

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

FRANCISCO DE ASSIS MARTINS PONCE

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DO BAGAÇO
DA CANA-DE-AÇÚCAR E LICOR DE PENTOSSES EM REATORES EM BATELADA
COM CONSÓRCIO DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONES**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2022

FRANCISCO DE ASSIS MARTINS PONCE

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DO BAGAÇO
DA CANA-DE-AÇÚCAR E LICOR DE PENTOSSES EM REATORES EM BATELADA
COM CONSÓRCIO DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche.

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M818p Martins Ponce, Francisco de Assis
Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir do bagaço de cana-de-açúcar e licor de pentoses em reatores em batelada com consórcio de microorganismos autóctones / Francisco de Assis Martins Ponce; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2022.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Ácido Butírico. 2. DCCR. 3. Planejamento Experimental. 4. Metodologia de Superfície Resposta. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **FRANCISCO DE ASSIS MARTINS PONCE**.

Título da dissertação: "Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir do bagaço de cana-de-açúcar e licor de pentoses em reatores em batelada com consórcio de microorganismos autóctones".

Data da defesa: 10/03/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Associada **Maria Bernadete Amancio Varesche Silva**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Eduardo Delloso Penteado**
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Aprovado

Profa. Dra. **Daniele Vital Vich**
(Universidade Federal de Alagoas/UFAL)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

À Deus, o arquiteto do universo...

AGRADECIMENTOS

Aqui ficam os agradecimentos a todos que de alguma maneira, me ajudaram nessa árdua caminhada que é fazer uma pós-graduação no Brasil no cenário de pandemia de COVID-19 que passei além da crescente desvalorização do pesquisador no país. Apesar de todas as dificuldades que passei durante o mestrado, foi uma aprendizagem pessoal e profissional enorme, muito amadurecimento me trouxe.

A começar por Deus, por ter me dado saúde, e força para suportar todas as provas que passei no mestrado.

À minha mãe Vera Lúcia, que mesmo distante no Equador, sempre me apoiou e me motivou.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete A. Varesche, pelos seus ensinamentos profissionais e pessoais, pela enorme paciência, e a sua pronta disponibilidade e confiança que foi depositada.

Ao meu colega de apartamento e república, que esteve comigo desde o início desse mestrado (também irmão da mesma orientadora) e não deixou-me desistir em nenhum momento (quando eu queria), Eduardo (vulgo duds).

Aos meus outros colegas de república, Viviane (Fubeca), Thiago e Renan que me deixaram meus dias melhores em São Carlos.

Aos colegas do LPB, que contribuíram com conversas engraçadas, bons momentos, idas ao bandeirão, alertando sobre as onças e cobras...

À equipe Bernadete's, em especial, Marina, Danilo, Henrique, Rafael, Luciana e Camila (esta que me apoiou com unhas e dentes e me ensinou muito mesmo).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.339527/2019-00 - pelo fornecimento da bolsa na realização da pesquisa.

A Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), Programa de pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (PPG-SHS) e Laboratório de processos biológicos (LPB) por proporcionar minha formação de qualidade e obtenção de título de Mestre em Ciências.

Agradeço a todos que não citei, mas que me apoiaram nessa caminhada, meus sinceros agradecimentos.

PONCE, F.A.M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir do bagaço da cana-de-açúcar e licor de pentoses em reatores em batelada com consórcio de microorganismos autóctones.** 119 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de açúcar e etanol, gerando grande quantidade de bagaço de cana de açúcar (BCA), que é uma biomassa de suma importância como fonte energética. Neste contexto, foi estudada a viabilidade da utilização do BCA moído como substrato e fonte de microorganismos (bactérias e fungos autóctones) para obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como H₂ e ácidos orgânicos. Na etapa de obtenção do consórcio autóctone, reatores (Duran®) de 2 L foram usados com BCA (5 g.L⁻¹) moído (ensaio 1) e *in natura* (ensaio 2) e 3 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses. Nestes reatores foi feita a suplementação de extrato de levedura (2 g.L⁻¹). Após a obtenção do consórcio autóctone, os experimentos foram realizados em reatores em batelada com BCA, extrato de levedura e licor de pentoses, sendo usado 1,3 g.L⁻¹.SSV de inóculo. Na condição fermentativa, foram avaliados pH, concentração do licor de pentoses e BCA (moído) via Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os ensaios foram feitos em triplicata totalizando 48 reatores. Nos ensaios do DCCR, foram avaliados o BCA (1,6 a 8,4 g.L⁻¹), licor de pentoses (0,4 a 4,4 g.L⁻¹ em termos de DQO) e pH (5,2 a 6,8). Nos ensaios do DCCR, na condição C4 com 3,0 g.L⁻¹ de BCA, 3,6 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses e pH inicial de 6,5, obteve-se o maior *P* de 126,82 ± 10,46 mL H₂. O maior valor de *R_m* de 17,25 ± 2,42 mL.h⁻¹ foi obtido na condição C8, com 7,0 g.L⁻¹ de BCA, 3,6 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses e pH inicial de 6,5. O menor valor de λ_{H₂}, de 8,64 ± 1,15 horas foi observado na condição C5, com 3,0 g.L⁻¹ de BCA, 1,2 g.L⁻¹ de licor de pentoses e pH inicial de 6,5. O ácido butírico (HBu) foi o metabólito solúvel mais observado nos ensaios de DCCR. A maior proporção deste ácido foi observada no ensaio C5 (47,11%). Para o ensaio de validação com base na análise na Metodologia Superfície Resposta com 1,5 g.L⁻¹ de BCA, pH inicial de 6,8 e 4,7 g.DQO.L⁻¹ de licor, foi obtido *P* de 179,43 ± 5,50 mL, *R_m* de 13,87 ± 1,64 mL.h⁻¹, λ de 4,89 ± 0,67 horas e R² de 0,98. Os principais metabólitos solúveis observados na fermentação autóctone do BCA e licor de pentoses foram os ácidos butírico (C7 com 860 mg.L⁻¹), acético (C12 com 578 mg.L⁻¹) e láctico (C13 com 786 mg.L⁻¹). Os ácidos fracos e os furanos, ambos advindos do licor de pentoses, não afetaram significativamente a produção de hidrogênio. A maior conversão de carboidratos (76%) foi observada no ensaio C7 para valor inicial de 2,59 ± 0,34 g.L⁻¹.

Palavras-chave: Ácido butírico; DCCR; Planejamento Experimental; Metodologia de Superfície Resposta.

PONCE, F.A.M. **Production of hydrogen and organic acids from sugarcane bagasse and pentose liquor in batch reactors with intercropping of autochthonous microorganisms.** 119 p. Dissertation (Master) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

ABSTRACT

Brazil is one of the world's largest producers of sugar and ethanol, generating a great amount of sugarcane bagasse (SCB), which is a biomass of extreme importance as an energy source. In this context, the feasibility was studied of using ground SCB as substrate and source of microorganisms (autochthonous fungi and bacteria) to obtain products of biotechnological interest, such as H₂ and organic acids. In the stage of obtaining the autochthonous consortium, reactors (Duran®) of 2 L were used with SCB (5 g.L⁻¹), using ground SCB (assay 1) and *in natura* (assay 2), and 3 g.COD.L⁻¹ of hydrolysate from SCB. In these reactors, yeast extract (2 g.L⁻¹) was supplemented. After obtaining the autochthonous consortium, the experiments were carried out in batch reactors with SCB, yeast extract, and hydrolysate from SCB, using 1.3 g.L⁻¹.VSS of inoculum. In the fermentation stage, pH, concentration of hydrolysate from SCB, and SCB (ground) were analyzed via Central Composite Rotatable Design (CCRD). The assays were performed in triplicate, totaling 48 reactors. In the CCRD assays, SCB (1,6 to 8,4 g.L⁻¹), hydrolysate from SCB (0,4 to 4,4 g.L⁻¹ in terms of COD), and pH (5,2 to 6,8) were analyzed. In the CCRD, the condition C4, with 3,0 g. L⁻¹ of SCB, 3,6 g.COD.L⁻¹ of hydrolysate from SCB and initial pH of 6,5, obtained a higher *P* of 126,82 ± 10,46 mL H₂. The highest R_m value of 17,25 ± 2,42 mL.h⁻¹ was obtained in the condition C8, with 7,0 of SCB, 3,6 g.COD.L⁻¹ of hydrolysate from SCB and initial pH of 6,5. The lowest value of λH₂, of 8,64 ± 1,15 hours, was observed in the condition C5, with 3,0 g.L⁻¹ of SCB, 1,2 g.L⁻¹ of hydrolysate from SCB and initial pH of 6,5. Butyric acid (HBu) was the soluble metabolite most observed in the CCRD. The highest proportion of this acid was observed in assay C5 (47.11%). For the validation test with basis in the analysis in the Surface Response Methodology with 1.5 g.L⁻¹ of SCB, initial pH of 6.8 and 4.7 g.COD.L⁻¹ of hydrolysate, *P* of 179.43 ± 5.50 mL, R_m of 13.87 ± 1.64 mL.h⁻¹, λ of 4.89 ± 0.67 hours, and R² of 0.98 were obtained. The main soluble metabolites observed in the autochthonous fermentation of SCB and hydrolysate were butyric acid (C7 with 860 mg.L⁻¹), acetic acid (C12 with 578 mg.L⁻¹) and lactic acid (C13 with 786 mg.L⁻¹). The weak acids and the furans, both originated from the hydrolysate from SCB, did not affect the production of hydrogen significantly. The highest carbohydrate conversion (76%) was observed in assay C7 for initial value of 2,59 ± 0,34 g.L⁻¹.

Keywords: Butyric acid; CCRD; Experimental Design; Response Surface Methodology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.....	24
Figura 3.2: Vias de formação de furanos e compostos aromáticos a partir do hidrolisado lignocelulósico do BCA.....	30
Figura 3.3: Preço de mercado de vários produtos de valor agregado recuperados por meio de biorrefinaria integrada de biohidrogênio.....	41
Figura 3.4: Resíduos da geração de etanol 1G e 2G pra produção de biohidrogênio..	43
Figura 4.1: Fluxograma experimental da pesquisa.....	49
Figura 4.2: Substratos utilizados na pesquisa.....	50
Figura 4.3: Esquema de obtenção de consórcio fermentativo autóctone com BCA in natura (a) e BCA moído (b).....	51
Figura 4.4: Reativação de inóculo para os ensaios fermentativos.....	54
Figura 5.1: Produção acumulada de hidrogênio – BCA moído e BCA in natura.....	60
Figura 5.2: Produção temporal de hidrogênio dos ensaios de DCCR.....	64
Figura 5.3: Efeito do pH inicial na produção de (P).....	67
Figura 5.4: Superfície resposta (a) e superfície de contorno (b) obtido através das interações entre BCA (X1) e Licor (X2) para resposta Y1 com pH fixado em 6.....	71
Figura 5.5: Superfície resposta (a) e superfície de contorno (b) obtido através das interações entre licor de pentoses (X2) e pH (X3) para resposta Y1.....	72
Figura 5.6: Ácidos orgânicos dos ensaios fermentativos – a) fase inicial e b) fase latência.....	78
Figura 5.7 Ácidos orgânicos durante os ensaios fermentativos – c) exponencial e d) estabilização.....	79
Figura 5.8: Superfície resposta gráfico de contorno pra produção de ácido butírico....	82
Figura 5.9: Carboidratos totais solúveis e hidrogênio acumulado ao longo do tempo nos ensaios fermentativos do DCCR.....	89
Figura 5.10: Furfural, fenóis e hidroximetilfurfural do licor de pentoses dos ensaios de DCCR.....	91
Figura 5.11: Produção de hidrogênio em condições otimizadas.....	94
Figura 5.12: Conversão de Carboidratos Totais.....	96
Figura 5.13: Balanço de Massa Solúvel (BMS) da condição otimizada para obtenção de hidrogênio a partir do BCA e licor de pentoses.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição química do BCA nacional in natura.....	21
Tabela 3.2: Efeitos de diversos microorganismos em diferentes tipos de biomassa em reatores em batelada.....	29
Tabela 3.3: Produção de biohidrogênio em reatores em batelada com resíduos lignocelulósicos de segunda geração.....	39
Tabela 4.1: Matriz do DCCR dos ensaios fermentativos.....	53
Tabela 4.2: Fatores de equivalência de metabólitos solúveis utilizados no cálculo do BMS.....	58
Tabela 5.1: Composição média Licor de Pentoses.....	59
Tabela 5.2: Parâmetros de Gompertz dos ensaios de obtenção do inóculo autóctone para BCA in natura e BCA moído.....	60
Tabela 5.3: Valores codificados e respostas para produção de hidrogênio.....	62
Tabela 5.4: Valores de significância para o intervalo de confiança de 90% das variáveis dos ensaios do DCCR.....	68
Tabela 5.5: ANOVA para os ensaios de DCCR, para P com nível de significância de 10%.....	69
Tabela 5.6: ANOVA para os ensaios de DCCR, para Rm com nível de significância de 10%.....	73
Tabela 5.7: Valores preditos e experimentais para as respostas P e Rm.....	74
Tabela 5.8: Porcentagem de ácidos orgânicos ao final dos experimentos.....	75
Tabela 5.9: Valores de significância para o intervalo de confiança de 90% das variáveis dos ensaios do DCCR para produção de ácido butírico.....	80
Tabela 5.10: ANOVA para os ensaios de DCCR, para HBU com nível de significância de 10%.....	81
Tabela 5.11: ANOVA para os ensaios de DCCR, para remoção de Carboidratos Totais com nível de probabilidade de 10%.....	84
Tabela 5.12: Valores codificados e respostas para produção de hidrogênio e remoção de carboidratos totais dos ensaios DCCR.....	85

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BCA = Bagaço de cana-de-açúcar

CCT = Conversão de carboidratos totais

H₂ = Hidrogênio

C₆H₁₂O₆ = Glicose

CNTP = Condições normais de temperatura e pressão

CT = Carboidratos totais

DCCR = Delineamento de composto central rotacional

DQO = Demanda química de oxigênio

HAc = Ácido acético

HBu = Ácido butírico

HIsv = Ácido isovalérico

His = Ácido isobutírico

HLac = Ácido láctico

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência

ST = Sólidos totais

SST = Sólidos suspensos totais

SSV = Sólidos suspensos voláteis

SV = Sólidos voláteis

LISTA DE SÍMBOLOS

P = Produção máxima acumulada de hidrogênio

R_m = Taxa de produção média de hidrogênio

λ_{H₂} = Tempo de início de produção de hidrogênio

% = Porcentagem

°C = Graus Celsius

cm = Centímetro

< = Menor que

> = Maior que

~ = Aproximado/aproximadamente/valor estimado

ΔG = Energia livre de Gibbs

g CT.L⁻¹ = Grama de carboidratos totais por litro

g.dm⁻³ = Grama por decímetro cúbico

g DQO.L⁻¹ = Grama de DQO por litro

g HAc.L⁻¹ = Grama de ácido acético por litro

g.L⁻¹ = Grama por litro

g NaCl.L⁻¹ = Grama de cloreto de sódio por litro

g SSV.L⁻¹ = Grama de sólidos suspensos voláteis por litro

g-1 ST.L = Grama de sólidos totais por litro

h = Hora

Kg = Kilograma KJ.g⁻¹ = Quilojoule por grama

mL = Mililitro

mL.g⁻¹ = Mililitro por grama

mL.g⁻¹CT = Mililitro por grama de carboidratos totais

mL H₂ g⁻¹DQO = Mililitro de gás hidrogênio por grama de DQO

mol.g = Mol por grama

mol.mol⁻¹ = mol por mol

mmol.L⁻¹ = Milimol por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 Bagaço da Cana-de-Açúcar	21
3.2 Microorganismos envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica	22
3.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica	24
3.3.1 <i>Pré-tratamento físico</i>	24
3.3.2 <i>Pré-tratamento químico</i>	25
3.3.3 <i>Pré-tratamento biológico</i>	26
3.4 Compostos inibitórios	29
3.4.1 <i>Fenóis</i>	30
3.4.2 <i>Furanos</i>	31
3.4.3 <i>Ácidos Orgânicos</i>	32
3.5 Fermentação	33
3.6 Produção de ácido butírico através da fermentação	40
3.7 Produção de biohidrogênio a partir do BCA	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Substratos	50
4.2 Obtenção do consórcio fermentativo autóctone	50
4.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR)	52
4.4.1 <i>Ensaio fermentativos</i>	54
4.4.2 <i>Avaliação dos métodos estatísticos</i>	55
4.5. <i>Análises físico-químicas e cromatográficas</i>	55
4.7 Balanço de Massa	57
4.8 Caracterização do BCA	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Caracterização dos substratos	59
5.1.1 <i>Licor de Pentoses</i>	59
5.2 Obtenção do inóculo autóctone	59
5.3 Produção de Hidrogênio	61
5.3.1 <i>Superfície Resposta e parâmetros cinéticos</i>	61
5.3.2 <i>Avaliação dos metabólitos solúveis</i>	74
5.3.3 <i>Validação experimental</i>	93
6 CONCLUSÕES	98
7 RECOMENDAÇÕES	99
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

Os problemas enfrentados pela dependência excessiva de recursos baseados no petróleo estão se expandindo devido ao decréscimo das reservas de combustíveis fósseis em todo o mundo alinhado às preocupações ambientais, devido a liberação de gases potenciadores do efeito estufa como N_2O , CO_2 , CH_4 , além de serem prejudiciais ao meio ambiente, podem causar problemas à saúde humana.

Os principais países produtores de cana-de-açúcar são a Índia, Brasil e China, que juntos produzem quase 65% da cana-de-açúcar mundial, sendo o Brasil responsável por cerca de 40% da produção mundial total, tornando-o um dos principais usuários das biorrefinarias da cana-de-açúcar, que processam quase toda a produção de biomassa da cana-de-açúcar do país para gerar bioenergia, biocombustíveis e outros derivados de alto valor agregado (MILÃO; ARAÚJO; DE MEDEIROS, 2021).

No Brasil, considerando produção estimada de 665 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2019/20 (CONAB, 2020), são geradas aproximadamente 168 milhões de toneladas de bagaço e palha.

Com o aumento pela procura de biocombustíveis como biodiesel e etanol, oriundos da utilização da biomassa vegetal, vem sendo propícios no país em virtude do clima favorável e a extensão territorial. Em relação ao etanol, em 2017 no Brasil, foram produzidos cerca de 7.060 milhões de galões, ficando apenas atrás dos EUA com 15.800 milhões (CHANDEL *et al.*, 2019). Esta enorme disponibilidade do bagaço da cana-de-açúcar (BCA) no Brasil faz dela uma opção atraente para a produção sustentável de biocombustíveis e produtos químicos de *commodity*. Os biocombustíveis, especificamente o etanol lignocelulósico, é produzido através da fermentação dos hidrolisados do BCA, tem recebido crescente atenção devido à sua adequação técnica para substituir os combustíveis geológicos como gasolina e diesel (VAN EIJCK; BATIDZIRAI; FAAIJ, 2014).

A partir da produção de açúcar e etanol tem-se a geração de bagaço, licor, vinhaça e melaço, sendo estes altamente potenciais para produção de hidrogênio e metano em condições anaeróbicas (BUNDHOO, 2019).

Após a extração da sacarose da cana de açúcar a fibra resultante (bagaço) é imediatamente usada como combustível em caldeiras ou armazenada para uso futuro. O melaço é processado nas destilarias para a produção de bioetanol, gerando a vinhaça como subproduto, e dependendo da forma como é descartada, pode acarretar em diversos impactos ao ambiente por conta das altas concentrações de potássio, sulfato e matéria orgânica (FUESS; GARCIA, 2014). Ademais, nem todo bagaço

produzido é utilizado (excedente de 8 a 12 %) e o restante pode gerar problemas ambientais e de armazenamento.

Por outro lado, as biorrefinarias lignocelulósicas fornecerão ao mercado diferentes compostos industrialmente atraentes com interessantes perspectivas econômicas e ambientais, consistindo no fracionamento de biomassa para obter diferentes produtos de valor agregado, além da possibilidade de exploração como fonte de recursos renováveis. Nesse sentido, a biorrefinaria de biohidrogênio se desenvolveu como uma provável alternativa à refinaria de petróleo.

Aproximadamente 30-40% das matérias-primas foram usadas para a produção de biohidrogênio e 60-70% dos residuais orgânicos são transformados em diferentes produtos de alto valor agregado como etanol, ácido butírico e 1,3-propanodiol (SARMA *et al.*, 2015). Além desses, ácido cítrico, ácido lático, ácido succínico, e ácido levulínico, estão sendo obtidos por fermentação de materiais lignocelulósicos (LIU *et al.*, 2014; CHANDEL; SILVEIRA, 2017; CHANDEL *et al.*, 2018).

Os processos de biorrefinaria baseados na fermentação microbiana de materiais lignocelulósicos precisam ser economicamente competitivos com os processos de refinaria de petróleo, por isso é importante maximizar o desempenho dos processos no que diz respeito à produtividade e ao produto desejado. Mais pesquisas são necessárias em nível laboratorial, a fim de produzir esses bioprodutos emergentes através da fermentação em larga escala e cumprir a função de refinaria de petróleo.

O BCA compõe-se principalmente em celulose (25-29%), hemicelulose (36–45%) e lignina (18–26%) (ROCHA *et al.*, 2015). As técnicas de pré-tratamento podem ser físicas, químicas ou biológicas. Essas técnicas são necessárias para quebrar a parede celular rígida e complexa. Celulose e hemiceluloses, que são formas poliméricas de açúcares simples, compõem aproximadamente 70% de toda a biomassa e estão intimamente ligadas a lignina por meio de ligações covalentes que tornam a estrutura altamente robusta e resistente (KHAN; KHAN, 2015). Celulose e hemicelulose podem ser convertidas via fermentação-metanogênese.

As fontes renováveis de bioenergia, tais como os insumos derivados de biomassa e os resíduos orgânicos, têm sido promissores para a produção de biohidrogênio. Alguns destes resíduos são subprodutos de processamento de alimentos e processos agrícolas (LAY, 2000). O hidrolisado do BCA contém altas quantidades de açúcar que podem ser convertidas em gás hidrogênio por bactérias fermentadoras (PATTRA *et al.*, 2008). Diferentes grupos de bactérias, tais como *Enterobacter*, *Clostridium* e *Bacillus*, têm sido relatadas para produzir hidrogênio através da fermentação anaeróbia do licor de pentoses do BCA (WANG *et al.*, 2007).

Populações microbianas autóctones podem prevalecer no BCA porque possuem enzimas capazes de degradar moléculas complexas como celulose e hemicelulose, estabelecendo interações microbianas para hidrólise e fermentação simultânea desse substrato. Dentre as bactérias autóctones, estão aquelas semelhantes à *Clostridium*, *Bacteroides*, *Paenibacillus* e *Tepidimicrobium* (RATTI *et al.*, 2015; RABELO *et al.*, 2018), e fungos autóctones do BCA, como *Aspergillus* (INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019) e *Polyporus* (AHMED *et al.*, 2018).

Muitos estudos utilizaram o Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR) e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), por meio de técnicas de Planejamento Experimental como estratégia de otimização em processos fermentativos para obtenção de biohidrogênio (CAMARGO *et al.*, 2021; MAZARELI *et al.*, 2021; MOURA *et al.*, 2020; MONTROYA *et al.*, 2020). A MSR executa a análise de regressão múltipla para determinar a relação entre as variáveis do processo, requerendo menos número de execuções experimentais para gerar as informações necessárias para um resultado estatisticamente aceitável (MU; WANG; YU, 2006; FERMOSO *et al.*, 2010).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial de utilização do BCA e licor de pentoses (hidrolisado do BCA) que são gerados em grandes quantidades pela indústria sucroalcooleira, como substrato e fonte de bactérias fermentativas para produção de bioenergia e compostos de alto valor agregado, empregando-se técnicas de Planejamento Experimental, como DCCR e MSR, variando pH, licor de pentoses e concentração de BCA com a finalidade de otimizar a produção de H₂ e ácidos orgânicos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo é avaliar a produção otimizada de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir do BCA e licor de pentoses em reatores anaeróbios em batelada.

Neste caso, os objetivos específicos foram elaborados nas condições estabelecidas.

- a) Avaliar a obtenção de inóculo autóctone (fungos e bactérias) do BCA e licor de pentoses na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos;
- b) Comparar a produção de H₂ a partir de BCA *in natura* e moído;
- c) Avaliar os efeitos das variáveis independentes, individuais e interativos (pH, concentração de licor de pentoses e BCA) sobre a produção de biohidrogênio em reatores em batelada, por meio do planejamento experimental;
- d) Avaliar a produção de hidrogênio para diferentes concentrações de matéria orgânica, carboidratos solúveis, fenóis totais e ácidos orgânicos nos experimentos em batelada.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bagaço da Cana-de-Açúcar

O BCA é composto por material lignocelulósico e não contém monossacarídeos acessíveis aos microorganismos durante o processo de fermentação. Por esse motivo, é necessário pré-tratamento físico-químico ou biológico para facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas. (KAVITHA *et al.*, 2017; BRAGA *et al.*, 2018).

O pré-tratamento pode ser aplicado ao inóculo e substrato (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015). Quando o pré-tratamento é aplicado ao inóculo tem-se como objetivo inibir os microorganismos consumidores de hidrogênio e enriquecer aqueles produtores de H₂ (LI; FANG, 2007; PRAKASHAM *et al.*, 2009; SAADY, 2013; WONG; WU; JUAN, 2014). Já o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos tem como objetivo a quebra da estrutura cristalina da celulose, bem como a estrutura da lignina e hemicelulose, auxiliando na despolimerização de modo a aumentar a hidrólise e conseqüentemente a produção de hidrogênio por processos fermentativos através de microorganismos especializados nesses processos (SUN; CHENG, 2002; MOSIER *et al.*, 2005; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009; ELBESHISHY *et al.*, 2011).

O BCA *in natura* nacional é constituído principalmente por 31,4-45,5% de celulose, 23,2-41,6% de hemicelulose, e 19,1-32,4% lignina (Tabela 3.1). Os componentes não-estruturais da biomassa, como cinzas (1,0-2,8%) e extrativos (4,6-9,1%) são as outras substâncias que fazem parte da composição química do BCA.

O bagaço e a sua fração hemicelulósica hidrolisada (licor de pentoses) podem ser utilizados também como matéria-prima para o cultivo de microorganismos para o processo de bioconversão e produção de produtos de valor biotecnológicos, como xilitol, produção de etanol, biometano, biohidrogênio e ácidos orgânicos. Devido a estas vantagens, o bagaço é considerado não apenas um subproduto da indústria açucareira, mas também um coproduto de alto valor agregado (PANDEY *et al.*, 2000; S. KONDE *et al.*, 2021).

Tabela 3.1: Composição química do BCA nacional *in natura*

Componentes (%)		Referências
Celulose	31,4~45,5	(BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; CANILHA <i>et al.</i> , 2012; DA SILVA <i>et al.</i> , 2010; JACKSON DE MORAES ROCHA <i>et al.</i> , 2011; RABELO <i>et al.</i> , 2011)
Hemicelulose	23,2~41,6	
Lignina	19,1~32,4	
Cinzas	1,0~2,8	
Extrato de etanol	4,6~9,1	

3.2 Microorganismos envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica

Na natureza, a biomassa lignocelulósica é degradada principalmente por fungos e bactérias produzindo combinação complexa de enzimas hidrolíticas (celulases, hemicelulases e pectinases) que agem de forma cooperada para quebra da celulose e seus componentes associados da parede celular (MUNIR; LEVIN, 2016).

As bactérias celulolíticas gram-positivas fazem parte do filo Firmicutes e pertencem à classe Clostridia e ao gênero *Clostridium* (PANTALÉON *et al.* 2014). Geralmente, em condições aeróbias, o material lignocelulósico é convertido em água e dióxido de carbono, no entanto, na degradação anaeróbia de celulose, também são produzidos etanol e hidrogênio. *Clostridium thermocellum*, recentemente denominado *Hungateiclostridium thermocellum* (NAKAZONO-NAGAOKA *et al.* 2019), é bactéria celulolítica anaeróbia e termofílica (BAYER *et al.* 2004; PAPANNEK *et al.* 2015) e tem sido estudada também na obtenção de hidrogênio a partir de BCA (LEITÃO *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2019b).

Ecem Öner *et al.* (2018) investigaram o efeito de *Clostridium thermocellum* na co-digestão anaeróbia de esterco de vaca e palha de trigo. *C. thermocellum* foi adicionado em 5%, 10%, 15% e 20% do volume de digestores anaeróbios que continham estrume de vaca e palha de trigo como substrato. Esses digestores foram operados por 50 dias e foram comparados com digestores em condição controle, sem bioaugmentação. Os autores concluíram que a bioaugmentação com *C. thermocellum* foi significativamente favorável à hidrólise e, como resultado, foi produzido metano a partir de arqueias metanogênicas do esterco de vaca e palha de trigo. Os efeitos positivos da bioaugmentação foram observados quando a co-inoculação de *C. thermocellum* foi de 20% (v/v). Por meio da análise microbiana os autores verificaram abundância 44% maior para representantes de Ruminococcaceae, no reator bioaugmentado em relação ao controle.

Soares *et al.* (2018) avaliaram as concentrações de substrato e extrato de levedura de reator em batelada, a fim de otimizar a conversão do BCA em hidrogênio. Os autores identificaram que a maioria das bactérias abundantes no reator pertencia as classes Clostridia, Bacteroides e Bacilli (44,22, 29,89 e 5,27%, respectivamente). Ainda no estudo, os autores inferiram sobre a maior proporção de *Clostridium*, a qual foi relacionada com a bioconversão do BCA em ácidos orgânicos e hidrogênio. Seu papel na decomposição da biomassa lignocelulósica pode ser devido à maior atividade celulolítica de muitos membros desse gênero, bem como à sua capacidade de realizar inúmeras vias de fermentação.

Os fungos são mais eficientes na degradação de material lignocelulósico do que as bactérias, nas quais a degradação é mais lenta e limitada. Este fato pode ser explicado porque os fungos podem se prender aos tecidos vegetais lignificados e, por sua vez, favorecem a adesão de bactérias celulolíticas, que então obtêm acesso ao interior de materiais vegetais. Os fungos de ambiente anaeróbio formam co-culturas sintróficas com arqueias metanogênicas para degradação do material lignocelulósico (KUMAR *et al.*, 2015c).

O papel dos fungos na degradação das fibras vegetais tem sido estudado (BUGG *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2013; ROUCHES *et al.*, 2016; DA SILVA; PEDEZZI; SOUTO, 2017; DE OLIVEIRA GORGULHO SILVA *et al.*, 2018). Entre as espécies de fungos mais relatadas estão as aeróbias como ascomicetos (*Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*), basidiomicetos, que incluem fungos de podridão branca (*Panaerochete chrysosporium*) e fungos de podridão parda (*Fomitopsis palustris*) e algumas espécies anaeróbias como *Orpinomyces* sp. (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Estes últimos pouco estudados, porém, exibindo alta atividade hidrolítica da biomassa lignocelulósica (COUGER *et al.* 2015; SOLOMON *et al.* 2016).

Machado e Ferraz (2017) analisaram o tratamento biológico do BCA com três basidiomicetos (*Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora*), que produziram variados padrões de degradação dos componentes da biomassa. Esses padrões incluíram a degradação predominante de polissacarídeo, degradação simultânea de todos os componentes da biomassa e degradação seletiva de lignina com preservação de celulose. *L. sulphureus* promoveu degradação maior de xileno (13%) e glucano (9,1%) com remoção desprezível de lignina (4,8%), após 60 dias de tratamento. *P. ostreatus* degradou todos os componentes do BCA em proporções semelhantes. A remoção de glucano, xileno e lignina foi de 8,4%, 15,7% e 11,1% após 60 dias de tratamento biológico, respectivamente. *C. subvermispora* promoveu a biodegradação de lignina e xileno. Nesse caso, a remoção de glucano foi mínima (15,7%), enquanto as de lignina e xilano atingiram 48% e 47% após 60 dias de tratamento, respectivamente.

Salomão *et al.* (2019) examinaram as condições operacionais (temperatura e teor de umidade) para a produção de celulasas a partir de *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Trichoderma koningii*, utilizando BCA *in natura* e pré-tratado com solução ácido-alcalina e peróxido de hidrogênio como substratos. O fungo mais adequado para a produção de celulasas foi o *Trichoderma koningii* (8,2 UI/g⁻¹ de substrato), seguido de *Penicillium* sp. (1,7 UI / g de substrato). Em relação ao substrato das culturas, verificou-se que o BCA pode ser utilizado como fonte de carbono para os microorganismos estudados e indutores na produção de celulasas. Os melhores resultados de produção

foram obtidos quando o BCA não foi pré-tratado. Dentre as variáveis operacionais estudadas, a temperatura teve maior efeito sobre a produção enzimática, resultando em melhores resultados ao utilizar temperaturas entre 28 e 30°C.

Braga *et al.* (2018) estudaram a viabilidade da coprodução de H₂ e CH₄ a partir do BCA, utilizando processo de digestão anaeróbia em dois estágios. Os metabólitos (ácidos orgânicos e H₂) gerados no final do Estágio I serviram como substratos no Estágio II, para a produção de CH₄, com três diferentes inóculos (lagoa anaeróbia, consórcio fermentativo/celulolítico, e lodo de UASB). O pré-tratamento do BCA foi conduzido em sistema hidrotérmico combinando tratamento enzimático com o fungo *Aspergillus niger*. Neste estudo, o pré-tratamento com *A. niger* forneceu enzimas necessárias para a decomposição do BCA. Os autores também notaram que alguns gêneros da família *Clostridiaceae* podem ter influenciado diretamente na degradação de açúcares, como celulose, hexoses e glicose, gerando ácidos orgânicos (acético e fórmico).

3.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento é essencial para alterar as características estruturais da biomassa e aumentar a acessibilidade dos carboidratos às enzimas hidrolíticas. Os principais efeitos promovidos pelos diferentes pré-tratamento incluem: (1) modificação do índice de cristalinidade da celulose e seu grau de polimerização, (2) interrupção das ligações lignina-carboidrato, (3) remoção de lignina e/ou hemiceluloses e (4) aumento da porosidade (MORENO *et al.* 2019). Na Figura 3.1 está ilustrado o efeito do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

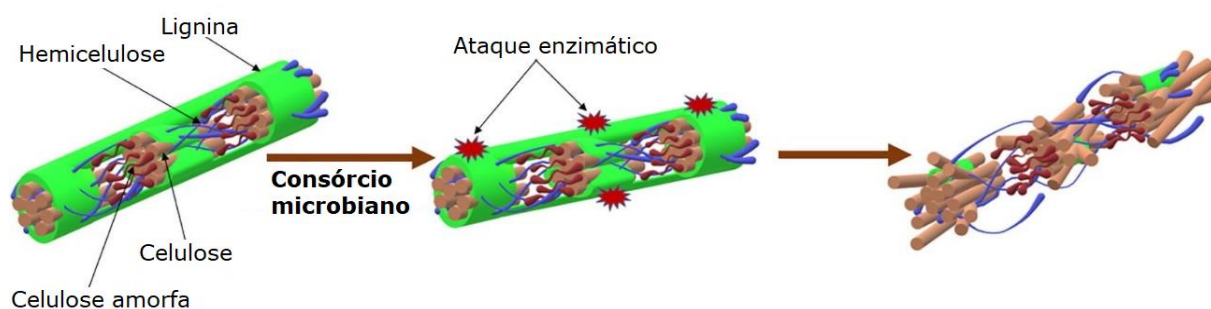


Figura 3.1: Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.

Fonte: adaptado de Abraham *et al.* (2020).

3.3.1 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico mais utilizado é a moagem, que diminui a cristalinidade e o grau de polimerização da lignocelulose, melhorando a suscetibilidade à hidrólise enzimática (ZENG *et al.*, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2015). A moagem costuma ser o

primeiro passo do pré-tratamento. Moagem de dois rolos, moagem de bolas, moagem de martelo, moagem de disco e moagem coloidal são vários tipos de moagem utilizados nos processos de diminuição do tamanho da biomassa. No entanto, conforme De la Rubia *et al.* (2011), a redução excessiva no tamanho da biomassa lignocelulósica pode resultar na produção excessiva de ácidos graxos voláteis (AGVs), os quais podem favorecer a inibição da produção de metano.

