 do planejamento experimental.

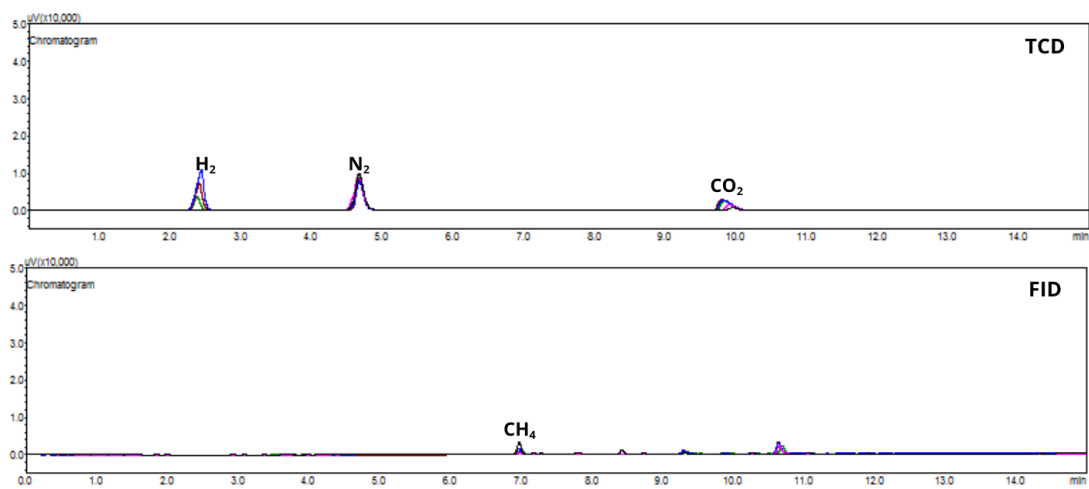


Figura C5- Perfil cromatográfico do ensaio 6 do planejamento experimental.

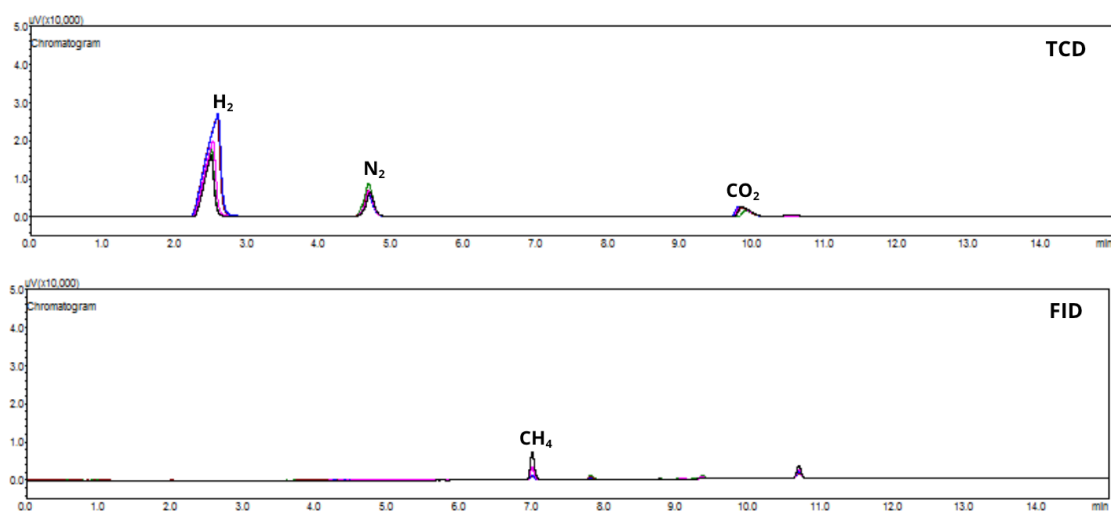


Figura C6- Perfil cromatográfico do ensaio 7 do planejamento experimental.

