



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO: “PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ESCURA A PARTIR DE
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR: ANÁLISE COMPARATIVA DOS
PRINCIPAIS MÉTODOS DE PRÉ TRATAMENTOS E SEUS EFEITOS
NO RENDIMENTO DO PROCESSO”**

Pedro Vianna Nunes
Orientadora: Professora Dra. Vicelma Luiz Cardoso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO: “PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ESCURA A PARTIR DE
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR: ANÁLISE COMPARATIVA DOS
PRINCIPAIS MÉTODOS DE PRÉ TRATAMENTOS E SEUS EFEITOS
NO RENDIMENTO DO PROCESSO”**

Pedro Vianna Nunes

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz
Cardoso**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para a defesa do Trabalho de
Conclusão de Curso da Faculdade de
Engenharia Química.

Uberlândia - MG
2026
Pedro Vianna Nunes

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO: “PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ESCURA A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR: ANÁLISE COMPARATIVA DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE PRÉ TRATAMENTOS E SEUS EFEITOS NO RENDIMENTO DO PROCESSO”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador(a): Prof. Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Banca Examinadora:

Uberlândia, 3 de agosto de 2026

Prof. Dra. Thamayne Valadares de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia - MG

Ma. Cristiane de Araujo da Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG

RESUMO

O crescimento da demanda mundial por energia e a necessidade de reduzir as emissões de gases de efeito estufa têm intensificado a busca por fontes renováveis capazes de atender aos princípios da sustentabilidade. Nesse contexto, o biohidrogênio destaca-se como uma alternativa energética promissora por possibilitar o aproveitamento de resíduos agroindustriais e contribuir para a redução da dependência de combustíveis fósseis. Entre as matérias-primas disponíveis, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta elevado potencial devido à sua ampla disponibilidade no Brasil e ao elevado teor de carboidratos estruturais passíveis de conversão em hidrogênio por fermentação escura. Entretanto, a elevada recalcitrância da biomassa, decorrente da presença de lignina, limita sua biodegradação, tornando necessária a aplicação de pré-tratamentos capazes de aumentar a acessibilidade da celulose e da hemicelulose aos microrganismos fermentativos. Os principais métodos de pré-tratamento empregados em biomassa lignocelulósica são processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, que afetam os parâmetros operacionais, como potencial hidrogeniônico, temperatura, inóculo e tempo de retenção hidráulica, sobre o desempenho do processo fermentativo. Os resultados evidenciaram que os pré-tratamentos alcalinos e físico-químicos apresentaram maior eficiência na remoção parcial da lignina e na exposição das fibras de celulose, favorecendo a liberação de açúcares fermentáveis. No estudo de caso, a associação entre solução alcalina e ultrassom promoveu modificações estruturais confirmadas por difração de raios X e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, resultando em aumento aproximado de trinta e cinco por cento na produção de biohidrogênio e favorecendo a formação de ácido acético e ácido butírico, metabólitos associados aos maiores rendimentos de hidrogênio. Esses resultados demonstram que a integração entre pré-tratamentos eficientes e o controle adequado das condições operacionais representa um fator determinante para maximizar a conversão do bagaço de cana-de-açúcar em biohidrogênio, reforçando o potencial dessa biomassa como matéria-prima para processos sustentáveis de produção de energia e para o desenvolvimento de biorrefinarias.

PALAVRAS-CHAVE: biohidrogênio; fermentação escura; bagaço de cana-de-açúcar; biomassa lignocelulósica; pré-tratamento; biorrefinaria.

ABSTRACT

The increasing global demand for energy and the need to reduce greenhouse gas emissions have intensified the search for renewable energy sources capable of meeting sustainability principles. In this context, biohydrogen has emerged as a promising energy alternative due to its potential to utilize agro-industrial residues while contributing to the reduction of dependence on fossil fuels. Among the available feedstocks, sugarcane bagasse has considerable potential because of its wide availability in Brazil and its high content of structural carbohydrates that can be converted into hydrogen through dark fermentation. However, the high recalcitrance of this lignocellulosic biomass, resulting from the presence of lignin, limits its biodegradation, making the application of pretreatment methods essential to increase the accessibility of cellulose and hemicellulose to fermentative microorganisms. The main pretreatment methods applied to lignocellulosic biomass include physical, chemical, physicochemical, and biological processes, whose effectiveness is directly associated with operational parameters such as pH, temperature, inoculum, and hydraulic retention time, all of which influence the performance of the fermentative process. The results demonstrated that alkaline and physicochemical pretreatments were more effective in promoting partial lignin removal and increasing cellulose fiber exposure, thereby enhancing the release of fermentable sugars. In the case study, the combined application of an alkaline solution and ultrasound promoted structural modifications confirmed by X-ray diffraction and Fourier-transform infrared spectroscopy, resulting in an approximately thirty-five percent increase in biohydrogen production and favoring the formation of acetic and butyric acids, metabolites associated with higher hydrogen yields. These findings demonstrate that the integration of efficient pretreatment strategies with appropriate control of operational conditions is a determining factor in maximizing the conversion of sugarcane bagasse into biohydrogen, reinforcing the potential of this biomass as a feedstock for sustainable energy production and the development of biorefineries.

KEYWORDS: biohydrogen; dark fermentation; sugarcane bagasse; lignocellulosic biomass; pretreatment; biorefinery.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. OBJETIVOS.....	12
1.1.1. OBJETIVO GERAL.....	12
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. METODOLOGIA.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. A DEMANDA POR FONTES RENOVÁVEIS DE ENERGIA E TRANSIÇÃO ENERGÉTICA.....	14
3.2. BIOCOMBUSTÍVEIS.....	16
3.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	18
3.4. BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR.....	21
3.5. PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO.....	22
3.6. FERMENTAÇÃO ESCURA.....	25
3.7. PRÉ TRATAMENTOS.....	28
3.7.1 PRÉ TRATAMENTO FÍSICO.....	31
3.7.2 PRÉ TRATAMENTO QUÍMICOS.....	34
3.7.3 PRÉ TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	36
3.7.4 PRÉ TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	38
3.7.5 COMPARAÇÃO DOS PRÉ TRATAMENTOS.....	39
3.8. PARÂMETROS OPERACIONAIS.....	39
3.8.1. PH.....	39
3.8.2. TEMPERATURA.....	40
3.8.3. TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICA.....	41
4. ESTUDO DE CASO.....	41
4.1. RESUMO.....	41
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução das emissões de CO ₂ associadas a fontes fósseis de energia, entre 1850 e 2019.....	15
Figura 2 – Classificação dos biocombustíveis.....	17
Figura 3 – Bagaço de Cana de Açúcar.....	19
Figura 4 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	19
Figura 5 - Evolução da área cultivada e da produção nacional de cana-de-açúcar no Brasil entre as safras 2006 e 2026.....	22
Figura 6- Classificação do hidrogênio de acordo com a matéria-prima empregada e as emissões de gases de efeito estufa associadas ao processo produtivo.....	24
Figura 7 – Representação simplificada da fermentação escura e dos principais produtos formados durante a conversão anaeróbia de substratos ricos em carboidratos.....	28
Figura 8- Diagrama da produção de biohidrogênio com pré tratamentos realizados.....	30
Figura 9 – Produtos desejáveis e compostos inibitórios formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	31
Figura 10 – Etapas envolvidas na produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar por fermentação escura.....	32
Figura 11 - Efeitos da moagem.....	34
Figura 12 – Frações restantes de componentes lignocelulósicos em amostras de bagaço após etapas de pré-tratamento.....	36
Figura 13 - Resultados da fermentação escura utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre fontes fósseis e renováveis.....	15
Tabela 2 - Classificação dos biocombustíveis segundo a geração.....	16
Tabela 3 - Composição química de diferentes biomassas lignocelulósicas.....	19
Tabela 4 - Comparação entre as principais rotas biológicas de produção de biohidrogênio..	24
Tabela 5 – Fonte de inóculo e parâmetros operacionais da produção de biohidrogênio fermentativo escuro a partir da biomassa lignocelulósica.....	26
Tabela 6 – Comparação entre os principais pré tratamentos químicos aplicados ao bagaço de cana.....	34
Tabela 7- Pré tratamentos físicos químicos.....	37

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, a expansão das atividades industriais e o aumento da demanda por bens e serviços têm resultado em uma elevação contínua do consumo energético em escala global. A energia constitui um dos principais fatores para o desenvolvimento econômico e social, sendo indispensável para o funcionamento dos setores produtivos, dos sistemas de transporte e das atividades cotidianas da sociedade moderna (SOARES et al., 2020).

Atualmente, a matriz energética mundial permanece fortemente dependente dos combustíveis fósseis, principalmente petróleo, carvão mineral e gás natural. Essas fontes representavam aproximadamente 81% da oferta mundial de energia primária em 2016. Embora tenham sido essenciais para o desenvolvimento industrial ao longo dos últimos séculos, sua utilização intensiva está associada à emissão de gases de efeito estufa e outros poluentes atmosféricos, contribuindo para o agravamento das mudanças climáticas e para diversos impactos ambientais (SOARES et al., 2020).

Nesse cenário, a busca por fontes energéticas renováveis e tecnologias capazes de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis tem se tornado cada vez mais relevante. Entre as alternativas estudadas, o hidrogênio destaca-se devido ao seu potencial de aplicação em diferentes setores industriais e energéticos, além da possibilidade de ser produzido a partir de diversas matérias-primas e rotas tecnológicas (DINCER; ACAR et al., 2015).

O hidrogênio é considerado um importante vetor energético devido à sua capacidade de armazenar e disponibilizar energia proveniente de diferentes fontes. Por não ser encontrado livremente em quantidades significativas na natureza, sua obtenção depende da conversão de compostos que o contenham, como água, hidrocarbonetos ou biomassa. Essas características que têm contribuído para a intensificação das pesquisas voltadas ao desenvolvimento dessa tecnologia (IRENA et al., 2022).

Diversas tecnologias podem ser empregadas para a produção de hidrogênio, incluindo processos termoquímicos, eletroquímicos e biológicos. Nos últimos anos, o interesse por rotas sustentáveis tem aumentado significativamente, impulsionado pela necessidade de desenvolver alternativas capazes de reduzir os impactos ambientais associados aos sistemas energéticos convencionais (DINCER; ACAR, 2015).

Entre essas alternativas, destaca-se o biohidrogênio, produzido por meio da ação de microrganismos capazes de converter matéria orgânica em hidrogênio. A utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como matéria-prima para esses processos tem despertado crescente interesse científico, uma vez que possibilita a geração de energia renovável associada ao aproveitamento de materiais frequentemente subutilizados. Em comparação com processos convencionais de obtenção de hidrogênio, as rotas biológicas operam sob condições mais brandas de temperatura e pressão, demandam menor consumo energético e possibilitam o aproveitamento de substratos renováveis, características que têm impulsionado o crescente interesse científico e tecnológico nessa área (RANI et al., 2024; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica, especialmente o bagaço de cana-de-açúcar, apresenta elevado potencial para aplicação em processos biotecnológicos destinados à produção sustentável de hidrogênio. Destaca-se pela grande quantidade gerada pela indústria sucroenergética e pelo elevado conteúdo de carboidratos estruturais passíveis de conversão em açúcares fermentáveis, configurando-se como uma das matérias-primas mais promissoras (KUMAR et al., 2015).

Estruturalmente, a biomassa lignocelulósica é formada basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. As duas primeiras frações correspondem às principais fontes de carboidratos da biomassa, os quais podem ser convertidos em açúcares fermentáveis e, posteriormente, consumidos por microrganismos durante a produção de biohidrogênio. No entanto, o fato de estarem associadas à lignina confere à biomassa uma estrutura recalcitrante, o que dificulta sua degradação e diminui a quantidade de açúcares disponíveis para a fermentação. Por essa razão, a produção biológica de hidrogênio depende fortemente do uso de estratégias que alterem a estrutura da biomassa, tornando-a mais acessível aos microrganismos fermentativos, ponto que será tratado com mais detalhes nas seções seguintes (RABELO et al., 2015).

Diante disso, diferentes estratégias de pré-tratamento vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de modificar a estrutura lignocelulósica, promovendo a remoção parcial da lignina, a desorganização das fibras e o aumento da acessibilidade da celulose e da hemicelulose. Como consequência, torna-se possível aumentar a liberação de açúcares fermentáveis, favorecendo etapas subsequentes de hidrólise e conversão biológica. Estudos recentes demonstram que a eficiência desses pré-tratamentos influencia diretamente o aproveitamento da biomassa e o rendimento dos processos de produção de biohidrogênio, evidenciando a importância dessa etapa para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e sustentáveis (CHANDRA et al.,

2026).