Outro tipo de tratamento físico muito utilizado é o hidrotérmico, sendo usada a água aquecida em altas temperaturas, com o objetivo de levar à dissolução parcial de hemicelulose e a redução estrutural da lignina. Em tal tratamento não são utilizados outros catalisadores ou produtos químicos além da água (JEŃDRZEJCZYK *et al.* 2019). As seguintes vantagens são observadas no tratamento hidrotérmico da biomassa: (a) remoção do processo de desintoxicação do hidrolisado líquido devido à produção tolerável de compostos inibidores; (b) maior eficiência de obtenção de carboidratos, após hidrólise enzimática subsequente; (c) pode ser aplicável a ampla gama de matérias-primas lignocelulósicas, desde resíduos agrícolas até biomassa de algas; (d) pode ser aplicada industrialmente (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018). Entretanto, em temperaturas acima de 160 °C pode levar a formação de compostos tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos solúveis (RAMOS, 2003).

Wang *et al.* (2018) avaliaram o pré-tratamento hidrotérmico da palha de arroz para produção de biogás, em diferentes temperaturas (90 °C, 150 °C, 180 °C e 210 °C) com carga orgânica de 35 g.L⁻¹ e 50 g.L⁻¹ em reatores batelada. Os autores observaram que após o pré-tratamento hidrotérmico a digestão anaeróbia não foi melhorada significativamente, com aumento de apenas 3% da produção de biogás em relação ao controle sem tratamento. Em temperatura maior, os autores verificaram redução de 30% no rendimento de biogás, comparando-se com o tratamento a 180 °C, sendo obtido valor máximo de metano de 175 e 146 mL. g.L⁻¹ para 35 e 50 g.L⁻¹, respectivamente de matéria orgânica. Furfural, xilose, ácido fórmico e oligômero foram observados na maior temperatura de tratamento em 98, 290, 776 e 996 mg.L⁻¹, respectivamente. Nesse estudo, o pré-tratamento hidrotérmico, especialmente em temperaturas maior, não foi recomendado para a produção de metano. No entanto, temperatura menor foi sugerida, porque com o aumento dela no pré-tratamento aumentou a concentração de substâncias inibitórias ao crescimento microbiano.

3.3.2 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico envolve a adição de produtos químicos para modificar a estrutura da lignocelulose, por exemplo, alterar a cristalinidade da celulose e modificar e/ou remover a lignina ou a hemicelulose. Em alguns casos, pré-

tratamentos químicos são combinados com pré-tratamentos físicos, como explosão a vapor ou hidrotermólise.

O pré-tratamento da biomassa lignocelulolística com ácidos é um dos métodos mais eficazes de solubilizar a hemicelulose, tornando a celulose mais acessível. As principais reações durante o tratamento ácido são a hidrólise da hemicelulose e a condensação e precipitação da lignina solubilizada (BAJPAI, 2016).

As principais desvantagens do pré-tratamento com ácido são o ambiente corrosivo das reações e a possível formação de inibidores (hidroximetilfurfural - HMF, furfural e ácido acético) em relação a outras possibilidades de tratamento (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Damião Xavier *et al.* (2018) avaliaram o licor hidrolisado da fração de hemicelulose do substrato da fibra de sisal na produção simultânea de xilitol e etanol, e verificaram que as melhores condições de pré-tratamento foram a 120 °C e 2,5% v/v de ácido sulfúrico. Os autores observaram que acima 2,0 g.L⁻¹ de 5-HMF, 2,0 g.L⁻¹ de furfural e 3,0 g.L⁻¹ de ácido acético em condição fermentativa, houve completa inibição celular.

A ozonização é um dos pré-tratamentos oxidativos também aplicado em biomassa lignocelulósica. Em função do uso do ozônio ocorre ataque à estrutura da lignina e hemicelulose, entretanto, não afeta a fração de celulose. Além disso, por meio desse pré-tratamento é possível quebrar a associação entre esses componentes e obtenção de fração sólida com melhor reatividade para processos subsequentes, como a hidrólise enzimática (TRAVAINI *et al.* 2016). Na ozonização do BCA é gerada fração líquida com elevada concentração de matéria orgânica, todavia, pouco se sabe sobre o seu uso como substrato para a produção de biogás após este pré-tratamento.

Adarme *et al.* (2017) estudaram o pré-tratamento do BCA com ozônio e obtiveram elevada remoção de hemicelulose (48,28%), extensão da deslignificação (45,19%) e solubilização de celulosas (40,7 %). No entanto, observaram compostos inibitórios para digestão anaeróbia, tais como ácido oxálico, butanol, xilitol, furanona, benzaldeído, *d*-eritrotetofuranose, *d*-eritro-pentofuranose e 2,5-furandiona.

O pré-tratamento com ozônio do BCA pode ser energeticamente compensado ao considerar o uso da fração sólida rica em celulose (gerada na etapa de pré-tratamento com biomassa).

3.3.3 Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento físico e químico pode significar mais de 40% dos custos de processamento da biomassa, neste sentido, têm-se o pré-tratamento biológico como alternativa mais sustentável financeiramente (ROUCHES *et al.* 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

O pré-tratamento com consórcio microbiano é realizado por microorganismos cujo substrato é a biomassa lignocelulósica. Por meio do pré-tratamento fúngico ocorre o ataque principalmente à estrutura da lignina (ZHANG *et al.* 2011). Nesse tipo de tratamento, os microorganismos atuam em sinergismo para a hidrólise do material lignocelulósico (RATTI *et al.* 2015).

Bactérias heterofermentativas pode ser a escolha mais adequada para o pré-tratamento biológico de substrato lignocelulolítico, em função da produção de intermediários na forma de ácidos orgânicos e álcoois para a metanogênese e, portanto, são benéficas para a digestão anaeróbia em comparação com as bactérias homofermentativas (NIZAMI; KORRES; MURPHY, 2009). Dentre as bactérias envolvidas na degradação anaeróbia do BCA são relatados os gêneros *Coprothermobacter*, *Clostridium* e *Methanothermobacter* (SOARES *et al.*, 2019b).

Os parâmetros que influenciam o pré-tratamento biológico são composição da biomassa, tamanho das partículas, umidade e características como temperatura e pH (BAJPAI, 2016). Além disso, alguns outros fatores são os seguintes: microorganismos envolvidos, concentração de inóculo, pH, taxa de aeração, tempo e temperatura de incubação. As vantagens deste pré-tratamento são (i) processo sem adição de agentes químicos; (ii) baixa demanda de energia; (iii) nenhuma descarga de compostos nocivos ao meio ambiente e nenhuma produção de resíduos ao longo do processo; e (iv) formação de inibidores de fermentação evitada durante o processo. Apesar de suas vantagens, a aplicação industrial é normalmente descartada, pois requer monitoramento contínuo do crescimento de microorganismos (LIGUORI; FARACO, 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Zhong *et al.* (2011) analisaram o tratamento biológico com agentes microbianos da palha de milho em temperatura ambiente (cerca de 20 °C) com objetivo de melhorar sua biodegradabilidade e produção de biogás. Consórcio microbiano (*Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis*, *Hansenula anomala*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Pleurotus florida*, *Lactobacillus deiliehii*) foi usado para o pré-tratamento biológico. O rendimento de metano foi aumentado em 75,57% com esse consórcio microbiano em relação à condição controle, sem pré-tratamento biológico. Os autores observaram remoção de 25,10% no conteúdo total de lignina, celulose e hemicelulose.

Saritha, Arora e Nain (2012) investigaram o pré-tratamento biológico de palha de arroz com fungo branco (*Trametes hirsuta*) e compararam com o pré-tratamento por explosão a vapor à 121 °C. Sob tais condições, foi observado maior remoção de lignina (52.69%) em relação à condição controle. A maior eficiência de remoção observada após 24 horas para o pré-tratamento biológico (76,5%) foi também superior

à do pré-tratamento por explosão a vapor (74,1%), com produção máxima de carboidratos (52,91 g.L⁻¹).

Castoldi et al. (2014) estudaram o pré-tratamento biológico da serragem de eucalipto com fungos de podridão branca, (*Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Trametes* sp.) com objetivo principal de obter as condições mais adequadas para melhorar a hidrólise enzimática da celulose. Os autores observaram a partir da curva de hidrólise, que a eficiência do tratamento referente à degradação da celulose hidrolisável obedeceu à seguinte sequência: *P. ostreatus* (16,7% da celulose total) > *P. pulmonarius* (15,4%) > *Trametes* sp. (10,1%) > *P. chrysosporium* (2,8%) e sem tratamento (2,8%). Os autores ainda concluíram que as condições de pré-tratamento com *P. chrysosporium* não foram favoráveis para degradação da celulose hidrolisável da serragem de eucalipto.

Yan et al. (2017) estudaram o tratamento biológico combinado com o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Os fungos (*Cupriavidus basilensis*) usados podiam trabalhar nas gotículas de lignina formadas no pré-tratamento com ácido sulfúrico, recuperando rachaduras e buracos na superfície da palha de arroz, deixando estrutura aberta e porosa para facilitar o acesso das enzimas à celulose interna. A digestibilidade enzimática da palha de arroz foi de 70% a 244% no processo combinado da palha de arroz diluída pré-tratado e não tratada, respectivamente.

Montoya et al. (2020) analisaram o perfil taxonômico e funcional do consórcio de bactérias e fungos associados às vias de produção máxima de H₂ e degradação do material lignocelulósico dos resíduos de café em reatores batelada. Para atingir esse objetivo foi obtido consórcio autóctone a partir da água residuária, polpa e casca de café. Os autores verificaram aumento de fenol de 383 para 517 mg.L⁻¹, como resultado da degradação da lignina. Os principais microorganismos hidrolíticos identificados foram *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* com participação na degradação de celulose, hemicelulose e lignina. Em relação aos fungos, foram identificados *Fusarium*, *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces*, relacionados com a produção de enzimas para a degradação de celulose, hemicelulose e pectina, contribuindo para a hidrólise de polpa e casca.

Na Tabela 3.2 estão incluídos os efeitos de diversos microorganismos em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.

Tabela 3.2: Efeitos de diversos microorganismos em diferentes tipos de biomassa em reatores em batelada.

Microrganismo	Biomassa	Efeitos	Referência
Consórcio microbiano	Palha de milho	Remoção de 25% de lignina, celulose e hemicelulose	Zhong <i>et al.</i> (2011)
Fungo <i>Trametes hirsuta</i>	Palha de arroz	Remoção de 52% de lignina	Saritha, Arora e Nain (2012)
Consórcio de fungos	Eucalipto	Hidrólise aumentada em 20 vezes	Castoldi <i>et al.</i> (2014)
Consórcio de fungos	Palha	Hidrólise aumentada em sete vezes	Taha <i>et al.</i> (2015)
Bactérias e fungos autóctones	Resíduos do café	Degradação da lignina	Montoya <i>et al.</i> (2020)
<i>Paraclostridium</i> sp.	Bagaço de Cana	Hidrólise e fermentação da celulose	Rabelo <i>et al.</i> (2020)

3.4 Compostos inibitórios

Além dos aspectos positivos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica como liberação de açúcares, coexistem durante o pré-tratamento, a formação de subprodutos tóxicos as comunidades microbianas como compostos fenólicos, derivados de furanos e ácidos fracos que podem ser inibidores para a produção de hidrogênio via fermentação (CHEN *et al.*, 2013; BEHERA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2015b). Os compostos inibidores são divididos em três grupos principais com base na sua origem, a saber: ácidos fracos, derivados de furanos e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Na Figura 3.2 estão ilustrados os compostos obtidos via hidrólise do BCA.

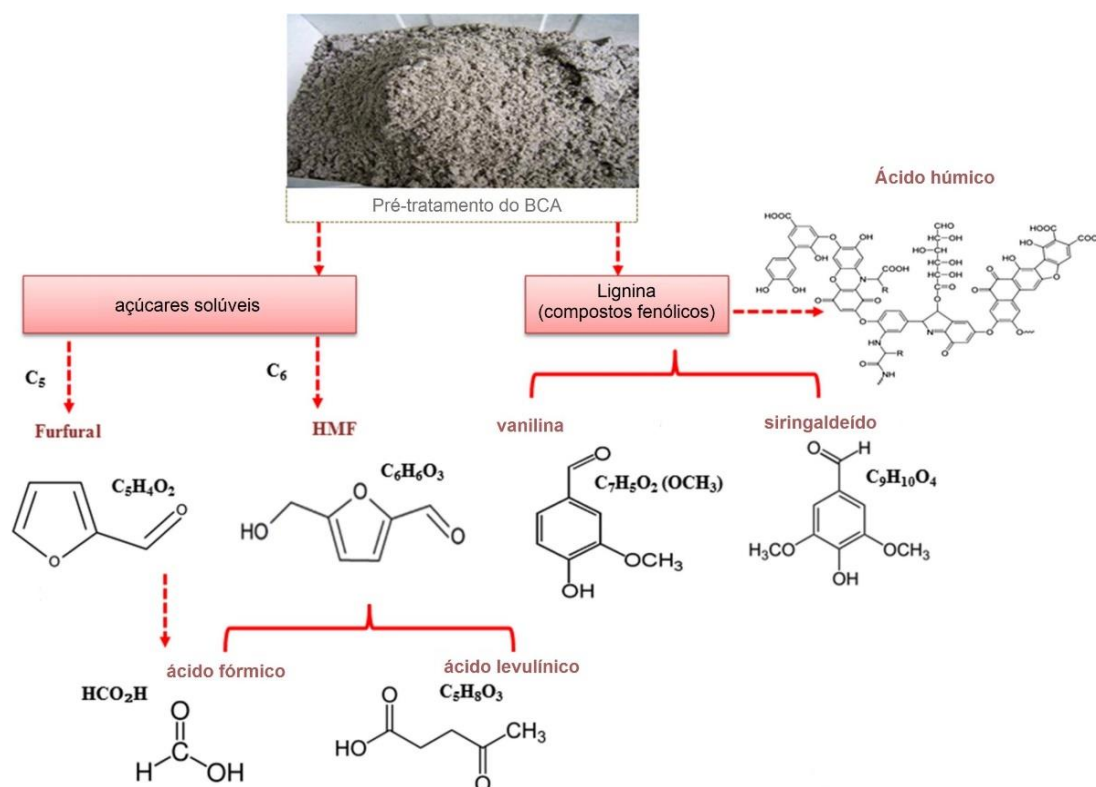


Figura 3.2: Vias de formação de furanos e compostos aromáticos a partir do hidrolisado lignocelulósico do BCA. Fonte: adaptado de Ghasimi *et al.* (2016).

3.4.1 Fenóis

Os compostos fenólicos e aromáticos são geralmente produzidos em pré-tratamentos que envolvem resíduos agrícolas, como a explosão a vapor (GHASIMI *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2016). A partir da degradação da lignina durante o pré-tratamento (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007) ou hidrólise ácida (CAO *et al.*, 2010; MONLAU *et al.*, 2013b; LAI *et al.*, 2014) são produzidos vanilina e siringaldeído (BELLIDO *et al.*, 2011; BARAKAT *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos afetam as membranas celulares, aumentam sua permeabilidade (HIERHOLTZER *et al.*, 2013) e/ou danificam as membranas (KUMAR *et al.*, 2015b). Como resultado disso, não existe barreira protetora para o citoplasma celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), deixando-o vulnerável à destruição por influxo de compostos tóxicos extracelulares. Ademais, o dano à membrana celular também resulta em vazamento de componentes citoplasmáticos como proteínas, potássio ou fosfato (CAMPOS *et al.*, 2009), resultando em redução da velocidade de crescimento bacteriano (KELLY *et al.*, 2008), atividades celulares suprimidas (TAI *et al.*, 2010) além de mudança nas vias de fermentação (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015). Além do mais, os fenóis são mais tóxicos que os furanos com os mesmos grupos funcionais, a vanilina, por exemplo, causa interrupção parcial do gradiente de K^+ nas células (PATRICK *et al.*, 2019). Os

compostos fenólicos em $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ inibiram em até 74% o crescimento das células de *C. beijerinckii* (CHO et al., 2009). Quéméneur et al. (2012) estudaram a produção de hidrogênio em reatores em batelada utilizando xilose como substrato na presença de fenol, em temperatura mesofílica e pH inicial de 5,5. Segundo os autores, houve diminuição da produção de hidrogênio de 64%, ou seja, de $1.367,7 \text{ mL H}_2$ na ausência de fenol e $480,5 \text{ mL H}_2$ com adição de 1 g.L^{-1} de fenol.

3.4.2 Furanos

Derivados de furanos incluem furaldeído (furfural) e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (CHEN et al., 2013; BEHERA et al., 2014; KUMAR et al., 2015b). Furfural é formado a partir da degradação da xilose em alta temperatura e pressão e pode ser convertido em ácidos via fermentação (ou em função do pré-tratamento) ácido fórmico, ácidos fracos, como ácido acético, ácido benzóico, ácido vanílico e ácido fórmico, identificados em hidrolisados lignocelulósicos pré-tratados (ALMEIDA et al., 2009; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; RUIZ et al., 2020). Enquanto a formação de HMF é um produto da degradação de hexoses (glicose, galactose e manose) a partir da hemicelulose da biomassa, podendo ser convertido posteriormente em ácido fórmico e ácido levulínico (GHASIMI et al., 2016; KUMAR et al., 2020). Ambos os inibidores podem resultar do pré-tratamento ácido (FANGKUM; REUNGSANG, 2011; PANAGIOTOPOULOS et al., 2011; ZHANG et al., 2013), tratamento térmico (JUNG; KIM; SHIN, 2011), explosão a vapor (CANTARELLA et al., 2004) e oxidação úmida (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007).

Derivados de furanos podem impedir as atividades de enzimas envolvidas em reações de fermentação (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002; LIN et al., 2015), suprimir o crescimento celular (BELLIDO et al., 2011; LAI et al., 2014; LIN et al., 2015), enquanto causa danos ao DNA e mutações em muitas bactérias, bem como mudanças nas vias de fermentação (ALMEIDA et al., 2009; LIN et al., 2015; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

Furfural é um inibidor chave do hidrolisado lignocelulósico, têm efeitos negativos nas enzimas glicolíticas e fermentativas, além de ser mutagênico e causar fracionamento do DNA (LIU et al., 2019). No entanto, em certas quantidades, esses compostos interferem pouco na atividade microbiana (AKOBI; HAFEZ; NAKHLA, 2016; DESSIE et al., 2019). Além disso, o NADH pode reduzir os derivados de furanos e ser oxidado a NAD^+ (ASK et al., 2013). Isso pode ser prejudicial a fermentação pois o NADH é uma coenzima importante na produção de hidrogênio, uma vez que em concentração mais baixa pode resultar em produção menor de H_2 (LIN et al., 2015). Segundo Veeravalli et al. (2013) a produção de H_2 foi completamente inibida após

adição de 2 g.L⁻¹ de furanos (HMF + furfural combinados). Verificou-se que o furfural e o HMF (3 g.L⁻¹) são estimulantes e não inibitórios para cultura de *Clostridium beijerinckii*, embora a mistura dos dois tenha afetado negativamente a cultura (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2007b). Kumar, Cheon e Kim (2014) verificaram diminuição da produção de hidrogênio em aproximadamente 50%, quando 0,59 g.L⁻¹ de HMF foi adicionada ao meio fermentativo.

3.4.3 Ácidos Orgânicos

Além da produção de hidrogênio a partir do processo fermentativo, outros subprodutos ou metabólitos solúveis também são gerados e incluem ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido fórmico e ácido láctico ou solventes como etanol, acetona ou butanol (WONG; WU; JUAN, 2014). A formação desses metabólitos é dependente da via metabólica percorrida pelos microorganismos e é geralmente classificada como acidogênese, para formação de ácidos orgânicos e solventogênese para produção de solventes (PRAKASHAM et al., 2009; WONG; WU; JUAN, 2014). Embora, em baixos níveis, esses produtos finais possam ser favoráveis para a produção de H₂ (ZHENG; YU, 2005; CIRANNA et al., 2014), altas concentrações podem resultar na inibição do processo, resultando em reduzida geração de hidrogênio (CASTRO-VILLALOBOS; GARCÍA-MORALES; FERNÁNDEZ, 2012; TANG et al., 2012).

Durante a acidogênese, os ácidos orgânicos são produzidos como subprodutos do processo fermentativo e resultam em diminuição do pH da célula (MILLAT et al., 2011). Esses ácidos podem estar em formas dissociadas ou não; ambos os quais têm efeitos inibitórios na produção de hidrogênio (CHONG et al., 2009). Os ácidos dissociados aumentam a força iônica do meio impactando na produção de H₂ devido à lise celular (CIRANNA et al., 2014) resultando na mudança da acidogênese para a solventogênese (CHONG et al., 2009). Já os ácidos fracos na forma não dissociada, penetram dentro das células para liberar o ânions e prótons, o que interrompe o pH intracelular (WANG; SUN; YUAN, 2018). O influxo de prótons no citoplasma da célula cria um desequilíbrio de pH e a diminuição resultante no pH intracelular pode afetar as atividades metabólicas ao mesmo tempo que causa a morte celular e conseqüentemente compromete a produção de hidrogênio (TANG et al., 2012; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Para manter um gradiente constante de pH na membrana, os prótons são forçados para fora do citoplasma da célula por meio de um sistema acionado por trifosfato de adenosina (ATP) e a energia (na forma de ATP celular) é consumida (CHONG et al., 2009).

Os hidrolisados lignocelulósicos também contêm ácidos fracos, principalmente ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Os furanos (furfural e HMF) podem ser convertidos em ácidos fracos (ácido levulínico e ácido fórmico) em condições de pré-tratamento como acidez e temperatura (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Já o ácido acético é gerado após a hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose durante os pré-tratamentos térmicos e termoquímicos (PANAGIOTOPOULOS et al., 2011). Ácidos fracos advindos do pré-tratamento do BCA podem ser inibidores de processos fermentativos (SANTUCCI et al., 2015; BAËTA et al., 2016a). O ácido fórmico, por exemplo, pode ser mais tóxico que o acético e ácido levulínico porque permeia mais facilmente através da membrana celular (CHO; SHIN; KIM, 2012). Kumar, Cheon e Kim (2014) analisaram a produção de hidrogênio em reatores em batelada com pH inicial 7 e temperatura mesofílica, alimentados com glicose. Os autores observaram diminuição em 50% da produção de H₂ para 1,55 g.L⁻¹ de ácido levulínico e 12,50 g.L⁻¹ de ácido fórmico.

3.5 Fermentação

Dentre as possibilidades de produção de H₂ tem-se processos sustentáveis e ecológicos como, por exemplo, a fermentação a partir da biomassa renovável (RAHMAN et al., 2016). A utilização de resíduos lignocelulósicos, como os florestais-industriais, agroindustriais, é particularmente interessante devido à abundância e disponibilidade desses tipos de materiais (MONLAU et al., 2013a; KUMAR et al., 2020).

Ampla variedade de microorganismos pode produzir hidrogênio por meio de suas vias metabólicas em condições anaeróbias. Os microorganismos que requerem condições anaeróbias estritas estão incluídos entre os anaeróbios obrigatórios, como o gênero *Clostridium*. A principal característica deste gênero é a possibilidade de realizar a fermentação a partir de diversas fontes de carbono. Além disso, sobrevive em condições adversas como altas temperaturas, pH e presença de substâncias tóxicas. Tais bactérias produzem H₂ durante a fase exponencial e uma vez atingida a fase estacionária, o fluxo metabólico será deslocado para o acúmulo de ácidos orgânicos, visto que a quantidade de substrato ficará escassa, e dependendo do tipo de substrato utilizado para fermentação por *Clostridium* ocorre a formação de hidrogênio e ácidos orgânicos, tais como ácido acético e ácido butírico (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012).

Lin et al. (2007) averiguaram o desempenho da produção de hidrogênio de quatro espécies *Clostridium* sp., incluindo *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C.*

tyrobutyricum e *C. beijerinckii*. Por meio dos experimentos em batelada foi observado que todas as cepas testadas fermentaram glicose, reduziram do pH médio de 7,2 para valor entre 4,6 e 5,0, e produziram ácido butírico (0,37-0,67 mmol/mmol-glicose) e ácido acético (0,34-0,42 mmol/mmol-glicose) como metabólitos principais. Dentre as linhagens examinadas, foi verificado para *C. beijerinckii* e *C. tyrobutyricum* maior e menor produção de hidrogênio, respectivamente de 2,81 mmol/mmol-glicose e 1,47 mmol/mmol-glicose.

As culturas mistas sob condição controlada podem realizar a fermentação em fontes complexas de carbono orgânico e produzir hidrogênio. Estas culturas podem utilizar substratos orgânicos que fazem parte da composição de resíduos industriais, resíduos agrícolas, lodo de esgoto e resíduos domésticos.

Antonopoulou *et al.* (2007) estudaram a produção comparativa de hidrogênio fermentativo a partir da mesma fonte de substrato (extrato de sorgo) utilizando cultura microbiana acidogênica mista e cultura pura de *Ruminococcus albus*. O maior rendimento de hidrogênio obtido do extrato de sorgo fermentado com culturas microbianas mistas em sistema contínuo foi de 0,86 mol H₂/mol glicose com tempo de detenção hidráulica de 12 horas em reator tanque agitado contínuo. Por outro lado, o rendimento de hidrogênio obtido do extrato de sorgo com a cultura pura *R. albus* foi de 2,1-2,6 mol H₂/mol de glicose. Assim, nas condições com *R. albus* foi observado aumento de três vezes a produção de hidrogênio do extrato de sorgo em comparação ao obtido a partir da cultura mista acidogênica. Entretanto, o inconveniente de usar uma cultura microbiana pura para a produção de hidrogênio a partir da biomassa do sorgo em comparação com o uso da cultura acidogênica mista, é a necessidade de manter condições esterilizadas como consequentes requisitos de energia extra, como autoclavagem.

Em outro estudo, Kotay e Das (2010) investigaram o uso de lodo de esgoto como substrato para a produção de hidrogênio em reatores em batelada utilizando consórcio microbiano composto de três bactérias: *E. cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Bacillus coagulans*, que foram isoladas do lodo anaeróbio pré-tratado. Entre estas, *B. coagulans* foi a espécie dominante. As produções máximas de H₂ da cultura pura e do consórcio microbiano foram de 37,16 e 41,23 mL H₂, respectivamente. Esta produção de hidrogênio foi quase 13% maior em relação àquele com cultura pura. Assim, observa-se que é possível obter maiores produções, tanto com cultura pura, quanto com consórcios microbianos, dependendo dos substratos e da composição fisiológica e taxonômica dos consórcios utilizados.

Teoricamente, a conversão de 1 mol de glicose produz 12 mol de hidrogênio gasoso (H₂) (WOODWARD *et al.*, 2000). Os anaeróbios facultativos produzem 2 mol

de hidrogênio a cada mol de glicose consumida para conversão a ácido acético, enquanto os anaeróbios obrigatórios podem produzir 4 mol de hidrogênio por mol de glicose na via acética e 2 mol na via butírica (YOSHIDA et al., 2006). Esse valor representa apenas 33% do valor máximo (12 mols H₂) a partir de uma molécula de glicose (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

Nasirian *et al.* (2011) avaliaram a produção de hidrogênio a partir da palha de trigo através do pré-tratamento ácido em reatores em batelada em temperatura de 35 °C e pH 5,4, utilizando cultura mista em reator acidogênico. Segundo os autores, a melhor produção de 168,4 mL H₂ g.SV⁻¹ foi obtida com pré-tratamento com ácido sulfúrico a 2% por 90 min. a 120 °C. Por outro lado, nas condições sem o pré-tratamento a produção de H₂ foi de apenas 6,4 mL H₂ g.SV⁻¹.

Han *et al.* (2012) avaliaram a partir de experimentos em batelada, a produção biohidrogênio a partir da palha de soja após o pré-tratamento, e lodo anaeróbio como inóculo. Os experimentos foram conduzidos à 35 °C e pH inicial 7,0. Foram estudados os efeitos dos pré-tratamentos ácido (HCl), alcalino (NaOH), peróxido de hidrogênio, peróxido de ácido e peróxido alcalino na biomassa da palha de soja para produção de biohidrogênio. Conforme o estudo, HCl a 4% foi a melhor escolha para o pré-tratamento da palha de soja para produção de biohidrogênio. Produção máxima de hidrogênio de 47,65 mL foi alcançada nesta condição, que foi aproximadamente 9 vezes maior do que a palha de soja sem pré-tratamento (5,46 mL H₂). Ainda, segundo o estudo, na melhor condição de produção de H₂, os principais metabólitos solúveis formados no fim da fermentação foram ácido butírico (1.467 mg.L⁻¹) e ácido acético (475 mg.L⁻¹).

Liu et al. (2013) estudaram a produção de biohidrogênio a partir do hidrolisado da palha de arroz pré-tratado com ácido sulfúrico, com lodo pré-tratado hidrotermicamente. A produção de biohidrogênio foi avaliada em diferentes condições iniciais de pH (de 5 a 9) e concentrações do hidrolisado 10, 15, 20, 25 e 30 (g de carboidratos/L) à 37 °C em reatores em batelada. As maiores produções de H₂ foram em pH inicial de 7 e 6, com 97,30 mL/100 mL e 92,80 mL/100 mL, respectivamente. A maior produção de H₂ foi obtida em pH inicial 7. A partir disto, os autores avaliaram o efeito da concentração do hidrolisado neste pH e verificaram para 25 g carboidratos/L da hidrolisado maior produção de biohidrogênio de 84,07 mL. Os ácidos butírico e acético foram os principais metabólitos solúveis formados durante a fermentação nesta condição, correspondendo a 45,19 e 31,07%, respectivamente.

Zhang, Ren e Wang (2014) avaliaram a produção de biohidrogênio em reatores em batelada (anaeróbio) a partir do hidrolisado da palha de milho obtido com pré-tratamento ácido em temperatura ambiente de 37 °C. Os inóculos utilizados nesse

estudo foram lodo anaeróbio de sedimento de rio e lodo granular de reator anaeróbio. Os inóculos foram submetidos a diferentes processos de pré-tratamento (calor, ultrassônico, ultravioleta, ácido e base) a fim de avaliar qual melhor tipo de pré-tratamento para produção de biohidrogênio. Por meio do pré-tratamento com calor foi observado maior produção de H₂, para ambos os inóculos utilizados, respectivamente de 436,0 mL.L⁻¹ e 296,1 mL.L⁻¹). Os principais metabólitos solúveis da condição ótima foram ácido acético (2.257 mg.L⁻¹) e etanol (613.9 mg.L⁻¹). Ainda conforme os autores, os melhores desempenhos na produção de H₂ foram acompanhados com o aparecimento de *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp, que foram identificados como microorganismos produtores de H₂ e eficientes ao usar vários substratos complexos.

Nasr et al. (2014) investigaram a produção de biohidrogênio em reatores em batelada a partir do hidrolisado de sabugo de milho. Neste estudo, quatro pré-tratamentos diferentes de sabugo de milho foram avaliados, DP (pré-tratamento de ácido diluído), DS (pré-tratamento de ácido diluído - corrente de compressão), HP (pré-tratamento de auto-hidrólise de alta pressão) e HS (pré-tratamento de auto-hidrólise de alta pressão - corrente de compressão). Os experimentos foram feitos em reatores em batelada em pH inicial de 5,5 e temperatura de 37 °C. Os autores concluíram que a maior produção de H₂ (141 mL.g⁻¹ DQO) foi obtido nas condições do pré-tratamento com ácido diluído - corrente de compressão (DS). Além disso, verificaram que a produção e rendimento de hidrogênio não foram prejudicados em função de 0,05 a 0,14 g.L⁻¹ de HMF e entre 0,21-1,09 g.L⁻¹ de furfural.

Phummala *et al.* (2014) estudaram a produção de biohidrogênio em reatores em batelada a partir do hidrolisado de pauzinhos de madeira descartáveis, que são usados em restaurantes, refeitórios, supermercados e lojas de conveniência no Japão, tornando um resíduo lignocelulósico interessante para a produção de bioenergia. O pré-tratamento alcalino com NaOH a 2% e 100 °C foi utilizado para remoção da lignina. Foram avaliados a influência da variação do pH (5,5-9) e temperatura (40-60 °C com incrementos de 5°C) para produção do hidrogênio e investigado a viabilidade de usar o hidrolisado de pauzinhos de madeira descartáveis como matéria-prima para a produção de H₂ fermentativo, com cultura enriquecida de fonte termal. Conforme o estudo, para condições de pH inicial de 7,0 a 50 °C foi obtida a maior produção de H₂. Além disso, foi observado que o hidrolisado foi um substrato para a produção de H₂, cuja produção acumulada de H₂ 564 mL foi obtida na melhor condição. Ainda, segundo o estudo, ao final da fermentação, os ácidos acético e butírico foram os principais metabólitos solúveis produzidos, respectivamente de 6,63 mmol.L⁻¹ e 5,71 mmol.L⁻¹. Assim, a fermentação ocorreu pela via acética-butírica. Ademais, nenhum

metano foi observado durante os experimentos, mesmo quando nenhum pré-tratamento foi realizado antes do enriquecimento da água da nascente termal.

Ghimire et al. (2015) investigaram a produção de biohidrogênio de seis diferentes tipos de resíduos de biomassa típicos da região da Campânia (Itália). Lodo anaeróbio pré-tratado com o inibidor metanogênico foi usado como inóculo. Os testes foram realizados em reatores em batelada à 36 °C e pH inicial 7,4. Os valores máximos de hidrogênio em ordem decrescente foram os seguintes: resíduos de batata e abóbora (171,1 mL H₂), esterco de búfala (135,6 mL H₂), sangue seco (resíduos de matadouro, 87,6 mL H₂), resíduos de funcho (58,1 mL H₂), bagaço de azeitona (54,9 mL H₂) e águas residuais de moinho (46,0 mL H₂). Ainda segundo os autores, no caso das águas residuais do moinho de azeite, o menor rendimento de H₂ foi devido à presença de polifenóis, que podem ter um efeito inibitório sobre muitas bactérias fermentativas, que pode eventualmente afetar o metabolismo microbiano. Já para os resíduos de batata e abóbora, as maiores produções de hidrogênio foram relacionadas a composição desta biomassa, devido a celulose e hemicelulose que são fontes de carboidratos. O principal metabólito produzido foi o ácido acético (126,32 mg.L⁻¹) que segundo os autores, foi favorecido devido ao pH inicial. Assim, a composição dos substratos influenciou diretamente na geração de biohidrogênio.

Moodley e Kana (2015) estudaram a produção de H₂ de folhas de cana-de-açúcar via pré-tratamento híbrido envolvendo HCl e calor úmido, para produção de biohidrogênio em reatores em batelada com pH inicial de 6,5 e temperatura de 37 °C, com lodo anaeróbio de uma estação de tratamento pré-tratado. A Metodologia de Superfície Resposta (MSR) foi usada para otimizar o pré-tratamento híbrido. Por meio do pré-tratamento híbrido otimizado (HCl 5.28%, temperatura de 94,40 °C e tempo de 187 min.) foi observado as maiores concentrações de xilose (8,6 g.L⁻¹) e glicose (1,78 g.L⁻¹). Segundo os autores, os microorganismos priorizaram a glicose do que a xilose. Durante a fase exponencial, a concentração de glicose diminuiu de 2,096 g.L⁻¹ para 0,9 g.L⁻¹, enquanto a concentração de xilose permaneceu relativamente estável. O rendimento de hidrogênio nesse estudo foi de 248,05 mL H₂ g⁻¹ de açúcar fermentável. As folhas da cana-de-açúcar, geralmente queimadas durante a colheita, podem ser uma excelente fonte renovável de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis como o hidrogênio.