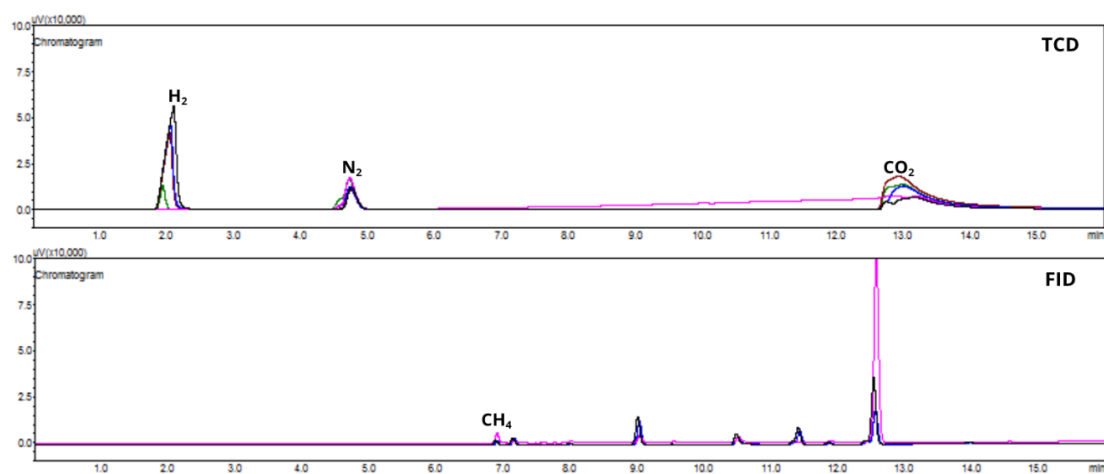


Figura C7- Perfil cromatográfico do ensaio 8 do planejamento experimental.

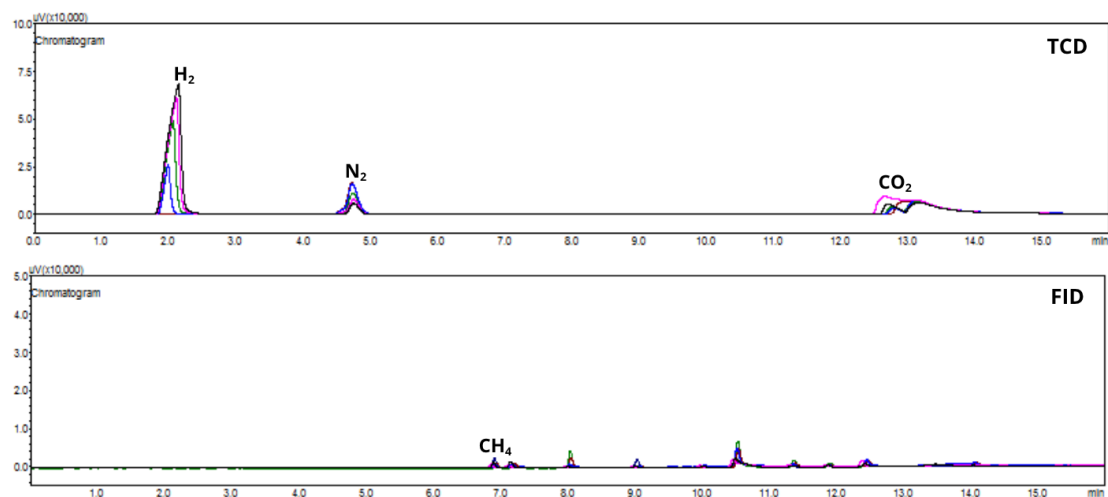


Figura C8- Perfil cromatográfico do ensaio 9 (C) do planejamento experimental.

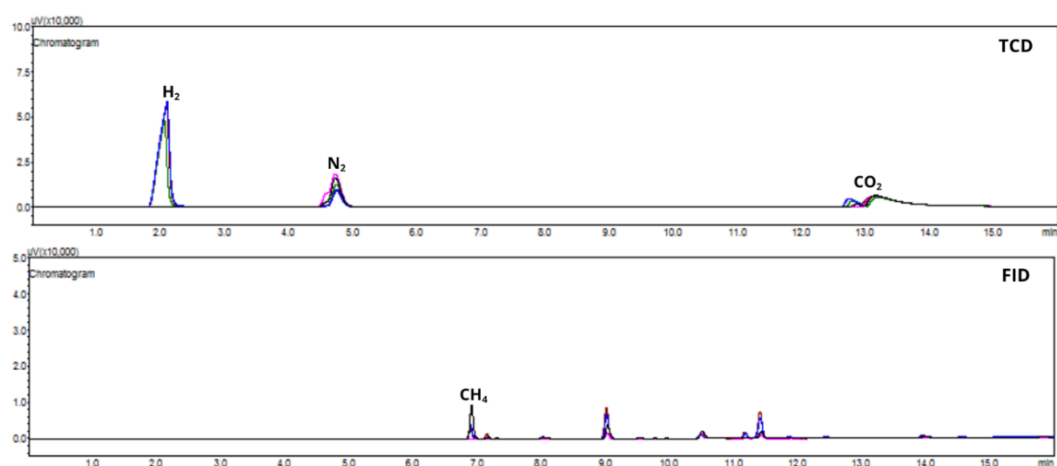


Figura C9- Perfil cromatográfico do ensaio 10 (C) do planejamento experimental.