Ao longo dos últimos anos, a fermentação escura para produção de biohidrogênio é uma alternativa sustentável para transformar resíduos lignocelulósicos em energia limpa após o pré tratamento. O interesse por essa rota tecnológica se justifica pela possibilidade de aliar o aproveitamento de resíduos agroindustriais à geração de um combustível renovável, o que colabora tanto para a diminuição dos impactos ambientais quanto para a consolidação dos princípios de biorrefinaria e economia circular. No entanto, o desempenho do processo fermentativo depende de diversos fatores, entre eles a composição da biomassa, as condições em que a fermentação é conduzida e, sobretudo, a eficácia das etapas de pré-tratamento responsáveis por liberar os carboidratos fermentáveis contidos na estrutura lignocelulósica (RANI et al., 2024).

Assim, diferentes técnicas de pré-tratamento têm sido estudadas, abrangendo métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, cada um deles com vantagens, limitações e efeitos distintos sobre a estrutura da biomassa e sobre o rendimento da produção de hidrogênio. Essas técnicas têm como finalidade aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis, que posteriormente são convertidos em biohidrogênio por meio da fermentação escura (RANI et al., 2024).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é analisar, por meio de um levantamento bibliográfico, a influência dos diferentes métodos de pré-tratamento aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar na produção de biohidrogênio por fermentação escura, bem como realizar a análise de um estudo de caso, visando identificar as estratégias que proporcionam maior eficiência na conversão da biomassa em biocombustível.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivos Específicos

- Apresentar os principais conceitos relacionados ao hidrogênio, ao biohidrogênio e à fermentação escura, destacando suas características e aplicações no contexto da produção de energia renovável.
- Descrever a composição e as características do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa lignocelulósica, evidenciando seu potencial para a produção de biohidrogênio.
- Caracterizar os principais métodos de pré-tratamento aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar, abordando seus princípios de funcionamento, vantagens e limitações.
- Comparar a influência dos diferentes métodos de pré-tratamento sobre a disponibilidade de açúcares fermentáveis e o rendimento da produção de biohidrogênio por fermentação escura.
- Analisar os principais parâmetros operacionais que influenciam o rendimento da produção de biohidrogênio por fermentação escura, com ênfase nas condições de processo descritas na literatura.
- Explorar um estudo de caso da literatura sobre a produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar, discutindo os resultados obtidos e os fatores que influenciam a eficiência do processo.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho será desenvolvido por meio de uma revisão bibliográfica sobre a produção de biohidrogênio por fermentação escura a partir do bagaço de cana-de-açúcar, com enfoque na influência dos diferentes métodos de pré-tratamento e dos principais parâmetros operacionais sobre o rendimento do processo. Para isso, serão consultados artigos científicos, artigos de revisão, livros, dissertações e teses obtidos em bases de dados confiáveis, como ScienceDirect, Periódicos CAPES, Scopus e Google Acadêmico. Com base nas informações levantadas, será realizada uma análise comparativa dos métodos de pré-tratamento descritos na literatura, bem como dos parâmetros operacionais que influenciam a produção de biohidrogênio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

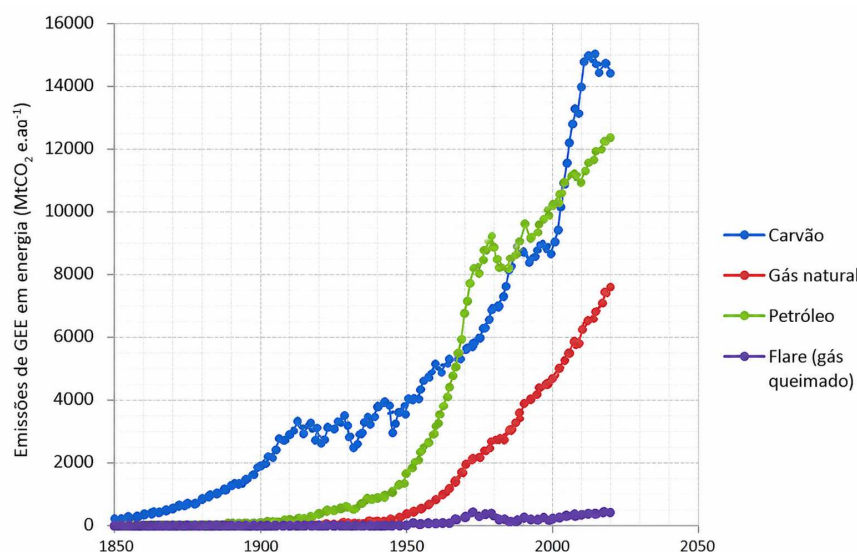
3.1. A DEMANDA POR FONTES RENOVÁVEIS DE ENERGIA E TRANSIÇÃO ENERGÉTICA

Nas últimas décadas, o consumo mundial de energia apresentou crescimento contínuo em decorrência da expansão populacional, da urbanização e da intensificação das atividades industriais. A ampliação da produção de bens, do transporte de cargas e passageiros e da demanda por eletricidade elevou significativamente a necessidade de energia em praticamente todos os setores da economia. As projeções indicam que a demanda global por energia deverá aumentar cerca de 25% até 2040, enquanto o consumo de eletricidade poderá crescer entre 64% e 90%, evidenciando que a expansão da oferta energética continuará sendo um dos principais desafios das próximas décadas e exigirá soluções capazes de conciliar desenvolvimento econômico e sustentabilidade ambiental (HOWARD et al., 2020).

Grande parte dessa demanda ainda é atendida por combustíveis fósseis, principalmente petróleo, carvão mineral e gás natural. A predominância dessas fontes está relacionada à elevada densidade energética, à infraestrutura consolidada para exploração e distribuição e ao amplo emprego nos setores industrial, elétrico e de transportes. Entretanto, sua utilização intensiva resulta na emissão de grandes quantidades de dióxido de carbono (CO_2), principal gás associado ao aquecimento global (WALTER et al., 2021).

Em 2019, as cadeias energéticas foram responsáveis por aproximadamente 38 Gt CO_2 e, correspondendo a cerca de dois terços das emissões globais de gases de efeito estufa conforme a **Figura 1**, o que evidencia a necessidade de reduzir progressivamente a participação dessas fontes na matriz energética mundial (WALTER et al., 2021).

Figura 1 – Evolução das emissões de CO₂ associadas a fontes fósseis de energia, entre 1850 e 2019



Fonte: WALTER et al., 2021.

Os impactos decorrentes do uso de combustíveis fósseis vão além do aumento das emissões de dióxido de carbono. Durante sua combustão também são liberados óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre (SO_x), material particulado e compostos orgânicos voláteis, substâncias associadas à degradação da qualidade do ar e ao aumento da incidência de doenças respiratórias e cardiovasculares. A poluição atmosférica proveniente do setor energético permanece entre os principais fatores de risco à saúde pública, sendo responsável por milhões de mortes prematuras anualmente (NOGUEIRA et al., 2021).

A intensificação das mudanças climáticas e os compromissos internacionais voltados à redução das emissões de carbono impulsionaram a adoção de políticas de transição energética em diversos países. Esse processo caracteriza-se pela substituição gradual de fontes fósseis por alternativas renováveis, pela ampliação da eficiência energética e pela incorporação de tecnologias de baixa emissão de carbono (SOVACOOOL et al., 2021).

Na Tabela 1, nota-se a comparação entre os combustíveis fósseis e renováveis em alguns aspectos como disponibilidade, emissão de CO₂, impacto ambiental, segurança energética e sustentabilidade.

Tabela 1 - Comparação entre fontes fósseis e renováveis

Aspectos	Fontes fósseis	Fontes renováveis
Disponibilidade	Limitada	Renovável
Emissão de CO ₂	Elevada	Baixa
Impacto ambiental	Alto	Reduzido
Segurança energética	Dependência de reservas	Diversificação
Sustentabilidade	Limitada	Elevada

Fonte: Adaptado de DINCER E ACAR ET AL, 2015.

A **Tabela 1** mostra que entre as principais estratégias associadas à transição energética destaca-se a ampliação do uso de biocombustíveis obtidos a partir de matérias-primas renováveis. Além de contribuírem para a redução das emissões atmosféricas, esses combustíveis favorecem o aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais, promovem a diversificação da matriz energética e fortalecem os princípios da bioeconomia e da economia circular (IRENA et al.,2023).

3.2.BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis são produzidos a partir da conversão de biomassa renovável em produtos com potencial energético. Diferentemente dos fósseis, esses produtos podem ser obtidos a partir de diversas matérias-primas, como culturas agrícolas, resíduos agroindustriais, biomassa lignocelulósica, óleos vegetais, resíduos orgânicos e microalgas, empregando processos físicos, químicos, termoquímicos ou biológicos (XIE et al., 2024).

À medida que novas tecnologias de conversão da biomassa foram desenvolvidas, tornou-se necessário classificar os biocombustíveis de acordo com a matéria-prima empregada e o nível de maturidade tecnológica dos processos de produção. Dessa forma, os biocombustíveis são tradicionalmente agrupados em quatro gerações, cuja evolução reflete a busca por processos mais eficientes, sustentáveis e menos dependentes de recursos destinados à alimentação humana (CHERUBINI, 2010; NAIK et al., 2010).

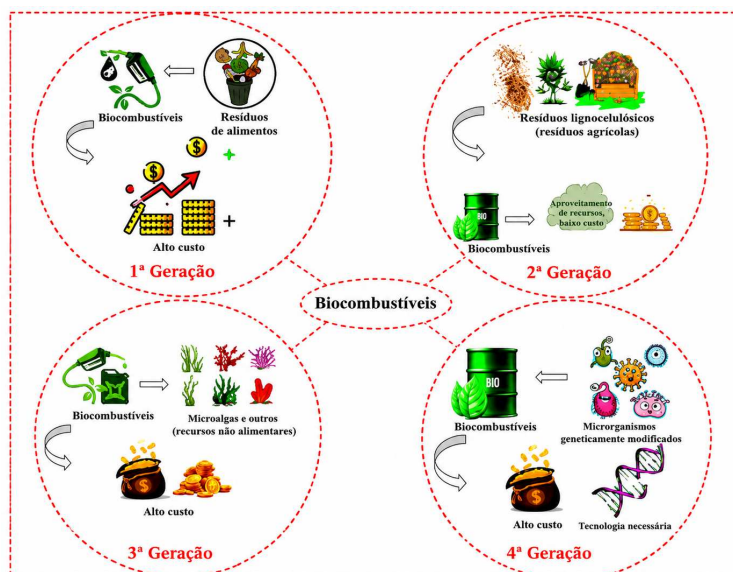
Tabela 2 - Classificação dos biocombustíveis segundo a geração

Geração	Matéria Prima	Exemplos	Principais características
Primeira	Cana-de-açúcar, milho, soja, palma	Bioetanol, biodiesel	Utilizam matérias-primas alimentícias
Segunda	Biomassa lignocelulósica e resíduos agroindustriais	Bioetanol 2G, biohidrogênio, biogás	Aproveitam resíduos e não competem diretamente com alimentos
Terceira	Microalgas	Biodiesel de microalgas	Elevada produtividade, porém alto custo
Quarta	Biomassa geneticamente modificada e processos com captura de carbono	Combustíveis avançados	Tecnologias ainda em desenvolvimento

Fonte: Adaptado de XIE, 2024.

A classificação apresentada na Tabela 2 evidencia que a evolução dos biocombustíveis ocorreu paralelamente ao desenvolvimento de novas tecnologias de conversão da biomassa e à busca por matérias-primas mais sustentáveis.

Figura 2 – Classificação dos biocombustíveis



Fonte: Adaptado Bukhari et al., 2025

Na **Figura 2**, enquanto as primeiras rotas de produção foram baseadas principalmente em culturas agrícolas destinadas à alimentação, as gerações seguintes passaram a incorporar resíduos lignocelulósicos, microalgas e estratégias biotecnológicas mais avançadas. Essa evolução representa não apenas uma mudança na origem da biomassa utilizada, mas também o aprimoramento dos processos produtivos, com o objetivo de aumentar a eficiência de conversão, ampliar o aproveitamento de resíduos e reduzir os impactos ambientais associados à produção de combustíveis renováveis. Entre essas tecnologias, os biocombustíveis de segunda geração ganharam destaque por utilizarem resíduos agrícolas e agroindustriais abundantes, característica que os torna particularmente atrativos para países com forte produção de biomassa, como o Brasil (ALALWAN et al., 2019; PADDER et al., 2024; KANT et al., 2025).

A ampla disponibilidade de resíduos lignocelulósicos tem contribuído para o crescente interesse pelos biocombustíveis de segunda geração, especialmente em países com forte atividade agrícola. Subprodutos como palha de cereais, resíduos florestais e o bagaço de cana-de-açúcar apresentam elevado potencial para conversão em biocombustíveis, uma vez que são gerados em grandes quantidades e possuem significativo conteúdo de carboidratos estruturais. Entre as diferentes alternativas de conversão, destacam-se as rotas biológicas voltadas à produção de biohidrogênio, que vêm recebendo atenção crescente em função do seu potencial para integrar o conceito de biorrefinaria e ampliar o aproveitamento sustentável da biomassa residual (SOARES et al., 2020).