Montoya et al. (2020) investigaram as condições de fermentação para otimização da produção de H₂ a partir dos resíduos do café (polpa e casca) com microorganismos autóctones dos resíduos servindo de fonte de bactérias e fungos. Os experimentos foram realizados em reatores batelada, avaliando a influência de três principais fatores: pH (variando de 4,82-8,18), concentração dos substratos de casca,

polpa (variando de 6,95-17,05 g.L⁻¹) e *headspace* (variando de 33,18-66,82%) e temperatura de 37 °C. Os autores utilizaram planejamento experimental e MSR para otimização da melhor condição de produção de H₂. Na condição otimizada de H₂ houve uma produção de 240 mL H₂ com pH inicial 7,00, 7 g.L⁻¹ de casca e polpa e 30% de *headspace*. Os principais metabólitos solúveis observados foram ácido butírico (3.838 mg.L⁻¹), ácido isobutírico (506 mg.L⁻¹), metanol (226 mg.L⁻¹) e butanol (156 mg.L⁻¹). Ainda segundo o estudo, foi observado para os reatores com resíduo de café predomínio da rota do ácido butírico, consumo de carboidratos e degradação do fenol para produção de H₂.

Camargo *et al.* (2021) avaliaram a produção de biohidrogênio com resíduos sólidos de laranja a partir de um inóculo alóctone pré-tratado para inibição das arqueias metanogênicas, em reatores em batelada, em temperatura de 30 °C. Sob tais condições foi avaliada a concentração de inóculo (2,0 a 5,7 g.STV.L⁻¹), concentração do substrato (1,5 a 29,8 g.L⁻¹) e pH inicial (3,5 a 8,98). Os autores observaram que a condição ótima para produção de H₂ foi a seguinte: 4,0 g.STV.L⁻¹ de inóculo, 29,8 g.L⁻¹ de resíduos sólidos e pH inicial de 8,98, resultando em 48,47 mmol.L⁻¹ H₂. A acetogênese foi a via metabólica predominante, com concentrações máximas de ácido butírico (3.731 mg.L⁻¹) e ácido acético (3.516 mg.L⁻¹) obtidas no ensaio de validação. O gênero *Clostridium* foi predominante na condição de maior produção de H₂.

Mazareli *et al.* (2021) avaliaram a produção de biohidrogênio a partir de resíduos da banana em reatores batelada. Para tanto, foi avaliado o pH (5,09 a 7,91) e temperatura (27,1 a 46,9 °C), a fim de chegar na condição otimizada de produção de H₂. Nesse estudo foi utilizado planejamento experimental e MSR para avaliar a influência entre pH e temperatura na produção de biohidrogênio. A fonte de bactérias autóctones utilizada como inóculo em todos os ensaios foi obtida a partir de resíduos de banana por fermentação natural em reator batelada. A condição ótima de produção de H₂ foi em pH inicial 7,0 e temperatura de 37 °C, produzindo nessa condição, 70,19 mL H₂. Na condição otimizada, os principais ácidos orgânicos observados foram butírico (1,33 g.L⁻¹) e acético (0,65 g.L⁻¹). Nesse estudo, foi verificada influência do pH na produção de H₂. Por exemplo, nas condições em que o pH inicial era de 5,09 e 5,5, observou-se as menores produções de H₂, com valores entre 6,06 e 11,65 mL H₂, respectivamente. Ainda segundo o estudo, em pH ácido foi favorecida a formação de ácido acético e ácido butírico na forma não dissociada, o que pode ter afetado as células, refletindo na baixa produção de biohidrogênio.

Diante do exposto, os diversos resíduos lignocelulósicos de segunda geração são fontes de biomassa promissora para produção de biohidrogênio em condições anaeróbias, estão listados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Produção de biohidrogênio em reatores em batelada com resíduos lignocelulósicos de segunda geração.

Biomassa	Pré-tratamento	Biogás (H ₂)	Temperatura (°C)	Fonte de inóculo	Principais metabólitos solúveis	Referência
Palha de trigo	ácido	168,4 mL g.SV ⁻¹	35	Lodo acidogênico de reator de mistura (CSTR)	-	Nasirian <i>et al.</i> (2011)
Palha de soja	ácido	47,75 mL	35	Lodo anaeróbio	acetato e butirato	Han <i>et al.</i> (2012)
Hidrolisado palha de arroz	ácido	97,30 mL/100 mL	37	Lodo anaeróbio	butirato e acetato	Liu <i>et al.</i> (2013)
Hidrolisado sabugo de milho	ácido	141 mL g.DQO ⁻¹	37	Lodo anaeróbio	-	Nasr <i>et al.</i> (2014)
Hidrolisado palha de milho	ácido	436 mL.L ⁻¹	37	Lodo de rio	acetato e etanol	Zhang, Ren e Wang (2014)
Hidrolisado de pauzinhos de madeira descartáveis	alcalino	564 mL.L ⁻¹	50	Lodo anaeróbio de fonte termal	acetato e butirato	Phummala <i>et al.</i> (2014)
Resíduos de batata e abóbora	-	171,1 mL	36	Lodo anaeróbio	acetato	Ghimire <i>et al.</i> (2015)
Palha de cana-de-açúcar	HCl e calor úmido	248,05 mL	37	Lodo anaeróbio	-	Moodley e Kana (2015)
Resíduos de café	-	240 mL	37	Inóculo autóctone	butirato	Montoya <i>et al.</i> (2020)
Resíduos de citros	-	48,47 mmol.L ⁻¹	30	Lodo anaeróbio	acetato e butirato	Camargo <i>et al.</i> (2021)
Resíduos de banana	-	70,19 mL	37	Inóculo autóctone	acetato e butirato	Mazareli <i>et al.</i> (2021)

Nota: (-) Não especificado.

3.6 Produção de ácido butírico através da fermentação

Os processos de fermentação compreendem três fases distintas: hidrólise, acidogênese e acetogênese. Na primeira fase (hidrólise), materiais orgânicos complexos são convertidos em monômeros simples (DAHIYA *et al.*, 2015). Na segunda e terceira fase (acidogênese e acetogênese, respectivamente), esses monômeros são em seguida transformados em ácidos orgânicos e álcool, H₂ e CO₂. Dentre os ácidos orgânicos e álcool estão incluídos ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido láctico e etanol como metabólitos solúveis. Geralmente, a produção de hidrogênio é favorecida pela formação dos ácidos acético e butírico, enquanto o gás hidrogênio é consumido pelos microorganismos produtores de ácido propiônico (RAJESH BANU *et al.*, 2021).

A produção de ácido butírico via fermentação é uma alternativa atrativa empregando diferentes tipos de culturas, incluindo *Clostridium barkeri*, *C. thermobutyricum*, *Butyribacterium* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Sarcina* e *Eubacterium limosum* (WAINAINA *et al.*, 2019).

O-Thong *et al.* (2008) investigaram a relação C/N e a concentração de ferro na produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores batelada em pH inicial 5,5 e temperatura 37 °C usando planejamento experimental e MSR. Neste estudo foram utilizadas águas residuárias de óleo de palma como substrato. Na condição otimizada de produção de H₂, com relação C/N de 74 e concentração de FC²⁺ de 257 mg.L⁻¹ foi obtido 762 mL H₂, com maior e menor proporção de ácido butírico e ácido propiônico com 6,2 g.L⁻¹ e 120 mg.L⁻¹, respectivamente.

Lazaro *et al.* (2014) analisaram três diferentes cepas produtoras de hidrogênio em condições mesofílicas utilizando glicose como substrato. Nas condições com a cepa CA foi observado maior produção de H₂ (1,8 mol H₂ mol⁻¹ de glicose) e também maior concentração de ácido butírico (2 g.L⁻¹). Por outro lado, o menor rendimento de hidrogênio, 0,2 mol H₂ mol⁻¹ de glicose, foi obtida nas condições com a cepa C1, todavia, com produção de ácido acético como seu principal subproduto (1,7 g.L⁻¹). Provavelmente, a cepa C1 foi capaz de realizar a via da homoacetogênese, o que explica o baixo rendimento de hidrogênio e a produção de ácido acético relativamente alta.

Baroi *et al.* (2015) reportaram que o ácido butírico, ácido acético e hidrogênio foram os principais produtos derivados do processo de fermentação anaeróbia por *C. tyrobutyricum* e a geração máxima de ácido butírico a partir de glicose e xilose foi de 0,49 g.g⁻¹ de açúcar. Xiao *et al.* (2018) relataram que a produção máxima de ácido butírico de 20,75 ± 0,65 g.L⁻¹ foi obtida utilizando o hidrolisado de casca de milho com

fermentação acidogênica em biorreator de cama fibrosa imobilizado com *C. tyrobutyricum*.

Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) utilizaram reator anaeróbio de leito estruturado com lactato como substrato e inóculo de vinhaça e observaram rendimento de ácido butírico de 5 g.L⁻¹, e hidrogênio de 2.074 mL H₂.L⁻¹.d⁻¹ com pH na faixa de 5-5,5.

Durante a produção de hidrogênio, a quantidade de ácido butírico acumulado no meio de fermentação pode ser tão alta quanto 74,8% do total de produtos microbianos solúveis (ABREU *et al.*, 2009).

A Figura 3.3 ilustra o preço de mercado de vários produtos de valor agregado recuperados via biorrefinaria integrada de biohidrogênio.

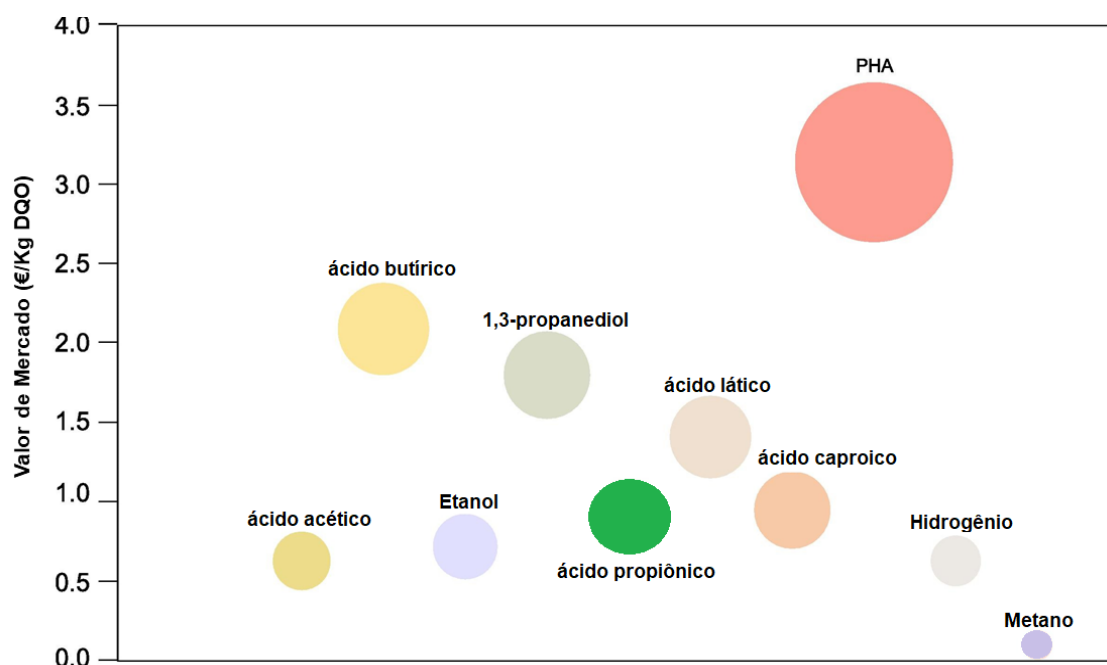


Figura 3.3 - Preço de mercado de vários produtos de valor agregado recuperados por meio de biorrefinaria integrada de biohidrogênio.

Fonte: Adaptado de Rajesh Banu *et al.* (2021).

3.7 Produção de biohidrogênio a partir do BCA

São necessários altos teores de celulose e hemicelulose em vez de lignina. Esses carboidratos são facilmente convertidos em açúcares fermentáveis como glicose e xilose por hidrólise. A lignina é a parte não fermentável dos materiais lignocelulósicos, e o hidrogênio não é gerado a partir da lignina (CHENG *et al.*, 2010; KLIMIUK *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2012). O potencial energético dos substratos lignocelulósicos está correlacionado com a soma do conteúdo de celulose e lignina. Quanto maior o conteúdo de celulose e lignina, menor o potencial de biogás

(BUFFIERE et al., 2006). O uso de hidrolisados de resíduos lignocelulósicos para produção de bioenergia pode abrir caminho para integração sustentável, conforme defendido por alguns autores (DIAS et al., 2013; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; KUMAR et al., 2020).

A hidrólise de material lignocelulósico resultará em uma mistura de glicose e xilose após a separação da lignina. Embora, a glicose seja conhecida como a fonte de carbono mais preferida pelos organismos produtores de hidrogênio, foi relatado que a xilose é o açúcar preferido em relação a glicose para obter maiores rendimentos de hidrogênio por substrato (PRAKASHAM et al., 2009). Os hidrolisados com a menor relação glicose/xilose de 1:10 resultaram em maior utilização de xilose, maior produção de hidrogênio e nenhum acúmulo de ácido acético que poderia ser inibitório para a produção de hidrogênio, através da mudança metabólica de produção de hidrogênio para etanol (ZHANG et al., 2015). Patel et al. (2015) relataram que nas condições com xilose resultou em maior produção de hidrogênio e ácidos orgânicos dentre outras fontes de carbono como celulose, celobiose, amido e sacarose.

O rendimento teórico da formação de hidrogênio a partir da xilose é de 3,33 mol H₂ por mol de xilose. O rendimento observado de produção de biohidrogênio variam de acordo com as culturas utilizadas. Alguns dos rendimentos observados com xilose foram 0,45 mol H₂ por mol de xilose com cultura pura de *Bacillus firmus* (SINHA; PANDEY, 2014) e 0,56 mol H₂ por mol de xilose pela cultura mista de *Caldoanaerobacter subterraneus* e *Caloramator fervidus* (YOKOYAMA et al., 2007).

No Brasil, como um dos maiores produtores mundiais de etanol a partir da cana-de-açúcar, gera-se anualmente quantidade significativa de BCA, resíduo lignocelulósico de segunda geração para produção de bioenergia. No processo convencional para geração de açúcar e etanol a partir da cana, também chamado de Etanol 1G, são produzidos bagaço e palha de cana. A utilização desses materiais para produção de etanol de segunda geração ou 2G, tem sido estudada por Rabelo et al., (2011) e Santos et al. (2020). A produção de etanol, a partir da cana-de-açúcar, envolve processos como pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação (DIAS et al., 2015).

Representação dos possíveis resíduos da produção de etanol 1G e 2G para a produção de biohidrogênio via fermentação está ilustrada na Figura 3.4.

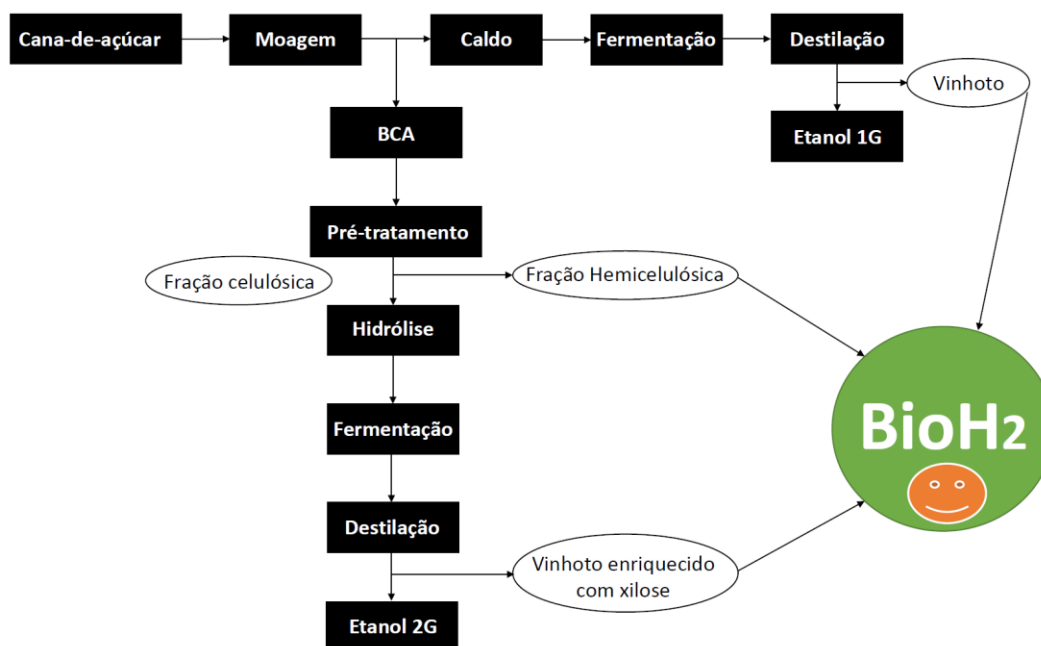


Figura 3.4: Resíduos da geração de etanol 1G e 2G para produção de biohidrogênio.

O pré-tratamento hidrotérmico da biomassa resulta em duas frações principais: a fração sólida constituída principalmente de celulose (hexose: glicose) (KLINKE *et al.*, 2002) e a fração líquida, chamada de hidrolisado hemicelulósico ou licor de pentoses, consistindo principalmente de xilose (pentose: xilose e arabinose) (BERCIER; PLANTIER-ROYON; PORTELLA, 2007). Pentose não é fermentável pela levedura convencional utilizada no processo fermentativo para produção de bioetanol (*Saccharomyces cerevisiae*) (JIN; JEFFRIES, 2004). Dessa forma, o licor de pentoses gerado a partir do pré-tratamento do BCA, tem gerado bastante interesse para bioconversão em H₂ por processos fermentativos, devido ao aproveitamento na bioconversão desse carboidrato por bactérias fermentativas para geração de biohidrogênio e compostos de alto valor agregado (PATTRA *et al.*, 2008; CANILHA *et al.*, 2011, 2012; REDDY *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2017; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018).

O vinhoto gerado no decorrer do processo de etanol 1G e o vinhoto enriquecido com xilose produzido durante o processo de etanol 2G (quando não ocorre a separação das frações de hexoses e pentoses) consistem em possíveis substratos para as bactérias fermentativas na produção de biohidrogênio (FERNANDES *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2012).

O licor de pentoses é gerado a partir do pré-tratamento hidrotérmico do material lignocelulósico, e tem em sua composição, elevadas concentrações de pentoses e hexoses. Além destes, encontra-se no licor, compostos como 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e monômeros fenólicos provenientes da

decomposição da lignina (vanilina, siringaldeído), hemicelulose e celulose (Figura 3.2). Ribeiro *et al.* (2017) caracterizaram o licor de pentoses do BCA pré-tratado hidrotérmicamente, com valores de pH (3,14), matéria orgânica (88,16 g.L⁻¹), xilose (18,40 g.L⁻¹), arabinose (0,66 g.L⁻¹), ácido acético (10,98 g.L⁻¹), HMF (7,92 g.L⁻¹) e furfural (3,93 g.L⁻¹).

Pattra *et al.* (2008) estudaram os efeitos do pH inicial e da concentração inicial de carboidratos totais (licor de pentoses gerado a partir do pré-tratamento do BCA com H₂SO₄) na produção de biohidrogênio por *Clostridium butyricum*. Os experimentos foram conduzidos em reatores batelada e temperatura de 37 °C. A variação de pH inicial nos experimentos foi na faixa de 5,0 a 8,0 com incrementos de 0,5. Nessas faixas de pH, todas as condições foram obtidas produção de H₂, exceto na condição de pH inicial de 5,0. Segundo os autores, no pH inicial 5,0, pode ter ocorrido protonação de ácidos fracos não dissociados no meio, que podem atravessar a membrana celular diretamente para o citoplasma, causando perda das atividades enzimáticas glicolíticas e danos estruturais a membrana celular. A maior produção acumulada de biohidrogênio, ocorreu com pH inicial 5,5, com produção de 180 mL H₂. A partir da melhor faixa do pH, os autores avaliaram a influência da concentração de carboidratos totais (em termos de DQO) do hidrolisado. A concentração de carboidratos foi ajustada em 1,5, 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 e 40,0 g DQO.L⁻¹, pH inicial fixado em 5,5. Ainda segundo o estudo, a produção de hidrogênio foi menor com uma concentração de 40,0 g DQO.L⁻¹ (1,41 mol H₂.mol.açúcar⁻¹) do que o obtido na melhor condição 20,0 g DQO.L⁻¹ (1,73 mol H₂.mol.açúcar⁻¹), indicando possível inibição por substrato nessa concentração.

Sangyoka; Reungsang e Lin (2016) estudaram os efeitos da concentração de substrato e inóculo na produção de H₂ através do hidrolisado do BCA, obtido após pré-tratamento com 0,5% (v/v) com ácido sulfúrico a 121 °C, utilizando planejamento experimental e MSR para otimizar a melhor condição da produção de H₂. O inóculo usado neste estudo foi de um reator de planta piloto de produção de hidrogênio. Todos os experimentos ocorreram em reatores em batelada com temperatura de 37 °C e pH inicial 6,0. A concentração do substrato e inóculo tiveram influência significativa na produção de H₂. Condição ótima foi observada com 22,77 g.L⁻¹ de carboidratos totais, e 0,31 referente a razão entre inóculo e substrato, resultando em produção otimizada de H₂ de 6.980 mL.

Thungklin, Sittijunda e Reungsang (2018) estudaram a influência da variação de pH e da concentração de carboidratos na produção de biohidrogênio, a partir do licor de pentoses gerado do BCA tratado por explosão à vapor. Os experimentos foram conduzidos em reatores em batelada e temperatura de 37 °C com inóculo fermentativo

de reator UASB, em pH inicial 6,00. Cinco condições de concentrações iniciais de carboidratos do licor de pentoses foram utilizadas: 5 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹, 30 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹. Os autores verificaram para concentração de carboidratos totais (10 g.L⁻¹) do licor de pentoses foi obtido o maior rendimento de 228 mL H₂ g⁻¹.açúcar. Ainda, verificaram diminuição da produção de H₂ quando a concentração inicial de carboidratos totais foi superior a 10 g.L⁻¹, onde um aumento na concentração inicial de substrato favoreceu a produção de hidrogênio até certo nível. Todavia, concentração excessiva de substrato resultou no acúmulo de ácidos orgânicos, levando ao pH ácido no sistema. Além disso, a diminuição do pH causada pelo acúmulo de ácidos orgânicos pode ter levado a uma mudança na via metabólica dos microorganismos ou na população microbiana.

Rabelo *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da concentração de BCA entre 0,80 e 9,20 g.L⁻¹ e do pH entre 4,60 e 7,40 sobre a produção de biohidrogênio e de ácidos orgânicos. Os experimentos ocorreram em reatores em batelada com temperatura de 37 °C, utilizando consórcio microbiano autóctone (*Clostridium* e *Paenibacillus*, bactérias autóctones do BCA) e alóctone (*Clostridium*, *Bacillus* e *Enterobacter*). Os autores utilizaram o planejamento experimental para a otimização dos experimentos e maximização da produção de H₂ e ácidos orgânicos. As condições otimizadas obtidas foram de 7,00 g.L⁻¹ do BCA e pH inicial de 7,20. Sob tais condições foi observada produção máxima de 64,32 mL H₂. Os principais ácidos orgânicos observados no processo de fermentação foram ácidos butírico (1,88 g.L⁻¹) e succínico (1,65 g.L⁻¹). Ainda, neste estudo a produção de hidrogênio foi 98,57% superior ao observado nas condições com BCA de 5,00 g.L⁻¹ e pH inicial de 4,60 com produção de 3,84 mL H₂.

Soares *et al.* (2018) investigaram os efeitos da concentração de extrato de levedura (0,58 g.L⁻¹ a 3,00 g.L⁻¹) e quantidade de substrato (3,58 g.L⁻¹ a 6,00 g.L⁻¹) na produção de H₂ através da fibra do BCA gerada após o pré-tratamento hidrotérmico, usada como substrato. No estudo, foi feito um planejamento experimental com superfície de resposta para obter-se a otimização do processo, a fim de identificar a concentração ideal de nutrientes e substratos para melhorar a produção de biohidrogênio. O estudo foi conduzido em reatores em batelada em temperatura de 37 °C e pH inicial 6, com inóculo de resíduos de compostagem. A menor produção de hidrogênio (0,28 mmol.L⁻¹) foi obtida para 0,58 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5,00 g.L⁻¹ de substrato. Em contraste, a maior produção de hidrogênio (1,53 mmol.L⁻¹) foi obtida para maior concentração de extrato de levedura (3,42 g.L⁻¹) e 5,00 g.L⁻¹ de substrato. Ainda, em todos os reatores o hidrogênio foi produzido pela via do ácido acético, sendo o principal ácido observado.

Soares *et al.* (2019b) avaliaram os efeitos de diferentes tipos de pré-tratamentos do BCA e suas influências na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores batelada em temperatura de 55 °C. O pH inicial foi ajustado em 6,0 em todos os experimentos. Lodo termofílico foi utilizado nesse estudo como inóculo alóctone. As seguintes condições foram estudadas: controle (glicose 2 g.L⁻¹), R1i (BCA sem tratamento com 2 g.L⁻¹), R2i (BCA após pré-tratamento hidrotérmico com 2 g.L⁻¹), R3i (BCA pré-tratado hidrotérmicamente seguido de delignificação alcalina com 2 g.L⁻¹) e R4i (BCA pré-tratado hidrotérmicamente seguido de delignificação alcalina com 1 g.L⁻¹ + BCA sem tratamento com 1 g.L⁻¹). A maior produção de biohidrogênio foi de 124,65 mL H₂ observada no reator controle com glicose. Para os reatores nos quais foram usados BCA como fonte de carbono, as seguintes produções de hidrogênio foram observadas: 19,81, 24,75, 19,84 e 18,73 mL H₂, para os reatores R1i, R2i, R3i e R4i, respectivamente. Segundo os autores, as menores produções de H₂ dos reatores em relação a condição de controle foi devido a estrutura recalcitrante do BCA. Ainda conforme os autores, os reatores alimentados apenas com BCA, que o pré-tratamento hidrotérmico favoreceu a produção de hidrogênio, já que a condição R2i a produção de hidrogênio foi maior do que R1i, com BCA sem pré-tratamento. Por outro lado, ao considerar a condição R3i, ou seja, tratamento hidrotérmico mais deslignificação alcalina, não houve aumento da produção de hidrogênio, que foi semelhante à do reator R1i (BCA sem pré-tratamento).

Conforme exposto na revisão bibliográfica acerca do assunto têm-se na produção de biohidrogênio uma fonte alternativa de energia limpa e sustentável. Atualmente, o consumo de combustíveis fósseis é considerado insustentável do ponto de vista econômico e ambiental devido às suas grandes contribuições para o aumento do nível de CO₂ atmosférico e para o aquecimento global. Além disso, há um grande declínio nas reservas de petróleo e cerca de 80% da sua demanda total de energia em breve será exaurida em breve (RAJKUMAR; YAAKOB; TAKRIFF, 2014).

Nesse sentido, é imprescindível haver outros tipos de fontes de energia renováveis, sustentáveis, que são ecológicas e econômicas viáveis, além de criar interesse na produção de biocombustíveis a partir de biomassa e resíduos orgânicos. A geração de energia limpa através da biomassa de segunda geração, ou seja, gerados a partir dos resíduos da biomassa, pode diminuir a dependência mundial por outras fontes não renováveis de energia, como carvão natural, abrindo caminhos para novas opções de emprego e renda em áreas urbanas e rurais.

A biomassa lignocelulósica, incluindo bagaço de cana-de-açúcar, caule de milho, palha de arroz, palha de trigo, palha de algodão, cascas de café, resíduos de citros entre diversos outros, são substratos atraentes para a produção de

biohidrogênio devido a sua ampla disponibilidade (sendo a matéria-prima mais abundante na natureza), representando o maior percentual de resíduos em diversos processos agroindustriais, ademais, são recursos baratos e renováveis e têm grande potencial para dar uma contribuição importante para o futuro abastecimento de energia.

Por meio dos diversos estudos apresentados nesta revisão bibliográfica pode-se observar que o BCA e o hidrolisado (ou licor de pentoses) são adequados como meio fermentativo para a produção de biohidrogênio. Entretanto não se evidencia na literatura, pesquisas que investigaram a produção de hidrogênio a partir da utilização do BCA e o seu hidrolisado de forma simultânea, usando microorganismos endógenos desses tipos de resíduos lignocelulósicos. Essa abordagem agregará ainda mais valor ao BCA, convertendo resíduos agrícolas em forma segura e limpa de energia. Entretanto, mais pesquisas em escala laboratorial são necessárias para aprimorar a efetividade e otimização do BCA como matéria-prima para produção de bioenergia e compostos de alto valor agregado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo serão apresentados os procedimentos experimentais e técnicas que foram utilizadas para execução dos objetivos. A pesquisa foi realizada em 4 etapas (Figura 4.1): (1) Preparação e caracterização do BCA e licor de pentoses, (2) Obtenção do consórcio de microorganismos autóctones, (3) Seleção das condições de otimização da produção de H₂ e ácidos orgânicos e (4) aplicação da Metodologia de Superfície Resposta para produção de hidrogênio e ácido butírico.

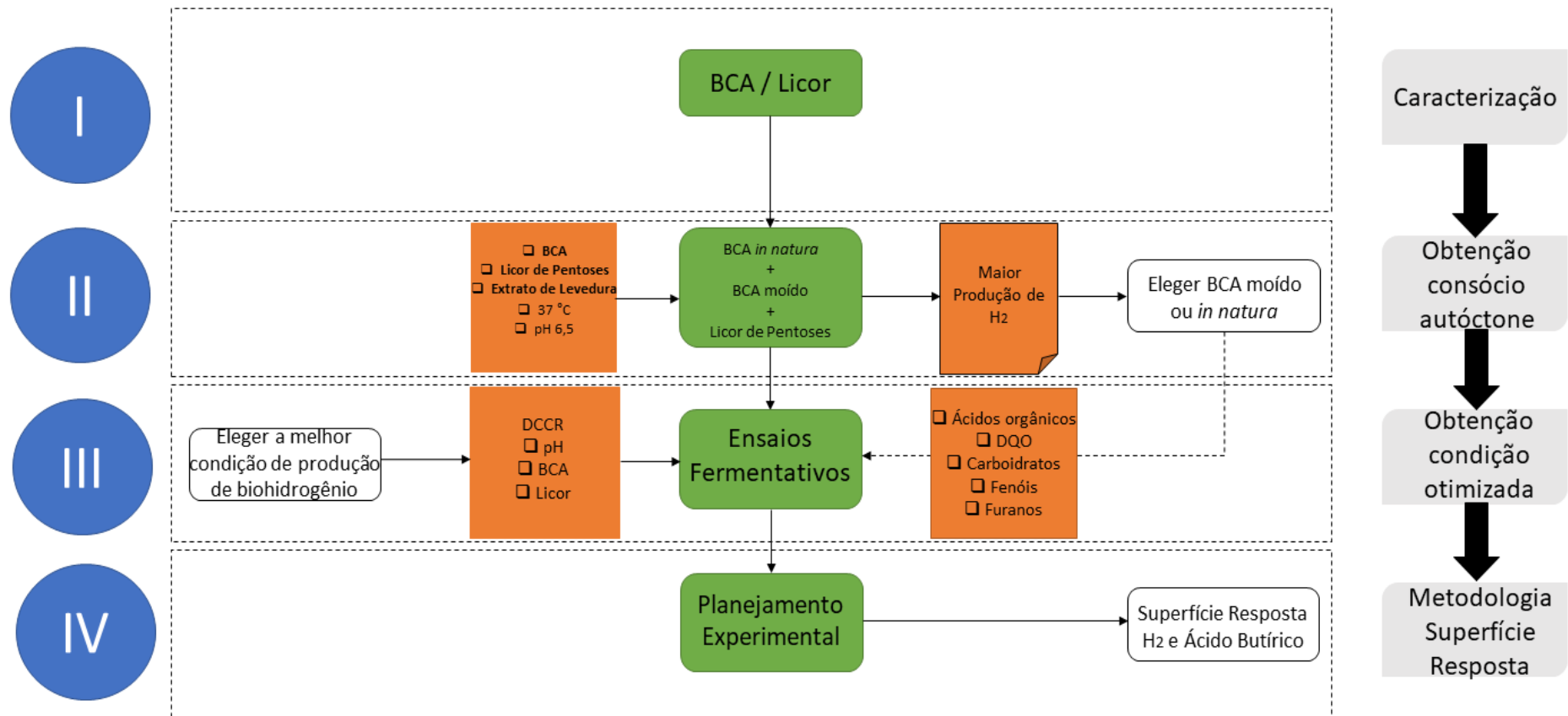


Figura 4.1: Fluxograma experimental da pesquisa.

4.1 Substratos

A fração sólida do substrato, o BCA *in natura* foi cedido pela Usina São Martinho (Pradópolis - SP). O BCA foi armazenado em caixas e guardado protegendo-os de umidade. O BCA moído foi obtido a partir do BCA *in natura*, onde o mesmo foi secado a peso constante conforme protocolo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) (HAMES *et al.* 2008), e posteriormente, triturado em moinho de facas tipo Willey, com *mesh* de 30 ($\leq 0,595$ mm).

A fração líquida do substrato, o licor de pentoses ou hidrolisado hemicelulósico, foi disponibilizado pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), o qual foi obtido por meio do pré-tratamento hidrotérmico do BCA à 190 °C por 10 minutos e armazenado em freezer – 20 °C. Na Figura 4.2 estão ilustrados os substratos usados nos experimentos.



Figura 4.2 - Substratos utilizados na pesquisa.

4.2 Obtenção do consórcio fermentativo autóctone

Nessa etapa, reatores (Duran®) de 2 L foram preenchidos mantendo-se 50% de *headspace* (1 L) e 50% de volume reacional (1 L), utilizando o BCA moído (ensaio 1) e *in natura* (ensaio 2), na quantidade de 5 g.L⁻¹ como única fonte endógena de bactérias e fungos (autóctone). Os ensaios foram feitos em triplicata. Após isto, foi adicionado 1 L de água deionizada. A concentração de substrato advinda do licor de pentoses hidrotérmico foi cerca de 3 g.L⁻¹ (em termos de matéria orgânica). Nestes reatores foi feita a suplementação de extrato de levedura (2 g.L⁻¹) como fonte de vitaminas e minerais (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017) e ajuste do pH em 6,5.

Os reatores foram preenchidos com solução de extrato de levedura e água deionizada. O BCA moído ou *in natura* juntamente com licor de pentoses foi adicionado aos reatores em batelada, e submetidos à atmosfera de nitrogênio (N₂) durante 10 min. com objetivo de troca gasosa no volume do *headspace* e

posteriormente, fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados em condição mesofílica (37 °C) sem agitação (Figura 4.3).

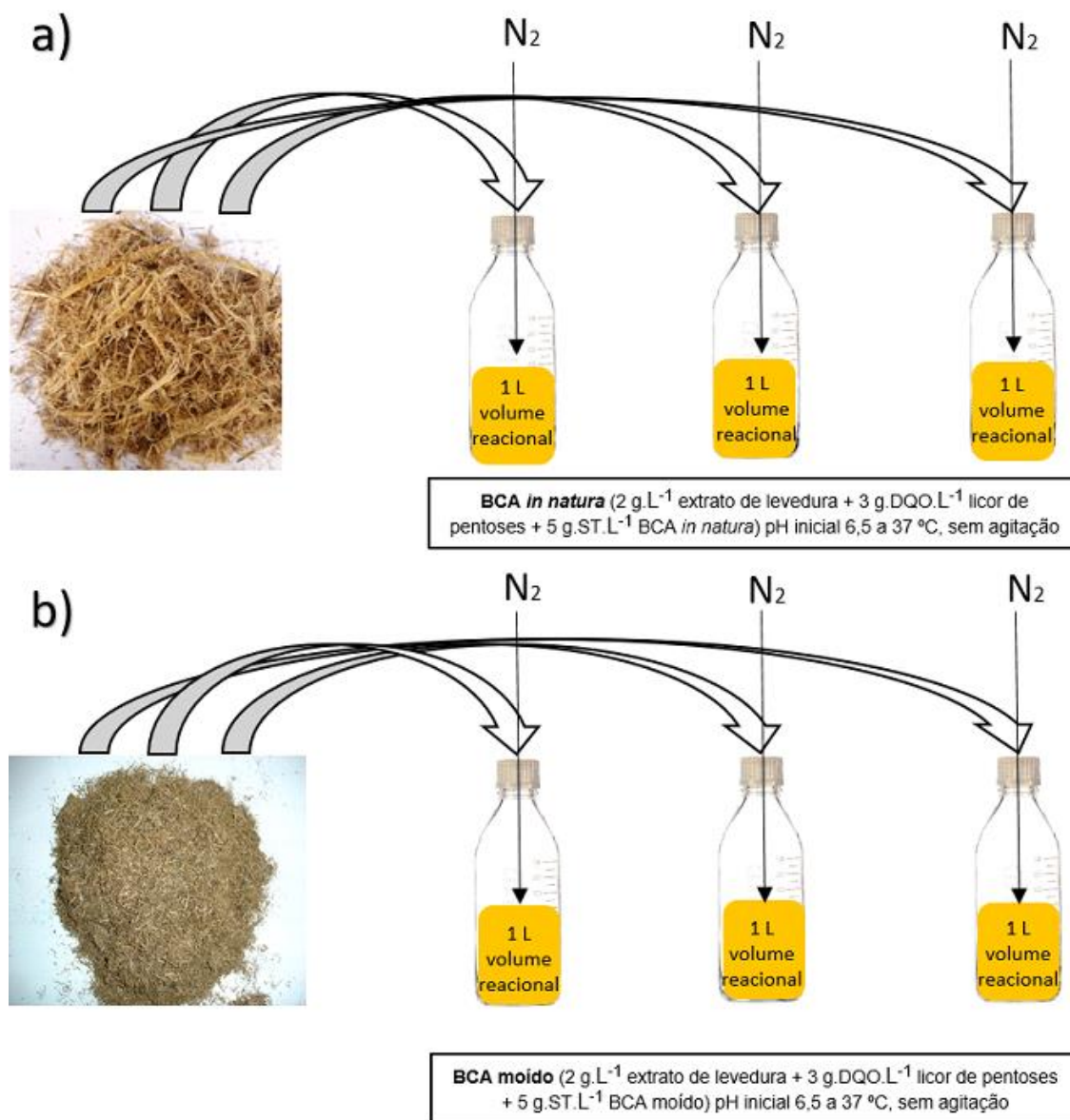


Figura 4.3: Esquema de obtenção de consórcio fermentativo autóctone com BCA *in natura* (a) e BCA moído (b).

Foram testadas duas condições diferentes com BCA *in natura* e o BCA moído além da adição da mesma concentração de licor de pentoses e mesmo pH inicial, o objetivo desse experimento foi observar se o tamanho da partícula de bagaço iria exercer alguma influência na produção de hidrogênio.

O inóculo autóctone foi obtido em frasco de Duran® de 5 L (BCA moído - maior produção de hidrogênio) com volume reacional de 2,5 L, para posteriormente ser utilizado em todos os ensaios em reatores em batelada. Para garantir a

homogeneidade dessa biomassa para todos os ensaios, o reator era retirado da câmara fria (± 4 °C), e submetido à agitação, e logo após era retirado o volume necessário para inoculação dos reatores.

4.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A partir da revisão de literatura, foi possível estabelecer variáveis significativas no delineamento experimental completo, visando-se obter a otimização do processo. As três variáveis independentes nesse estudo foram: concentração de BCA (g.L^{-1} - em termos de Sólidos Totais), representada por X_1 , concentração de licor de pentoses (g.L^{-1} - em termos de DQO), representada por X_2 e pH representado por X_3 . Segundo Rodrigues e lemma (2014) para condições com 3 variáveis independentes, adota-se o DCCR. As condições fixadas nesse estudo em todos os experimentos do DCCR foram *headspace* (50%), concentração de inóculo (10%) e temperatura mesofílica (37 °C).

Foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (planejamento fatorial 3^2) com objetivo de analisar os efeitos de três variáveis independentes sobre a produção acumulada de H_2 (mL). Para avaliar os efeitos de diferentes condições na fermentação foram determinados para cada uma das três variáveis independentes, 5 valores distintos. Estes valores podem ser representados por valores codificados - 1,68; -1,00; 0,00; +1,00; +1,68. Cada valor codificado corresponde um nível da faixa de valores analisadas no planejamento. Os valores codificados foram os seguintes: i) - 1,68; o menor valor da variável independente (ponto axial inferior); ii) -1,00; o segundo menor valor da variável independente, iii) 0,00; o valor intermediário da faixa de variação (ponto central); iv) +1,00; o segundo maior valor da variável independente e v) +1,68; o maior valor da variável independente (ponto axial superior).

O planejamento via DCCR é baseado em uma equação polinomial de segunda ordem, como apresentado pela Equação 4.1:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 x_i + \sum \beta_{12} x_i x_j x_k + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Equação 4.1}$$

Sendo, Y a variável resposta, β_0 constante, β_i o coeficiente do efeito linear, β_{ii} o coeficiente do efeito quadrático, β_{ijk} o coeficiente da interação dos efeitos, x_i , x_j e x_k os níveis codificados das variáveis: X_i (fator: concentração de BCA), X_j (concentração do licor de pentoses), X_k (variação de pH).

Para este estudo a variável resposta representa a produção acumulada de H_2 , em mL. As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a Equação 4.2:

$$x_1 = \left(\frac{X_1 - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad \text{Equação 4.2}$$

Sendo, X_1 o valor codificado da variável independente (concentração de BCA, concentração de licor de pentoses ou pH) e X_i é o valor real da variável independente, x_0 é o valor real do ponto central e ΔX_i é o intervalo entre os valores das variáveis independentes.

Definido as variáveis e as faixas a serem estudadas foi realizado o DCCR, cujos níveis utilizados e condições experimentais deste planejamento estão delineados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Matriz do DCCR dos ensaios fermentativos

Ensaio	BCA (g.L ⁻¹)	Licor de Pentoses (g.L ⁻¹)	pH	Valores Codificados
1	3,0	1,2	5,5	(-1 -1 -1)
2	7,0	1,2	5,5	(+1 -1 -1)
3	3,0	3,6	5,5	(-1 +1 -1)
4	7,0	3,6	5,5	(+1 +1 -1)
5	3,0	1,2	6,5	(-1 -1 +1)
6	7,0	1,2	6,5	(+1 -1 +1)
7	3,0	3,6	6,5	(-1 +1 +1)
8	7,0	3,6	6,5	(+1 +1 +1)
9	1,6	2,4	6,0	(-1,68 0 0)
10	8,4	2,4	6,0	(+1,68 0 0)
11	5,0	0,4	6,0	(0 -1,68 0)
12	5,0	4,4	6,0	(0 +1,68 0)
13	5,0	2,4	5,2	(0 0 -1,68)
14	5,0	2,4	6,8	(0 0 +1,68)
15 (PC)	5,0	2,4	6,0	(0 0 0)
16 (PC)	5,0	2,4	6,0	(0 0 0)

Nota: PC – Ponto Central.

Os experimentos do DCCR foram feitos de acordo com a Equação 4.3, conforme Rodrigues e Lemma (2014). Todos os 16 ensaios, foram realizados em triplicada, totalizando-se assim, 48 reatores.

$$r.(2^k + 2.k) + cp = 1.(2^3 + 2.3) + 2 = 16 \quad \text{Equação 4.3}$$

Sendo, r número de repetições genuínas, k número de variáveis independentes e cp o número de pontos centrais.

4.4.1 Ensaios fermentativos

4.4.1.1 Reativação do inóculo

O processo de reativação partiu da melhor condição de produção de H_2 da obtenção do inóculo autóctone. Cada um dos três reatores com 1 L da condição de maior produção de hidrogênio (BCA moído) foi coletado em cada deste, 50 mL de sobrenadante e transferidos para tubos *falcon*, onde após centrifugação a 7.000 rpm/5 min., esses microorganismos foram transferidos para um Duran de 5 L (2,5 L *headspace*) com extrato de levedura (2 g.L⁻¹), licor de pentoses (3 g DQO.L⁻¹) e BCA (5 g.L⁻¹), onde ocorreu a reativação a 37 °C por 24 horas e posteriormente, foi armazenado a uma temperatura de ± 4 °C para utilização nos ensaios fermentativos, conforme mostrado na Figura 4.4.

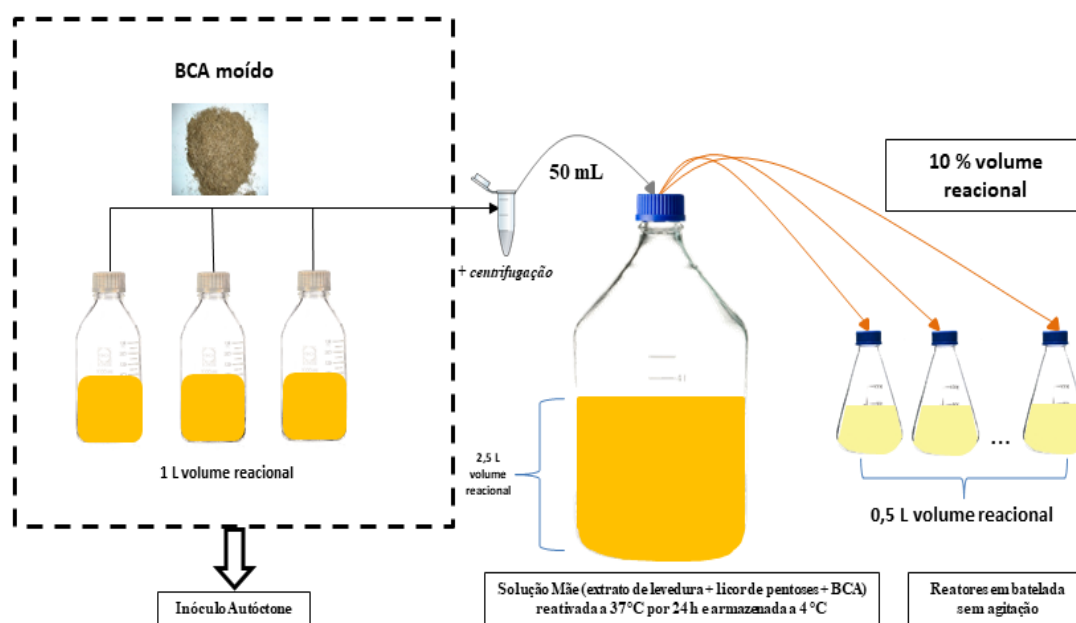


Figura 4.4: Reativação de inóculo para os ensaios fermentativos.

4.4.1.2 Reatores em batelada

Os ensaios em batelada foram conduzidos em reatores de 1.000 mL com 50% de *headspace*, sob atmosfera de N_2 (100%), com 10% (v/v), de inóculo (concentração de 1,3 g.L⁻¹.SSV) e 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e vitaminas (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017). Os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica. O pH inicial nos experimentos foi ajustado com HCl ou

NaOH. Os reatores foram incubados a 37 °C em condições estáticas. Os reatores em batelada foram operados até estabilização da fermentação, por meio monitoramento da produção de H₂ por cromatografia gasosa. Durante o processo de fermentação foram coletadas amostras para análise de matéria orgânica, fenóis, carboidratos totais, ácidos orgânicos e furanos.

4.4.1.3 Validação experimental

O ensaio de validação é recomendável para verificar a precisão experimental e valores preditivos da resposta do modelo, sendo utilizado o *software Statistica*[®], versão 10.0 (StatSoft Inc. 2010, USA). A validação decorreu-se da análise gráfica dos resultados da produção acumulada de biogás com base na faixa ótima da superfície resposta utilizando MSR, conforme Rabelo *et al.* (2018) e Gomes *et al.* (2021). Foram montados reatores em triplicata para monitoramento da validação experimental. As condições fermentativas estáticas, temperatura mesofílica de 37 °C e 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura, foram mantidas.

4.4.2 Avaliação dos métodos estatísticos

Os resultados do DCCR foram submetidos a testes ANOVA, realizado para obter-se o valor de F_{CALCULADO} ou F_{OBSERVADO} e compará-lo ao F_{TABELADO}. O modelo é considerado estatisticamente significativo quando além do coeficiente de determinação (R²) é ≥ 90%, o valor de F_{OBSERVADO} é maior ou igual que o valor de F_{TABELADO} (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Os desenhos da superfície de resposta e de contorno foram realizados utilizando o programa *Statistica*[®], versão 10.0 (StatSoft Inc. 2010, USA), conforme Faber e Ferreira-Leitão (2016). As análises estatísticas (ANOVA) foram realizadas utilizando o programa Protimiza (RODRIGUES; IEMMA, 2014). A RSM foi aplicada com o conjunto de dados do DCCR para a obtenção das faixas ótimas de produção acumulada de H₂ e ácidos orgânicos, mostrando graficamente os efeitos das combinações das variáveis independentes analisadas sobre a produção de biohidrogênio. Foram considerados significativas as variáveis com *p* – valores menores que 10% (*p* < 0,1), conforme Gomes *et al.* (2021) e Mazareli *et al.* (2021).

4.5. Análises físico-químicas e cromatográficas

Sólidos totais e sólidos voláteis do inóculo foram determinados de acordo com os procedimentos do método gravimétrico descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2017).

A DQO foi realizada de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2017). A análise de carboidratos totais foi determinada pelo método do ácido fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.* 1956). O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método da 4-Aminoantipirina explicado por Buchanan e Nicell, (1997).

Os ácidos orgânicos solúveis e furanos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®) conforme Ratti *et al.* (2013), equipado com bomba LC-10ADvp, injetor automático SIL e 20A HT, forno CT-20A, detector ultravioleta com arranjo de diodos do modelo SCL-M10AVP, e detector com índice de rarefação RID-10A, adicionalmente coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad). O efluente foi uma solução de H₂SO₄ 0,005M, a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 43°C e injeção de 100 µL. O limite de detecção dos ácidos variam de 10-1.000 mg.L⁻¹ (AHMAD *et al.*, 2021)

O gás hidrogênio foi determinado por cromatografia gasosa por meio da retirada de 500 µL de amostra gasosa do *headspace* utilizando-se seringa *gastight* com trava. O equipamento de medição é um Shimadzu® (GC-2010) equipado com Detector de Condutividade Térmica (DCT). A coluna usada é Carboxen 1010 PLOT, 30 m x 0,53 mm. A temperatura do injetor, a temperatura do forno e a temperatura do detector foram 220 °C, 130 °C e 230 °C, respectivamente. O gás argônio foi usado como gás de arraste com uma taxa de fluxo de 5,66 mL.min⁻¹ com volume de fluxo de 12 mL.min⁻¹ (JÚNIOR *et al.* 2014).

Em todos os experimentos realizados nesse estudo, a concentração de H₂ foi calculada considerando o volume injetado, a área cromatográfica (promovida pela calibração e em mmol) e o volume do *headspace*, conforme Braga *et al.* (2019). Após as medições de hidrogênio, foi capaz de eleger o melhor tipo de bagaço para os ensaios fermentativos com base na maior produção de H₂ durante o período observado.

4.6 Análise cinética

Os dados experimentais de hidrogênio foram obtidos e as médias ajustadas usando a equação de Gompertz modificada Equação 4.4 (ZWIETERING *et al.* 1990) com o *software* OriginPro® versão 2020.

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot \varepsilon}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Equação 4.4}$$

Sendo, H - produção cumulativa de hidrogênio (mL), P – potencial máximo de produção de hidrogênio (mL), Rm – taxa máxima de produção de hidrogênio (mL.h⁻¹), ϵ - constante de Euler (2.71828), λ - tempo de início de produção de hidrogênio ou fase *lag* (horas).

4.7 Balanço de Massa

Para realização do Balanço de Massa Solúvel (BMS) em termos de DQO_{FILTRADA}, utilizou-se os dados de monitoramento dos reatores relativos aos compostos solúveis durante os ensaios fermentativos. A determinação do BMS foi realizada de acordo com a Equação 4.5 (MAZARELI, 2019).

$$\text{BMS} = \left(\frac{\text{DQO}_{\text{METABÓLITOS}} + \text{DQO}_{\text{CARBOIDRATOS}} + \text{DQO}_{\text{FENÓIS}}}{\text{DQO}_{\text{SOLÚVEL}}} \right) \quad \text{Equação 4.5}$$

4.5

Sendo, BMS= balanço de massa da fase solúvel (%), DQO_{METABÓLITOS} – DQO equivalente aos metabólitos solúveis (mg.L⁻¹), DQO_{CARBOIDRATOS} – DQO equivalente aos carboidratos totais (mg.L⁻¹) e DQO_{FENÓIS} – DQO equivalente aos fenóis (mg.L⁻¹).

Na Tabela 4.2 estão apresentados os fatores de equivalência que foram utilizados nos cálculos para a BMS, levando em consideração a oxidação completa dos compostos que foram determinados analiticamente como ácidos orgânicos, fenóis e carboidratos totais.

Tabela 4.2: Fatores de equivalência de metabólitos solúveis utilizados no cálculo do BMS.

Metabólito	Reação de Oxidação	Fator de Equivalência
Ácido láctico	$C_3H_6O_3 + 3 O_2 \rightarrow 3 CO_2 + 3 H_2O$	$1,07 \text{ gDQO g}^{-1} H_{LA}$
Ácido fórmico	$CH_2O_2 + 0,5 O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$	$0,35 \text{ gDQO g}^{-1} H_{FO}$
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + 2 O_2 \rightarrow 2 CO_2 + 2 H_2O$	$1,07 \text{ gDQO g}^{-1} H_{AC}$
Ácido propiônico	$C_3H_6O_2 + 3 O_2 \rightarrow 4 CO_2 + 3 H_2O$	$1,51 \text{ gDQO g}^{-1} H_{PR}$
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 5 O_2 \rightarrow 4 CO_2 + 4 H_2O$	$1,82 \text{ gDQO g}^{-1} H_{BU}$
Ácido isobutírico	$C_4H_8O_2 + 5 O_2 \rightarrow 4 CO_2 + 4 H_2O$	$1,82 \text{ gDQO g}^{-1} H_{ISB}$
Ácido valérico	$C_5H_{10}O_2 + 6,5 O_2 \rightarrow 5 CO_2 + 5 H_2O$	$2,04 \text{ gDQO g}^{-1} H_{VA}$
Ácido isovalérico	$C_5H_{10}O_2 + 6,5 O_2 \rightarrow 5 CO_2 + 5 H_2O$	$2,04 \text{ gDQO g}^{-1} H_{ISV}$
Fenóis	$C_6H_6O + 4 O_2 \rightarrow 3 CO_2 + 3 H_2O$	$1,36 \text{ gDQO g}^{-1} \text{ Fenol}$
Carboidratos totais ^a	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$	$1,07 \text{ gDQO g}^{-1} \text{ CT}$

Nota: em termos de g-glicose^a

4.8 Caracterização do BCA

O BCA utilizado nesse estudo foi caracterizado anteriormente por Ahmad *et al.*, (2018) e Dionizio *et al.* (2020), sendo as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina de 31,4%, 41,6% e 24,8%, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos substratos

Os substratos usados nesse estudo foram previamente caracterizados com finalidade de identificar a possibilidade potencial, além das limitações para os ensaios fermentativos. A caracterização do Licor de Pentoses utilizado nesse estudo como fonte de substratos e bactérias endógenas serão discutidos no próximo item.

5.1.1 Licor de Pentoses

O licor de pentoses utilizado nesse estudo foi caracterizado, e os resultados estão incluídos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Composição média Licor de Pentoses

Componente	Valor
DQO (mg.L ⁻¹)	155.000
Carboidratos Totais (mg.L ⁻¹)	117.000
Relação Carboidratos/DQO	0,74
Ácido Acético (mg.L ⁻¹)	4.700
Ácido Fórmico (mg.L ⁻¹)	1.100
5-HMF (mg.L ⁻¹)	1.400
Furfural (mg.L ⁻¹)	3.300
Fenóis Totais (mg.L ⁻¹)	10.500

Nota: Licor advindo do pré-tratamento hidrotérmico.

Os valores alcançados nesse estudo para ácidos fórmico, acético e furanos, são maiores do que os obtidos por Robl *et al.* (2015) que aplicaram pré-tratamento hidrotérmico no BCA e obtiveram um licor de pentoses com 230 mg.L⁻¹ de ácido fórmico, 1.470 mg.L⁻¹ de ácido acético, 1.050 mg.L⁻¹ de furfural e 180 mg.L⁻¹ de 5-HMF. A concentração de ácido acético obtida nessa pesquisa foi próxima aquela observada por Zetty-Arenas *et al.* (2019), de 4.170 mg.L⁻¹ de ácido acético. Todavia, em relação ao ácido fórmico, 5-HMF e furfural os valores foram de 1.100 mg.L⁻¹, 1.400 mg.L⁻¹ e 3.300 mg.L⁻¹, respectivamente; enquanto Zetty-Arenas *et al.* (2019) obtiveram 180 mg.L⁻¹ de ácido fórmico, 120 mg.L⁻¹ de 5-HMF e 270 mg.L⁻¹ de furfural aplicando pré-tratamento ácido ao BCA.

5.2 Obtenção do inóculo autóctone

O BCA *in natura* e o BCA moído em 5 g.L⁻¹ foram usados como fonte endógena de microorganismos celulolíticos dos resíduos de bagaço de cana, além de ser

considerado um substrato fermentativo. Os experimentos nessa etapa foram feitos em triplicata, com temperatura mesofílica ($\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), com adição de 2 g.L^{-1} de extrato de levedura e pH inicial ajustado em 6,5. Além do BCA foi utilizado nos experimentos de obtenção do inóculo, 3 g.DQO L^{-1} de licor de pentoses.

A partir das curvas de Gompertz ilustradas na Figura 5.1 foi possível comparar o inóculo com BCA moído e o BCA *in natura*. A maior produção acumulada de hidrogênio ocorreu nos ensaios com BCA moído ($53,87\text{ mL H}_2$) em relação ao BCA *in natura* ($50,24\text{ mL H}_2$) (Figura 5.1).

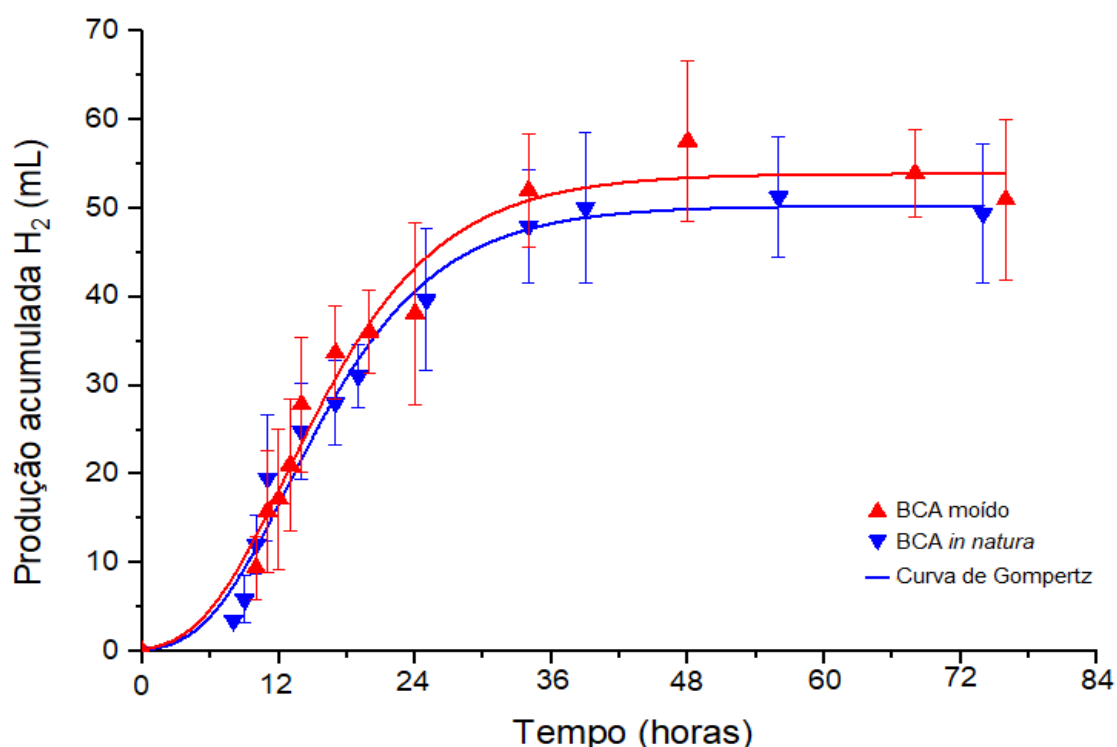


Figura 5.1: Produção acumulada de hidrogênio – BCA moído e BCA *in natura*.

A partir das curvas de Gompertz, foi capaz de comparar qual inóculo teve os melhores resultados para serem usados na etapa posterior dos ensaios fermentativos (Tabela 5.2). O maior valor de P ($53,87\text{ mL H}_2$) foi obtido com BCA moído.

Tabela 5.2: Parâmetros de Gompertz dos ensaios de obtenção do inóculo autóctone para BCA *in natura* e BCA moído

Parâmetro/Substrato	BCA <i>in natura</i>	BCA moído
R ² (%)	96	95
P (mL H ₂)	50,24	53,87
Rm (mL H ₂ .h ⁻¹)	2,55	2,64
λ (h)	6,49	5,11

Nota: R² é coeficiente de determinação obtido com equação de Gompertz modificada.

Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis (95% nível de confiança) com objetivo de avaliar a produção de H₂ nos ensaios de obtenção do inóculo autóctone. A maior produção de hidrogênio a partir do BCA moído não foi significativa ($p \geq 0,05$) quando comparada ao BCA *in natura*. Dessa forma, decidiu-se utilizar o BCA moído nos ensaios fermentativos, porque nessa condição, observou-se maior valor médio de P (53,87 mL H₂) e o menor tempo de produção de hidrogênio (5,11 λ H₂).

O tamanho da partícula utilizada nos experimentos com BCA moído foi de $\geq 0,595$ mm. Nesse estudo, o início da produção de hidrogênio λ (h) diminuiu de 6,49 para 5,11 horas com o BCA moído em relação ao BCA *in natura*. A redução de tamanho de partícula tem sido usada em vários estudos sobre fermentação. A moagem reduz o tamanho da biomassa lignocelulósica e aumenta a área de superfície acessível para a reação fermentativa e diminui a cristalinidade da celulose (REN et al., 2016). Delgenès; Penaud e Moletta (2003) relataram que o processo de moagem de resíduos agrícolas aumentou os rendimentos de hidrogênio. Song *et al.* (2014) também verificaram que o tamanho das partículas de talo de milho influencia na produção de hidrogênio em reatores batelada. Tais autores observaram aumento de P de 66,3 mL para 67,8 mL, além da diminuição do início da produção de H₂ (λ) de 8,2 h para 7,8 h, respectivamente. Da mesma forma, Tosuner, Taylan e Özmihçi (2019) observaram que a redução do tamanho da casca de arroz de <300 μm para <74 μm , favoreceu maior produção de hidrogênio de 19,71 mL para 29,26 mL H₂.

5.3 Produção de Hidrogênio

5.3.1 Superfície Resposta e parâmetros cinéticos

Objetivou-se a comparação dos parâmetros cinéticos de produção de H₂ (P), velocidade de produção (R_m) e tempo de início de produção (λ), os quais foram determinados para os reatores em batelada do DCCR (Tabela 5.3) utilizando a equação de Gompertz modificada para ajuste dos dados de produção acumulada de biohidrogênio.

Tabela 5.3: Valores codificados e respostas para produção de hidrogênio

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	P (mL)	R _m (mL.h ⁻¹)	λH ₂ (h)	R ²
1	-1	-1	-1	19,64 ± 1,22	1,27 ± 0,21	33,36 ± 7,56	0,99
2	+1	-1	-1	21,96 ± 3,31	2,84 ± 0,20	48,96 ± 3,24	0,98
3	-1	+1	-1	29,94 ± 3,12	2,50 ± 0,49	50,88 ± 5,45	0,99
4	+1	+1	-1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	--
5	-1	-1	+1	28,82 ± 2,97	3,28 ± 0,62	8,64 ± 1,15	0,98
6	+1	-1	+1	35,66 ± 3,97	13,46 ± 4,96	12,03 ± 0,49	0,99
7	-1	+1	+1	126,82 ± 10,46	11,04 ± 1,75	9,36 ± 2,13	0,97
8	+1	+1	+1	69,84 ± 3,37	17,25 ± 2,42	12,96 ± 3,07	0,99
9	-1,68	0	0	32,57 ± 3,05	1,43 ± 0,36	41,73 ± 6,04	0,97
10	+1,68	0	0	21,4 ± 1,54	2,32 ± 0,25	15,84 ± 1,04	0,96
11	0	-1,68	0	14,46 ± 1,46	0,70 ± 0,24	39,60 ± 0,85	0,98
12	0	+1,68	0	52,30 ± 5,60	3,59 ± 0,71	50,64 ± 13,48	0,99
13	0	0	-1,68	30,34 ± 5,37	0,99 ± 0,20	38,64 ± 9,90	0,96
14	0	0	+1,68	71,34 ± 3,80	15,86 ± 4,55	11,28 ± 0,40	0,98
15 (PC)	0	0	0	31,84 ± 2,31	0,95 ± 0,28	33,68 ± 5,31	0,99
16 (PC)	0	0	0	30,62 ± 3,57	2,59 ± 0,60	33,12 ± 6,07	0,99

Nota: X₁ é BCA (g.L⁻¹), X₂ é Licor de Pentoses (g.DQO.L⁻¹), X₃ é pH.

Nos ensaios fermentativos do DCCR, foi observado que o tempo de início de produção de hidrogênio (λ) foi de $8,44 \pm 1,15$ (C05) a $50,88 \pm 5,45$ horas (C03), ao passo que a estabilização foi alcançada em até 96 horas. Em outros estudos em reatores batelada, o hidrogênio foi produzido em poucas horas após o inóculo ser adicionado no meio, e logo em seguida foram observadas a fase de estabilização à medida que para P o valor tendeu a valores constantes (JAYASINGHEARACHCHI *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2011).

Em relação ao (λ), quando o pH passou de 5,2 para 6,5, houve diminuição média na fase de início de produção de hidrogênio em 33 horas. O tempo de início de produção de H₂ (λ) para os ensaios com pH inicial de 5,5; 6,0 e 6,5 foram de $43,98 \pm 9,5$ horas (ensaios 1 a 4); $34,95 \pm 11,75$ horas (ensaios 09, 10, 11, 12, 15 e 16) e $10,66 \pm 2,15$ horas (ensaios 5 a 8), respectivamente. Dessa forma, λ em pH neutro foi menor se comparado ao pH ácido, provavelmente, em função das características fisiológicas das bactérias hidrolíticas e acidogênicas, as quais tem crescimento mais rápido, em relação as demais bactérias envolvidas nas rotas de fermentação

(MAZARELI; VARESCHE, 2017) sendo a fase hidrolítica primordial para a ocorrência das demais etapas da fermentação.

Outra hipótese associada a essa diminuição da fase de início de produção de H_2 , pode estar relacionada com o inóculo autóctone, uma vez que foi obtido em pH inicial de 6,5. As bactérias e fungos endógenos do BCA e do hidrolisado hemicelulósico provavelmente estavam adaptadas às condições ambientais de pH próximo ao neutro. Lin *et al.* (2017) reportaram que a utilização do inóculo endógeno favoreceu a rápida adaptação ao substrato (cogumelo), contribuindo assim, para a rápida conversão em hidrogênio. Chairattamanokorn *et al.* (2009) também verificaram menor λ (9 h) de produção de biohidrogênio a partir do hidrolisado do BCA em pH inicial de 6. Em contrapartida, maior λ ocorreu em pH inicial de 4, sendo necessário 43,3 h para início de produção de hidrogênio. Segundo os autores, isso pode ser atribuído a adaptação do consórcio microbiano em pH ácidos, semelhante ao observado na presente pesquisa.

Em pH inicial $\geq 6,5$ (C05~C08 e C14) foi observado λ de $8,44 \pm 1,15$ a $12,96 \pm 3,07$ h. Valores similares a essa pesquisa; ou seja $12 \pm 4,8$ h foram observados por Akobi, Hafez e Nakhla, (2016) em reatores em batelada com hidrolisado de madeira de choupo em pH inicial de 5,5. Niel, Claassen e Stams (2003) ressaltam que o maior acúmulo de hidrogênio no início da produção, pode impedir o crescimento de microorganismos e conseqüentemente o consumo de alguns açúcares. Abreu *et al.* (2009) observaram valores de λ de 19,3 h em pH inicial de 5,5, 14,5 h em pH inicial de 6,5 e 13,7 h em pH 7,5 utilizando arabinose (monossacarídeo) em reatores em batelada.

Os valores de λ também podem variar de acordo com pH do meio. Por exemplo, Muri *et al.* (2016) utilizaram resíduos do processamento de café e obtiveram valores de λ de $32,4 \pm 11,1$ horas e 131,7 horas para ensaios em pH inicial 5,5 e 4,8, respectivamente. Ferchichi *et al.* (2005) também observaram redução de λ_{H_2} de 40 horas, quando o pH inicial passou de 5 ($\lambda_{H_2} = 43$ h) para 7 ($\lambda_{H_2} = 3$ h) nos experimentos com soro de queijo em reatores batelada. Entretanto, houve redução em 28% da produção acumulada de hidrogênio, o que não foi verificado no presente estudo, quando o pH aumentou de 5,2 para 6,5, houve redução média de 33h no valor de λ .

Soares *et al.* (2019a) obtiveram valor de λ_{H_2} com 2 g.L^{-1} do hidrolisado do BCA (pré-tratamento hidrotérmico) de 17 horas, em pH inicial de 6, se comparado com glicose, a diferença é de 8 horas. Segundo os autores, esse valor pode ser justificado devido ao pré-tratamento do BCA que libera compostos inibitórios como furanos (furfural e hidroximetilfurfural). Esses compostos são formados pela desintegração de pentoses e hexoses. Vale ressaltar que diferentemente dos autores supracitados, no

presente estudo, obteve-se para mesma faixa de pH inicial nas condições C9, C10, C11, C12, C15 e C16, λ_{H_2} de 35 horas, ou seja, o dobro de horas observado por estes autores. Também, é importante notar, que os experimentos conduzidos por Soares *et al.* (2019a) foram em temperatura termofílica (55 °C).

Planejamento composto central rotacional de 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 2 repetições no ponto central, totalizando desta forma 16 ensaios em triplicata (Figura 5.2) foi realizado com objetivo de analisar a atuação das variáveis independentes, a saber: concentração de BCA (x_1 : 1,63-8,36 g.L⁻¹), concentração de licor de pentoses (x_2 : 0,4-4,4 g.L⁻¹) e pH (x_3 : 5,15-6,85).

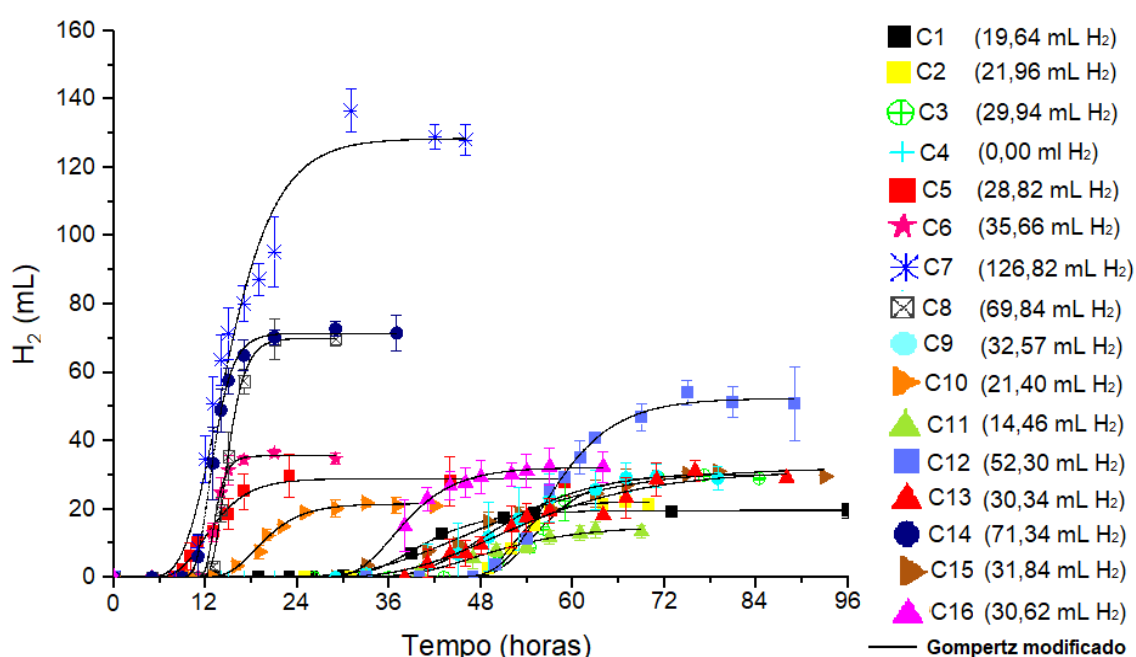


Figura 5.2: Produção temporal de hidrogênio dos ensaios de DCCR.