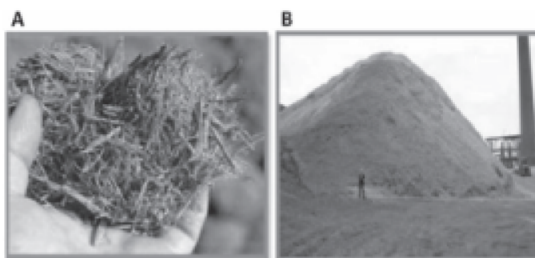
3.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica constitui a principal fração estrutural dos vegetais e representa a fonte de biomassa renovável mais abundante disponível no planeta. Em razão de sua abundância, esse material tem sido amplamente utilizado como matéria-prima em processos voltados à produção de biocombustíveis de segunda geração e de outros bioprodutos. Diferentemente das culturas agrícolas empregadas na primeira geração, a biomassa lignocelulósica é obtida, predominantemente, de resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, permitindo o aproveitamento de materiais que não competem diretamente com a cadeia alimentar. Essa característica favorece sua inserção no conceito de biorrefinaria, no qual diferentes produtos podem ser obtidos a partir de uma mesma matéria-prima (SATARI et al., 2021; BUKHARI et al., 2025).

A diversidade de resíduos que compõem a biomassa lignocelulósica amplia significativamente seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos. Entre as principais fontes destacam-se o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, a palha de milho, a casca de arroz, a palha de trigo, resíduos florestais e subprodutos da indústria madeireira, todos gerados em grandes volumes durante as atividades agroindustriais (PUHAKKA et al., 2014).

No Brasil, em especial, o setor sucroenergético se destaca pela expressiva produção de bagaço e palha de cana-de-açúcar, materiais que apresentam elevado potencial para conversão em biocombustíveis devido ao seu conteúdo de carboidratos estruturais. Por essa razão, esses resíduos têm sido amplamente investigados como matéria-prima para a produção de bioetanol, biogás e biohidrogênio, consolidando-se como importantes recursos para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (SOARES et al., 2020).

Figura 3 – Bagaço de Cana de Açúcar

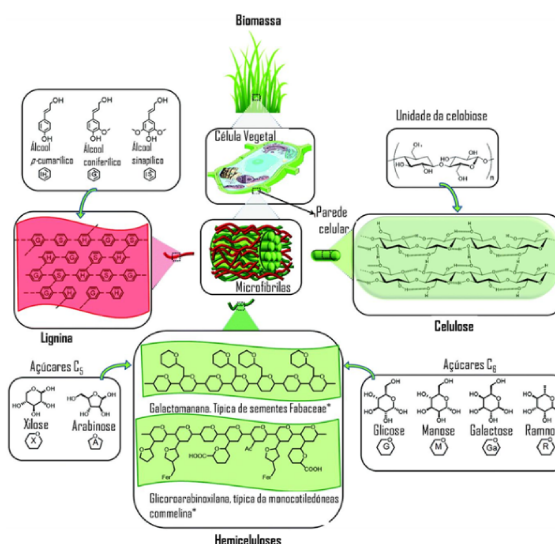


Fonte: PAYNE et al., (2015).

Apesar da diversidade de matérias-primas utilizadas, a biomassa lignocelulósica apresenta uma organização estrutural semelhante, constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Esses três polímeros encontram-se intimamente associados na parede

celular vegetal e desempenham funções complementares relacionadas ao suporte estrutural e à proteção dos tecidos vegetais. A celulose corresponde à principal fração de carboidratos estruturais, enquanto a hemicelulose atua como uma matriz de ligação entre as microfibrilas de celulose e a lignina, responsável por conferir rigidez e resistência à parede celular. A interação entre esses componentes influencia diretamente o aproveitamento da biomassa em processos de conversão biológica, uma vez que determina sua acessibilidade durante as etapas de hidrólise e fermentação (PAËS et al., 2019)

Figura 4 – Estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte: MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G. M. et al., 2016

Tabela 3 - Composição química de diferentes biomassas lignocelulósicas

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de arroz	28.2	17.5	14.6
Casca de arroz	40.26	12.54	25.40
Estalido de milho	37.6	21.5	19.1
Bagaço de cana-de-açúcar	38.1	21.2	8.3

Fonte: Adaptado de SOARES, J. F. et al. (2020)

Conforme apresentado na **Tabela 3**, a composição química das biomassas lignocelulósicas varia de acordo com a espécie vegetal e a origem do resíduo. Em todas as biomassas avaliadas, a celulose corresponde à principal fração estrutural, enquanto os teores de hemicelulose e lignina apresentam maior variação.

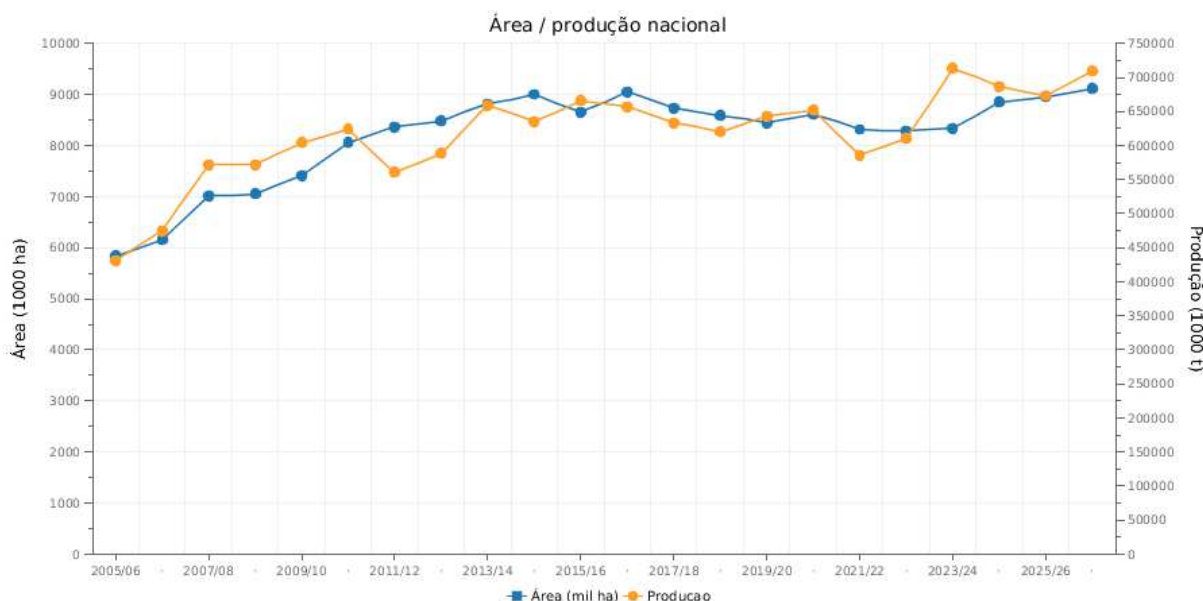
A celulose e a hemicelulose constituem as principais fontes de açúcares fermentáveis utilizados na produção de biocombustíveis. Entretanto, o aproveitamento desses carboidratos é limitado pela presença da lignina, um polímero aromático que envolve as fibras de celulose e hemicelulose, formando uma estrutura altamente resistente à ação de agentes químicos, enzimas e microrganismos. Essa organização confere à biomassa lignocelulósica elevada recalcitrância, reduzindo a acessibilidade aos polissacarídeos e dificultando os processos de hidrólise e conversão biológica. Em razão dessa característica, a composição química da biomassa constitui um dos principais fatores considerados na seleção de matérias-primas e no desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a eficiência da produção de biocombustíveis (SOARES et al., 2020).

Em razão da elevada recalcitrância da biomassa lignocelulósica, a aplicação de etapas de pré-tratamento torna-se indispensável para aumentar a disponibilidade dos carboidratos estruturais e favorecer sua conversão em açúcares fermentáveis (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

3.4. BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

A cana-de-açúcar possui elevada relevância para o setor agroindustrial brasileiro, colocando o país entre os principais produtores mundiais de açúcar e etanol. O processamento industrial dessa matéria-prima resulta na geração de resíduos lignocelulósicos, principalmente bagaço e palha, que podem ser aproveitados para fins energéticos e industriais. Tradicionalmente, o bagaço é utilizado nas próprias usinas para produção de vapor e energia elétrica por meio da cogeração. Entretanto, o avanço dos conceitos de biorrefinaria e aproveitamento integral da biomassa ampliou o interesse pela utilização desse resíduo em outras rotas de conversão, incluindo a produção de combustíveis e insumos químicos renováveis (CONAB et al., 2024).

Figura 5- Evolução da área cultivada e da produção nacional de cana-de-açúcar no Brasil entre as safras 2006 e 2026.



Fonte: CONAB et al.,2025

Durante o processamento da cana-de-açúcar são gerados aproximadamente 250 a 300 kg de bagaço para cada tonelada de matéria-prima processada, além da produção de quantidades expressivas de palha durante a colheita mecanizada. Considerando a dimensão do setor sucroenergético nacional, a geração desse resíduo alcança dezenas de milhões de toneladas por safra, constituindo uma das principais fontes de biomassa lignocelulósica disponíveis no país. Embora parcela significativa do bagaço seja destinada à cogeração de energia, parte desse material permanece disponível para aplicações em processos de conversão biológica e termoquímica, incluindo estudos voltados à produção de biohidrogênio (CANILHA et al., 2012).

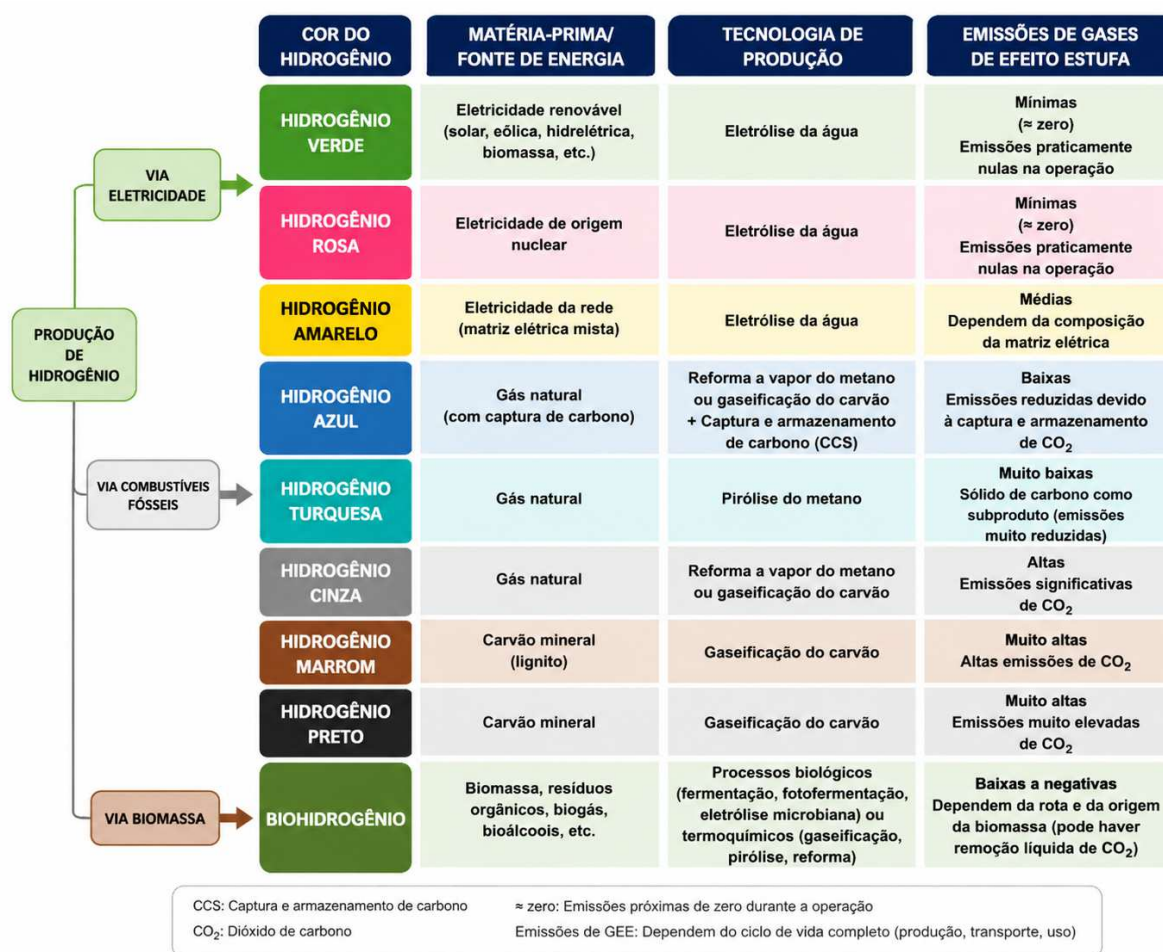
O interesse pelo bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de biocombustível está relacionado, principalmente, à sua elevada concentração de carboidratos estruturais e à ampla disponibilidade ao longo do ano. A fração celulósica e hemicelulósica presente nesse resíduo constitui uma importante fonte de açúcares fermentáveis, que podem ser convertidos em hidrogênio por diferentes rotas biológicas após etapas adequadas de processamento. Além disso, a concentração da produção nas unidades sucroenergéticas favorece a coleta, o armazenamento e a utilização do material em escala industrial, reduzindo custos logísticos e facilitando sua integração em sistemas de biorrefinaria existentes (CANILHA et al., 2012).