Os valores maiores de P (mL H₂) foram verificados nos ensaios em pH inicial $\geq 6,5$, de $126,82 \pm 10,46$ mL H₂ (C7), $71,34 \pm 3,80$ mL H₂ (C14), $69,84 \pm 3,37$ mL H₂ (C8), $35,66 \pm 3,97$ mL H₂ (C6) e $28,82 \pm 2,97$ mL H₂ (C5), sendo a maior produção de H₂ obtida em pH inicial de 6,5 (C7). Ademais, valores maiores de R_m também foram associados a estes mesmos reatores, sendo de $11,04 \pm 1,75$, $15,86 \pm 4,55$, $17,25 \pm 2,42$, $13,46 \pm 4,96$, e $3,28 \pm 0,62$ mL.h⁻¹ H₂, respectivamente. Eker e Sarp (2017) observaram valor aproximado de produção de hidrogênio acumulado ao desse estudo, utilizando hidrolisado de resíduos de papel como substrato para produção de hidrogênio em reatores batelada em temperatura mesofílica e pH inicial de 6,8. Os autores obtiveram produção acumulada de 128,99 mL H₂.

Os resultados observados neste estudo de produção de hidrogênio, corroboram com aqueles de Fangkum e Reungsang (2011), que obtiveram valor maior de P (18,81 mL H₂) para hidrolisado de BCA em pH inicial de 6,5. Para faixa similar de pH, Wei, Liu e Zhang (2010) a partir da água residuária do amido, investigaram a produção de biohidrogênio variando pH (5-7,5, acrescidos em intervalos de 0,5) e concentração de amido (1-7, acrescidos em intervalo de 1 g.L⁻¹) em temperatura de 37 °C. Sob tais condições, a produção ótima de H₂ (930 mL) foi obtida em pH inicial de 6,5 e 5 g.L⁻¹ de substrato.

De forma similar, Montoya *et al.* (2020) observaram valores maiores de P (29,46 mmol H₂.L⁻¹ em pH inicial \geq 7,0) em reatores em batelada operados com resíduos sólidos e líquido do processamento de café como substratos. Ademais, os autores notaram que o aumento do pH em intervalo de 4,0 a 7,0 resultou em efeito positivo em P e R_m , de 22,67 mmol H₂.L⁻¹ e 1,18 mmol H₂.h⁻¹, respectivamente. Camargo *et al.* (2021) do mesmo modo, observaram valor de P (48,47 mmol H₂.L⁻¹) em pH inicial \geq 7,0 em reatores batelada com resíduos de citros. Rabelo *et al.* (2018) da mesma forma, obtiveram maior produção de hidrogênio (64,38 mL H₂) utilizando BCA como substrato (8 g.L⁻¹) em pH inicial de 7 em reatores batelada. Hu, Wang e Yu (2004) avaliaram o efeito do pH sobre a degradação da celulose e concluíram que a maior degradação da celulose (75%) foi verificada em valores de pH entre 6,8 e 7,3, entretanto a degradação da celulose diminuiu significativamente em valores de pH na faixa ácida. Rai, Pandey e Pandey (2019) otimizaram a produção de hidrogênio utilizando *design box-behnken*, com casca de banana em pó como substrato. Os autores observaram a condição ótima de hidrogênio (43 \pm 1 mL H₂) com 5% v/v de substrato em pH inicial de 7,0. A presente pesquisa corrobora com os estudos supracitados.

Para os ensaios em pH inicial \leq 5,5 (C1 a C4 e C13) os valores de P foram de 19,64 \pm 1,22, 21,96 \pm 3,31, 29,94 \pm 3,12, 0 e 30,34 \pm 5,37 mL H₂, respectivamente. O consórcio autóctone de licor de pentoses juntamente com o BCA mesmo em pH mais ácido nesse estudo, conseguiram produzir um P maior de hidrogênio, quando se comparado a Mazareli *et al.* (2021) que observaram produção acumulada de hidrogênio em condição mesofílica, de 12,32 mL H₂, utilizando consórcio autóctone de resíduos de banana em pH inicial de 5,09.

Neste presente estudo não foi observada produção de hidrogênio apenas em C4, em pH inicial 5,5. Possivelmente, para concentração maior de substratos (BCA e Licor de Pentoses) e pH inicial ácido podem ter contribuído para instabilidade microbiana. Similarmente, Pattra *et al.* (2008) utilizaram hidrolisado do BCA em reatores em batelada e observaram durante os ensaios fermentativos em pH inicial de

5,0 que não houve produção de hidrogênio. Os autores atribuíram à hipótese de que em pH inicial ácido, pode ocorrer liberação de ácidos fracos indissociados no meio, podendo atravessar a membrana celular, causando a perda das atividades das enzimas glicolíticas e consequente danos estruturais à membrana e DNA celular. Da mesma forma, Thungklin, Sittijunda e Reungsang (2018) usaram também hidrolisado do BCA em ensaios fermentativos para produção de hidrogênio e não obtiveram produção de hidrogênio em pH inicial de 4,5.

A concentração de matéria orgânica pode influenciar no rendimento de hidrogênio. Por exemplo, concentração maior de substrato pode acarretar acúmulo de ácidos orgânicos e, por conseguinte, a diminuição do pH, ocasionando assim a inibição do sistema e prejudicando a produção de H₂ (GÓMEZ *et al.*, 2011).

Em termos gerais, houve aumento médio de P e Rm de 25,47 mL H₂ para 66,51 mL H₂ e 1,9 mL.h⁻¹ para 12,17 mL.h⁻¹, respectivamente, quando o pH inicial dos ensaios fermentativos passou de 5,5 para 6,5 (Figura 5.3). Ademais, houve diminuição em 33 horas quando o pH inicial passou de 5,5 para 6,5.

Nos ensaios 7 e 8, onde os valores de P foram 126,82 ± 10,46 e 69,84 ± 3,37 mL H₂, respectivamente, a diferença entre os ensaios foi da variável independente X₁ (BCA) que foi do nível -1 (3,0 g.L⁻¹ de BCA) em C7 para o nível +1 (7,0 g.L⁻¹ de BCA) em C8, onde ocorreu diferença do valor de P em 44,92%. Nesse sentido, na maior concentração de BCA como fonte de substrato pode ter sido desfavorável à transferência de massa, levando a baixa eficiência do processo de conversão do substrato em biohidrogênio. Além do que, na maior concentração de BCA pode-se obter alta concentração de ácidos que inibe a atividade celulolítica, por conseguinte diminuindo a produção de hidrogênio (CHENG; ZHU, 2013). De outra forma, não existe valor ideal de concentração de substrato em ensaios fermentativos. Da mesma forma, Argun *et al.* (2008) reportaram que a concentração de substrato de pó de trigo (≥ 30 g.L⁻¹) diminuiu a produção de hidrogênio de 751 mL para 652 mL, quando se comparado a 20 g.L⁻¹ de substrato, em pH inicial de 7,0.

Nos ensaios fermentativos de conversão da biomassa lignocelulósica é frequentemente limitada pela hidrólise por microorganismos celulolíticos (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015). Ademais, as condições ideais para a hidrólise de hexoses e pentoses para geração de hidrogênio são diferentes. Por exemplo, hidrólise de açúcares pentoses foi relatada em pH neutro ou tendendo a básico (CALLI *et al.*, 2008; LO *et al.*, 2009), enquanto os rendimentos de H₂ a partir de açúcares hexoses são relatados em pH ácido entre 5,0 a 5,5 (HU; WANG; YU, 2004; KARADAG; PUHAKKA, 2010). Do contrário ao exposto anteriormente, Rabelo *et al.* (2018) observaram consumo preferencial de hexoses a pentoses, em condições de pH inicial

$\geq 6,0$ e consumo preferencial de pentoses a hexoses em ensaios em pH inicial $\leq 5,0$, em reatores em batelada com inóculo autóctone e BCA como substrato. Além disso, valores iniciais de pH próximos a 4,5 favorecem a produção de etanol e lactato, consequentemente reduzindo a geração de H_2 em ensaios fermentativos (LIN *et al.*, 2012). Valores iniciais de pH ácidos podem resultar na formação de solvente, uma vez que *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butylicum* e *Clostridium beijerinckii* produzem etanol, butanol e acetona em faixas de pH ácidas, reduzindo a formação de H_2 (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2007a).

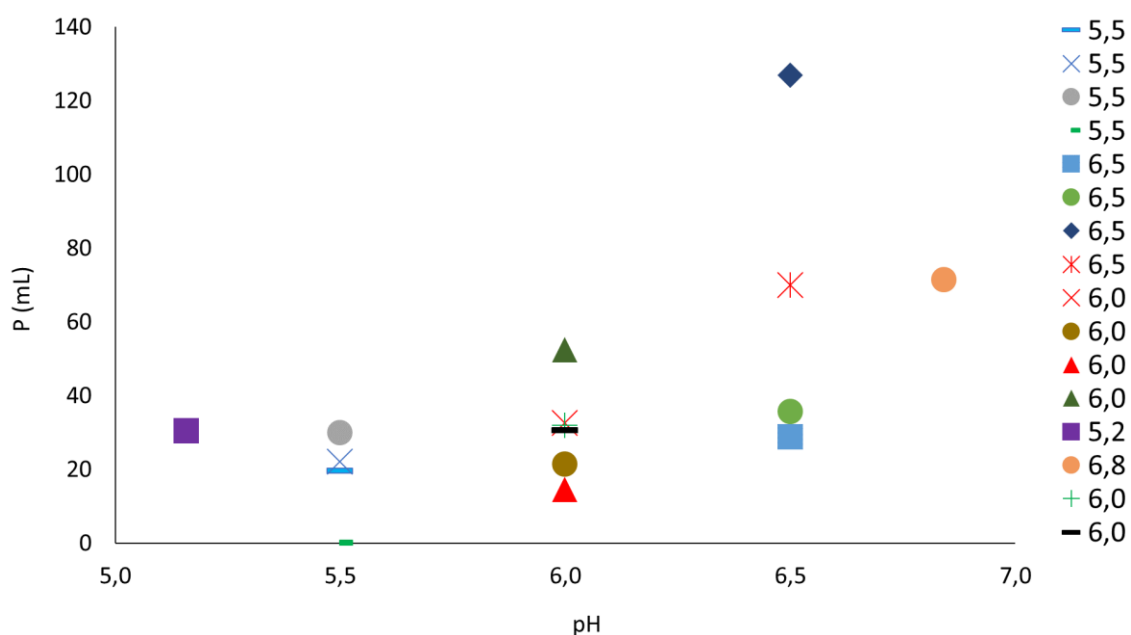


Figura 5.3: Efeito do pH inicial na produção de hidrogênio (P).

Com objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes sobre a produção máxima de hidrogênio, foram considerados significantes estatisticamente as variáveis com nível de significância de 10% ($p \leq 0,10$) para P e R_m (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Valores de significância para o intervalo de confiança de 90% das variáveis dos ensaios do DCCR

p-valor			
Interações	P	Rm	Fatores
X_1	0,0290	0,0391	Significativo
X_1^2	0,7029	0,4625	Não Significativo
X_2	0,0008	0,0972	Significativo
X_2^2	0,8742	0,3916	Não Significativo
X_3	0,0001	0,0049	Significativo
X_3^2	0,0272	0,0061	Significativo
$X_1.X_2$	0,0082	0,2242	Significativo
$X_1.X_3$	0,8142	0,0267	Não Significativo
$X_2.X_3$	0,0007	0,0684	Significativo

Nota: X_1 é BCA (g.L^{-1}), X_2 é Licor de Pentoses (g.DQO.L^{-1}), X_3 é pH. P é o potencial de concentração de H_2 , Rm é a velocidade específica máxima de obtenção de H_2 .

O modelo de regressão adquirido para resposta P (Y_1) com nível de significância de 10%, têm os termos estatisticamente significativos, constituindo-se de três termos lineares (X_1 , X_2 e X_3), um termo quadrático (X_3^2) e duas interações entre eles ($X_1.X_2$ e $X_2.X_3$), referentes a concentração de BCA (X_1) e licor de pentoses (X_2) e licor de pentoses com pH (X_3). Não foi considerado significativa, as interações entre (X_1 e X_3) pois o valor de p ($p = 0,8142$) ultrapassou o limite de significância a 10% ($p \leq 0,1$). Por meio da Equação 5.1 tem-se a descrição da produção de hidrogênio (P) em função das variáveis codificadas. No modelo, contém apenas os termos que são estatisticamente significativos.

$$Y_1 = 1254,07 + 8,47 X_1 - 143,54 X_2 - 396,36 X_3 + 30,19 X_3^2 - 5,00 X_1 X_2 + 29,96 X_2 X_3$$

Equação 5.1

Conforme a Tabela 5.5 é possível inferir que o modelo para P é estatisticamente significativo, pois além do coeficiente de determinação (R^2) de 93,20%, o valor de $F_{\text{OBSERVADO}}$ para regressão/resíduos é aproximadamente 8,24 vezes maior que o F_{TABELADO} para os experimentos com intervalo de confiança de 90% para 6 graus de liberdade de regressão e 9 graus de liberdade para resíduos. O $F_{\text{OBSERVADO}}$ da falta de ajuste/erro puro é 2,57 vezes maior que o F_{TABELADO} para experimentos com 8 graus de liberdade para falta de ajuste e 1 grau de liberdade para erro puro em um

mesmo intervalo de significância de 10%. Ademais, o p-valor da regressão e falta de ajuste foram considerados estatisticamente significativos, com valores de 0,00009 e 0,06243, respectivamente. Dessa forma para P , a falta de ajuste não foi significativa, concluindo que o modelo é confiável para essa resposta (Y_1).

Tabela 5.5: ANOVA para os ensaios de DCCR, para P com nível de significância de 10%

P						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{OBSERVADO}	F_{TABELADO}	p-valor
Regressão	12504,2	6	2084,0	20,6	2,5	0,00009
Resíduos	912,3	9	101,4			
Falta de Ajuste	911,6	8	113,9	153,1	59,4	0,06243
Erro Puro	0,7	1	0,7			

Visto que o resultado obtido após o modelo de regressão foi tido como estatisticamente significativo, é possível considerar a superfície resposta para Y_1 em suas interações significativas de $X_1.X_2$ (Figura 5.4) e $X_2.X_3$ (Figura 5.5). Por meio da análise da superfície, verificou-se para resposta Y_1 para as interações entre X_1 e X_2 , a maior obtenção de P (mL) foi para concentração de licor de pentoses de 3 a 5 g.DQOL⁻¹ e BCA de 1 a 5 g.L⁻¹.

Já para o modelo de regressão obtido para resposta R_m (Y_2) com nível de significância de 10%, têm-se os termos estatisticamente significativos, constituindo-se de três termos lineares (X_1 , X_2 e X_3), um termo quadrático (X_3^2) e duas interações entre eles ($X_1.X_3$ e $X_2.X_3$), referentes a concentração de BCA (X_1) e pH (X_3) e licor de pentoses (X_2) com pH (X_3). Não foi considerado estatisticamente significativo, as interações entre (X_1 e X_2) pois o valor de p ($p = 0,2242$) ultrapassou o limite de significância a 10% ($p \leq 0,1$). Por meio da Equação 5.2 tem-se a descrição da velocidade de produção (R_m) em função das variáveis codificadas. No modelo, contém apenas os termos que são estatisticamente significativos a um nível de confiança de 90%.

$$Y_2 = 457,23 - 12,71 X_1 - 15,57 X_2 - 145,23 X_3 + 11,42 X_3^2 - 2,16 X_1 X_3 + 2,21 X_2 X_3$$

Equação 5.2

Sendo, $Y_1 = P$, concentração máxima de H_2 ; $Y_2 = P$, velocidade de produção de H_2 ; $X_1 = \text{BCA}$, efeito linear; $X_2 = \text{Licor de pentoses}$, efeito linear; $X_3 = \text{pH}$, efeito linear; $X_3^2 = \text{pH}$, efeito quadrático; $X_1 X_2 = \text{Interação entre } X_1 \text{ e } X_2$; $X_1 X_3 = \text{Interação entre } X_1 \text{ e } X_3$; $X_2 X_3 = \text{Interação entre } X_2 \text{ e } X_3$.

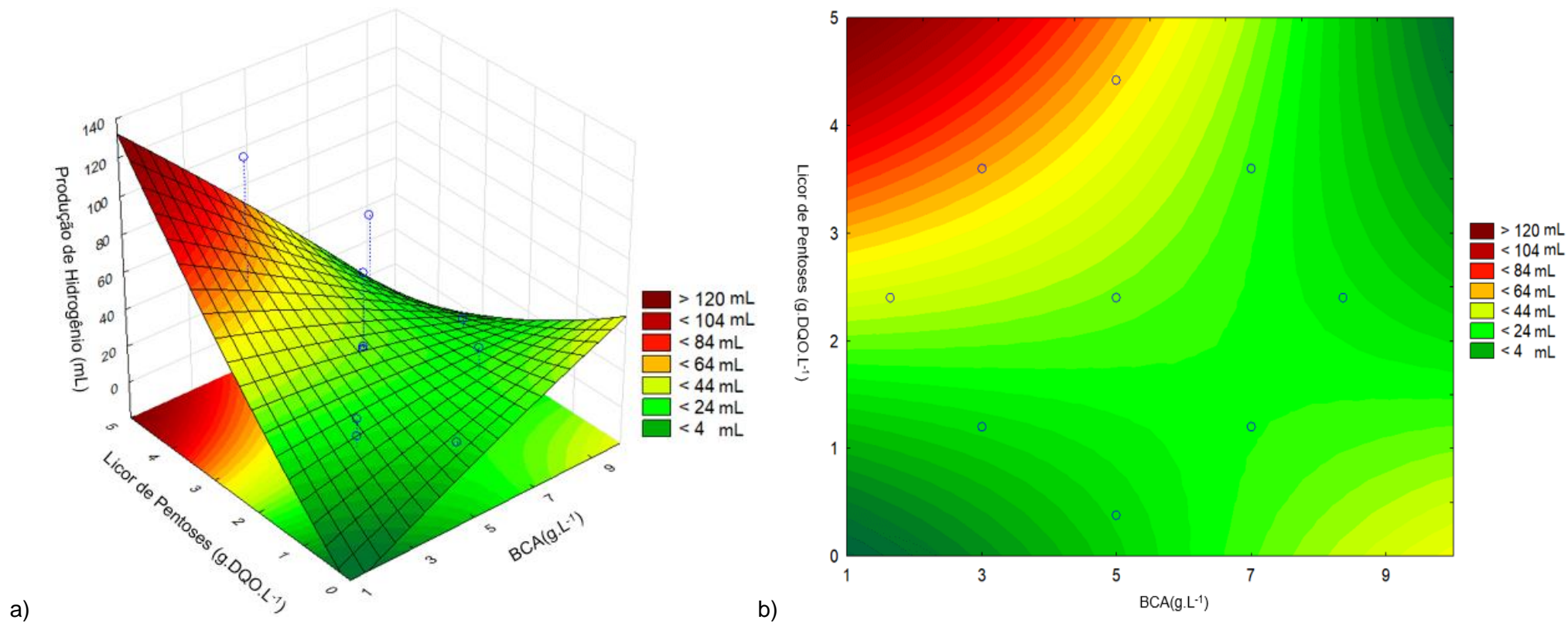


Figura 5.4: Superfície resposta (a) e superfície de contorno (b) obtido através das interações entre BCA (X_1) e Licor (X_2) para resposta Y_1 com pH fixado em 6.

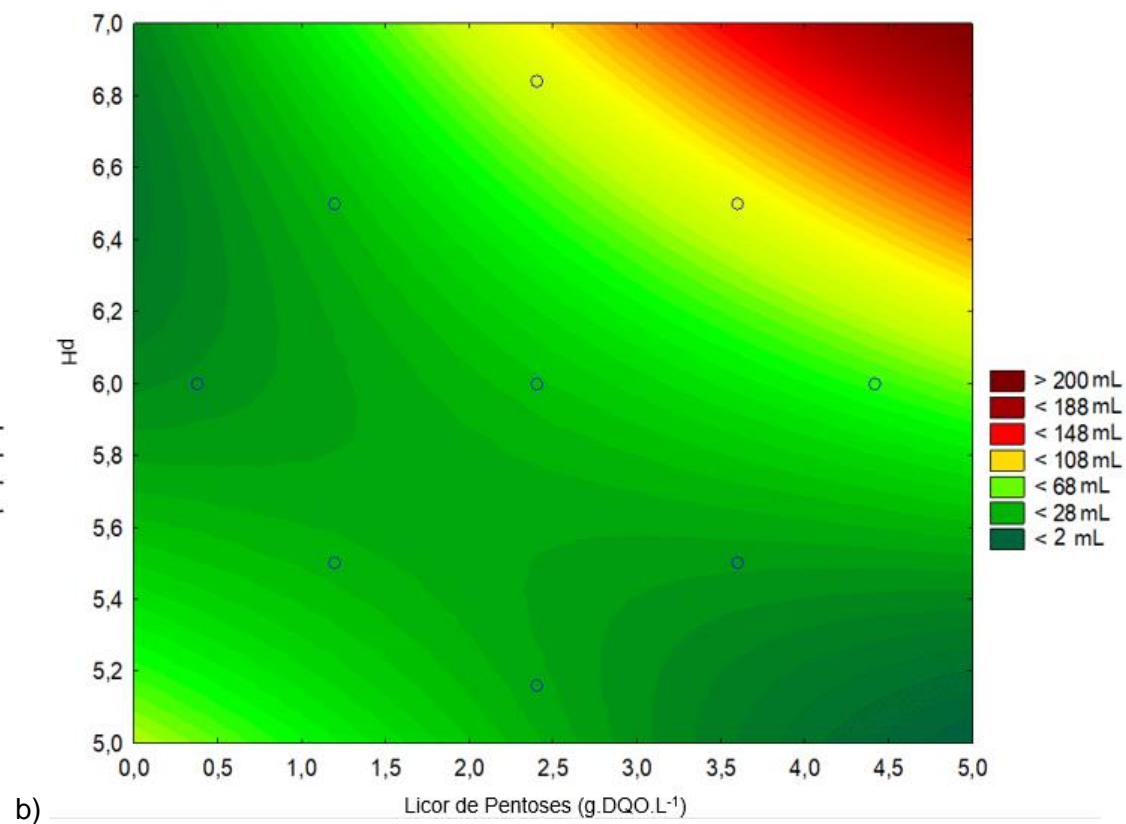
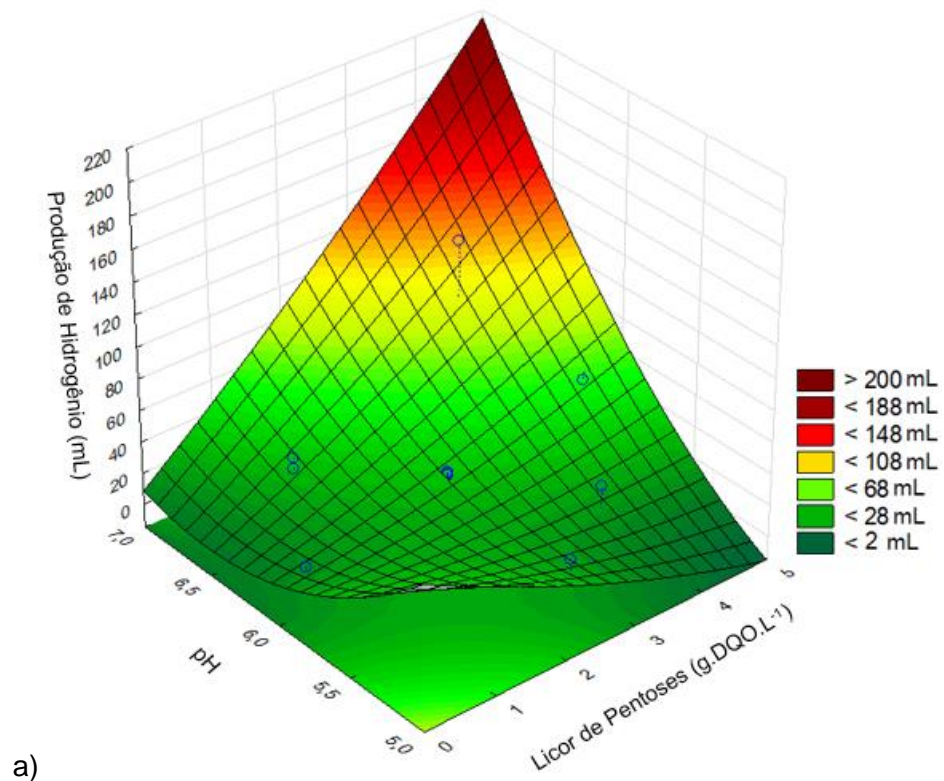


Figura 5.5: Superfície resposta (a) e superfície de contorno (b) obtido através das interações entre licor de pentoses (X_2) e pH (X_3) para resposta Y_1 .

A partir da Figura 5.4 observa-se que a região ótima para produção de hidrogênio entre as interações X_1 (BCA) e X_2 (Licor de Pentoses) apresenta-se com BCA variando a partir 1 e 3 g.L⁻¹ e valor de licor a partir de 4 e 5 g.DQO.L⁻¹. Conforme a Figura 5.5, observa-se a região ótima para produção de hidrogênio entre as interações X_2 (Licor de Pentoses) e X_3 (pH) foi com licor de 4,5 a 5 g.DQO.L⁻¹ e pH de 6,7 e 7.

Na Tabela 5.6 são mostrados os valores do teste ANOVA para a resposta Rm, sendo obtido $F_{\text{OBSERVADO}}$ para regressão/resíduos de aproximadamente 7,2 vezes maior que o F_{TABELADO} para os experimentos com intervalo de significância de 10% para 6 graus de liberdade de regressão e 9 graus de liberdade para resíduos. Por outro lado, para o erro puro o $F_{\text{OBSERVADO}}$ é 16,97 vezes menor que o F_{TABELADO} para experimentos com 8 graus de liberdade para falta de ajuste e 1 grau de liberdade para erro puro em intervalo de confiança de 90%. Dessa forma, a falta de ajuste foi significativa para o parâmetro Rm, portanto, os resultados experimentais não foram ajustados ao modelo.

Tabela 5.6: ANOVA para os ensaios de DCCR, para Rm com nível de significância de 10%

Rm						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{OBSERVADO}}$	F_{TABELADO}	p-valor
Regressão	468,5	6	78,1	18,0	2,5	0,00015
Resíduos	39,1	9	4,3			
Falta de Ajuste	37,7	8	4,7	3,5	59,4	0,39211
Erro Puro	1,3	1	1,3			

Conforme a Figura 5.5, para as interações X_2 e X_3 , observa-se que a faixa de pH inicial ótimo foi de 6,5 a 7,0 com hidrolisado do BCA entre 3 e 5 g.DQO.L⁻¹. O pH inicial nessa faixa pode estimular maior diversidade de microorganismos, levando a maior produção de hidrogênio, aumentando a sinergia entre grupos de microorganismos de capacidade metabólica, tanto hidrolíticos quanto fermentativos (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Os valores preditos e experimentais para as respostas P (Y_1) e Rm (Y_2) são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Valores preditos e experimentais para as respostas *P* e *R_m*

Ensaio	Valor Experimental de <i>P</i> (mL)	Valor Predito de <i>P</i> (mL)	Valor Experimental de <i>R_m</i> (mL.h ⁻¹)	Valor Predito de <i>R_m</i> (mL.h ⁻¹)	R ²
C1	19,64 ± 1,22	20,33	1,27 ± 0,21	1,43	0,99
C2	21,96 ± 3,31	30,21	2,84 ± 0,20	1,59	0,98
C3	29,94 ± 3,15	35,35	2,50 ± 0,49	2,32	0,99
C4	0,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00	--
C5	28,82 ± 2,97	22,23	3,28 ± 0,62	3,10	0,98
C6	35,66 ± 3,97	32,11	13,46 ± 4,96	11,92	0,99
C7	126,82 ± 10,46	109,18	11,04 ± 1,75	10,57	0,97
C8	69,84 ± 3,37	71,02	17,25 ± 2,42	15,37	0,99
C9	32,57 ± 3,05	44,04	1,43 ± 0,36	1,00	0,97
10	21,4 ± 1,54	20,26	2,32 ± 0,25	5,18	0,96
C11	14,46 ± 1,46	9,48	0,70 ± 0,24	1,54	0,98
C12	52,30 ± 5,60	54,83	3,59 ± 0,71	5,18	0,99
C13	30,34 ± 5,37	21,66	0,99 ± 0,20	1,83	0,96
C14	71,34 ± 3,80	88,76	15,86 ± 4,55	17,45	0,98
C15 (PC)	31,84 ± 2,31	32,15	0,95 ± 0,28	1,56	0,99
C16 (PC)	30,62 ± 3,57	32,15	2,59 ± 0,60	1,56	0,99

Conforme a Tabela 5.7, os valores de todas as condições experimentais de *P* e *R_m*, aproximaram-se dos valores preditos de *P* e *R_m*, respectivamente. Vale ressaltar ainda que para todas as condições dos ensaios do DCCR os valores de R² foram ≥ 0,96.

5.3.2 Avaliação dos metabólitos solúveis

5.3.2.2 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos foram observados em todos os experimentos, sendo de 725 mg.L⁻¹ em C11 até 2.343 mg.L⁻¹ em C12. Os principais ácidos orgânicos observados foram os seguintes: ácido butírico (10,64 em C13 até 53,16% em C11), acético (14,58 em C4 até 30,81% em C16) láctico (6,38 em C5 até 34,72% em C13) e propiônico (9,01 em C6 até 49,54% em C4), conforme a Tabela 5.8. Possivelmente, a provável

diversidade de populações endógenas dos substratos utilizados nessa pesquisa, resultou em capacidade metabólica diversa (WEI; LIU; YANG, 2013). Dessa forma, observa-se que as principais vias metabólicas durante os ensaios com BCA e licor de pentoses, foram as vias butírica e acética, respectivamente.

Os resultados dessa pesquisa corroboram com outros autores como Baêta *et al.* (2016b), Fangkum e Reungsang (2011), Soares *et al.* (2017) e Pattra *et al.* (2008), os quais trabalharam com hidrolisado do BCA, sendo verificado que as principais vias metabólicas utilizadas para produção biológica de H₂ foram a butírica e acética.

Tabela 5.8: Porcentagem de ácidos orgânicos ao final dos experimentos.
Ácidos orgânicos voláteis (%)

Ensaio	HAc	HFo	HLa	HPr	HBu*	Outros**
C1	25,9		13,2	15,7	31,7	13,5
C2	25,5		19,3	27,9	26,0	13,4
C3	23,6	2,9	21,5	18,1	18,5	16,2
C4	14,6	7,6	15,1	49,5		13,3
C5	28,3		6,4	9,5	47,1	8,7
C6	29,3		9,5	9,0	48,4	3,9
C7	20,5	1,71	11,3	14,8	44,4	6,8
C8	21,3	3,6	11,6	20,8	38,4	4,4
C9	25,9	2,3	15,4	14,0	27,9	14,5
C10	22,1	2,4	17,0	18,7	26,1	13,7
C11	26,9		8,3	11,6	53,5	
C12	24,7	4,78	14,8	14,4	25,6	15,7
C13	20,3	4,6	34,7	23,8	10,6	13,7
C14	17,5	1,9	13,2	12,3	45,7	9,3
C15 (PC)	28,9	1,1	12,7	11,5	36,3	9,4
C16 (PC)	30,8	1,6	9,8	9,9	33,7	14,1

* Conforme Wang *et al.* (1999), ocorre simultânea conversão entre os ácidos butírico e isobutírico pela migração de agrupamentos carboxílicos. Desse modo, foi considerado as formas isômeras desses ácidos como ácido butírico.

** Ácido valérico, ácido isovalérico e ácido cítrico.

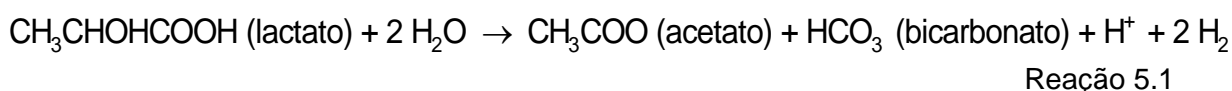
O ácido butírico (HBu) foi o metabólito solúvel mais observado nos ensaios de DCCR, a partir da biomassa autóctone do BCA e do licor de pentoses. A maior proporção deste ácido ocorreu nos ensaios C5 (47,11%), C6 (48,36%), C7 (44,43%) e C14 (45,74%), em pH inicial 6,50 (exceto em C14 em pH inicial 6,0). A excessiva produção de HBu pode ter contribuído significativamente para maior *P* de H₂

observadas nos ensaios citados anteriormente. Todavia, no ensaio C4 onde não ocorreu produção de hidrogênio, também não foi observado este ácido orgânico. Mazareli *et al.* (2020) também relataram incremento nas concentrações finais de H₂ nos ensaios em pH inicial $\geq 6,50$, utilizando resíduos da casca da banana para produção de hidrogênio.

Ácido acético (HAc) foi o segundo ácido orgânico observado em maior proporção nos ensaios do DCCR. Destaque-se que esse ácido faz parte da composição do licor de pentoses, advindo da hemicelulose e celulose. A maior concentração deste ácido foi observada no ensaio C9 (478 mg.L⁻¹) e ensaio C12 (577 mg.L⁻¹). Vale ressaltar que ambas as condições foram em pH inicial 6,0. Entretanto, a menor concentração deste ácido foi observada no ensaio C11, também em pH inicial 6,0, porém com menor concentração de licor de pentoses (0,4 g.DQO.L⁻¹) dos ensaios do DCCR.

O ácido láctico (HL_a) foi o terceiro maior metabólito solúvel observado nos ensaios do planejamento experimental (Figura 5.6 e Figura 5.7). As maiores concentrações deste ácido ocorreram nos ensaios C12 e C16 de 488 e 408 mg.L⁻¹, respectivamente. As menores concentrações deste ácido ocorreram nos ensaios C5 e C6, ambas em pH inicial 6,50, de 88 e 72 mg.L⁻¹, respectivamente. Provavelmente, condições em pH básico são desfavoráveis a produção desse composto (ANTONOPOULOU; VAYENAS; LYBERATOS, 2016). Nos ensaios em pH inicial $\leq 5,5$ (C1, C2, C3, C4 e C13) foram observados 358, 369, 322, 348 e 312 mg.L⁻¹, respectivamente, de ácido láctico. Tal possibilidade pode estar relacionada à afinidade de bactérias lácticas a condições ácidas, e conseqüentemente, à assimilação de hexoses e pentoses. Estas bactérias também foram relatadas por Baêta *et al.* (2016a) durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico em reatores em batelada, a 35 °C.

Em relação ao consumo do ácido láctico em todos os ensaios, possivelmente pode ter ocorrido via síntese do bicarbonato e produção de ácido acético, e relacionado ao incremento de pH observado na maioria dos ensaios (Reação 5.1) (MONTTOYA *et al.*, 2020):



Não foi possível estabelecer uma relação de produção de hidrogênio e ácido láctico, uma vez que tanto no ensaio com ausência de H₂ (C4), quanto no ensaio com maior produção de H₂ (C7) as concentrações de ácido láctico foram similares.

Em relação ao ácido propiônico (HPr), observou-se (Figura 5.7) que sua maior produção ocorreu nos ensaios C4, C2 e C13, correspondendo a 793, 389 e 386 mg.L⁻¹, respectivamente. Ressalta-se ainda que nessas condições, o pH inicial foi $\leq 5,50$, corroborando com Dareioti, Vavouraki e Kornaros (2014), em que o pH mais ácido é favorável para o estabelecimento da rota propiônica. Ademais, este ácido orgânico não é favorável para fermentação uma vez que consome hidrogênio (Reação 5.2), explicando a ausência de hidrogênio em C4.



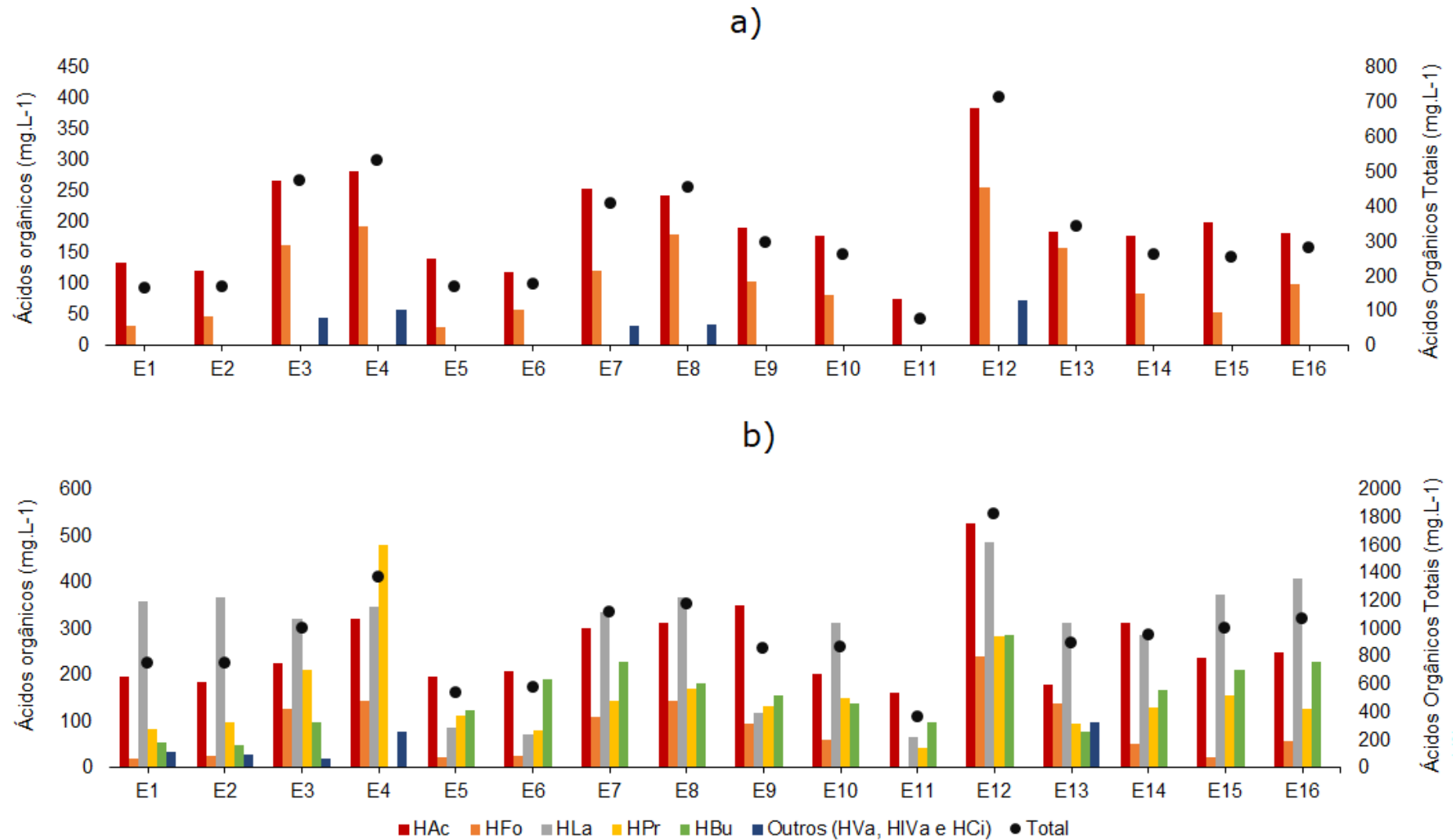


Figura 5.6: Ácidos orgânicos dos ensaios fermentativos – a) fase inicial e b) fase latência.

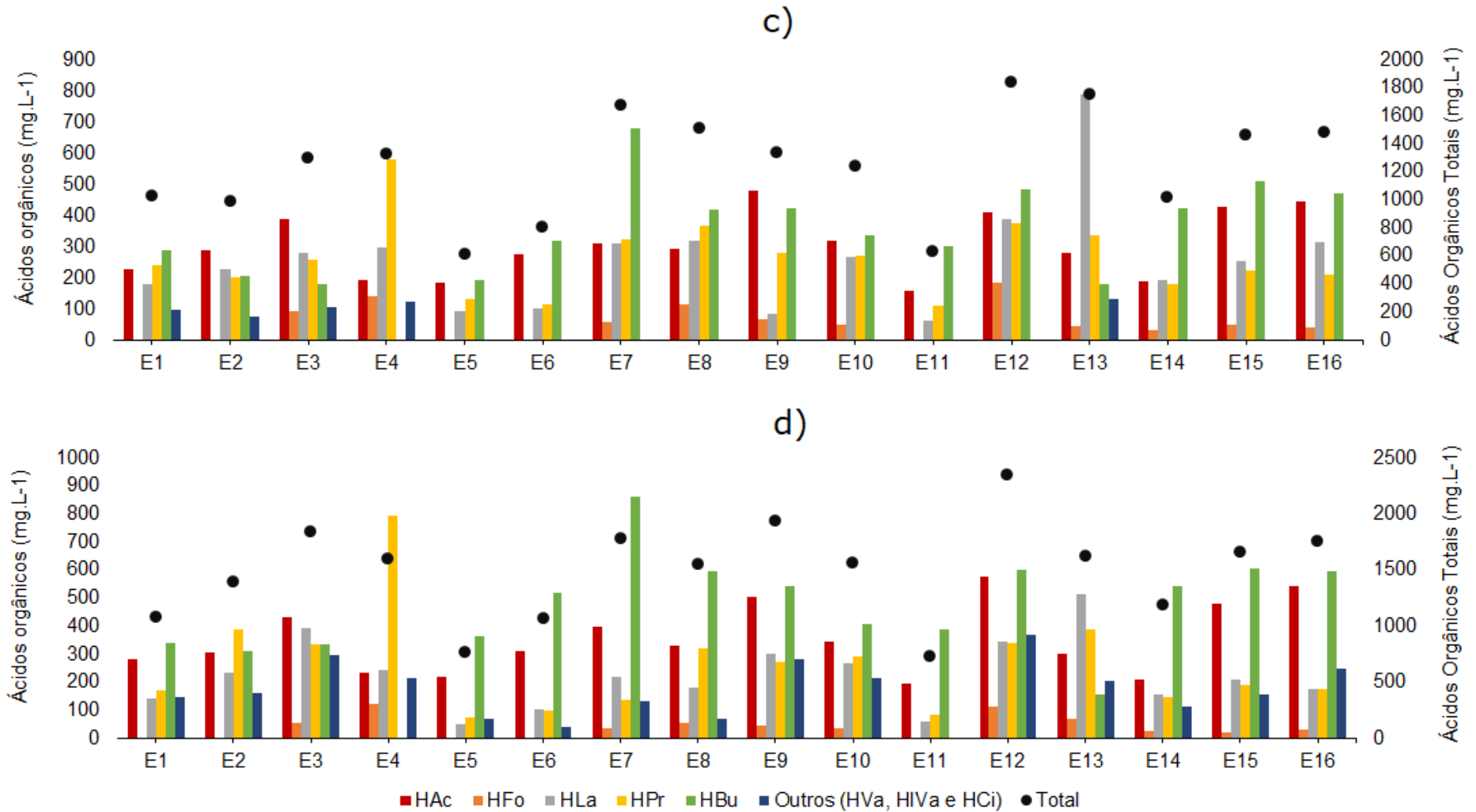


Figura 5.7: Ácidos orgânicos durante os ensaios fermentativos – c) exponencial e d) estabilização.

Foi realizado um teste delineamento fatorial para verificação da interferência das variáveis independentes na produção de ácidos orgânicos. Apenas as produções finais de ácido butírico (mg.L^{-1}) foram afetadas pela concentração do substrato e pH. Com objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes sobre a produção de HBU, foram considerados estatisticamente significativos as variáveis com nível de significância de 10% ($p \leq 0,10$) (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Valores de significância para o intervalo de confiança de 90% das variáveis dos ensaios do DCCR para produção de ácido butírico

p-valor		
Interações	HBU	Fatores
X_1	0,0105	Significante
X_1^2	0,0318	Significante
X_2	0,0180	Significante
X_2^2	0,0541	Significante
X_3	0,0000	Significante
X_3^2	0,0017	Significante
$X_1.X_2$	0,0025	Significante
$X_1.X_3$	0,1338	Não Significante
$X_2.X_3$	0,0009	Significante

O modelo de regressão adquirido para resposta HBU com nível de significância de 10%, têm os termos estatisticamente significativos, constituindo-se de três termos lineares (X_1 , X_2 e X_3), três termos quadráticos (X_1^2 , X_2^2 e X_3^2) e duas interações entre eles ($X_1.X_2$ e $X_2.X_3$), referentes a concentração de BCA (X_1) e licor de pentoses (X_2) e licor de pentoses (X_2) com pH (X_3). Não foi considerado como significativa, as interações entre (X_1 e X_3) porque o valor de p ($p = 0,1338$) ultrapassou o limite de significância a 10% ($p \leq 0,1$). Na Equação 5.3 está descrita a equação de regressão de ácido butírico (HBU) em função das variáveis codificadas. No modelo, contém apenas os termos que são estatisticamente significativos.

$$\text{HBU} = - 12495,2 + 183,6 X_1 - 11,9 X_1^2 - 751,9 X_2 - 28,3 X_2^2 + 4227,5 X_3 - 365,1 X_3^2 - 37,8 X_1 X_2 + 185,7 X_2 X_3$$

Equação 5.3

Conforme a Tabela 5.10 é possível inferir que o modelo para P é estatisticamente significativo, pois além do coeficiente de determinação (R^2) de 96,10%, o valor de $F_{\text{OBSERVADO}}$ para regressão/resíduos é aproximadamente 2,32 vezes

maior que o F_{TABELADO} para os experimentos com intervalo de confiança de 90% para 8 graus de liberdade de regressão e 7 graus de liberdade para resíduos. O $F_{\text{OBSERVADO}}$ da falta de ajuste/erro puro é 1,86 vezes maior que o F_{TABELADO} para experimentos com 6 graus de liberdade para falta de ajuste e 1 grau de liberdade para erro puro em um mesmo intervalo de significância de 10%. Ademais, o p-valor da regressão e falta de ajuste foram considerados estatisticamente significativos, com valores de 0,00028 e 0,07360, respectivamente. Dessa forma para HBU, a falta de ajuste não foi significativa, concluindo que os dados experimentais se ajustaram ao modelo para essa resposta.

Tabela 5.10: ANOVA para os ensaios de DCCR, para HBU com nível de significância de 10%

P						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{OBSERVADO}	F_{TABELADO}	p-valor
Regressão	597776,1	8	74722,0	21,6	9,3	0,00028
Resíduos	24243,7	7	3463,4			
Falta de Ajuste	24206,2	6	4034,4	107,8	58,2	0,07360
Erro Puro	37,4	1	37,4			

Com base na Figura 5.8, observa-se que as condições de maior concentração de ácido butírico foram aquelas com concentração de licor de pentoses acima de 4,0 g/L e pH acima de 6,6. Além disso, a maior produção de ácido butírico foi observada na mesma região de maior produção de hidrogênio pH $\geq 6,4$ e licor de pentose entre 3,5 e 5.

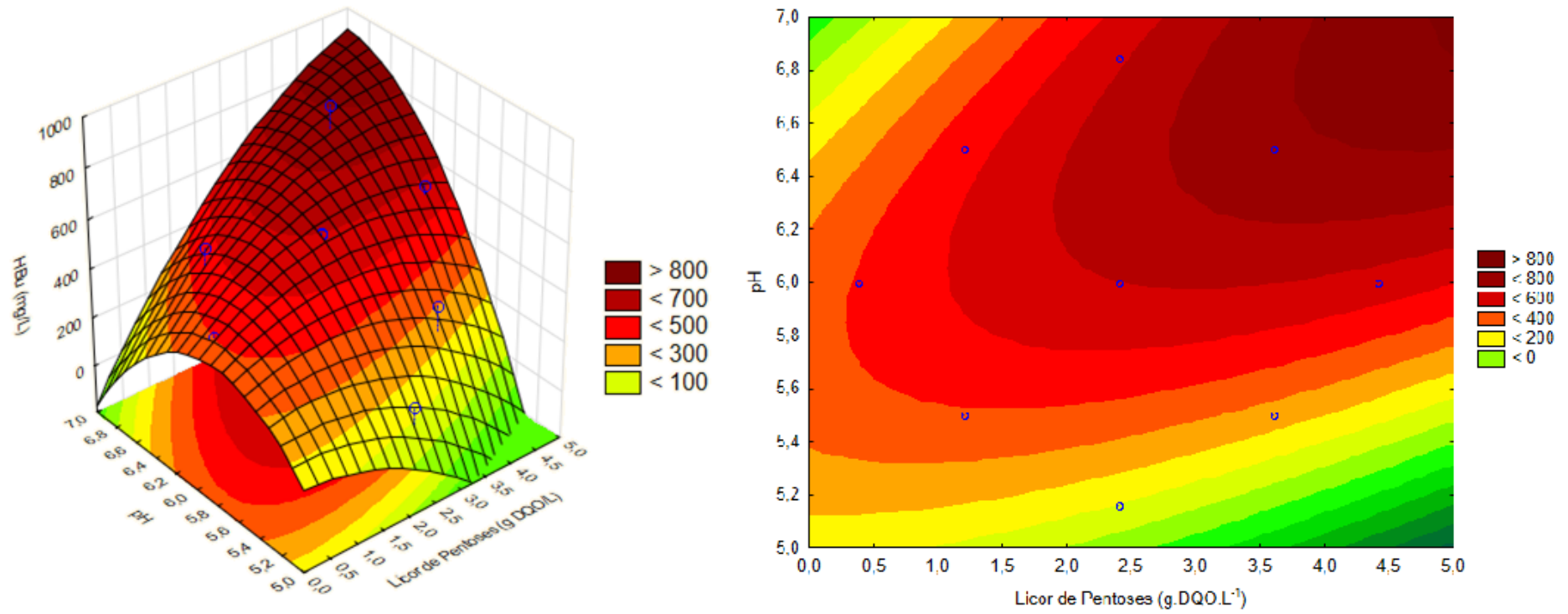


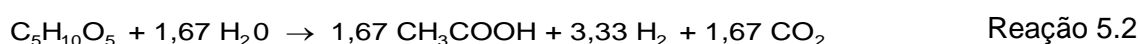
Figura 5.8: Superfície resposta e gráfico de contorno para produção de ácido butírico.

5.3.2.1 Carboidratos

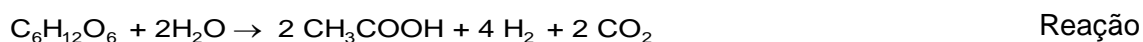
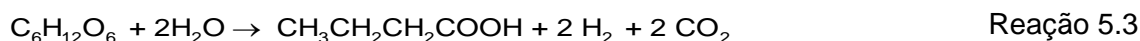
A produção de hidrogênio requer a degradação das frações de carboidratos dos resíduos por hidrólise enzimática para a produção de açúcar redutor (ALEXANDROPOULOU *et al.*, 2018). Esta etapa é seguida pela fermentação heterotrófica de açúcares para produzir ácidos orgânicos (NATH; KUMAR; DAS, 2006). Em seguida, os ácidos orgânicos são convertidos em hidrogênio pelo processo de fermentação (NAYAK; BHUSHAN, 2019). Carboidratos advindos do BCA e do seu hidrolisado (licor de pentoses) são fornecidos pela celulose e hemicelulose. Com a quebra da celulose, há liberação de açúcares hexoses (C6), entretanto, pela quebra da hemicelulose, há liberação de açúcares pentoses (C5). Os principais monossacarídeos de hexoses vindos da celulose do BCA são glicose e galactose. Já enquanto há uma quebra da estrutura da hemicelulose do BCA, os principais monossacarídeos liberados em forma de pentoses são xilose e arabinose. Esses açúcares monossacarídeos podem ser convertidos em hidrogênio e ácidos orgânicos através de microorganismos fermentativos.

A produção biológica de hidrogênio usando carboidratos (pentoses e hexoses) como substrato é caracterizado como fermentação do tipo acético-butírico. Esses carboidratos entram na via glicolítica, formando ácido butírico (Reação 5.1 e Reação 5.3) e acético (Reação 5.2 e Reação 5.4) principalmente, além de H₂ e CO₂ (DE SÁ *et al.*, 2020). Este processo biológico pode ser resumido pelas seguintes reações:

Pentoses:



Hexoses:



Para a remoção de carboidratos totais (CT) não houve valor significativo para intervalo de confiança de 90% conforme a ANOVA (Tabela 5.11). O modelo de regressão obtido para resposta CT com nível de significância de 10% ($p \leq 0,1$), têm-se os termos estatisticamente significativos, constituindo-se de dois termos lineares (X_1 e X_2) e um termo quadrático (X_1^2). Não foi considerado como estatisticamente

significativo, as interações entre (X_1 e X_2) porque o valor de p ($p = 0,1967$) ultrapassou o limite de significância a 10% ($p \leq 0,1$). A conversão de Carboidratos Totais (C_{CT}) em função das variáveis codificadas está descrita na Equação 5.4, para um modelo com apenas os termos estatisticamente significativos e nível de confiança de 90%.

$$Y = 59,94 - 4,19 X_1 + 3,96 X_1^2 - 4,58 X_2 + 7,73 X_3 \quad \text{Equação 5.4}$$

De acordo com a Tabela 5.11 obtida para a resposta de C_{CT} , a regressão foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,1$). Entretanto a falta de ajuste observada foi considerada não significativa ($p \geq 0,1$). Para regressão, o $F_{OBSERVADO}$ foi aproximadamente 4,8 vezes maior que o $F_{TABELADO}$. Para o erro puro, o $F_{OBSERVADO}$ foi 7,9 vezes menor que o $F_{TABELADO}$. O percentual de variação (R^2) foi de 81,53%, contendo alta variação observada dentro do erro experimental.

Tabela 5.11: ANOVA para os ensaios de DCCR, para remoção de Carboidratos Totais com nível de probabilidade de 10%

CT						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{OBSERVADO}$	$F_{TABELADO}$	p-valor
Regressão	1536,0	4	384,0	12,1	2,5	0,00051
Resíduos	347,9	11	31,6			
Falta de Ajuste	343,4	10	34,3	7,6	60,1	0,27511
Erro Puro	4,5	1	4,5			

Os valores de produção de hidrogênio e conversão de carboidratos totais estão delineados na Tabela 5.12. Para faixa de pH final entre 3,4 e 5,7, o menor valor de pH final (3,4) ocorreu no ensaio 4, em que não houve produção de hidrogênio. Também de acordo com a Tabela 5.12, em todas as condições dos ensaios do DCCR, o pH final em todos os ensaios foi menor que o pH inicial. Evidentemente, a diminuição dos valores de pH finais em relação aos valores iniciais nos ensaios em batelada, deu-se à pelo acúmulo de ácidos orgânicos durante a fermentação. Alterações nas vias metabólicas nos ensaios fermentativos podem ocasionar mudanças no metabolismo bacteriano, que por conseguinte, se altera conforme as condições experimentais.

Tabela 5.12: Valores codificados e respostas para produção de hidrogênio e remoção de carboidratos totais dos ensaios DCCR

Ensaio	BCA (g.L ⁻¹)	Licor de Pentoses (g.L ⁻¹)	pH inicial	P (mL H ₂)	CT _I (g.L ⁻¹)	CT _F (g.L ⁻¹)	C _{CT} (%)	pH final
1	3,0	1,2	5,5	19,64 ± 1,22	0,98 ± 0,26	0,49 ± 0,24	60	5,5
2	7,0	1,2	5,5	21,96 ± 3,31	0,89 ± 0,15	0,41 ± 0,12	54	4,6
3	3,0	3,6	5,5	29,94 ± 3,15	2,61 ± 0,25	1,88 ± 0,44	44	4,8
4	7,0	3,6	5,5	0,00 ± 0,00	2,88 ± 0,13	1,23 ± 0,49	38	3,4
5	3,0	1,2	6,5	28,82 ± 2,97	0,77 ± 0,09	0,21 ± 0,11	73	5,7
6	7,0	1,2	6,5	35,66 ± 3,97	0,92 ± 0,17	0,32 ± 0,15	67	5,8
7	3,0	3,6	6,5	126,82 ± 10,46	2,59 ± 0,34	0,76 ± 0,17	76	5,3
8	7,0	3,6	6,5	69,84 ± 3,37	2,90 ± 0,28	1,24 ± 0,21	57	5,1
9	1,6	2,4	6,0	32,57 ± 3,05	1,98 ± 0,16	0,96 ± 0,10	51	5,2
10	8,4	2,4	6,0	21,4 ± 1,54	2,04 ± 0,18	1,23 ± 0,15	39	5,3
11	5,0	0,4	6,0	14,46 ± 1,46	0,21 ± 0,06	0,08 ± 0,05	63	5,4
12	5,0	4,4	6,0	52,30 ± 5,60	3,53 ± 0,29	1,79 ± 0,22	49	5,2
13	5,0	2,4	5,2	30,34 ± 5,37	2,02 ± 0,26	1,03 ± 0,52	49	4,2
14	5,0	2,4	6,8	71,34 ± 3,80	2,06 ± 0,12	0,71 ± 0,19	66	5,9
15 (PC)	5,0	2,4	6,0	31,84 ± 2,31	2,03 ± 0,18	0,87 ± 0,13	58	5,1
16 (PC)	5,0	2,4	6,0	30,62 ± 3,57	2,05 ± 0,12	0,81 ± 0,29	61	5,4

Nota: X₁ é BCA (g.L⁻¹), X₂ é Licor de Pentoses (g.DQO.L⁻¹), X₃ é pH, CT_I é carboidratos totais inicial, CT_F é carboidratos totais final e C_{CT} é Conversão de Carboidratos Totais.

Diferentes concentrações finais de carboidratos em todos os ensaios do DCCR (C1-C16) foram observadas (Figura 5.9), sendo 1,89 g.L⁻¹ a concentração inicial média de carboidratos totais (hexoses e pentoses). A maior conversão de carboidratos (76%) foi observada no ensaio C7 e maior produção acumulada de hidrogênio de 126 mL. Rodríguez-Valderrama *et al.* (2020), também observaram maior consumo de carboidratos totais (96%) advindos do hidrolisado de frutas juntamente com palha de milho, na condição com maior produção acumulada de H₂ (212 mL) em reatores batelada em temperatura mesofílica. Nos demais ensaios, como por exemplo em C1, C5, C6, C7, C11, C14 e C16, houve conversão de carboidratos ≥ 60%. Para os

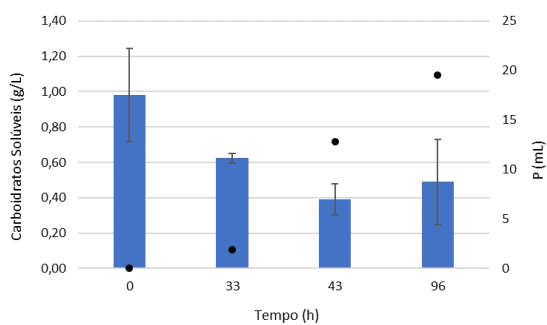
ensaios com pH inicial $\geq 6,5$ (C5 a C8) a conversão média de carboidratos foi de 67,8%, com valor médio de P de 66,49 mL H₂. Ensaios em pH inicial 6,0 (ensaios 9, 10, 11, 12, 15 e 16), a conversão média de carboidratos foi de 53,5 %, enquanto a produção média de hidrogênio foi de 30,53 mL. Para condições em pH inicial $\leq 5,5$ (ensaios 1, 2, 3, 4 e 13), a conversão média de carboidratos foi de 49%, valor 27% inferior àquele observado para os ensaios em pH inicial de 6,5. Enquanto, o valor médio de P foi de 20,37 mL H₂, valor 69,4% menor se comparado aos ensaios em pH inicial de 6,5. Esse estudo corrobora com Hwang *et al.* (2011), onde segundo os autores, a diminuição de λ pode ser atribuída ao tipo de resíduo com maior concentração de carboidratos, conseqüentemente favorecendo rápida utilização e produção hidrogênio.

Para o ensaio C4 (Figura 5.9), houve consumo de carboidratos, porém não ocorreu produção de hidrogênio. Provavelmente, em função da concentração de carboidratos (2,8 g.L⁻¹) nesse ensaio, além do pH inicial ácido (pH inicial de 5,5), pode ter ocasionado em mudança do metabolismo microbiano, resultando em alteração da via de produção de hidrogênio para formação de outros subprodutos (ARGUN; DAO, 2016). Ademais, em C4 houve maior produção de ácido propiônico desde a fase de latência até a fase de estabilização (Figura 5.6 e Figura 5.7). Eker e Sarp (2017) utilizaram o hidrolisado de resíduos de papel como substrato para produção de hidrogênio em reatores batelada em temperatura mesofílica e pH inicial de 6,8. Os carboidratos obtidos a partir do hidrolisado dos resíduos de papel foram usados em seis concentrações diferentes entre 3,84 e 45,5 g.L⁻¹ para determinar os efeitos da concentração de açúcar na produção de H₂. A maior produção acumulada de H₂ (128,99 mL) ocorreu com 18,9 g.L⁻¹ de carboidratos. Sob tais condições ocorreu inibição da produção de hidrogênio por acúmulo excessivo de ácidos orgânicos.

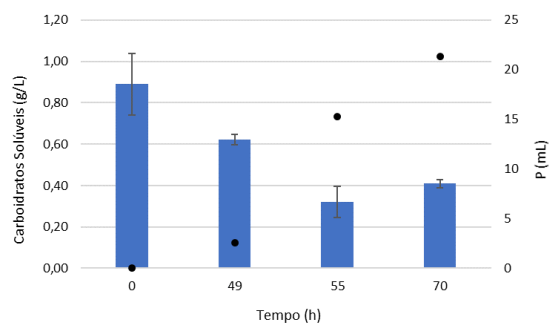
Em condições com pH inicial $\leq 5,5$ (C1, C2, C3 e C13), ocorreu aumento na concentração de carboidratos (100 mg.L⁻¹ em C1, 90 mg.L⁻¹ em C2, 410 mg.L⁻¹ em C3 e 320 mg.L⁻¹ em C13) (Figura 5.10). Este fato deve-se possivelmente as condições ambientais no meio, que poderiam ter favorecido o consórcio de bactérias consumidoras de material lignocelulósico, preferencialmente a quebra da celulose e a liberação de açúcares advindos da hemicelulose. Em contraste, nas demais condições (C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C14, C15 e C16) ocorreu a diminuição de carboidratos (pH inicial $\geq 6,0$) em todas as condições, possivelmente houve somente o consumo dos açúcares advindos do licor de pentoses (prontamente disponível no meio) e não a liberação de açúcares advindos do BCA (hemicelulose), como ocorreu com pH inicial $\leq 5,5$. De maneira semelhante, Rabelo *et al.* (2018) verificaram que a maior liberação de açúcares solúveis totais (403,4 mg.L⁻¹) advindos do BCA em

reatores batelada, ocorreu em condição de pH inicial de 4,6; ou seja, o dobro da concentração de açúcares liberados em experimentos com pH inicial de 6,0 e 7,4. Ainda segundo os autores, tanto a celulose, como a hemicelulose do BCA foi hidrolisada pelo consórcio fermentativo e pelas bactérias autóctones do BCA.

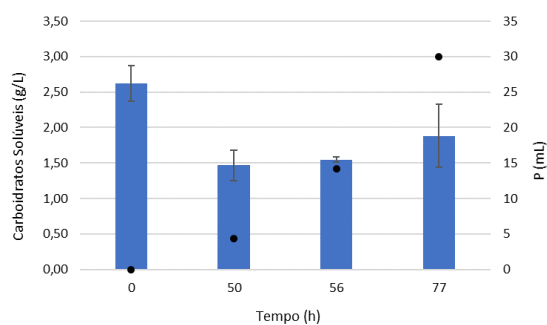
C1 (3,0 g BCA/L, 1,2 g licor/L, pH 5,5)



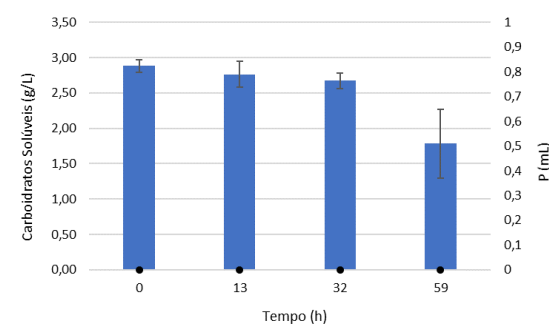
C2 (7,0 g BCA/L, 1,2 g licor/L, pH 5,5)



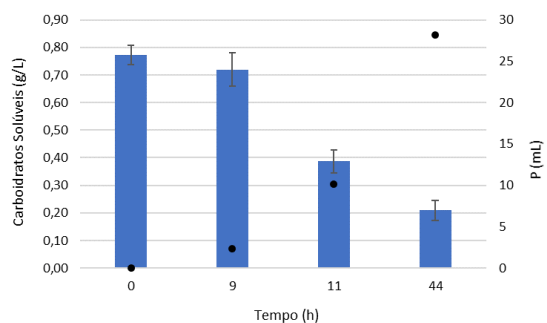
C3 (3,0 g BCA/L, 3,6 g licor/L, pH 5,5)



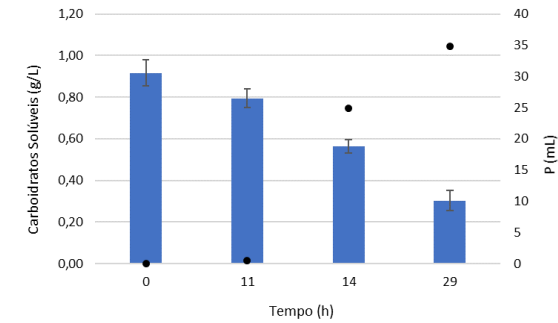
C4 (7,0 g BCA/L, 3,6 g licor/L, pH 5,5)



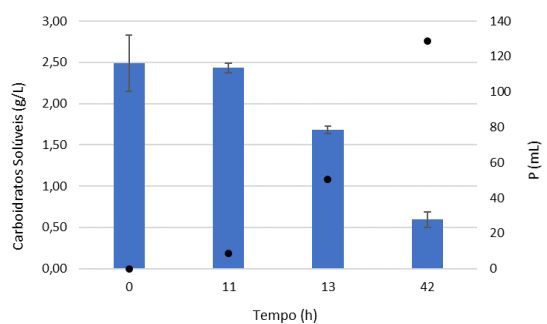
C5 (3,0 g BCA/L, 1,2 g licor/L, pH 6,5)



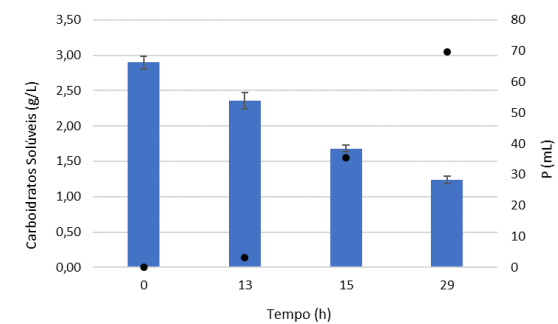
C6 (7,0 g BCA/L, 1,2 g licor/L, pH 6,5)



C7 (3,0 g BCA/L, 3,6 g licor/L, pH 6,5)



C8 (7,0 g BCA/L, 3,6 g licor/L, pH 6,5)



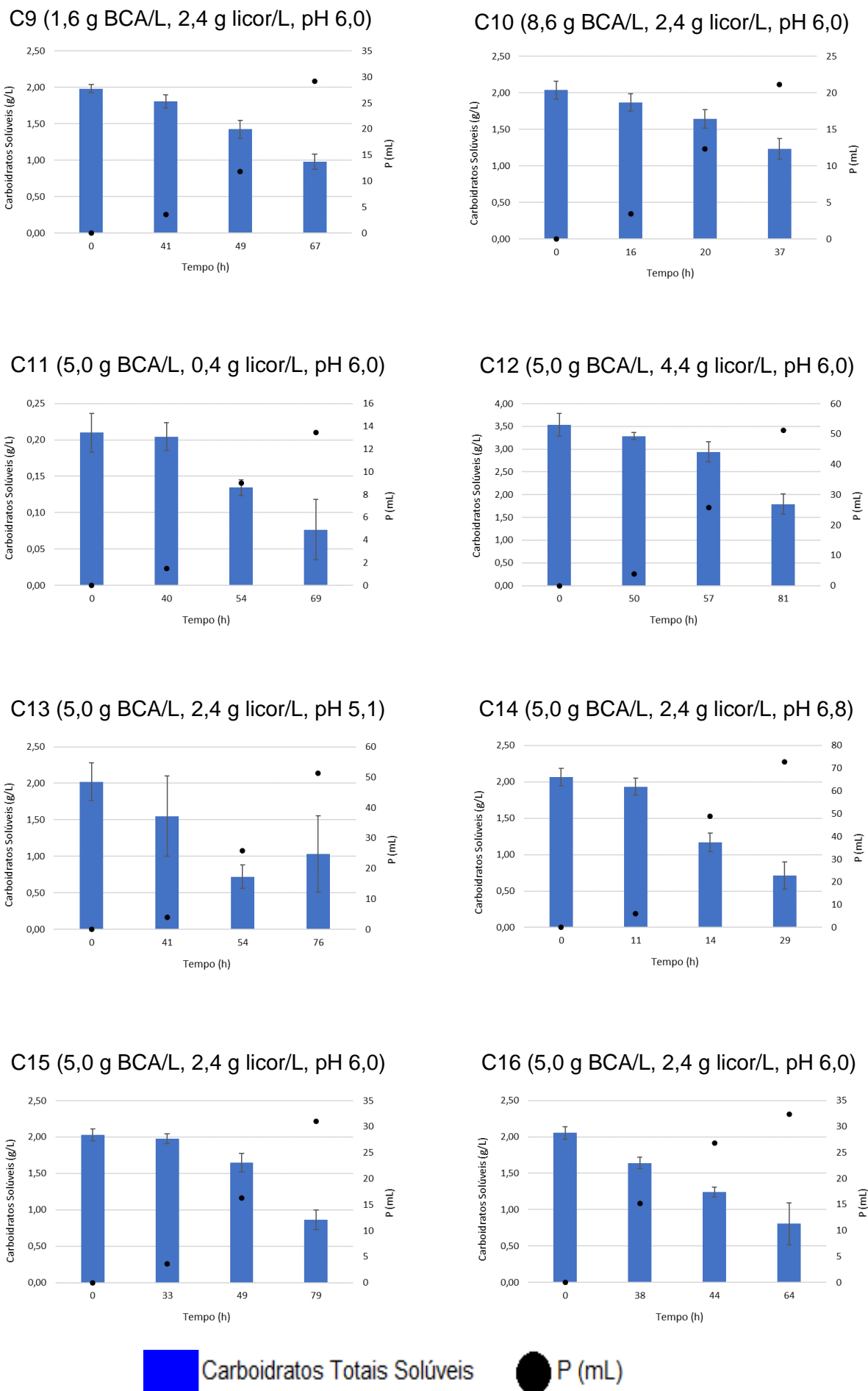


Figura 5.9: Carboidratos totais solúveis e hidrogênio acumulado ao longo do tempo nos ensaios fermentativos do DCCR.