Apesar dessas características, a utilização direta do bagaço em processos fermentativos é limitada pela organização estrutural da parede celular vegetal. A associação entre celulose, hemicelulose e lignina reduz a acessibilidade aos carboidratos estruturais e dificulta a ação de enzimas e microrganismos responsáveis pela conversão biológica. Em razão disso, etapas de pré-tratamento são necessárias para aumentar a disponibilidade dos açúcares fermentáveis e melhorar a eficiência dos processos de produção de biocombustíveis de segunda geração, incluindo o biohidrogênio (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

3.5. PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO

A classificação do hidrogênio é normalmente realizada com base na matéria-prima empregada e na intensidade das emissões associadas ao processo produtivo. Atualmente, o hidrogênio cinza, obtido principalmente a partir da reforma do gás natural, representa a maior parcela da produção mundial, embora esteja associado à emissão significativa de dióxido de carbono. Alternativas de menor impacto ambiental incluem o hidrogênio azul, produzido a partir de combustíveis fósseis com captura e armazenamento de carbono, e o hidrogênio verde, obtido pela eletrólise da água utilizando eletricidade proveniente de fontes renováveis. Nesse cenário, o biohidrogênio corresponde ao hidrogênio produzido a partir da conversão biológica ou termoquímica de biomassa e resíduos orgânicos, constituindo uma alternativa capaz de integrar produção energética e aproveitamento de resíduos agroindustriais (ANANTHI et al., 2024).

Figura 6- Classificação do hidrogênio de acordo com a matéria-prima empregada e as emissões de gases de efeito estufa associadas ao processo produtivo



Fonte: Adaptado AKHLAGHI et al., 2020

A produção de biohidrogênio pode ocorrer por diferentes rotas biológicas e termoquímicas, cuja escolha depende da matéria-prima disponível, das condições operacionais e do objetivo do processo. Entre as principais alternativas destacam-se a gaseificação da biomassa, a pirólise, a fotofermentação, a biophotólise e a fermentação escura. As rotas termoquímicas geralmente operam em temperaturas elevadas e apresentam elevada eficiência de conversão, enquanto os processos biológicos são conduzidos sob condições mais brandas e permitem o aproveitamento de resíduos orgânicos e biomassas lignocelulósicas. Em razão dessas características, as tecnologias biológicas têm recebido atenção crescente em estudos voltados à produção sustentável de hidrogênio a partir de resíduos agroindustriais e efluentes orgânicos (AGYEKUM et al., 2024).

Entre as rotas biológicas disponíveis, a fermentação escura destaca-se pela elevada produtividade volumétrica de hidrogênio e pela simplicidade operacional quando comparada

aos processos dependentes de radiação luminosa. Outra característica importante está relacionada à possibilidade de utilização de diferentes tipos de substrato, incluindo resíduos agroindustriais e materiais lignocelulósicos. Em virtude dessas características, essa tecnologia tem sido amplamente investigada para aplicações em escala industrial e em sistemas integrados de aproveitamento energético de resíduos (PACHAIAPPAN et al., 2024).

Tabela 4- Comparação entre as principais rotas biológicas de produção de biohidrogênio

Parâmetro	Fermentação escura	Fotofermentação	Biophotólise
Necessidade de luz	Não	Sim	Sim
Taxa de produção de H ₂	Alta	Limitada	Baixa
Complexidade operacional	Moderada	Elevada	Elevada
Escalabilidade	Alta	Limitada	Baixa
Substratos utilizados	Resíduos orgânicos	Ácidos	Água
Aplicação industrial	Mais promissora	Limitada	Experimental

Fonte: Adaptado de Manish e Banerjee (2008)

Conforme apresentado na **Tabela 4**, as diferentes rotas biológicas de produção de biohidrogênio apresentam características distintas em relação às condições operacionais, aos substratos empregados e ao potencial de aplicação em escala industrial. Embora processos como a fotofermentação e a biophotólise apresentem elevados rendimentos teóricos de hidrogênio, a dependência de radiação luminosa e a menor produtividade volumétrica ainda representam limitações para sua aplicação em larga escala. Por outro lado, a fermentação escura ocorre a partir da degradação anaeróbia de compostos orgânicos por microrganismos capazes de converter carboidratos em hidrogênio e metabólitos intermediários (MANISH E BANERJEE et al., 2008).

Durante o processo, os açúcares presentes no substrato são utilizados como fonte de carbono e energia, resultando na formação de hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos de cadeia curta (AKRAM et al., 2024).

3.6. FERMENTAÇÃO ESCURA

A fermentação escura pode ser conduzida por diferentes grupos de bactérias anaeróbias capazes de converter compostos orgânicos em hidrogênio por meio de distintas rotas metabólicas, utilizando culturas puras ou consórcios microbianos mistos. Entre os microrganismos mais frequentemente associados ao processo destacam-se espécies pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Thermoanaerobacterium*, que apresentam diferenças quanto à utilização dos substratos, às condições ótimas de crescimento e aos metabólitos produzidos durante a fermentação. Em processos envolvendo substratos lignocelulósicos, especialmente aqueles operados sob condições anaeróbias estritas ou em temperaturas elevadas, observa-se predominância de espécies dos gêneros *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium*, frequentemente associadas a elevados rendimentos de hidrogênio e à metabolização de açúcares provenientes da hidrólise da biomassa (RATTI et al., 2015)

As culturas puras correspondem a sistemas fermentativos nos quais apenas uma espécie microbiana é responsável pela conversão do substrato em hidrogênio. Essa abordagem permite associar diretamente os produtos formados às rotas metabólicas do microrganismo empregado, possibilitando maior controle experimental e melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos na produção de hidrogênio. Em contraste, não conseguem metabolizar uma variedade de substratos como amido e celulose (DAS VEZIROGLU et al., 2008).

Por outro lado, os consórcios microbianos mistos são constituídos por diferentes populações de microrganismos que coexistem e participam simultaneamente das etapas de degradação do substrato e produção de metabólitos intermediários. Nessas condições, diferentes grupos microbianos desempenham funções complementares, permitindo a utilização de substratos mais complexos e de composição variável. Em sistemas destinados ao aproveitamento de resíduos orgânicos e hidrolisados lignocelulósicos, a presença de comunidades microbianas diversificadas favorece a conversão simultânea de diferentes carboidratos e reduz a necessidade de condições rigorosas de esterilidade durante a operação dos reatores. Por esse motivo, consórcios obtidos a partir de lodos anaeróbios, sedimentos e resíduos orgânicos são empregados em processos de produção fermentativa de hidrogênio em

escala aplicada e em sistemas contínuos de operação (FUESS et al., 2024).

Nesse sistema, além das bactérias produtoras de hidrogênio, comunidades anaeróbias naturais frequentemente apresentam microrganismos consumidores desse gás, incluindo arqueias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas, capazes de converter o hidrogênio produzido em metano ou ácido acético. Dessa forma, procedimentos de enriquecimento e seleção microbiana são empregados com o objetivo de favorecer o crescimento de bactérias hidrogenogênicas e reduzir a atividade dos microrganismos competidores. Entre os tratamentos mais utilizados destacam-se o choque térmico, a acidificação, a alcalinização e a exposição ao oxigênio, estratégias que exploram diferenças fisiológicas entre os grupos microbianos presentes no inóculo e contribuem para o aumento da produção de hidrogênio (CHAGANTI et al., 2012; MOHANAKRISHNA et al., 2024; MOKHTARANI et al., 2025).

Tabela 5 – Fonte de inóculo e parâmetros operacionais da produção de biohidrogênio fermentativo escuro a partir da biomassa lignocelulósica

Biomassa lignocelulósica	Inóculo	H₂ produção
Farelo de milho	Cultura mista	1025.19–2648.41 mL H ₂ /L
Bagaço de cana	Cultura mista	121,7–402,0 mL H ₂ /L

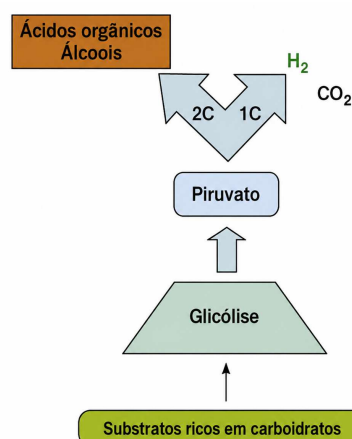
Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2020

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta rendimentos inferiores quando utilizado sem etapas adequadas de desestruturação da matriz lignocelulósica, evidenciando a influência da recalcitrância da biomassa sobre o desempenho fermentativo como mostra na **Tabela 5**. Ainda assim, a elevada disponibilidade desse resíduo no setor sucroenergético brasileiro e seu expressivo conteúdo de celulose e hemicelulose tornam o bagaço uma das matérias-primas mais promissoras para a produção sustentável de biohidrogênio, especialmente quando associado a estratégias eficientes de pré-tratamento e hidrólise (KUMAR et al., 2020).

A composição dos metabólitos solúveis formados durante a fermentação constitui um dos principais indicadores do comportamento metabólico do sistema e do desempenho da produção de hidrogênio. Entre os compostos mais frequentemente observados destacam-se os

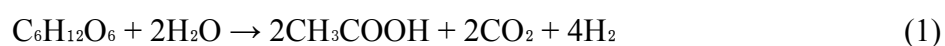
ácidos acético, butírico, propiônico e lático, além de álcoois como etanol e butanol, cujas concentrações variam em função da comunidade microbiana e das condições operacionais empregadas. Em sistemas com elevada produção de hidrogênio, observa-se predominância das rotas associadas à formação de ácido acético e ácido butírico, enquanto o acúmulo de ácido propiônico (Equação 3) e lactato está frequentemente relacionado ao redirecionamento dos equivalentes redutores para produtos distintos do hidrogênio molecular. Dessa forma, a análise dos metabólitos produzidos durante a fermentação é amplamente utilizada para interpretação das rotas metabólicas predominantes e para avaliação da estabilidade do processo (FUESS et. al, 2024; RATTI et al., 2015).

Figura 7 – Representação simplificada da fermentação escura e dos principais produtos formados durante a conversão anaeróbia de substratos ricos em carboidratos



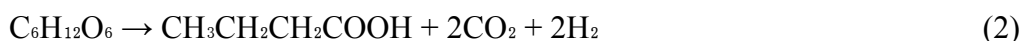
Fonte: Adaptado de HALLENBECK; GHOSH et al., 2009

Entre as diferentes rotas fermentativas, as vias acética (Equação 1) e butírica são consideradas as mais favoráveis à produção de hidrogênio devido ao maior direcionamento dos elétrons liberados durante o metabolismo para a formação desse gás. Na via acética, a conversão da glicose resulta predominantemente na formação de ácido acético, dióxido de carbono e hidrogênio, apresentando rendimento teórico máximo de até 4 mol de H₂ por mol de glicose consumida



A via butírica (Equação 2), por sua vez, produz ácido butírico como principal metabólito e apresenta rendimento teórico inferior, de aproximadamente 2 mol de H₂ por mol de glicose, embora seja frequentemente observada em sistemas fermentativos devido à maior

estabilidade operacional dessa rota metabólica



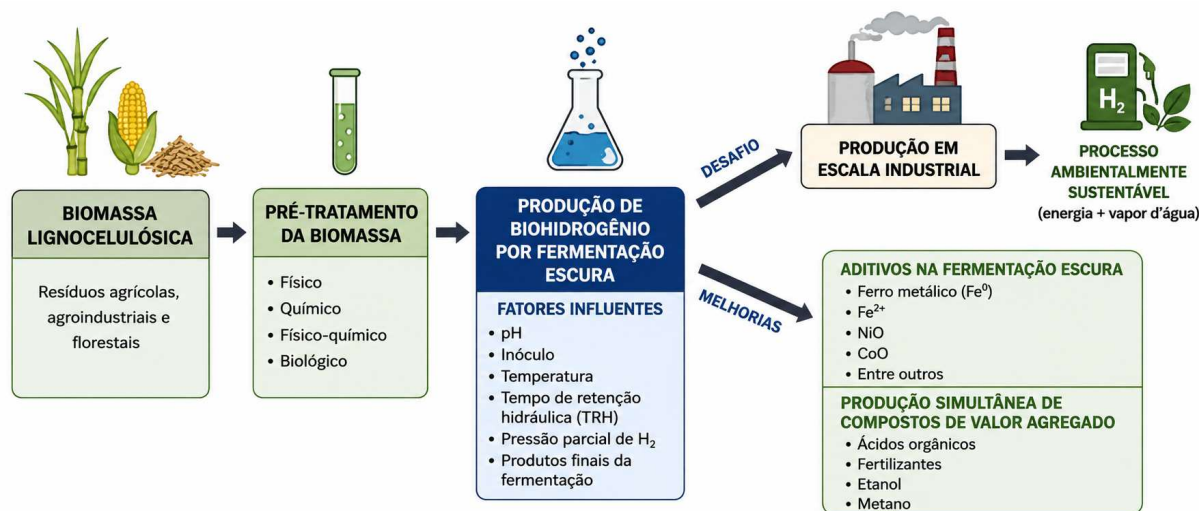
Em estudos envolvendo resíduos lignocelulósicos e substratos derivados da cana-de-açúcar, a predominância das vias acética e butírica tem sido associada aos maiores rendimentos de hidrogênio obtidos experimentalmente (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

Embora as características metabólicas dos microrganismos exerçam influência direta sobre os produtos formados durante a fermentação, a predominância de determinadas rotas bioquímicas também depende das condições de operação do processo. Variáveis como pH, temperatura, tempo de retenção hidráulica, concentração de substrato e composição do meio influenciam o crescimento microbiano, a distribuição dos metabólitos e o rendimento de hidrogênio obtido. Dessa forma, a definição adequada desses parâmetros constitui um dos principais fatores para a maximização da produção fermentativa de hidrogênio e para a estabilidade operacional dos sistemas biológicos (SOARES et al., 2020).