5.3.2.3 Ácidos fracos

Para todos os ensaios do DCCR, foram avaliados os furanos, fenóis, ácido acético (HAc) e ácido fórmico (HFO), com objetivo de investigar a possível relação desses compostos endógenos do licor de pentoses bruto com a possível influência na produção de hidrogênio. As concentrações iniciais e finais de furanos, fenóis, ácido HAc e HFO, além da produção acumulada de hidrogênio (mL) estão delineadas na Figura 5.10.

Em relação ao 5-HMF verificou-se que sua concentração variou de inferior ao limite de detecção (C11) a 72 mg.L⁻¹ (C12), observando assim, baixos valores deste composto. A concentração média final foi de 16 mg.L⁻¹ (em todas as condições). Anburajan *et al.* (2018) observaram que uma concentração de até 600 mg.L⁻¹ não afetou a produção de hidrogênio. A remoção média de 5-HMF nos ensaios do DCCR foi de 56%. Remoção completa de 5-HMF ocorreu nos ensaios C1, C2 e C5. A menor remoção ocorreu em C14, com 33% (de 42 para 28 mg.L⁻¹). Cheng *et al.* (2015) observaram remoção média de 45% de 5-HMF em hidrolisado de aguapé para produção de hidrogênio em reatores batelada.

Em relação ao furfural, as concentrações iniciais variaram de inferior ao limite de detecção (C11) até 152 mg.L⁻¹ (C12). A concentração média inicial de furfural foi de 70 mg.L⁻¹. Já a concentração média final foi de 22 mg.L⁻¹. O furfural é produto originado da degradação de pentoses, enquanto o 5-HMF é resultante da degradação de hexoses, por isso a concentração de furfural em hidrolisados hemicelulósicos é geralmente superior à de 5-HMF. A conversão média de furfural foi de 65% para os ensaios do DCCR. A hipótese de maior conversão do furfural (65%) em relação ao 5-HMF (56%), pode ser devido ao seu menor peso molecular (LIN *et al.*, 2015). A completa remoção de furfural ocorreu nos ensaios C6 e C14, enquanto em C4 ocorreu a menor remoção, com 20%, onde também não houve produção de H₂ (118 mg.L⁻¹ para 94 mg.L⁻¹). Baêta *et al.* (2016b) observaram remoção média de furfural de 86%, a partir do hidrolisado do BCA para produção de hidrogênio.

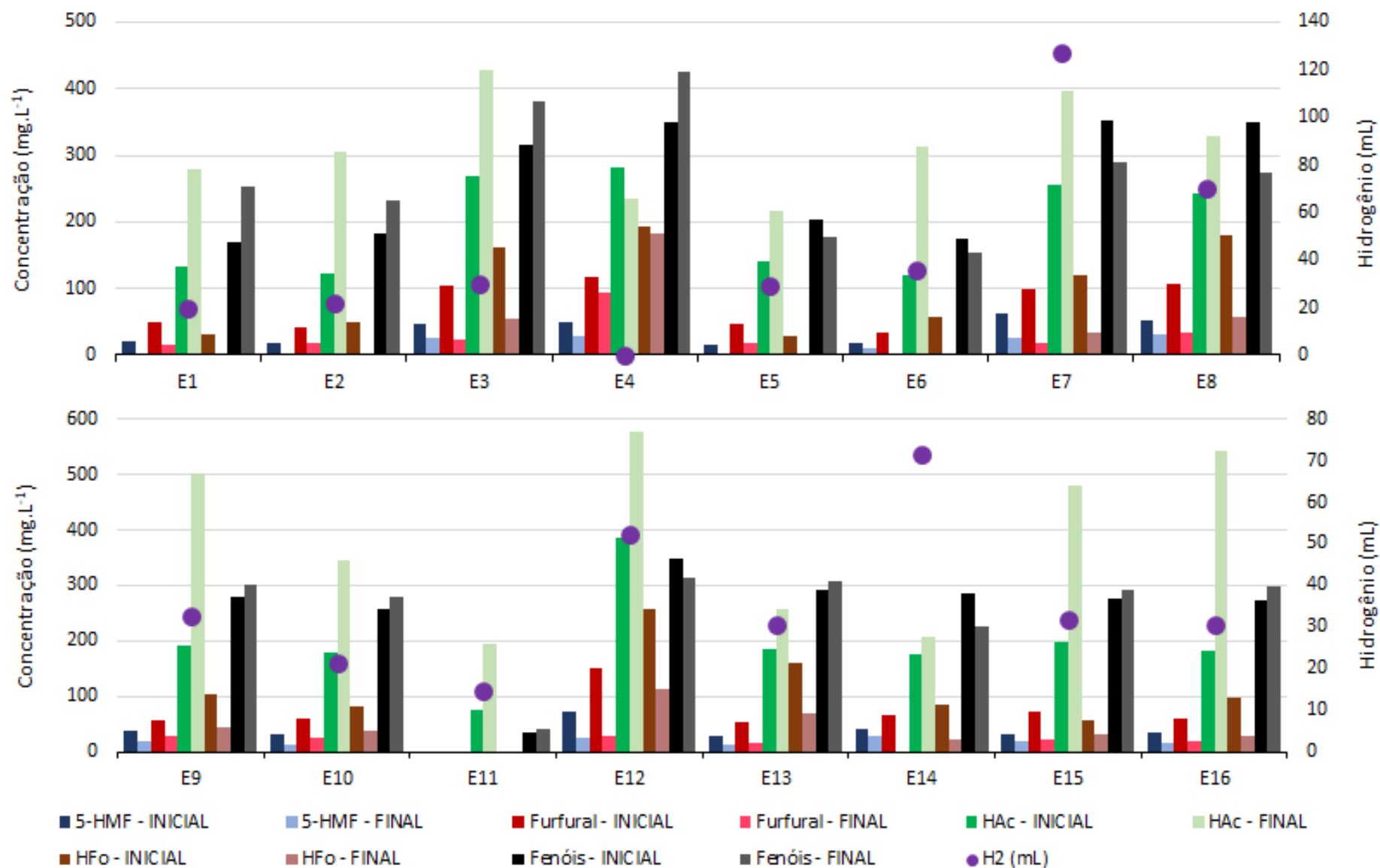
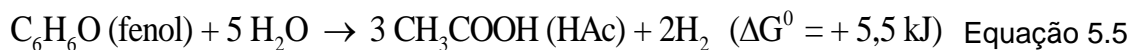


Figura 5.10: Furfural, fenóis e hidroximetilfurfural do licor de pentoses dos ensaios de DCCR.

Verificou-se para o ácido fórmico, concentração média inicial e final de 104 mg.L⁻¹ e 41 mg.L⁻¹, respectivamente. As concentrações de ácido fórmico não afetaram negativamente a produção de hidrogênio, uma vez que em C12 foi observado 256 mg.L⁻¹ e *P* de 52 mL H₂. Nos ensaios C1, C2, C5 e C6 foi observada remoção completa de ácido fórmico. Giraldeli, Fonseca e Reginatto, (2018) analisaram os efeitos das misturas de 5-HMF (0,6 g.L⁻¹), ácido levulínico (2,1 g.L⁻¹) e ácido fórmico (0,8 g.L⁻¹) para produção de hidrogênio por *Clostridium gjerinckii* e *Clostridium acetobutylicum*, utilizando glicose como substrato. Segundo os autores, sob tais condições ocorreu inibição da produção de hidrogênio por *C. beijerinckii* em 83% e *C. acetobutylicum* em 89%.

Para o ácido acético, observou-se concentrações médias iniciais e finais de 166 mg.L⁻¹ e 350 mg.L⁻¹, respectivamente. Não se verificou relação entre as concentrações iniciais de ácido acético e a produção de H₂, uma vez que para maior (C12 = 384 mg.L⁻¹) e menor (C11 = 75 mg.L⁻¹) concentração de ácido acético foi observada *P* de 52,30 ± 5,60 e 14,46 ± 1,46 mL H₂, respectivamente. Wang, Wan e Wang (2008) estudaram os efeitos de ácidos fracos em reatores batelada alimentados com glicose para produção de H₂ em temperatura mesofílica e pH inicial de 7,0. Segundo os autores, houve diminuição da produção de 274,2 mL H₂ para 118,0 mL H₂ quando houve adição de 2.450 mg.L⁻¹ de ácido acético.

Acerca dos fenóis, observou-se valor médio inicial e final de 259 mg.L⁻¹ e 265 mg.L⁻¹, respectivamente. Provavelmente, sob tais condições não foi verificado efeito negativo da produção de hidrogênio, uma vez que para o ensaio com maior concentração de fenóis totais C12 (349 mg.L⁻¹) e ensaio com menor concentração C11 (36 mg.L⁻¹) foi observado *P* de 52,30 ± 5,60 e 14,46 ± 1,46 mL H₂, respectivamente. Ademais, concentrações de fenóis totais ≥ 600 mg.L⁻¹ foi relatada como inibitória para produção de hidrogênio (KUMAR *et al.*, 2015b). Nos ensaios C5 (204 para 178 mg.L⁻¹), C6 (176 para 155 mg.L⁻¹), C7 (352 para 289 mg.L⁻¹), C8 (349 para 275 mg.L⁻¹), C12 (349 para 314 mg.L⁻¹) e C14 (287 para 227 mg.L⁻¹), ocorreu diminuição na concentração final de fenóis totais, em média de 15%, possivelmente utilizado para geração de hidrogênio, uma vez que foi observada maiores valores de *P* nesses ensaios (MONTTOYA *et al.*, 2020). Observa-se ainda que, nos ensaios que ocorreram diminuição da concentração de fenóis, exceto em C12, o pH inicial foi de 6,5. Possivelmente nesses ensaios, ocorreu a degradação de fenol para produção de hidrogênio e cogeração de ácido acético (Equação 5.5) (VILLA MONTTOYA *et al.*, 2020).



Embora, a reação possa ser termodinamicamente desfavorável ($\Delta G^\circ = + 5,5$), a continuação do processo possivelmente foi devido ao sinergismo microbiano entre diferentes populações no consórcio autóctone, sendo favorável para degradação do substrato lignocelulósico, além da capacidade de hidrólise de compostos complexos. (BOBOESCU *et al.*, 2014). Tai *et al.* (2010) investigaram a produção de hidrogênio utilizando glicose como substrato em reatores batelada, usando cultura pura de *C. butyricum*. Inibição total da atividade celular foi observada para concentração de fenol total $\geq 1.000 \text{ mg.L}^{-1}$. Durante a fermentação de 20 horas, com 200 mg.L^{-1} e 400 mg.L^{-1} de fenóis totais foram degradados, respectivamente, 67% e 34,8%. Ainda segundo os autores, verificou-se que *C. butyricum* produziu H_2 a partir de compostos fenólicos.

Nos ensaios C1 (169 para 253 mg.L^{-1}), C2 (183 para 232 mg.L^{-1}), C3 (315 para 382 mg.L^{-1}), C4 (343 para 425 mg.L^{-1}), C9 (278 para 300 mg.L^{-1}), C10 (256 para 293 mg.L^{-1}), C11 (36 para 40 mg.L^{-1}), C13 (291 para 309 mg.L^{-1}), C15 (276 para 253 mg.L^{-1}) e C16 (273 para 299 mg.L^{-1}), foi observado aumento da concentração de fenóis totais ao fim dos experimentos, provavelmente relacionado a degradação da lignina do BCA e consumo preferencial de carboidratos do licor (CHAPLEUR *et al.*, 2013; MONLAU *et al.*, 2014). Segundo Ahmad *et al.* (2018), o acúmulo de fenóis também pode causar alterações no fluxo de elétrons e conseqüentemente, causar o acúmulo de HAc no meio.

5.3.3 Validação experimental

A validação do modelo foi realizada com o objetivo de aferir a resposta predita na forma de produção acumulada máxima de H_2 para a condição ótima (MU; WANG; YU, 2006). Dessa forma para o ensaio de validação com base na análise na MSR com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de BCA, pH inicial de 6,8 e $4,7 \text{ g.DQO.L}^{-1}$ de licor, foi possível obter P de $179,43 \pm 5,50 \text{ mL}$, R_m de $13,87 \pm 1,64 \text{ mL.h}^{-1}$, λ de $4,89 \pm 0,67 \text{ horas}$ e R^2 de 0,98. O grau de precisão da produção de hidrogênio acumulado foi de 83% em relação ao modelo predito (Equação 5.1), com $215,14 \text{ mL H}_2$. De forma similar, Rabelo *et al.* (2018) obtiveram grau de precisão do modelo de 85% utilizando BCA como substrato para produção de hidrogênio (Figura 5.11).

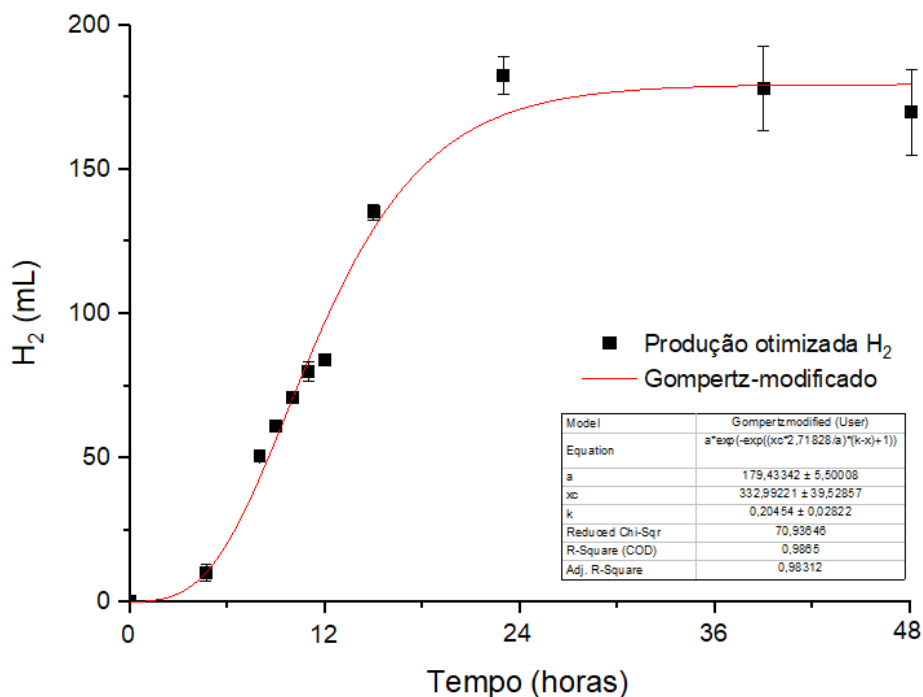


Figura 5.11: Produção de hidrogênio em condições otimizadas.

De forma similar, Alvarez-Guzmán *et al.* (2016) obtiveram condições ótimas para produção de hidrogênio na fermentação de glicose a 26,30 °C e pH inicial de 6,24. Os valores predito e experimental obtidos pelos autores foram 503 e 513 mL, respectivamente. Boboescu *et al.* (2014) operaram reatores em batelada em condições otimizadas a 26 °C, pH inicial de 6,65 e 10 g.L⁻¹ de glicose, com água residuária industrial. Os valores predito e experimental para produção de hidrogênio foram 26 e 28 mL, respectivamente. Kumar *et al.* (2015a) investigaram a produção de hidrogênio utilizando resíduos de pião-roxo como substrato em reatores batelada. Os autores variaram substrato (32–368 g.L⁻¹), temperaturas (38–72 °C) e pH inicial (4,8–8,2) de acordo com o projeto experimental. A concentração ideal de substrato, pH inicial e temperatura foram 211 g.L⁻¹, 6,5 e 55,4 °C, respectivamente, alcançando uma produção acumulada de hidrogênio de 307,4 ± 4,5 mL. O valor predito de acordo com o modelo foi de 296 mL H₂. Similarmente, Mazareli *et al.* (2021) observaram produção otimizada de hidrogênio de 70,19 mL em pH inicial de 7,0 e temperatura de 37 °C, utilizando resíduos de banana como substrato. Igualmente, Montoya *et al.* (2020) observaram nas condições ótimas de produção de hidrogênio, produção acumulada de 240 mL H₂ em pH inicial de 7,0, *headspace* 30% e 7 g.L⁻¹ de polpa de café. Meier *et al.* (2020) obtiveram hidrogênio, sob condições otimizadas, com água residuária de suínos, 4% de glicerol e temperatura de 38,5 °C em reatores batelada, obtendo valor experimental de 1.102,6 ± 21,3 mL H₂ e valor predito do modelo de 1.093,5 mL H₂.

Os valores de P ($179,43 \pm 5,50$ mL) e λ_{H_2} ($4,89 \pm 0,67$ horas) obtidos para a condição otimizada foram próximos àqueles observados por Pattra *et al.* (2008), com 20 g.DQO.L⁻¹ de hidrolisado do BCA, sendo P de 180 mL H₂ e λ_{H_2} de 5 h, em temperatura mesofílica. Diferentemente, desta pesquisa, tais autores realizaram experimentos em pH inicial $5,5$, enquanto no presente estudo, a condição ótima foi em pH inicial $6,8$. Supostamente, as características do inóculo influenciaram em diferentes condições da produção de hidrogênio. O valor de R_m obtido na condição otimizada neste estudo ($13,87 \pm 1,64$ mL.h⁻¹) foi próximo (R_m de $14,95$ mL.h⁻¹) ao observado por Kim, Han e Shin (2004) com $11,2$ g.L⁻¹ de carboidratos e por Wang e Wan (2008) com R_m de $15,1$ mL.h⁻¹ e 25 g.L⁻¹ de substrato, em temperatura mesofílica. Este estudo também corrobora com Vi, Salakkam e Reungsang (2017) que estudaram a produção de H₂ por meio de planejamento experimental juntamente com MSR utilizando batata-doce como substrato em reatores batelada. Os autores analisaram a influência da variação de batata-doce ($14-34$ g.L⁻¹), pH inicial ($4,5-7,5$) e FeSO₄ ($20-100$ g.L⁻¹). Os experimentos ocorreram em temperatura mesofílica. Conforme o estudo, o alto valor de P deu-se em pH inicial de $7,5$, $0,1$ g.L⁻¹ de FeSO₄ e 34 g.L⁻¹ de batata-doce, obtendo $21,83$ mL H₂. Entretanto, nas condições com pH inicial de $4,5$, $0,02$ g.L⁻¹ de FeSO₄ e 34 g.L⁻¹ de batata-doce, obteve-se o maior valor de P com 399 mL H₂. Dessa forma, os autores encontraram que as baixas concentrações de substrato, FeSO₄ e pH tem relação direta com a produção de hidrogênio por meio da análise da MSR e planejamento experimental.

O tipo de substrato pode influenciar totalmente a dinâmica de populações produtoras de hidrogênio. Por exemplo, na presente pesquisa, o pH ideal foi na faixa de $6,8$, com P ($179,43 \pm 5,50$ mL) e R_m de $13,87 \pm 1,64$ mL.h⁻¹. Todavia, Mu, Wang e Yu (2006) utilizaram o DCCR e MSR para otimizar as respostas P e R_m em reatores batelada e verificaram os efeitos do pH ($4,5-6,0$), temperatura ($25-45$ °C) e concentração de sacarose ($15-35$ g.L⁻¹). A condição ótima para P (252 mL H₂) foi em pH inicial $5,5$, temperatura de $34,8$ °C e $24,8$ g.L⁻¹ de sacarose. Já para R_m , a condição otimizada foi obtida em pH inicial $5,5$, temperatura de $35,5$ °C e $25,4$ g.L⁻¹ de sacarose, com 1.511 mL H₂.h⁻¹. Ou seja, na pesquisa de Mu, Wang e Yu (2006) com pH mais ácido em relação ao presente estudo, os autores conseguiram maior produção de hidrogênio, reforçando que para cada tipo de substrato, pode haver diferente sinergia no consórcio microbiano.

Em relação a Conversão de Carboidratos Totais (C_{CT}) foi observado no ensaio de otimização 83% . Valor similar de conversão de carboidratos deste estudo foi observado por Lee *et al.* (2008), onde os autores analisaram a produção de hidrogênio utilizando o amido de mandioca como substrato em reatores bateladas. Nesse estudo

com 16 g.DQO.L⁻¹ de substrato, pH inicial de 6,5 e temperatura de 37 °C, os autores conseguiram observar P de 1.441 mL com conversão de 84% de carboidratos totais. Não obstante ao valor do ensaio 7 (C7) com maior valor de P dentre os ensaios do DCCR (C_{CT} de 76%), houve aumento percentual de 7% de C_{CT} em relação a condição otimizada, além da maior remoção de carboidratos totais. Verificou-se também na condição otimizada em relação a C7, aumento percentual de 42% no valor de P . Segundo Cieciora-Włoch, Borowski e Domański (2020) houve redução de 90% de carboidratos totais em experimentos com polpa de beterraba hidrolisada em testes de batelada em temperatura mesofílica. Sob tais condições, os autores observaram também que a maior conversão de carboidratos correspondeu ao maior rendimento de hidrogênio. Na Figura 5.12 está ilustrado a conversão de carboidratos em ambos os ensaios.

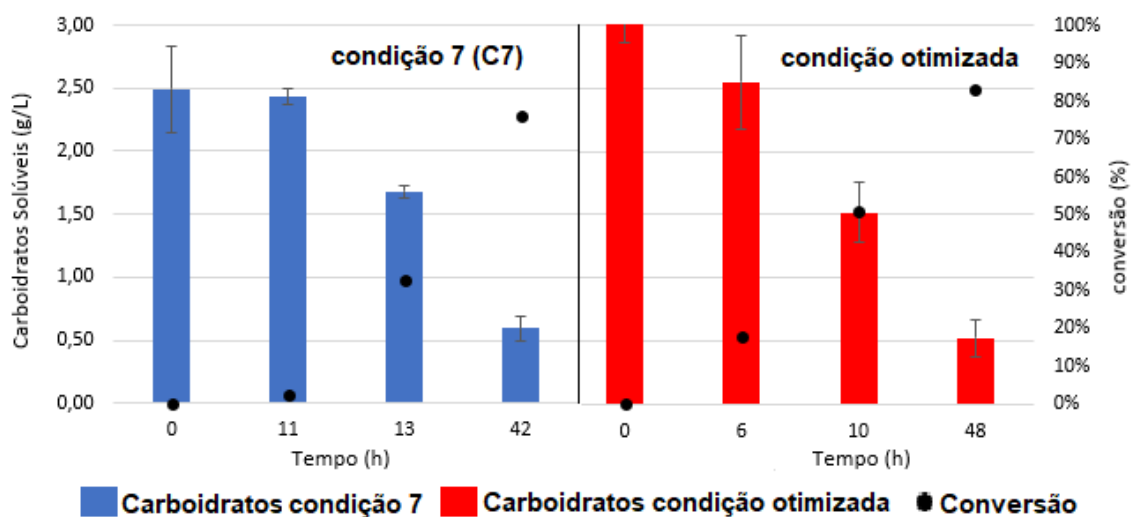


Figura 5.12: Conversão de Carboidratos Totais

5.3.3.1 Balanço de Massa Solúvel

O Balanço de Massa Solúvel (BMS) da condição otimizada foi feito por meio das análises de monitoramento e descrito conforme o item 4.6.

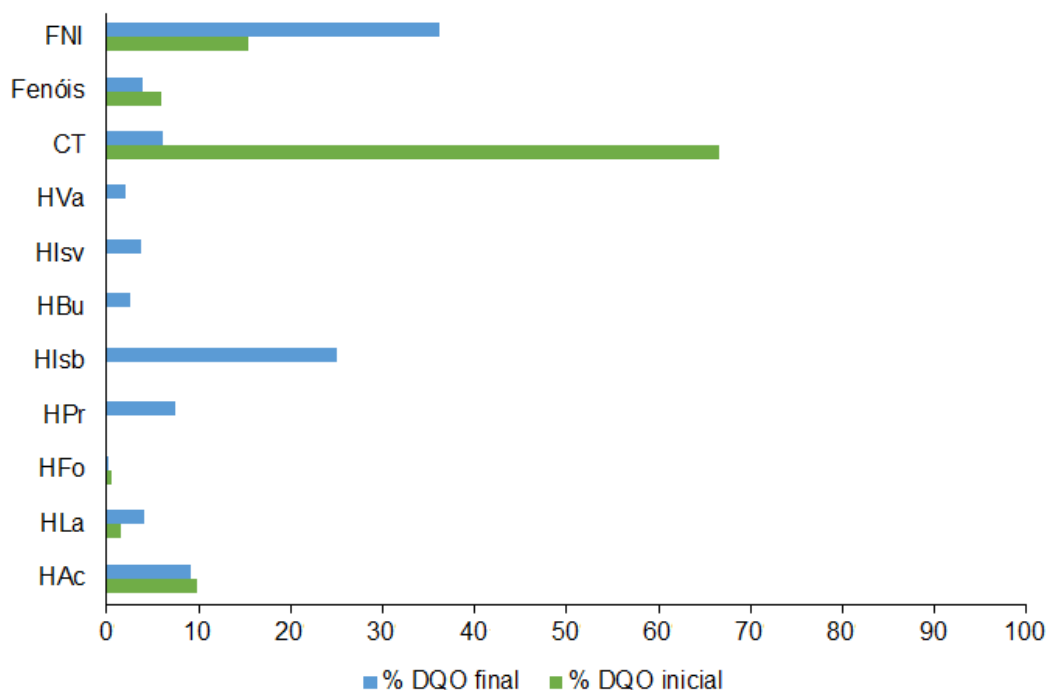


Figura 5.13: Balanço de Massa Solúvel (BMS) da condição otimizada para obtenção de hidrogênio a partir do BCA e licor de pentoses.

Nota: FNI = fração não identificada, CT = carboidratos totais, HLa = ácido lático, HFo = ácido fórmico, HAc = ácido acético, HPr = ácido propiônico, HIs = ácido isobutírico, HBU = ácido butírico, HIsv = ácido isovalérico e HVa = ácido valérico.

Conforme a Figura 5.13, foi verificado que os metabólitos que mais contribuíram para o BMS em termos de $DQO_{FILTRADA}$ foram os HIsb e HAc, produtos estes provenientes da transformação dos carboidratos em ácidos orgânicos e biogás nos ensaios fermentativos. O aumento da FNI (Fração Não Identificada) de 15% para 36% ao final do ensaio se deveu a geração de outros produtos metabólicos gerados, tais como ácido cítrico e etanol (KANDASAMY; ARADHYA, 2014; GHASIMI *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÕES

- Inóculo autóctone foi obtido a partir dos substratos BCA moído e licor de pentoses.
- Nos ensaios do DCCR, a condição C4 com 3,0 g.L⁻¹ de BCA, 3,6 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses e pH inicial de 6,5, ocorreu maior P com 126,82 ± 10,46 mL H₂. Na condição C8 com 7,0 de BCA, 3,6 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses e pH inicial de 6,5, obteve maior valor de Rm com 17,25 ± 2,42 mL.h⁻¹. Na condição C5 com 3,0 g.L⁻¹ de BCA ,1,2 de licor de pentoses e pH inicial de 6,5, obteve melhor valor de λH₂, com 8,64 ± 1,15 horas.
- As interações entre as variáveis independentes de concentração de BCA e licor de pentoses e pH e licor de pentoses, influenciaram a produção de hidrogênio.
- Foi obtido 179,43 mL de produção acumulada de hidrogênio nas condições otimizadas (1,5 g.L⁻¹ de BCA, pH inicial de 6,8 e 4,7 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses) utilizando inóculo autóctone do BCA.
- Os principais metabólitos solúveis observados na fermentação autóctone do BCA e licor de pentoses foram ácidos butírico, acético e láctico.
- Os ácidos fracos e os furanos, ambos advindos do licor de pentoses, não afetaram significativamente a produção de hidrogênio fermentativo.

7 RECOMENDAÇÕES

- Aplicar a condição otimizada em reatores contínuos e em escala ampliada;
- Avaliar a substituição da água deionizada por esgoto doméstico, em um processo de co-digestão.
- Avaliar a produção de hidrogênio também com a fração sólida (rica em hexoses) do pré-tratamento do BCA.
- Realizar um novo Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR) com concentrações de licor e BCA acima das condições otimizadas (1,5 g.L⁻¹ de BCA, 4,7 g.DQO.L⁻¹ de licor de pentoses) com objetivo de determinar maiores informações de produção de hidrogênio.
- Realizar um novo DCCR em condições termofílicas para avaliar a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos nessas condições.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. *et al.* Pretreatment Strategies for Enhanced Biogas Production from Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, p. 122725, 3 jan. 2020.
- ABREU, A. A. *et al.* Inoculum Type Response to Different PHs on Biohydrogen Production from L-Arabinose, a Component of Hemicellulosic Biopolymers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 4, p. 1744–1751, 1 fev. 2009.
- ADARME, O. F. H. *et al.* Methane and Hydrogen Production from Anaerobic Digestion of Soluble Fraction Obtained by Sugarcane Bagasse Ozonation. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 288–299, 15 dez. 2017.
- AHMAD, F. **Methane production in response to sulfuric acid and hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse.** 2017. Universidade de São Paulo, 2017.
- AHMAD, F. *et al.* Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, 17 set. 2018.
- AHMAD, F. *et al.* Bioprospecting Sulfuric Acid Assisted Hydrothermal Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Microbial Community Structure for Methane Production. **BioEnergy Research**, 31 mar. 2021.
- AHMAD, F.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Hydrothermal Processing of Biomass for Anaerobic Digestion – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 98, p. 108–124, 1 dez. 2018.
- AHMED, P. M. *et al.* Sustainable Bioremediation of Sugarcane Vinasse Using Autochthonous Macrofungi. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 5177–5185, 1 ago. 2018.
- AKOBI, C.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. The Impact of Furfural Concentrations and Substrate-to-Biomass Ratios on Biological Hydrogen Production from Synthetic Lignocellulosic Hydrolysate Using Mesophilic Anaerobic Digester Sludge. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 598–606, 1 dez. 2016.
- ALEXANDROPOULOU, M. *et al.* Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 1054–1063, 10 fev. 2018.
- ALMEIDA, J. R. M. *et al.* Metabolic Effects of Furaldehydes and Impacts on Biotechnological Processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625–638, 1 mar. 2009.
- ALVAREZ-GUZMÁN, C. L. *et al.* Biohydrogen production by the psychrophilic G088 strain using single carbohydrates as substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8092–8100, 2016.
- ANBURAJAN, P. *et al.* Effect of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) on high-rate continuous biohydrogen production from galactose. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1197–1200, 1 jan. 2018.

ANTONOPOULOU, G. *et al.* Biohydrogen Production from Sweet Sorghum Biomass Using Mixed Acidogenic Cultures and Pure Cultures of *Ruminococcus Albus*. **Global N E S T Journal**, v. 9, n. 2, p. 144–151, 2007.

ANTONOPOULOU, G.; VAYENAS, D.; LYBERATOS, G. Ethanol and Hydrogen Production from Sunflower Straw: The Effect of Pretreatment on the Whole Slurry Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 65–74, 2016.

ANZOLA-ROJAS, M. del P. *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 46–54, 1 mar. 2015.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition**. 23 edition ed. Washington, DC: American Water Works Association, 2017.

ARGUN, H. *et al.* Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6109–6115, 1 nov. 2008.

ARGUN, H.; DAO, S. Hydrogen gas production from waste peach pulp by dark fermentation and electrohydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 27, p. 11568–11576, 2016.

ASK, M. *et al.* The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 22, 15 fev. 2013.

BAËTA, B. E. L. *et al.* Optimization of Sugarcane Bagasse Autohydrolysis for Methane Production from Hemicellulose Hydrolyzates in a Biorefinery Concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137–146, jan. 2016a.

BAËTA, B. E. L. *et al.* Evaluation of Hydrogen and Methane Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzates by Two-Stage Anaerobic Digestion Process. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 436–446, out. 2016b.

BAJPAI, P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: BAJPAI, P. (Ed.). **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. SpringerBriefs in Molecular Science. Singapore: Springer Singapore, 2016. p. 17–70.

BARAKAT, A. *et al.* Effect of Lignin-Derived and Furan Compounds Found in Lignocellulosic Hydrolyzates on Biomethane Production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 90–99, 1 jan. 2012.

BAROI, G. *et al.* Butyric acid fermentation from pretreated and hydrolysed wheat straw by an adapted *Clostridium tyrobutyricum* strain. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 874–882, 2015.

BAYER, E. A. *et al.* The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 521–554, 2004.

BEHERA, S. *et al.* Importance of Chemical Pretreatment for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, ago. 2014.

BELLIDO, C. *et al.* Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868–10874, 1 dez. 2011.

BERCIER, A.; PLANTIER-ROYON, R.; PORTELLA, C. Convenient Conversion of Wheat Hemicelluloses Pentoses (d-Xylose and l-Arabinose) into a Common Intermediate. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 16, p. 2450–2455, 26 nov. 2007.

BOBOESCU, I. Z. *et al.* Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 139, 24 set. 2014.

BRAGA, J. K. *et al.* Bacterial and Archaeal Community Structure Involved in Biofuels Production Using Hydrothermal- and Enzymatic-Pretreated Sugarcane Bagasse for an Improvement in Hydrogen and Methane Production. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 2, n. 12, p. 2644–2660, 2018.

BRAGA, J. K. *et al.* Hydrogen Production by *Clostridium Cellulolyticum* a Cellulolytic and Hydrogen-Producing Bacteria Using Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 4, p. 827–837, 1 abr. 2019.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for Optimum Conditions of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199–204, 1 out. 2009.

BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model Development for Horseradish Peroxidase Catalyzed Removal of Aqueous Phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 3, p. 251–261, 1997.

BUFFIERE, P. *et al.* Towards New Indicators for the Prediction of Solid Waste Anaerobic Digestion Properties. **Water Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 233–241, 1 abr. 2006.

BUGG, T. D. H. *et al.* Pathways for Degradation of Lignin in Bacteria and Fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883, 2011.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of Pre-Treatment Technologies on Dark Fermentative Biohydrogen Production: A Review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20–48, 1 jul. 2015.

BUNDHOO, Z. M. A. Potential of Bio-Hydrogen Production from Dark Fermentation of Crop Residues: A Review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17346–17362, jun. 2019.

CALLI, B. *et al.* Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—Effects of on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 522–530, 1 jan. 2008.

CAMARGO, F. P. *et al.* Microbial and Functional Characterization of an Allochthonous Consortium Applied to Hydrogen Production from Citrus Peel Waste in Batch Reactor in Optimized Conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 291, p. 112631, 1 ago. 2021.

CAMPOS, F. M. *et al.* Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 144–151, 31 out. 2009.

CANILHA, L. *et al.* A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 1 set. 2011.

CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. C989572, 26 nov. 2012.

CANTARELLA, M. *et al.* Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 200–206, 2004.

CAO, G.-L. *et al.* Effect of Lignocellulose-Derived Inhibitors on Growth and Hydrogen Production by Thermoanaerobacterium Thermosaccharolyticum W16. **International Journal of Hydrogen Energy**, 3rd Asian Bio Hydrogen Symposium. v. 35, n. 24, p. 13475–13480, 1 dez. 2010.

CASTOLDI, R. *et al.* Biological Pretreatment of Eucalyptus Grandis Sawdust with White-Rot Fungi: Study of Degradation Patterns and Saccharification Kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240–246, 15 dez. 2014.

CASTRO-VILLALOBOS, M. C.; GARCÍA-MORALES, J. L.; FERNÁNDEZ, F. J. By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. **III Iberian Symposium on Hydrogen, Fuel Cells and Advanced Batteries, HYCELTEC-2011**, v. 37, n. 8, p. 7077–7083, 1 abr. 2012.

CECCATO-ANTONINI, S. R. *et al.* Yeast for Pentose Fermentation: Isolation, Screening, Performance, Manipulation, and Prospects. In: BUCKERIDGE, M. S.; DE SOUZA, A. P. (Ed.). **Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 133–157.

CHAIRATTANAMANOKORN, P. *et al.* Production of Biohydrogen from Hydrolyzed Bagasse with Thermally Preheated Sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 18, p. 7612–7617, 1 set. 2009.

CHANDEL, A. K. *et al.* The Path Forward for Lignocellulose Biorefineries: Bottlenecks, Solutions, and Perspective on Commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 370–381, 1 set. 2018.

CHANDEL, A. K. *et al.* Comparative Analysis of Key Technologies for Cellulosic Ethanol Production from Brazilian Sugarcane Bagasse at a Commercial Scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. bbb.1990, 26 mar. 2019.

CHANDEL, A.; SILVEIRA, M. H. L. **Advances in sugarcane biorefinery: technologies, commercialization, policy issues and paradigm shift for bioethanol and by-products**. [s.l.] Elsevier, 2017.

CHAPLEUR, O. *et al.* Growing concentrations of phenol increasingly modify microbial communities' dynamics and performances' stability of anaerobic digesters. In: 13th World Congress on Anaerobic Digestion: Recovering (bio) Ressources for the World, Santiago de Compostella, Spain. **Anais...** Santiago de Compostella, Spain.: jun. 2013.

CHEN, R. *et al.* Hydrolysates of Lignocellulosic Materials for Biohydrogen Production. **BMB Reports**, v. 46, n. 5, p. 244–251, 2013.

CHENG, J. *et al.* Cogeneration of H₂ and CH₄ from Water Hyacinth by Two-Step Anaerobic Fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2008 International Hydrogen Forum (HyForum2008). v. 35, n. 7, p. 3029–3035, 1 abr. 2010.

CHENG, J. *et al.* Enhancement of fermentative hydrogen production from hydrolyzed water hyacinth with activated carbon detoxification and bacteria domestication. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 6, p. 2545–2551, 19 fev. 2015.

CHENG, J.; ZHU, M. A novel anaerobic co-culture system for bio-hydrogen production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 623–631, 1 set. 2013.

CHO, D. H. *et al.* Detoxification of Model Phenolic Compounds in Lignocellulosic Hydrolysates with Peroxidase for Butanol Production from *Clostridium Beijerinckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 1035–1043, 1 jul. 2009.

CHO, D. H.; SHIN, S.-J.; KIM, Y. H. Effects of Acetic and Formic Acid on ABE Production by *Clostridium Acetobutylicum* and *Clostridium Beijerinckii*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 270–275, 1 abr. 2012.

CHONG, M.-L. *et al.* Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3277–3287, 1 maio 2009.

CHRISTOFOLETTI, C. A. *et al.* Sugarcane Vinasse: Environmental Implications of Its Use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, dez. 2013.

CIECIURA-WŁOCH, W.; BOROWSKI, S.; DOMAŃSKI, J. Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by iron addition. **Bioresource Technology**, v. 314, p. 123713, 1 out. 2020.

CIRANNA, A. *et al.* Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6391–6401, 15 abr. 2014.

Conab - Safra Brasileira de Cana-de-açúcar.

COUGER, M. B. *et al.* Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 208, 8 dez. 2015.

DA SILVA, A. S. *et al.* Milling Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Straw for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 1 out. 2010.

DA SILVA, R. R.; PEDEZZI, R.; SOUTO, T. B. Exploring the Bioprospecting and Biotechnological Potential of White-Rot and Anaerobic Neocallimastigomycota Fungi: Peptidases, Esterases, and Lignocellulolytic Enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3089–3101, abr. 2017.

DAHIYA, S. *et al.* Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen. **Bioresource technology**, v. 182, p. 103–113, 2015.

DAMIÃO XAVIER, F. *et al.* Evaluation of the Simultaneous Production of Xylitol and Ethanol from Sisal Fiber. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p. 2, mar. 2018.

DAREIOTI, M. A.; VAVOURAKI, A. I.; KORNAROS, M. Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: A lab-scale evaluation using batch tests. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 218–227, 1 jun. 2014.

DE LA RUBIA, M. A. *et al.* Influence of Particle Size and Chemical Composition on the Performance and Kinetics of Anaerobic Digestion Process of Sunflower Oil Cake in Batch Mode. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 162–167, 15 dez. 2011.

DE OLIVEIRA GORGULHO SILVA, C. *et al.* Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus Niger*. **BioEnergy Research**, v. 11, n. 2, p. 316–329, 1 jun. 2018.

DE SÁ, L. R. V. *et al.* Biohydrogen Production Using Xylose or Xylooligosaccharides Derived from Sugarcane Bagasse Obtained by Hydrothermal and Acid Pretreatments. **Renewable Energy**, v. 146, p. 2408–2415, 1 fev. 2020.

DELGENÈS, J.-P.; PENAUD, V.; MOLETTA, R. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. 2003.

DESSIE, W. *et al.* Inhibitory Effects of Lignocellulose Pretreatment Degradation Products (Hydroxymethylfurfural and Furfural) on Succinic Acid Producing *Actinobacillus Succinogenes*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107263, 15 out. 2019.

DIAS, M. O. de S. *et al.* Sugarcane Processing for Ethanol and Sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 1 jul. 2015.

DIAS, M. O. S. *et al.* Biorefineries for the Production of First and Second Generation Ethanol and Electricity from Sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72–78, 1 set. 2013.

DIONIZIO, B. S. *et al.* Lignocellulosic biomass delignification using fungal laccases to improve biological hydrogen production. In: **Anais...** In: EUROPEAN BIOTECHNOLOGY CONGRESS 2020. 2020.

JÚNIOR, A. D. N. F. *et al.* Effect of Organic Loading Rate on Hydrogen Production from Sugarcane Vinasse in Thermophilic Acidogenic Packed Bed Reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16852–16862, 13 out. 2014.

DONG, X. Q. *et al.* Sugarcane Bagasse Degradation and Characterization of Three White-Rot Fungi. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 443–451, mar. 2013.

DUBOIS, Michel. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

ECEM ÖNER, B. *et al.* Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 620–625, 1 fev. 2018.

EKER, S.; SARP, M. Hydrogen Gas Production from Waste Paper by Dark Fermentation: Effects of Initial Substrate and Biomass Concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 4, p. 2562–2568, 26 jan. 2017.

ELBESHISHY, E. *et al.* Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. **International Conference on Hydrogen Production (ICH2P)-2010**, v. 36, n. 17, p. 11379–11387, 1 ago. 2011.

ESPAÑA-GAMBOA, E. *et al.* Vinasses: Characterization and Treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, dez. 2011.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. **Energy biotechnology / Environmental biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 220–227, 1 jun. 2007a.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol Production from Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium Beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1460–1469, 2007b.

FABER, M. de O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 1 nov. 2016.

FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Elephant Dung: Effects of Initial PH and Substrate Concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, 4th Asian Bio-Hydrogen Symposium. v. 36, n. 14, p. 8687–8696, 1 jul. 2011.

FERCHICHI, M. *et al.* Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 402–409, 2005.

FERMOSO, J. *et al.* Application of Response Surface Methodology to Assess the Combined Effect of Operating Variables on High-Pressure Coal Gasification for H₂-Rich Gas Production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 3, p. 1191–1204, 1 fev. 2010.

FERNANDES, B. S. *et al.* Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143–148, 2010.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of Stillage Land Disposal: A Critical Review on the Impacts of Fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, dez. 2014.

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, 1 ago. 2019.

GHASIMI, D. S. M. *et al.* Impact of Lignocellulosic-Waste Intermediates on Hydrolysis and Methanogenesis under Thermophilic and Mesophilic Conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 181–191, 1 jul. 2016.

GHIMIRE, A. *et al.* Dark Fermentation of Complex Waste Biomass for Biohydrogen Production by Pretreated Thermophilic Anaerobic Digestate. **Journal of Environmental Management**, v. 152, p. 43–48, 1 abr. 2015.

GIRALDELI, L. D.; FONSECA, B. C.; REGINATTO, V. Mixtures of 5-Hydroxymethylfurfural, Levulinic Acid, and Formic Acid Have Different Impact on H₂-

Producing Clostridium Strains. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 49, p. 22159–22169, 6 dez. 2018.

GOMES, M. M. *et al.* Statistical Optimization of Methane Production from Brewery Spent Grain: Interaction Effects of Temperature and Substrate Concentration. **Journal of Environmental Management**, v. 288, p. 112363, 15 jun. 2021.

GÓMEZ, X. *et al.* Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. **Special Issue : Biofuels-III: Biohydrogen**, v. 102, n. 18, p. 8621–8627, 1 set. 2011.

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C. Characterization of Pressmud: A Sugar Industry Waste. **Fuel**, v. 90, n. 1, p. 389–394, jan. 2011.

HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for Improving Biological Hydrogen Production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1–9, 1 abr. 2012.

HAMES, B. *et al.* Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 08/08/2008. **Technical Report**, p. 12, 2008.

HAN, H. *et al.* Optimization of Biohydrogen Production from Soybean Straw Using Anaerobic Mixed Bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, 12th CHEC. v. 37, n. 17, p. 13200–13208, 1 set. 2012.

HIERHOLTZER, A. *et al.* The Impact and Mode of Action of Phenolic Compounds Extracted from Brown Seaweed on Mixed Anaerobic Microbial Cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 964–973, 2013.

HO, K.-L. *et al.* Biohydrogen from Lignocellulosic Feedstock via One-Step Process. **International Journal of Hydrogen Energy**, The 2011 Asian Bio-Hydrogen and Biorefinery Symposium (2011ABBS). v. 37, n. 20, p. 15569–15574, 1 out. 2012.

HU, Z.-H.; WANG, G.; YU, H.-Q. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 59–62, 1 set. 2004.

HWANG, J.-H. *et al.* Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1051–1058, 2011.

INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I. *et al.* Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus Niger* ITV 02 from Sweet Sorghum Bagasse in Submerged Culture Using a Box–Behnken Design. **Sugar Tech**, 26 set. 2019.

JACKSON DE MORAES ROCHA, G. *et al.* Dilute Mixed-Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663–670, 1 jan. 2011.

JANKE, L. *et al.* Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20685–20703, 31 ago. 2015.

JAYASINGHEARACHCHI, H. S. *et al.* Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. **IWBT 2008**, v. 34, n. 17, p. 7197–7207, 1 set. 2009.

- JĘDRZEJCZYK, M. *et al.* Chapter 6 - Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In: BASILE, A.; DALENA, F. (Ed.). **Second and Third Generation of Feedstocks**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 143–196.
- JIN, Y.-S.; JEFFRIES, T. W. Stoichiometric Network Constraints on Xylose Metabolism by Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 6, n. 3, p. 229–238, 1 jul. 2004.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 28 jan. 2013.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-Products and Strategies for Minimizing Their Effects. **Bioresource Technology**, Pretreatment of Biomass. v. 199, p. 103–112, 1 jan. 2016.
- JUNG, K.-W.; KIM, D.-H.; SHIN, H.-S. Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2745–2750, 1 fev. 2011.
- KANDASAMY, S.; ARADHYA, S. M. Polyphenolic profile and antioxidant properties of rhizome of commercial banana cultivars grown in India. **Food Bioscience**, v. 8, p. 22–32, 1 dez. 2014.
- KARADAG, D.; PUHAKKA, J. A. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. **Hyceltec 2009 Conference**, v. 35, n. 20, p. 10954–10959, 1 out. 2010.
- KAVITHA, S. *et al.* Enhancement of Biogas Production from Microalgal Biomass through Cellulolytic Bacterial Pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 34–43, 1 jun. 2017.
- KELLY, C. *et al.* Effect of Furfural, Vanillin and Syringaldehyde on *Candida Guilliermondii* Growth and Xylitol Biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 97–108, 1 mar. 2008.
- KHAN, J. A.; KHAN, M. A. 1 - The use of jute fibers as reinforcements in composites. In: FARUK, O.; SAIN, M. (Ed.). **Biofiber Reinforcements in Composite Materials**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2015. p. 3–34.
- KHANNA, N. *et al.* Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 9–15, 10 mar. 2011.
- KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 15, p. 1607–1616, 1 dez. 2004.
- KLIMIUK, E. *et al.* Theoretical and Observed Biogas Production from Plant Biomass of Different Fibre Contents. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9527–9535, 1 dez. 2010.
- KLINKE, H. B. *et al.* Characterization of Degradation Products from Alkaline Wet Oxidation of Wheat Straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 15–26, 1 mar. 2002.

- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial Hydrogen Production from Sewage Sludge Bioaugmented with a Constructed Microbial Consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, Indo-French Workshop on Biohydrogen: from Basic Concepts to Technology. v. 35, n. 19, p. 10653–10659, 1 out. 2010.
- KUMAR, G. *et al.* Modeling and Optimization of Biohydrogen Production from De-Oiled Jatropha Using the Response Surface Method. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 40, n. 1, p. 15–22, 1 jan. 2015a.
- KUMAR, G. *et al.* Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 728–737, 1 abr. 2015b.
- KUMAR, G.; CHEON, H.-C.; KIM, S.-H. Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H₂ production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16885–16890, 13 out. 2014.
- KUMAR, S. *et al.* Associative Patterns among Anaerobic Fungi, Methanogenic Archaea, and Bacterial Communities in Response to Changes in Diet and Age in the Rumen of Dairy Cows. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015c.
- KUMAR, V. *et al.* A Critical Review on Current Strategies and Trends Employed for Removal of Inhibitors and Toxic Materials Generated during Biomass Pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122633, 1 mar. 2020.
- LAI, Z. *et al.* Optimization of Key Factors Affecting Hydrogen Production from Sugarcane Bagasse by a Thermophilic Anaerobic Pure Culture. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 119, 20 ago. 2014.
- LAY, J.-J. Modeling and Optimization of Anaerobic Digested Sludge Converting Starch to Hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 3, p. 269–278, 2000.
- LAZARO, C. Z. *et al.* Sugarcane Vinasse as Substrate for Fermentative Hydrogen Production: The Effects of Temperature and Substrate Concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, 15 abr. 2014.
- LEE, K.-S. *et al.* Exploring Optimal Environmental Factors for Fermentative Hydrogen Production from Starch Using Mixed Anaerobic Microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, Asian bioH₂ Symposium 2006. v. 33, n. 5, p. 1565–1572, 1 mar. 2008.
- LEITÃO, V. O. *et al.* Growth and Expression of Relevant Metabolic Genes of *Clostridium Thermocellum* Cultured on Lignocellulosic Residues. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 825–834, 1 jun. 2017.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen Production: Prospects and Limitations to Practical Application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 2, p. 173–185, 1 fev. 2004.
- LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1–39, 1 jan. 2007.

- LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy. v. 215, p. 13–20, 1 set. 2016.
- LIN, C.-Y. *et al.* Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. **The 2011 Asian Bio-Hydrogen and Biorefinery Symposium (2011ABBS)**, v. 37, n. 20, p. 15632–15642, 1 out. 2012.
- LIN, C.-Y. *et al.* Anaerobic hydrogen production from unhydrolyzed mushroom farm waste by indigenous microbiota. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 425–429, 1 out. 2017.
- LIN, P.-Y. *et al.* Biological Hydrogen Production of the Genus Clostridium: Metabolic Study and Mathematical Model Simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 12, p. 1728–1735, 1 ago. 2007.
- LIN, R. *et al.* Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 250–255, 1 nov. 2015.
- LIU, C.-M. *et al.* Biohydrogen Production Evaluation from Rice Straw Hydrolysate by Concentrated Acid Pre-Treatment in Both Batch and Continuous Systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15823–15829, 22 nov. 2013.
- LIU, H. *et al.* Magnetic Induction Heating Properties of Mg_{1-x}Zn_xFe₂O₄ Ferrites Synthesized by Co-Precipitation Method. **Solid State Sciences**, v. 93, p. 101–108, 1 jul. 2019.
- LIU, X. *et al.* Direct Conversion of Pretreated Straw Cellulose into Citric Acid by Co-Cultures of *Yarrowia Lipolytica* SWJ-1b and Immobilized *Trichoderma Reesei* Mycelium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 501–509, 1 maio 2014.
- LO, Y. C. *et al.* Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 15, p. 6189–6200, 1 ago. 2009.
- MACHADO, A. da S.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 17–22, 1 fev. 2017.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **International Conference on Enzyme Technology “RELATENZ 2005”**, v. 40, n. 3, p. 426–432, 5 fev. 2007.
- MAZARELI, R. C. da S. **Otimização da produção de hidrogênio a partir de resíduos de banana: avaliação da diversidade de bactérias autóctones e distribuição funcional**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.
- MAZARELI, R. C. da S. *et al.* Metagenomic Analysis of Autochthonous Microbial Biomass from Banana Waste: Screening Design of Factors That Affect Hydrogen Production. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, p. 105573, 1 jul. 2020.
- MAZARELI, R. C. da S. *et al.* Enzymatic Routes to Hydrogen and Organic Acids Production from Banana Waste Fermentation by Autochthonous Bacteria: Optimization

of PH and Temperature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 12, p. 8454–8468, 16 fev. 2021.

MAZARELI, R. C. da S.; VARESCHE, M. B. A. **POTENCIAL PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO UTILIZANDO RESÍDUOS DEBANANA (*Musa spp.*) COMO SUBSTRATO E FONTE NATURAL DE BACTÉRIASFERMENTATIVAS**. 2017.

MEIER, T. R. W. *et al.* Production of Biohydrogen by an Anaerobic Digestion Process Using the Residual Glycerol from Biodiesel Production as Additive to Cassava Wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, p. 120833, 10 jun. 2020.

MILÃO, R. de F. D.; ARAÚJO, O. de Q. F.; DE MEDEIROS, J. L. Chapter 5 - Sugarcane-based ethanol biorefineries with bioenergy production from bagasse: thermodynamic, economic, and emissions assessments. In: BHASKAR, T. *et al.* (Ed.). **Waste Biorefinery**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 125–158.

MILLAT, T. *et al.* The pH-induced metabolic shift from acidogenesis to solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*—From experiments to models. In: **Anais...** In: 5TH SYMPOSIUM ON ESCEC. 2011.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, n. 3, p. 769–776, 24 abr. 2002.

MONLAU, F. *et al.* Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 260–322, 1 jan. 2013a.

MONLAU, F. *et al.* Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium sp.* after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 28, p. 12273–12282, 19 set. 2013b.

MONLAU, F. *et al.* Do Furanic and Phenolic Compounds of Lignocellulosic and Algae Biomass Hydrolyzate Inhibit Anaerobic Mixed Cultures? A Comprehensive Review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 1 set. 2014.

MONTOYA, A. C. V. *et al.* Optimization of Key Factors Affecting Hydrogen Production from Coffee Waste Using Factorial Design and Metagenomic Analysis of the Microbial Community. **International Journal of Hydrogen Energy**, 3 jan. 2020.

MOODLEY, P.; KANA, E. B. G. Optimization of Xylose and Glucose Production from Sugarcane Leaves (*Saccharum Officinarum*) Using Hybrid Pretreatment Techniques and Assessment for Hydrogen Generation at Semi-Pilot Scale. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 10, p. 3859–3867, 16 mar. 2015.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic Digestion of Vinasse from Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Challenges and Perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 1 abr. 2015.

MORENO, A. D. *et al.* Chapter 16 - Pretreatment Technologies for Lignocellulosic Biomass Deconstruction Within a Biorefinery Perspective. In: PANDEY, A. *et al.* (Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition)**. Biomass, Biofuels, Biochemicals. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 379–399.

- MOSIER, N. *et al.* Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 1 abr. 2005.
- MOURA, A. G. L. *et al.* Enhancement of Clostridium Butyricum Hydrogen Production by Iron and Nickel Nanoparticles: Effects on HydA Expression. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 53, p. 28447–28461, 30 out. 2020.
- MU, Y.; WANG, G.; YU, H.-Q. Response Surface Methodological Analysis on Biohydrogen Production by Enriched Anaerobic Cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 905–913, 2 maio 2006.
- MUNIR, R.; LEVIN, D. B. Enzyme Systems of Anaerobes for Biomass Conversion. In: HATTI-KAUL, R.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. (Ed.). **Anaerobes in Biotechnology**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 113–138.
- MURI, P. *et al.* Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters. **Acta Chimica Slovenica**, v. 63, n. 1, p. 154–164, 17 fev. 2016.
- NAKAZONO-NAGAOKA, E. *et al.* Draft genome sequence data of Clostridium thermocellum PAL5 possessing high cellulose-degradation ability. **Data in Brief**, v. 25, p. 104274, 1 ago. 2019.
- NASIRIAN, N. *et al.* Development of a Method for Biohydrogen Production from Wheat Straw by Dark Fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, 11th International Conference: “Hydrogen Materials Science & Chemistry of Carbon Nanomaterials”. v. 36, n. 1, p. 411–420, 1 jan. 2011.
- NASR, N. *et al.* Biohydrogen Production from Pretreated Corn Cobs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 35, p. 19921–19927, 3 dez. 2014.
- NATH, K.; KUMAR, A.; DAS, D. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by Enterobacter cloacae DM11. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 525–532, 1 jun. 2006.
- NAYAK, A.; BHUSHAN, B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 352–370, 1 mar. 2019.
- NIEL, E. W. J. van; CLAASSEN, P. A. M.; STAMS, A. J. M. Substrate and Product Inhibition of Hydrogen Production by the Extreme Thermophile, Caldicellulosiruptor Saccharolyticus. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 255–262, 2003.
- NIZAMI, A.-S.; KORRES, N. E.; MURPHY, J. D. Review of the Integrated Process for the Production of Grass Biomethane. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 22, p. 8496–8508, 15 nov. 2009.
- O-THONG, S. *et al.* Optimization of Simultaneous Thermophilic Fermentative Hydrogen Production and COD Reduction from Palm Oil Mill Effluent by Thermoanaerobacterium-Rich Sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 4, p. 1221–1231, 1 fev. 2008.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 1 ago. 2000.
- PANAGIOTOPOULOS, I. A. *et al.* Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11204–11211, 1 dez. 2011.
- PANDEY, A. *et al.* Biotechnological Potential of Agro-Industrial Residues. I: Sugarcane Bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 1 ago. 2000.
- PANTALÉON, V. *et al.* Biofilms of Clostridium species. **Anaerobe**, v. 30, p. 193–198, 1 dez. 2014.
- PAPANEK, B. *et al.* Elimination of metabolic pathways to all traditional fermentation products increases ethanol yields in Clostridium thermocellum. **Metabolic Engineering**, v. 32, p. 49–54, 1 nov. 2015.
- PATEL, A. K. *et al.* Biohydrogen Production from a Novel Alkalophilic Isolate Clostridium Sp. IODB-O3. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 291–297, 1 jan. 2015.
- PATTRA, S. *et al.* Bio-Hydrogen Production from the Fermentation of Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Clostridium Butyricum. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2nd Asian Bio Hydrogen Symposium. v. 33, n. 19, p. 5256–5265, 1 out. 2008.
- PATTRICK, C. A. *et al.* Proteomic Profiling, Transcription Factor Modeling, and Genomics of Evolved Tolerant Strains Elucidate Mechanisms of Vanillin Toxicity in Escherichia Coli. **mSystems**, v. 4, n. 4, 27 ago. 2019.
- PEIXOTO, G. *et al.* Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.
- PHUMMALA, K. *et al.* Delignification of Disposable Wooden Chopsticks Waste for Fermentative Hydrogen Production by an Enriched Culture from a Hot Spring. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1361–1368, 1 jun. 2014.
- PRAKASHAM, R. S. *et al.* Fermentative Biohydrogen Production by Mixed Anaerobic Consortia: Impact of Glucose to Xylose Ratio. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 23, p. 9354–9361, 1 dez. 2009.
- QIN, L. *et al.* Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 70, 22 mar. 2016.
- QUÉMÉNEUR, M. *et al.* Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Conference on Renewable Energy (ICRE 2011)**, v. 37, n. 4, p. 3150–3159, 1 fev. 2012.
- RABELO, C. A. B. S. *et al.* Optimization of Hydrogen and Organic Acids Productions with Autochthonous and Allochthonous Bacteria from Sugarcane Bagasse in Batch Reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 223, p. 952–963, out. 2018.
- RABELO, C. A. B. S. *et al.* Isolation of Paraclostridium CR4 from Sugarcane Bagasse and Its Evaluation in the Bioconversion of Lignocellulosic Feedstock into Hydrogen by Monitoring Cellulase Gene Expression. **Science of The Total Environment**, v. 715, p. 136868, 1 maio 2020.

- RABELO, S. C. *et al.* Production of Bioethanol, Methane and Heat from Sugarcane Bagasse in a Biorefinery Concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7887–7895, set. 2011.
- RADJARAM, B.; SARAVANANE, R. Assessment of Optimum Dilution Ratio for Biohydrogen Production by Anaerobic Co-Digestion of Press Mud with Sewage and Water. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2773–2780, fev. 2011.
- RAHMAN, S. N. A. *et al.* Overview Biohydrogen Technologies and Application in Fuel Cell Technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 137–162, 1 dez. 2016.
- RAI, P.; PANDEY, A.; PANDEY, A. Optimization of sugar release from banana peel powder waste (BPPW) using box-behnken design (BBD): BPPW to biohydrogen conversion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 47, p. 25505–25513, 4 out. 2019.
- RAJESH BANU, J. *et al.* Integrated Biorefinery Routes of Biohydrogen: Possible Utilization of Acidogenic Fermentative Effluent. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124241, 1 jan. 2021.
- RAJKUMAR, R.; YAAKOB, Z.; TAKRIFF, M. S. Potential of micro and macro algae for biofuel production: a brief review. **Bioresources**, v. 9, n. 1, p. 1606–1633, 2014.
- RAMOS, L. P. The Chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, dez. 2003.
- RATTI, R. P. *et al.* Microbial Diversity of Hydrogen-Producing Bacteria in Batch Reactors Fed with Cellulose Using Leachate as Inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 23, p. 9707–9717, 6 ago. 2013.
- RATTI, R. P. *et al.* Thermophilic Hydrogen Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion and Alkaline Delignification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 19, p. 6296–6306, 25 maio 2015.
- REDDY, K. *et al.* Biohydrogen Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate: Effects of PH, S/X, FC2+, and Magnetite Nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8790–8804, 1 mar. 2017.
- REN, N.-Q. *et al.* A Review on Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to H₂: Key Challenges and New Insights. **Bioresource Technology**, Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy. v. 215, p. 92–99, 1 set. 2016.
- RIBEIRO, F. R. *et al.* Anaerobic Digestion of Hemicellulose Hydrolysate Produced after Hydrothermal Pretreatment of Sugarcane Bagasse in UASB Reactor. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1108–1113, abr. 2017.
- ROBL, D. *et al.* Xylanase production by endophytic *Aspergillus niger* using pentose-rich hydrothermal liquor from sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 3, p. 175–187, 4 maio 2015.
- ROCHA, G. J. de M. *et al.* Influence of Mixed Sugarcane Bagasse Samples Evaluated by Elemental and Physical–Chemical Composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 1 fev. 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. Edição: 1 ed. Boca Raton ; London: CRC Press, 2014.

RODRÍGUEZ-VALDERRAMA, S. *et al.* Batch Biohydrogen Production from Dilute Acid Hydrolyzates of Fruits-and-Vegetables Wastes and Corn Stover as Co-Substrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 140, p. 105666, 1 set. 2020.

ROUCHES, E. *et al.* Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, 1 jun. 2016.

RUIZ, H. A. *et al.* Engineering Aspects of Hydrothermal Pretreatment: From Batch to Continuous Operation, Scale-up and Pilot Reactor under Biorefinery Concept. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122685, 1 mar. 2020.

SÁ, L. R. V. de; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, p. 857–867, jun. 2014.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 8 out. 2013.

SALOMÃO, G. S. B. *et al.* Production of Cellulases by Solid State Fermentation Using Natural and Pretreated Sugarcane Bagasse with Different Fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1–6, jan. 2019.

SANGYOKA, S.; REUNGSANG, A.; LIN, C.-Y. Optimization of Biohydrogen Production from Sugarcane Bagasse by Mixed Cultures Using a Statistical Method. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 5, p. 235–242, 1 set. 2016.

SANTOS, F. *et al.* Chapter 11 - Production of second-generation ethanol from sugarcane. In: SANTOS, F. *et al.* (Ed.). **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 195–228.

SANTUCCI, B. S. *et al.* Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: A Kinetic Assessment. **BioEnergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 1 dez. 2015.

SARITHA, M.; ARORA, A.; NAIN, L. Pretreatment of Paddy Straw with *Trametes Hirsuta* for Improved Enzymatic Saccharification. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 459–465, 1 jan. 2012.

SARMA, S. J. *et al.* Hydrogen Biorefinery: Potential Utilization of the Liquid Waste from Fermentative Hydrogen Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 942–951, 1 out. 2015.

SIGOILLOT, J.-C. *et al.* Chapter 8 - Fungal Strategies for Lignin Degradation. In: JOUANIN, L.; LAPIERRE, C. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. Lignins. [s.l.] Academic Press, 2012. 61p. 263–308.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, Pretreatment of Biomass. v. 199, p. 76–82, 1 jan. 2016.

SINHA, P.; PANDEY, A. Biohydrogen Production from Various Feedstocks by *Bacillus Firmus* NMBL-03. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7518–7525, 5 maio 2014.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of Fermentative H₂ Production by Hydrolysis Byproducts of Lignocellulosic Substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109–116, 1 ago. 2015.

S. KONDE, K. *et al.* Sugarcane Bagasse Based Biorefineries in India: Potential and Challenges. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 5, n. 1, p. 52–78, 2021.

SOARES, L. A. *et al.* Design and Optimization of Hydrogen Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse Using Response Surface Methodology. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 1, p. 95–105, 14 jul. 2017.

SOARES, L. A. *et al.* Metagenomic Analysis and Optimization of Hydrogen Production from Sugarcane Bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 117, p. 78–85, out. 2018.

SOARES, L. A. *et al.* Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 7, p. 1899–1912, jul. 2019a.

SOARES, L. A. *et al.* Experimental Design and Syntrophic Microbial Pathways for Biofuel Production from Sugarcane Bagasse under Thermophilic Condition. **Renewable Energy**, v. 140, p. 852–861, set. 2019b.

SOLOMON, K. V. *et al.* Early-Branching Gut Fungi Possess a Large, Comprehensive Array of Biomass-Degrading Enzymes. **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1192–1195, 11 mar. 2016.

SONG, Z.-X. *et al.* Direct bioconversion of raw corn stalk to hydrogen by a new strain *Clostridium* sp. FS3. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 91–97, 1 abr. 2014.

SRIVASTAVA, N. *et al.* A Review on Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass. **International Journal of Green Energy**, v. 12, n. 9, p. 949–960, 2 set. 2015.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Reviews Issue**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 1 maio 2002.

TAHA, M. *et al.* Enhanced Biological Straw Saccharification Through Coculturing of Lignocellulose-Degrading Microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3709–3728, 1 abr. 2015.

TAI, J. *et al.* Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. **3rd Asian Bio Hydrogen Symposium**, v. 35, n. 24, p. 13345–13349, 1 dez. 2010.

TALHA, Z. *et al.* Alkaline Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Filter Mud Codigested to Improve Biomethane Production. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

TANG, J. *et al.* Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinese* B49. **11th China Hydrogen Energy Conference**, v. 37, n. 1, p. 741–747, 1 jan. 2012.

- THUNGKLIN, P.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Sequential Fermentation of Hydrogen and Methane from Steam-Exploded Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 21, p. 9924–9934, 24 maio 2018.
- TOSUNER, Z. V.; TAYLAN, G. G.; ÖZMIHÇI, S. Effects of Rice Husk Particle Size on Biohydrogen Production under Solid State Fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Selected Papers from the 3rd International Hydrogen Technologies Congress. v. 44, n. 34, p. 18785–18791, 12 jul. 2019.
- TRAVAINI, R. *et al.* Ozonolysis: An Advantageous Pretreatment for Lignocellulosic Biomass Revisited. **Bioresource Technology**, Pretreatment of Biomass. v. 199, p. 2–12, 1 jan. 2016.
- VAN EIJCK, J.; BATIDZIRAI, B.; FAAIJ, A. Current and Future Economic Performance of First and Second Generation Biofuels in Developing Countries. **Applied Energy**, v. 135, p. 115–141, 15 dez. 2014.
- VEERAVALLI, S. S. *et al.* Effect of Furans and Linoleic Acid on Hydrogen Production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 28, p. 12283–12293, 19 set. 2013.
- VI, L. V. T.; SALAKKAM, A.; REUNGSANG, A. Optimization of Key Factors Affecting Bio-Hydrogen Production from Sweet Potato Starch. **Energy Procedia**, 2017 International Conference on Alternative Energy in Developing Countries and Emerging Economies. v. 138, p. 973–978, 1 out. 2017.
- VILLA MONTOYA, A. C. *et al.* Improving the Hydrogen Production from Coffee Waste through Hydrothermal Pretreatment, Co-Digestion and Microbial Consortium Bioaugmentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, p. 105551, 1 jun. 2020.
- WAINAINA, S. *et al.* Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437–458, 2019.
- WANG, B.; WAN, W.; WANG, J. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 7013–7019, 1 dez. 2008.
- WANG, D. *et al.* Can Hydrothermal Pretreatment Improve Anaerobic Digestion for Biogas from Lignocellulosic Biomass? **Bioresource Technology**, v. 249, p. 117–124, 1 fev. 2018.
- WANG, J.; WAN, W. The Effect of Substrate Concentration on Biohydrogen Production by Using Kinetic Models. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 1110–1117, 1 nov. 2008.
- WANG, Q. *et al.* Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, n. 6, p. 407–416, 1 jun. 1999.
- WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for Enhancing Microbial Tolerance to Inhibitors for Biofuel Production: A Review. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 302–309, 1 jun. 2018.

- WANG, X. *et al.* The Isolation and Microbial Community Analysis of Hydrogen Producing Bacteria from Activated Sludge. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1415–1423, 2007.
- WEI, D.; LIU, X.; YANG, S.-T. Butyric Acid Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by *Clostridium Tyrobutyricum* Immobilized in a Fibrous-Bed Bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 553–560, 1 fev. 2013.
- WEI, J.; LIU, Z.-T.; ZHANG, X. Biohydrogen production from starch wastewater and application in fuel cell. **2008 International Hydrogen Forum (HyForum2008)**, v. 35, n. 7, p. 2949–2952, 1 abr. 2010.
- WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A Review of Sustainable Hydrogen Production Using Seed Sludge via Dark Fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 1 jun. 2014.
- WOODWARD, J. *et al.* Enzymatic Production of Biohydrogen. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1014–1015, jun. 2000.
- XIAO, Z. *et al.* Production of butyric acid from acid hydrolysate of corn husk in fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*: kinetics and process economic analysis. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.
- YAN, X. *et al.* Bacteria-Enhanced Dilute Acid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 419–425, 1 dez. 2017.
- YOKOYAMA, H. *et al.* Community Analysis of Hydrogen-Producing Extreme Thermophilic Anaerobic Microflora Enriched from Cow Manure with Five Substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 213–222, 1 nov. 2007.
- YOSHIDA, A. *et al.* Enhanced Hydrogen Production from Glucose Using Ldh- and Frd-Inactivated *Escherichiacoli* Strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 67–72, 1 nov. 2006.
- ZENG, M. *et al.* Microscopic Examination of Changes of Plant Cell Structure in Corn Stover Due to Hot Water Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 265–278, 2007.
- ZETTY-ARENAS, A. M. *et al.* Towards Enhanced N-Butanol Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate: Strain Screening, and the Effects of Sugar Concentration and Butanol Tolerance. **Biomass and Bioenergy**, v. 126, p. 190–198, 1 jul. 2019.
- ZHANG, J.-N. *et al.* Direct Degradation of Cellulosic Biomass to Bio-Hydrogen from a Newly Isolated Strain *Clostridium Sartagoforme* FZ11. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 60–67, 1 set. 2015.
- ZHANG, K.; REN, N.-Q.; WANG, A.-J. Enhanced Biohydrogen Production from Corn Stover Hydrolyzate by Pretreatment of Two Typical Seed Sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 27, p. 14653–14662, 12 set. 2014.
- ZHANG, Q. *et al.* Enhancement of Methane Production from Cassava Residues by Biological Pretreatment Using a Constructed Microbial Consortium. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8899–8906, 1 out. 2011.

ZHANG, X. *et al.* Lignocellulosic hydrolysates and extracellular electron shuttles for H₂ production using co-culture fermentation with *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens*. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 89–95, 1 nov. 2013.

ZHENG, X.-J.; YU, H.-Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **Journal of Environmental Management**, v. 74, n. 1, p. 65–70, 1 jan. 2005.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 30 set. 2009.

ZHONG, W. *et al.* Effect of Biological Pretreatments in Enhancing Corn Straw Biogas Production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11177–11182, 1 dez. 2011.

ZWIETERING, M. H. *et al.* Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, jun. 1990.