3.7. PRÉ TRATAMENTOS

Embora o bagaço de cana-de-açúcar apresente elevada disponibilidade de carboidratos estruturais e elevado potencial para a produção de biohidrogênio, a conversão direta dessa biomassa em processos fermentativos é limitada pela reduzida acessibilidade dos microrganismos aos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. A associação entre celulose, hemicelulose e lignina resulta em uma estrutura altamente resistente à degradação biológica, dificultando o contato entre enzimas hidrolíticas, reagentes químicos e microrganismos fermentativos com os carboidratos potencialmente convertíveis em hidrogênio. Dessa forma, a quantidade total de açúcares presente na biomassa não corresponde, necessariamente, à fração efetivamente disponível para conversão biológica. Nesse contexto, os pré-tratamentos têm como principal finalidade promover modificações estruturais capazes de aumentar a acessibilidade da holocelulose, reduzir a recalcitrância do material e favorecer as etapas subsequentes de conversão dos carboidratos em produtos de interesse biotecnológico (MOSIER et al., 2005).

Figura 8- Diagrama da produção de biohidrogênio com pré tratamentos realizados



Fonte: Adaptado de SOARES et al. 2020

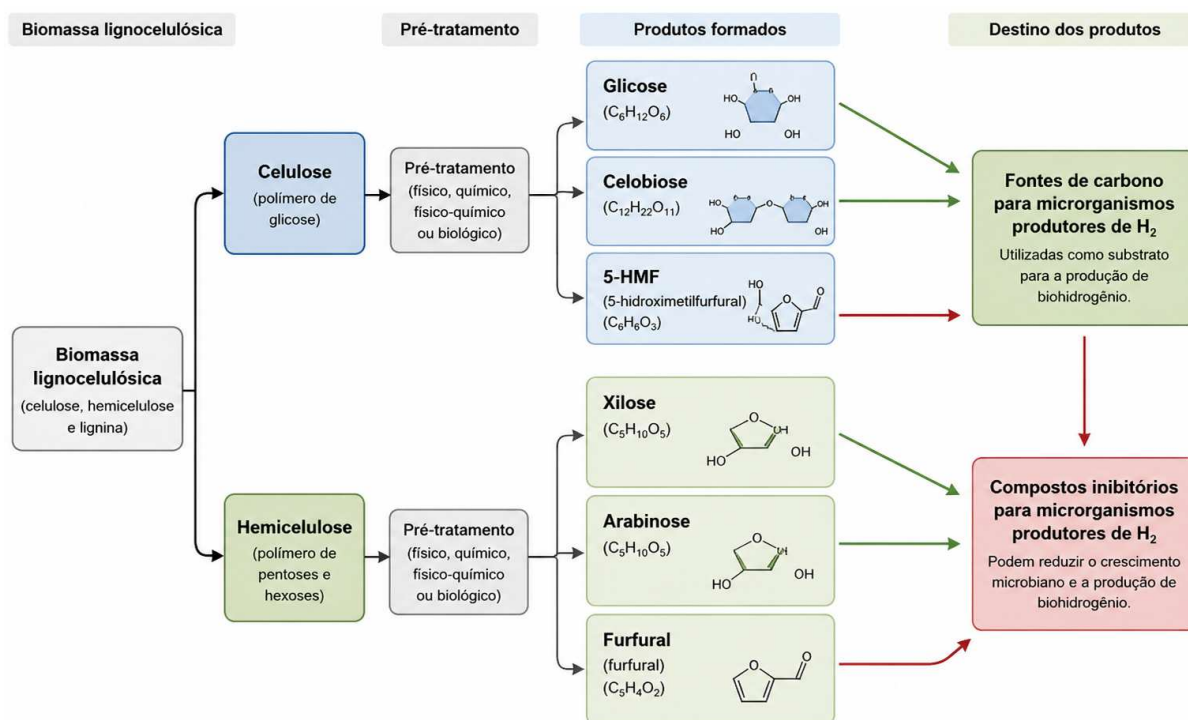
Conforme ilustrado na **Figura 8**, o desempenho global do processo depende não apenas da eficiência do pré-tratamento empregado, mas também das condições operacionais do sistema fermentativo e das estratégias adotadas para maximizar a produção de hidrogênio e minimizar a formação de metabólitos indesejáveis.

Durante o pré-tratamento, diferentes alterações físicas e químicas são promovidas na biomassa lignocelulósica, incluindo a solubilização parcial da hemicelulose, a remoção de frações da lignina e a desorganização das regiões cristalinas da celulose. Essas modificações resultam em aumento da porosidade e da área superficial disponível para a ação microbiana e enzimática, favorecendo a exposição das fibras celulósicas e a liberação de açúcares fermentáveis. Entre os principais produtos obtidos destacam-se a glicose e a celobiose provenientes da celulose, além da xilose e da arabinose derivadas da hemicelulose. Em sistemas destinados à produção de biohidrogênio, a disponibilidade desses monossacarídeos exerce influência direta sobre o desempenho da fermentação escura, uma vez que a glicose apresenta maior velocidade de assimilação pelos microrganismos hidrogenogênicos em comparação às pentoses provenientes da hemicelulose (MOODLEY; KANA, 2019).

Além da disponibilização dos açúcares fermentáveis, os processos de pré-tratamento podem promover reações secundárias de degradação dos carboidratos liberados, especialmente quando empregadas condições severas de temperatura, pressão ou concentração de reagentes químicos. Nessas condições, hexoses provenientes da celulose podem ser convertidas em 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), enquanto pentoses oriundas da hemicelulose podem originar furfural. Embora a glicose, a celobiose, a xilose e a arabinose constituam importantes fontes de

carbono para os microrganismos produtores de hidrogênio, a presença desses compostos de degradação pode comprometer o crescimento celular, reduzir a atividade das hidrogenases e diminuir a eficiência da fermentação escura (MOODLEY; KANA, 2019).

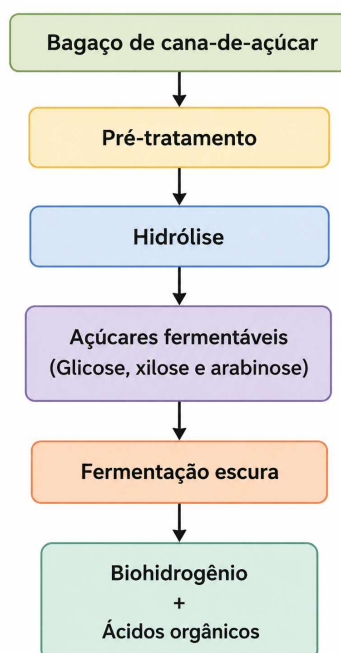
Figura 9 – Produtos desejáveis e compostos inibitórios formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de MOODLEY; KANA et al., 2019

Os métodos de pré-tratamento aplicados à biomassa lignocelulósica diferem quanto ao mecanismo de atuação e às modificações promovidas na estrutura do material. De forma geral, essas tecnologias podem ser agrupadas em métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, cada um apresentando vantagens e limitações específicas em relação à remoção de lignina, recuperação de carboidratos, geração de compostos inibitórios e custo operacional. A seleção do método mais adequado depende das características da biomassa, da aplicação pretendida e das exigências do processo biotecnológico subsequente (KUMAR, et al. 2015).

Figura 10 – Etapas envolvidas na produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar por fermentação escura



Fonte: Elaborado por Pedro Vianna Nunes et al., 2026.

Conforme ilustrado na **Figura 10**, a produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar envolve uma sequência integrada de etapas, compreendendo o pré-tratamento da biomassa, a hidrólise dos polissacarídeos estruturais e a conversão dos açúcares liberados por meio da fermentação escura. Nesse contexto, o pré-tratamento assume papel estratégico no processo, uma vez que determina a disponibilidade dos carboidratos fermentáveis para os microrganismos hidrogenogênicos e influencia diretamente o desempenho das etapas subsequentes. Em razão disso, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de maximizar a recuperação de açúcares e minimizar a formação de compostos inibitórios, sendo tradicionalmente classificadas em métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos

3.7.1 PRÉ TRATAMENTO FÍSICO

Os pré-tratamentos físicos correspondem a técnicas que promovem alterações estruturais na biomassa lignocelulósica por meio da aplicação de energia mecânica, térmica ou eletromagnética, sem a utilização direta de reagentes químicos. De modo geral, esses processos atuam na redução do tamanho das partículas, no aumento da área superficial específica e na modificação da organização física das fibras vegetais, favorecendo a transferência de massa e a acessibilidade dos agentes hidrolíticos aos polissacarídeos estruturais presentes na biomassa.

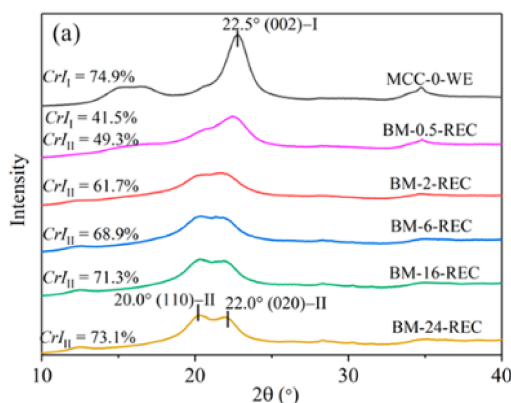
Em comparação aos demais métodos de pré-tratamento, os processos físicos apresentam menor geração de compostos inibitórios e reduzido impacto ambiental, características que tornam sua aplicação atrativa em diferentes rotas de conversão de biomassa lignocelulósica (GALLEGO-GARCÍA et al., 2023).

Apesar das modificações estruturais promovidas, os pré-tratamentos físicos apresentam capacidade limitada de remoção da lignina e de solubilização da hemicelulose, não sendo suficientes, na maioria dos casos, para disponibilizar os carboidratos estruturais em concentrações adequadas para processos fermentativos. Em razão disso, essas tecnologias são frequentemente empregadas como etapas preliminares aos pré-tratamentos químicos e físico-químicos, potencializando a eficiência dos processos subsequentes de deslignificação e hidrólise da biomassa. No caso da produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar, a combinação entre redução granulométrica e métodos de maior capacidade de desestruturação da matriz lignocelulósica tem sido amplamente utilizada para aumentar a recuperação de açúcares fermentáveis e melhorar os rendimentos de hidrogênio obtidos experimentalmente (GALLEGO-GARCÍA et al., 2023; RATTI et al., 2015).

Entre os métodos físicos, a moagem constitui a tecnologia mais amplamente empregada no processamento de biomassas lignocelulósicas, atuando principalmente na redução granulométrica do material e na modificação de propriedades estruturais diretamente relacionadas à eficiência da hidrólise e da fermentação. A diminuição do tamanho das partículas promove aumento da área superficial específica e da porosidade da biomassa, favorecendo o contato entre os polissacarídeos estruturais e os agentes hidrolíticos (PÉREZ-MERCHÁN et al., 2022)

Além disso, processos de moagem mais intensos podem promover alterações no grau de cristalinidade da celulose e na organização das microfibrilas celulósicas, aumentando a acessibilidade dos carboidratos estruturais e facilitando sua conversão em açúcares fermentáveis. Entretanto, a elevada demanda energética associada à obtenção de partículas muito finas e a limitada capacidade de remoção da lignina fazem com que a moagem seja frequentemente utilizada como etapa preliminar aos tratamentos químicos e físico-químicos, potencializando a eficiência das etapas subsequentes de deslignificação e hidrólise da biomassa (YAO et al., 2022).

Figura 11 - Efeitos da moagem



Fonte: YAO et al., 2022

Os efeitos da moagem sobre a organização estrutural da celulose podem ser observados por meio das análises de difração de raios X apresentadas na **Figura 11**. Verifica-se redução progressiva da intensidade dos picos cristalinos característicos da celulose com o aumento do tempo de moagem, refletida pela diminuição do índice de cristalinidade (CrI) do material. Amostras submetidas à moagem de alta energia apresentaram redução do CrI de aproximadamente 75% para valores próximos a 41%, indicando aumento significativo da fração amorfa da biomassa. Essa desorganização estrutural favorece a penetração de reagentes e enzimas nas microfibrilas celulósicas e contribui para o aumento da susceptibilidade da biomassa aos processos subsequentes de hidrólise e fermentação (MATTONAI et al., 2018).

No caso específico do bagaço de cana-de-açúcar, a moagem promove a fragmentação das fibras vegetais e a ruptura parcial dos feixes fibrosos que compõem a estrutura da biomassa, reduzindo a compactação característica do material e aumentando a exposição das superfícies celulósicas. Além da redução granulométrica, estudos de difração de raios X demonstram que processos de moagem de alta energia podem promover alterações na organização cristalina da celulose presente no bagaço, resultando em aumento da fração amorfa e maior susceptibilidade aos processos de hidrólise subsequentes. Essa modificação estrutural favorece a penetração de reagentes químicos e enzimas no interior das fibras e contribui para o aumento da recuperação de açúcares fermentáveis durante as etapas posteriores do processo. Entretanto, devido à limitada capacidade de remoção da lignina e de solubilização da hemicelulose, a moagem é frequentemente utilizada como etapa preparatória aos pré-tratamentos alcalinos, ácidos e físico-químicos aplicados ao bagaço de cana destinado à produção de biocombustíveis e biohidrogênio (DA SILVA et al., 2010; CHEN et al., 2021).

O ultrassom também tem recebido atenção devido à sua capacidade de promover alterações estruturais na biomassa por meio do fenômeno de cavitação acústica. Durante o

processo, a propagação das ondas ultrassônicas no meio líquido resulta na formação, crescimento e colapso de microbolhas, gerando microjatos, elevadas pressões localizadas e gradientes instantâneos de temperatura capazes de provocar alterações na superfície das fibras vegetais. No bagaço de cana-de-açúcar, esses efeitos favorecem a desagregação parcial da matriz lignocelulósica, aumentam a porosidade do material e facilitam a penetração de reagentes químicos e enzimas no interior das fibras. Em razão disso, o ultrassom é frequentemente empregado em associação com tratamentos alcalinos ou ácidos, potencializando os processos de deslignificação e aumentando a recuperação de açúcares fermentáveis destinados à produção de biohidrogênio (GALLEGO-GARCÍA et al., 2023).

3.7.2 PRÉ TRATAMENTO QUÍMICOS

Os pré-tratamentos químicos empregam ácidos, bases, agentes oxidantes ou solventes para modificar seletivamente os constituintes da matriz lignocelulósica. Nos tratamentos ácidos, a hidrólise das ligações presentes na hemicelulose promove sua solubilização e a liberação predominante de pentoses, enquanto a fração celulósica permanece concentrada no sólido residual. Nos tratamentos alcalinos, ocorre a ruptura de ligações éster entre lignina e carboidratos, acompanhada do intumescimento das fibras e da remoção parcial da lignina. Esses mecanismos produzem hidrolisados com composições distintas e, por isso, interferem de maneira diferente na etapa de fermentação escura do bagaço de cana-de-açúcar. A escolha do reagente e das condições de operação deve considerar a recuperação dos carboidratos, a perda de matéria orgânica e a formação de compostos que possam inibir a atividade microbiana (NISSILÄ; LAY; PUHAKKA, 2014).

Tabela 6 – Comparação entre os principais pré tratamentos químicos aplicados ao bagaço de cana

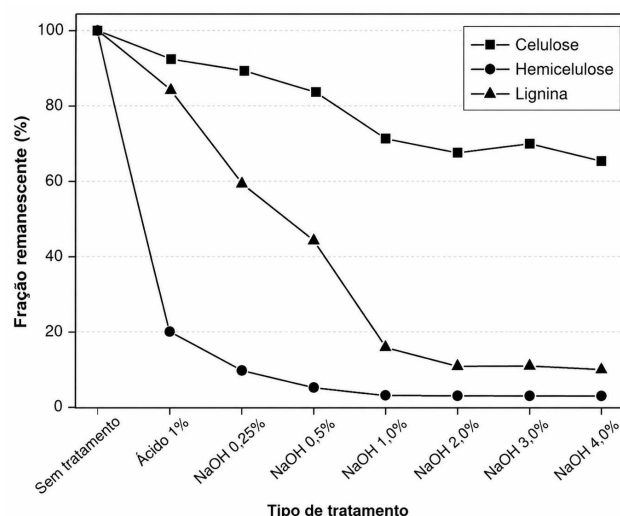
Método	Principal componente afetado	Principais produtos obtidos	Formação de inibidores	Aplicação em biohidrogênio
Ácido diluído	Hemicelulose	Pentoses (xilose e arabinose)	Elevada	Moderada
Alcalino	Lignina	Fração sólida enriquecida em celulose	Baixa	Elevada
Explosão a vapor	Hemicelulose e Lignina	Mistura de açúcares e oligossacarídeos	Moderada	Elevada
Organossolve	Lignina	Celulose	Baixa	Limitada pelo custo

Fonte: Adaptado de Karp et al., 2013, Rocha et al., 2012, Nath et al. 2021 e Johannes et al., 2024

Nesse contexto, tratamentos alcalinos e processos combinados envolvendo explosão a vapor seguida de deslignificação alcalina apresentam resultados superiores aos tratamentos exclusivamente ácidos para o bagaço de cana-de-açúcar, principalmente em função da maior remoção de lignina e da menor formação de compostos furânicos no hidrolisado (ROCHA et al., 2012; Rashid et al., 2020; Johannes et al., 2024).

Os pré-tratamentos alcalinos atuam predominantemente sobre a fração lignínica da biomassa, diferentemente dos tratamentos ácidos, que apresentam maior afinidade pela hemicelulose. Em soluções alcalinas, ocorre a ruptura de ligações éster e éter responsáveis pela associação entre lignina e carboidratos estruturais, promovendo a solubilização parcial da lignina e o intumescimento das fibras vegetais. No bagaço de cana-de-açúcar, essas modificações resultam em alterações significativas na organização da parede celular, aumentando a exposição da celulose e favorecendo as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação. Em razão da elevada eficiência na deslignificação e da reduzida formação de compostos furânicos, os tratamentos alcalinos ocupam posição de destaque entre os métodos empregados na produção de biohidrogênio a partir de resíduos lignocelulósicos (REZENDE et al., 2011).

Figura 12 – Frações restantes de componentes lignocelulósicos em amostras de bagaço após etapas de pré-tratamento.



Fonte: Adaptado de REZENDE et al., 2011

A **Figura 12** evidencia as diferenças no comportamento dos principais componentes estruturais do bagaço de cana frente aos tratamentos químicos empregados. Enquanto o tratamento com ácido diluído promove elevada remoção da hemicelulose, preservando grande parte da lignina presente na biomassa, o aumento da concentração de hidróxido de sódio resulta em remoção progressiva da fração lignínica, com manutenção de parcela significativa da celulose no sólido residual. Em concentrações próximas de 2 a 4% de NaOH, observa-se redução da lignina para valores inferiores a 15% da fração inicial, enquanto aproximadamente dois terços da celulose permanecem disponíveis para as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação (REZENDE et al., 2011).

Em contrapartida, o pré tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, a fração hemicelulósica é a primeira a sofrer modificações significativas devido à sua menor estabilidade química quando comparada à celulose. Durante o processo, ocorre a ruptura das ligações que unem os polímeros de xilana presentes na hemicelulose, promovendo a transferência dessa fração para a fase líquida e resultando na formação de um hidrolisado rico em xilose e arabinose. Como consequência, a fração sólida remanescente apresenta aumento relativo do teor de celulose e redução da proteção exercida pela hemicelulose sobre as microfibrilas celulósicas. Em bagaço de cana submetido à hidrólise com ácido sulfúrico diluído, diversos estudos reportam remoções superiores a 80% da hemicelulose, acompanhadas pelo aumento da digestibilidade enzimática da fração sólida residual (ROCHA et al., 2012; CANILHA et al., 2012; SOCCOL et al., 2017).

3.7.3 PRÉ TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO

Os pré-tratamentos físico-químicos utilizam simultaneamente temperatura elevada, pressão e agentes químicos ou fluidos pressurizados para promover alterações na estrutura da biomassa lignocelulósica. Nessas condições, ocorre maior penetração dos fluidos no interior das fibras vegetais, favorecendo a transferência de massa e intensificando os fenômenos de hidrólise e solubilização dos componentes estruturais da parede celular. Entre os principais processos empregados destacam-se a explosão a vapor (*steam explosion*), o tratamento com água quente líquida (*liquid hot water*) e a expansão da fibra assistida por amônia (*ammonia fiber expansion* – *AFEX*). No processamento do bagaço de cana-de-açúcar, esses métodos apresentam a vantagem de reduzir o consumo de reagentes químicos quando comparados aos tratamentos exclusivamente ácidos ou alcalinos, mantendo elevadas eficiências de fracionamento da biomassa (MOODLEY; KANA, 2019).

Tabela 7- Pré tratamentos físicos químicos

Método	Agente	Temperatura crítica	Pressão	Principal efeito
Explosão a vapor	Vapor d' água	160-240°C	Elevada	Solubilização parcial da hemicelulose
Água quente líquida	Água	160-230°C	Elevada	Hidrólise parcial da hemicelulose
AFEX	NH ₃	70-100°C	Moderada	Modificação da lignina

Fonte: Adaptado de Hendriks e Zeeman (2009) e Moodley e Kana (2019).

Os métodos físico-químicos diferenciam-se principalmente pela intensidade das condições operacionais empregadas e pela composição do hidrolisado obtido após o tratamento da biomassa. Conforme apresentado na **Tabela 7**, a explosão a vapor apresenta elevada capacidade de solubilização dos carboidratos estruturais, sendo frequentemente associada a maiores recuperações de açúcares fermentáveis. Entretanto, as elevadas temperaturas e a rápida depressurização favorecem a formação de compostos como furfural, 5-hidroximetilfurfural e derivados fenólicos, capazes de inibir a atividade microbiana durante a fermentação escura. Em contraste, os processos utilizando água quente líquida e água subcrítica tendem a gerar menores concentrações desses compostos, embora geralmente resultem em menores taxas de solubilização da biomassa (MOODLEY; KANA, 2019).

Dessa forma, parte das transformações químicas necessárias ao fracionamento da biomassa ocorre sem a necessidade da adição de catalisadores externos, constituindo uma das principais características desse processo.

Apesar das vantagens operacionais associadas à ausência de reagentes químicos adicionais, a aplicação de temperaturas elevadas durante a explosão a vapor pode favorecer reações secundárias de degradação dos carboidratos liberados durante o processo. Pentoses oriundas da hemicelulose podem ser convertidas em furfural, enquanto hexoses provenientes da celulose podem originar 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Além dos compostos furânicos, também podem ser formados ácido acético, ácido fórmico e derivados fenólicos provenientes da fragmentação parcial da lignina. A presença dessas substâncias no hidrolisado pode comprometer etapas subsequentes de hidrólise enzimática e reduzir a atividade metabólica dos microrganismos envolvidos na fermentação escura. Dessa forma, a definição das condições operacionais da explosão a vapor envolve um compromisso entre a eficiência do fracionamento da biomassa e a minimização da formação de compostos inibitórios (CARA et al., 2007).

O pré-tratamento com água quente líquida (*Liquid Hot Water – LHW*) utiliza água mantida no estado líquido sob elevadas temperaturas e pressões para promover a solubilização parcial da hemicelulose e a redistribuição de componentes estruturais da biomassa, sem a necessidade da adição de reagentes químicos externos. Em comparação à explosão a vapor, esse processo apresenta menor formação de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, produzindo hidrolisados mais adequados para etapas subsequentes de fermentação. Embora a explosão a vapor possa resultar em maiores recuperações de açúcares, o tratamento com água quente líquida frequentemente apresenta maiores rendimentos de hidrólise enzimática devido à menor presença de compostos inibitórios no meio reacional, característica particularmente importante em processos biológicos destinados à produção de biohidrogênio (CARA et al., 2007).

3.7.4 PRÉ TRATAMENTO BIOLÓGICO

Os pré-tratamentos biológicos baseiam-se na utilização de fungos ligninolíticos, principalmente fungos de podridão branca (*white-rot fungi*), capazes de produzir enzimas extracelulares como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, responsáveis pela degradação seletiva de compostos aromáticos presentes na lignina. Entre os microrganismos mais estudados destacam-se espécies dos gêneros *Phanerochaete*, *Pleurotus* e *Trametes*, frequentemente empregados em biomassas lignocelulósicas devido à elevada seletividade enzimática e à reduzida formação de compostos inibitórios durante o processamento. Apesar

dessas vantagens, os longos tempos de residência, que podem variar de semanas a meses, constituem a principal limitação para sua aplicação industrial, restringindo seu uso principalmente a processos combinados com outras tecnologias de pré-tratamento (WAN; LI, 2012).

3.7.5 COMPARAÇÃO DOS PRÉ TRATAMENTOS

No caso do bagaço de cana-de-açúcar destinado à produção de biohidrogênio, diversos estudos têm reportado resultados favoráveis para estratégias que combinam diferentes técnicas de pré-tratamento, explorando as vantagens específicas de cada método e minimizando suas limitações individuais. Associações envolvendo tratamentos físicos e alcalinos, explosão a vapor seguida de deslignificação alcalina ou etapas sequenciais de hidrólise ácida e tratamento alcalino têm apresentado maiores rendimentos de sacarificação e maior disponibilidade de carboidratos para os processos fermentativos subsequentes.

3.8. PARÂMETROS OPERACIONAIS

A produção de biohidrogênio por fermentação escura é influenciada por diferentes variáveis operacionais que afetam diretamente a atividade metabólica dos microrganismos e, conseqüentemente, a eficiência do processo. Além das características do substrato e da eficiência do pré-tratamento, fatores como pH, temperatura, tipo de inóculo, tempo de retenção hidráulica exercem influência sobre o crescimento microbiano, a atividade das hidrogenases e a distribuição das rotas metabólicas responsáveis pela formação de hidrogênio. Dessa forma, a otimização dessas condições constitui uma das principais estratégias para aumentar o rendimento e a produtividade do processo fermentativo (SHOW et al., 2011; HALLENBECK; GHOSH, 2009; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

As alterações nos parâmetros operacionais podem modificar significativamente o desempenho da fermentação escura, favorecendo ou limitando determinadas vias metabólicas. Condições inadequadas podem estimular a formação de metabólitos como propionato, lactato e etanol, reduzindo a disponibilidade de elétrons destinados à produção de hidrogênio. Por essa razão, o controle dessas variáveis é considerado indispensável tanto em estudos laboratoriais quanto no desenvolvimento de processos em escala piloto e industrial, sendo amplamente investigado para maximizar a conversão de biomassa lignocelulósica em biohidrogênio (LEVIN; PITT; LOVE, 2004; HAWKES et al., 2007; WANG; WAN, 2009).

3.8.1. PH

O pH é considerado um dos principais parâmetros operacionais na produção de biohidrogênio por fermentação escura, uma vez que influencia diretamente o crescimento dos microrganismos, a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo fermentativo e a distribuição dos produtos gerados durante o processo. Variações nesse parâmetro podem alterar o fluxo metabólico das bactérias produtoras de hidrogênio, favorecendo ou restringindo determinadas vias fermentativas. Em condições inadequadas de pH, observa-se redução da atividade das hidrogenases, diminuição da conversão dos açúcares fermentáveis e maior formação de metabólitos que competem pelo poder redutor disponível, comprometendo o rendimento de hidrogênio (HAWKES et al., 2007; HALLENBECK; GHOSH, 2009; WANG; WAN, 2009).

De modo geral, a maior produção de biohidrogênio ocorre em condições levemente ácidas, normalmente na faixa de pH entre 5,0 e 6,5, embora o valor ótimo dependa do substrato utilizado, do tipo de inóculo e das condições operacionais do reator. Valores inferiores a essa faixa tendem a inibir o crescimento microbiano e reduzir a atividade enzimática, enquanto valores mais elevados favorecem o desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio, como arqueias metanogênicas, diminuindo a produção do gás (SHOW et al., 2011; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

3.8.2. TEMPERATURA

A temperatura exerce influência direta sobre a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela fermentação escura, afetando a velocidade de crescimento celular, a atividade das enzimas envolvidas na produção de hidrogênio e a conversão dos carboidratos presentes no substrato. Em função da faixa térmica de operação, os microrganismos podem ser classificados como mesófilos (25–40 °C), termófilos (40–65 °C) e hipertermófilos (acima de 80 °C), sendo que cada grupo apresenta características fisiológicas distintas que condicionam seu desempenho durante o processo fermentativo. Dessa forma, a definição da temperatura de operação deve considerar simultaneamente o tipo de microrganismo, o substrato empregado e as condições do sistema reacional (DINAMARCA; BAKKE, 2011; RANI et al., 2024).

O aumento da temperatura pode favorecer a hidrólise dos compostos orgânicos e intensificar a atividade das hidrogenases, refletindo em maiores taxas de conversão do substrato. Entretanto, esse comportamento não ocorre de maneira uniforme para todos os materiais lignocelulósicos e comunidades microbianas, uma vez que a resposta do processo

depende das características do substrato e da adaptação do inóculo às condições térmicas empregadas. Além disso, temperaturas mais elevadas aumentam a demanda energética do sistema, aspecto que deve ser considerado na avaliação da viabilidade operacional do processo. (SATTAR et al., 2016; KUMAR et al., 2015; RANI et al., 2024).

No caso do bagaço de cana-de-açúcar, resultados satisfatórios têm sido obtidos tanto em condições mesofílicas quanto termofílicas. Ensaios conduzidos a 37 °C utilizando *Bacillus subtilis* apresentaram elevada produção volumétrica de hidrogênio, enquanto processos realizados a 55 °C com *Thermoanaerobacterium aotearoense* também alcançaram elevados rendimentos.

3.8.3. TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICA

O tempo de retenção hidráulica (HRT) corresponde ao período médio em que o substrato permanece no interior do reator, constituindo um parâmetro de elevada relevância para o desempenho da fermentação escura. Essa variável influencia o tempo disponível para a hidrólise da biomassa, o consumo dos açúcares fermentáveis, a atividade metabólica dos microrganismos e a formação dos produtos finais da fermentação. Em sistemas contínuos e semicontínuos, a definição adequada do HRT é essencial para manter o equilíbrio entre a conversão do substrato e a permanência da biomassa ativa no reator (WANG; WAN, 2009; RANI et al., 2024).

A redução do tempo de retenção hidráulica pode favorecer o crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio, uma vez que esses microrganismos apresentam maior velocidade de crescimento em comparação com arqueias metanogênicas, responsáveis pelo consumo de hidrogênio. Entretanto, valores excessivamente baixos podem reduzir o tempo disponível para a degradação da matéria orgânica, comprometendo a conversão do substrato e o rendimento do processo. Por outro lado, tempos de retenção muito elevados favorecem o estabelecimento de microrganismos consumidores de hidrogênio, reduzindo a produtividade do sistema fermentativo (HAWKES et al., 2007; LEVIN; PITT; LOVE, 2004; RANI et al., 2024).

4. ESTUDO DE CASO

4.1. RESUMO

O estudo de caso selecionado para este trabalho foi desenvolvido por Hu (2018) e Rani (2024), com o objetivo de avaliar a produção de biohidrogênio a partir do pó de bagaço de cana-de-açúcar por meio da fermentação escura. Os autores investigaram o efeito da aplicação de um pré-tratamento combinado utilizando solução alcalina e ultrassom sobre a estrutura da biomassa lignocelulósica, buscando aumentar a disponibilidade dos carboidratos fermentáveis e, consequentemente, a eficiência da produção de hidrogênio. Além da quantificação do biohidrogênio produzido, o estudo contemplou a caracterização estrutural do bagaço, o monitoramento do pH durante a fermentação, a determinação dos ácidos graxos voláteis (AGVs) e a avaliação do potencial de recuperação energética por meio da integração da fermentação escura com uma célula eletrolítica microbiana (MEC).

A escolha deste estudo de caso fundamenta-se na abrangência das etapas investigadas, as quais contemplam os principais aspectos discutidos ao longo desta revisão bibliográfica. Dessa forma, torna-se possível correlacionar os efeitos do pré-tratamento, da composição da biomassa, das condições operacionais e da formação de metabólitos com o desempenho da produção de biohidrogênio, permitindo uma análise integrada do processo.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de biohidrogênio por fermentação escura. Inicialmente, foi realizada a caracterização da biomassa, sendo determinada sua composição química quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. Posteriormente, o material foi submetido a um pré-tratamento combinado utilizando solução alcalina e ultrassom, com o objetivo de promover alterações estruturais capazes de aumentar a acessibilidade dos carboidratos presentes na parede celular.

Após o pré-tratamento, foram conduzidos ensaios de fermentação escura utilizando *Enterobacter aerogenes* como microrganismo produtor de hidrogênio. Durante o processo fermentativo foram monitorados o volume de biohidrogênio produzido, a variação do pH do meio e a formação dos ácidos graxos voláteis. Para verificar as alterações estruturais provocadas pelo pré-tratamento, foram empregadas análises de Difração de Raios X (DRX) e

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), enquanto a quantificação dos AGVs foi realizada por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID).

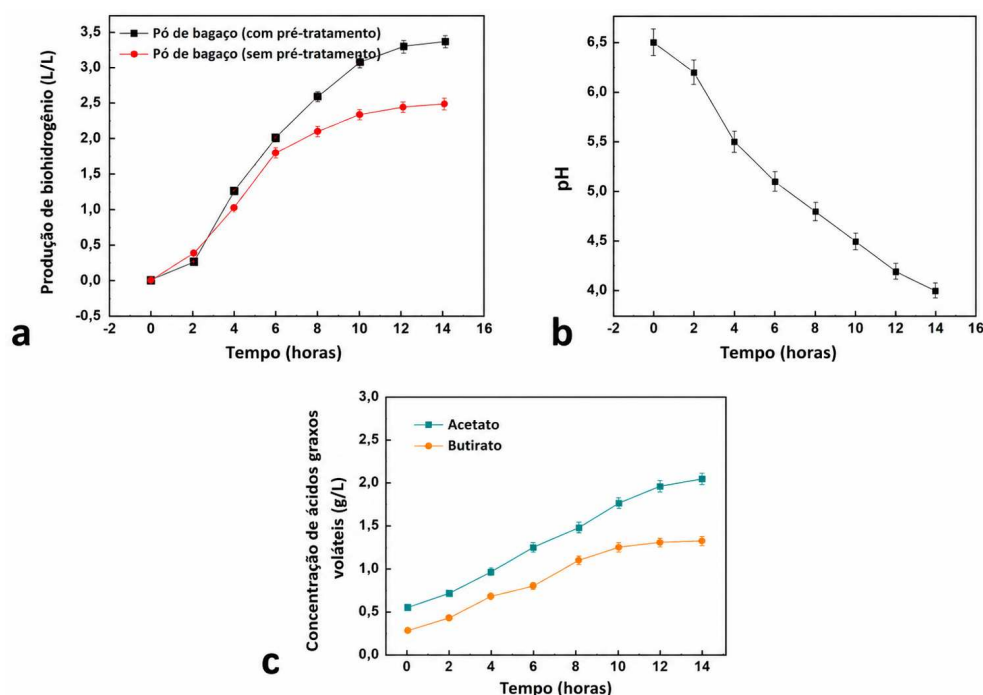
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizada a caracterização química do pó de bagaço de cana-de-açúcar utilizado como substrato na fermentação escura. Os resultados demonstraram que a biomassa era composta por aproximadamente 40% de celulose, 33,5% de hemicelulose e 17% de lignina, evidenciando seu elevado potencial como matéria-prima para a produção de biohidrogênio. Entretanto, a presença da lignina e da hemicelulose limita o acesso dos microrganismos à fração celulósica, tornando necessária a aplicação de um pré-tratamento capaz de modificar a estrutura lignocelulósica e aumentar a disponibilidade dos carboidratos fermentáveis.

Com o objetivo de promover essas modificações estruturais, os autores aplicaram um pré-tratamento combinado utilizando solução alcalina e ultrassom. As análises por Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) evidenciaram redução parcial da lignina e da hemicelulose, bem como maior exposição das fibras de celulose. Essas alterações favoreceram o aumento da acessibilidade da biomassa aos microrganismos fermentativos, contribuindo para uma conversão mais eficiente dos açúcares disponíveis durante a fermentação.

Os resultados da fermentação escura demonstraram que a biomassa submetida ao pré-tratamento apresentou desempenho superior quando comparada ao bagaço sem tratamento. Observou-se um incremento aproximado de 35% na produção de biohidrogênio, alcançando produção máxima de 3,40 L H₂/L de meio fermentativo. Esse comportamento indica que o aumento da disponibilidade dos carboidratos fermentáveis proporcionou maior atividade metabólica dos microrganismos, favorecendo a produção de hidrogênio durante aproximadamente 12 a 14 horas de operação.

Figura 13 - Resultados da fermentação escura utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: SOARES et al., 2020

A **Figura 13** apresenta os principais resultados obtidos durante a fermentação escura utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Na **Figura 13 (a)**, observa-se a produção acumulada de biohidrogênio para o bagaço com e sem pré-tratamento, evidenciando o melhor desempenho da biomassa pré-tratada. A **Figura 13 (b)** mostra a redução gradual do pH do meio fermentativo ao longo do processo, decorrente da formação de metabólitos ácidos. Por sua vez, a **Figura 13 (c)** apresenta a evolução da concentração dos ácidos graxos voláteis (AGVs), representados pelo acetato e pelo butirato, durante a fermentação da biomassa pré-tratada.

Durante a fermentação também foi monitorada a variação do pH do meio reacional e a formação de ácidos graxos voláteis (AGVs). Verificou-se redução progressiva do pH em decorrência do acúmulo desses metabólitos, sendo o acetato o ácido predominante ao longo do processo. A predominância dessa rota metabólica favorece elevados rendimentos teóricos de produção de hidrogênio; entretanto, o aumento contínuo da concentração de AGVs reduziu o pH para valores inferiores a 4,5, promovendo a inibição da atividade das hidrogenases e interrompendo a produção de biohidrogênio, mesmo na presença de açúcares residuais.

Considerando que parte significativa da energia permaneceu armazenada nos ácidos graxos voláteis presentes no efluente fermentado, os autores avaliaram a utilização de uma célula eletrolítica microbiana (MEC) como etapa complementar do processo. A integração

entre a fermentação escura e a MEC permitiu elevar a recuperação energética de 12,4% para aproximadamente 21%, demonstrando que o aproveitamento dos metabólitos gerados durante a fermentação representa uma estratégia promissora para aumentar a eficiência global do processo. Esses resultados reforçam o potencial da integração de diferentes tecnologias para o aproveitamento integral do bagaço de cana-de-açúcar em sistemas de biorrefinaria voltados à produção sustentável de biohidrogênio.

4.4. CONCLUSÃO DO ESTUDO DE CASO

A análise do estudo de caso evidenciou que o bagaço de cana-de-açúcar apresenta elevado potencial para a produção de biohidrogênio por fermentação escura, desde que submetido a estratégias capazes de aumentar a disponibilidade dos carboidratos estruturais. A aplicação do pré-tratamento alcalino associado ao ultrassom promoveu alterações significativas na estrutura lignocelulósica da biomassa, reduzindo parcialmente a lignina e a hemicelulose e favorecendo a exposição da celulose, o que resultou em maior eficiência na conversão do substrato e em um incremento de aproximadamente 35% na produção de biohidrogênio.

Os resultados também demonstraram que o desempenho da fermentação está diretamente relacionado às condições operacionais do processo, principalmente ao controle do pH e ao acúmulo de ácidos graxos voláteis. Embora a predominância da rota de formação de acetato esteja associada a elevados rendimentos teóricos de hidrogênio, a elevada concentração desses metabólitos promoveu a redução do pH para valores inibitórios, ocasionando a interrupção da atividade das hidrogenases e, conseqüentemente, da produção de biohidrogênio.

Além disso, a integração da fermentação escura com a célula eletrolítica microbiana mostrou-se uma alternativa promissora para o aproveitamento energético dos metabólitos remanescentes, elevando a recuperação global de energia do sistema. Esse resultado demonstra que a associação de diferentes tecnologias pode contribuir para o aproveitamento mais eficiente da biomassa lignocelulósica, reduzindo perdas energéticas e ampliando o potencial de aplicação do processo em escala industrial.

Dessa forma, o estudo de caso corrobora os conceitos discutidos ao longo desta revisão bibliográfica, evidenciando a importância da seleção adequada do pré-tratamento, do controle dos parâmetros operacionais e da integração de processos para maximizar a produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos reforçam o potencial dessa biomassa como matéria-prima renovável para a geração de biocombustíveis e destacam a fermentação escura como uma tecnologia promissora para a valorização de resíduos

agroindustriais.

5. CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO

A produção de biohidrogênio por fermentação escura utilizando bagaço de cana-de-açúcar apresenta elevado potencial como alternativa sustentável para a geração de energia renovável, contribuindo para a redução da dependência de combustíveis fósseis e para o avanço da transição energética. A ampla disponibilidade desse resíduo agroindustrial no Brasil, aliada ao seu elevado teor de celulose e hemicelulose, reforça sua relevância como matéria-prima para processos biotecnológicos voltados à produção de biocombustíveis.

Entretanto, a elevada recalcitrância da biomassa lignocelulósica, decorrente da presença da lignina, constitui uma das principais limitações para sua conversão biológica, tornando indispensável a aplicação de pré-tratamentos capazes de aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis. Entre as tecnologias avaliadas, os pré-tratamentos alcalinos e físico-químicos, especialmente aqueles associados ao ultrassom, apresentaram melhor desempenho na remoção parcial da lignina, na desorganização da estrutura da biomassa e no aumento da acessibilidade da celulose e da hemicelulose, favorecendo o rendimento da produção de biohidrogênio.

Também foi verificado que o desempenho da fermentação escura depende não apenas da eficiência do pré-tratamento, mas também do controle adequado das condições operacionais. Parâmetros como potencial hidrogeniônico, temperatura, tempo de retenção hidráulica e fonte de inóculo exercem influência direta sobre a atividade microbiana e sobre as rotas metabólicas envolvidas na produção de hidrogênio. Além disso, a formação de compostos inibitórios, como furfural e 5-hidroximetilfurfural, deve ser minimizada, uma vez que esses subprodutos comprometem a atividade dos microrganismos fermentativos e reduzem a eficiência do processo.

A análise do estudo de caso corroborou as informações levantadas na revisão bibliográfica, demonstrando que a combinação entre pré-tratamento alcalino e ultrassom promove modificações estruturais na biomassa e resulta em aumento significativo da produção de biohidrogênio, evidenciando a importância da integração entre estratégias de pré-tratamento e condições operacionais adequadas.

Por fim, conclui-se que a produção de biohidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar representa uma alternativa tecnicamente promissora para o aproveitamento sustentável de resíduos agroindustriais.

6. REFERÊNCIAS

- [1] AGYEKUM, E. B. *et al.* Advances in biological hydrogen production technologies: A review of dark fermentation, photofermentation and integrated systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 49, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319924044215>. Acesso em: 14 maio. 2025.
- [2] ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. *Renewable Energy Focus*, v. 28, p. 127–139, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1755008418303011>. Acesso em: 12 jul. 2026.
- [3] AKRAM, F. *et al.* Biohydrogen: Production, promising progressions and challenges. *Environmental Technology & Innovation*, v. 35, 2024. Disponível em: [Biohidrogênio: Produção, progressos promissores e desafios de uma energia verde livre de carbono - ScienceDirect](#). Acesso em: 15 jun. 2026.
- [4] CARVALHO, N. B.; VIANA, D. B.; ARAÚJO, M. S. M.; LAMPREIA, J.; GOMES, P.; FREITAS, M. A. V. How likely is Brazil to achieve its NDC commitments in the energy sector? A review on Brazilian low-carbon energy perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 133, art. 110343, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032120306316>. Acesso em: 19 jul. 2026.
- [5] 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, art. 989572, 2012.
- [6] CHANDRA, S.; PANDIT, S.; KUMAR, M.; SHUKLA, S. K.; BANERJEE, S. Boosting biohydrogen production from pretreated sugarcane bagasse dust via coupled dark fermentation and microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, v. 448, art. 134288, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2026.134288>. Acesso em: 19 jul. 2026.
- [7] DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319908009337>. Acesso em: 19 jul. 2026.

- [8] FUESS, L. T. Fermentative biohydrogen production in sugarcane biorefineries: Advances, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 49, p. 532–553, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319923042298>. Acesso em: 19 jul. 2026.
- [9] GALLEGO-GARCÍA, P. *et al.* Physical pretreatments of lignocellulosic biomass: fundamentals, advances and future perspectives. *Bioresource Technology*, 2023. Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852422017308>. Acesso em 08 jun. 2026.
- [10] HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779909000328>. Acesso em: 30 maio. 2026.
- [11] HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, n. 12, p. 172–184, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902000903>. Acesso em: 29 jun. 2026.
- [12] HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408005348>. Acesso em: 19 jul. 2026.
- [13] HOWARD, D. B.; SORIA, R.; THÉ, J.; SCHAEFFER, R.; SAPHORES, J.-D. The energy-climate-health nexus in energy planning: A case study in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 132, art. 110016, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032120303075>. Acesso em: 1 jul. 2026.
- [14] INTERNATIONAL RENEWABLE ENERGY AGENCY (IRENA). *Innovation outlook: Renewable hydrogen*. Abu Dhabi: IRENA, 2023. Disponível em: <https://www.irena.org/>. Acesso em: 15 maio 2026.
- [15] KUCHARSKA, K.; RYBARCZYK, P.; HOŁOWACZ, I.; ŁUKAJTYS, R.; GLINKA, M.; KAMIŃSKI, M. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules*, v. 23, n. 11, art. 2937, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/2937>. Acesso em: 28 maio 2026.

- [16] KUMAR, G.; BAKONYI, P.; SIVAGURUNATHAN, P.; KIM, S.-H.; NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Improved microbial conversion of lignocellulosic biomass for biohydrogen production: A review. *Bioresource Technology*, v. 213, p. 353–363, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416304582>. Acesso em: 10 junho 2026.
- [17] LAN, T.; LOU, H.; ZHU, J. Y. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Fundamentals and influencing factors. *Bioresource Technology*, v. 345, art. 126507, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/edited-volume/abs/pii/B9781845695101500062>. Acesso em: 18 jun. 2026.
- [18] 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, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319903000946>. Acesso em: 21 junho 2026.
- [19] MATTONAI, M.; ESPOSITO, F.; RIBECHINI, E. Ultrasound-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 40, p. 982–990, 2018.
- [20] MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404002942>. Acesso em: 17 junho 2026.
- [21] MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 1, p. 279–286, 2008. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.026. Disponível em: [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319903000946). Acesso em: 15 jun 2026

- [22] YAO, G.; LI, P.; WANG, D.; CHONG, K. K.; CHAN, K.-Y.; LI, K. Effect of ball-milling pretreatment of cellulose on its photoreforming for H₂ production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 10, n. 20, p. 6508–6518, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.1c07301>. Acesso em: 18 jun. 2026.
- [23] NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128510000325>. Acesso em: 22 maio 2026.
- [24] NISSILÄ, M. E.; LAY, C.-H.; PUHAKKA, J. A. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates – A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 67, p. 145–159, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>. Acesso em: 11 junho 2026.
- [25] NOGUEIRA, L. A. H.; CAPAZ, R. S.; LORA, E. E. S. Biofuels in Brazil: Evolution, achievements and perspectives. *Energy Policy*, 2021.
- [26] PADDER, S. *et al.* Recent advances in lignocellulosic biomass pretreatment for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421014656>. Acesso em: 30 jun. 2026.
- [27] RATTI, R. P.; BOTELHO, R. G.; SILVA, E. L. Pretreatment of sugarcane bagasse for hydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 19, p. 6559–6567, 2015.
- [28] REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, art. 54, 2011. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-4-54>. Acesso em: 08 julho 2026.
- [29] SATARI, B.; KARIMI, K.; KUMAR, R. Cellulose accessibility in biomass pretreatment for enhanced biological conversion: A review. *Biofuel Research Journal*, v. 8, n. 1, p. 1334–1353, 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/se/article-abstract/3/1/11/623177/Cellulose-solvent-based-pretreatm-ent-for-enhanced?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em 14 jul. 2026.

- [30] SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8524–8533, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411008380>. Acesso em: 27 junho 2026.
- [31] SIVAGURUNATHAN, P.; SEN, B.; LIN, C.-Y. Batch fermentative hydrogen production by enriched mixed culture: Combination strategy and their microbial composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 117, n. 2, p. 222–228, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.015>. Acesso em: 14 junho 2026.
- [32] SOARES, J. F.; CONCEIÇÃO, T. V.; SILVA, F. T.; *et al.* Biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Current challenges and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 119, art. 109607, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032119306926>. Acesso em 5 jul.2026.
- [33] WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 2, p. 799–811, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319908017218>. Acesso em: 19 maio 2026.
- [34] XIE, Y. *et al.* Advances in second-generation biofuels from lignocellulosic biomass: Current status and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421015376>. Acesso em 23 jun. 2026.