

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO



MANOEL DAS VIRGENS SOUZA XAVIER

**Produção de biohitano a partir da vinhaça e melaço de cana-de-açúcar via
digestão anaeróbia em dois estágios**

Maceió - AL

2025

MANOEL DAS VIRGENS SOUZA XAVIER

**Produção de biohitano a partir da vinhaça e melaço de cana-de-açúcar via
digestão anaeróbia em dois estágios**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Orientador(a): Professor Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Coorientadora: Professora Dra. Georgia Nayane Silva Belo Gois

Maceió - AL

2025

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

X3p Xavier, Manoel das Virgens Souza.
 Produção de biohitano a partir da vinhaça e melaço de cana-de-açúcar via
 digestão anaeróbica em dois estágios / Manoel das Virgens Souza Xavier. –
 2025.
 87 f.: il. color.

 Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.
 Coorientadora: Georgia Nayane Silva Belo Gois.
 Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) –
 Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-
 Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento. Maceió, 2025.

 Bibliografia: f. 73-87.

 1. Biohitano (Hidrogênio e metano). 2. Digestão anaeróbica. 3. Resíduos
 agroindustriais. I. Título.

CDU: 628.35



Folha de Aprovação

MANOEL DAS VIRGENS SOUZA XAVIER

PRODUÇÃO DE BIOHITANO A PARTIR DA VINHAÇA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Em: 22 /04 /2025

Documento assinado digitalmente
gov.br EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM
Data: 29/04/2025 09:08:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim
(Orientador - PPGRHS/ CTEC/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br GEORGIA NAYANE SILVA BELO GOIS
Data: 24/04/2025 19:48:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Geórgia Nayane Silva Belo Gois
(Coorientadora - IFAL)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br MANOEL MARIANO NETO DA SILVA
Data: 24/04/2025 13:15:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Manoel Mariano Neto da Silva
(Examinador Interno – PPGRHS/ CTEC/UFAL)

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO FARIAS DE NOVAES
Data: 24/04/2025 11:40:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luciano Farias de Novaes
(Examinador Externo à Instituição - UNAERP)

RESUMO

A busca por fontes de energia alternativas e sustentáveis tem se intensificado, sobretudo no contexto da transição energética e da necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis. Entre essas alternativas, destaca-se o biohitano, uma mistura biológica de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4) gerada a partir da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. Sua combustão resulta, principalmente, na emissão de vapor de água, além de apresentar um elevado conteúdo energético superior ao dos combustíveis fósseis. Ademais, sua produção a partir de substratos renováveis, como resíduos industriais e domésticos ricos em carboidratos, torna-se uma solução promissora para a geração de energia limpa. Nesse cenário, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a produção de biohitano em reatores anaeróbios de leiteo fluidificado (RALFs), utilizando a co-digestão de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar como substrato. Esses resíduos agroindustriais, oriundos do processamento da cana-de-açúcar, possuem elevadas concentrações de carbono, favorecendo a digestão anaeróbia e a conversão da matéria orgânica em biogás. O melaço, subproduto rico em matéria orgânica, é amplamente empregado na produção de biogás por processos biológicos, enquanto a vinhaça, resultante da fabricação de etanol, também se destaca como fonte potencial para a produção de biohitano. Assim, a integração desses resíduos em sistemas anaeróbios constitui uma alternativa viável e ambientalmente sustentável para a geração de energia renovável. Para a realização do estudo, foram operados dois RALFs sob aumento progressivo da carga orgânica volumétrica (COV), com tempos de detenção hidráulica (TDH) variando entre 6 h, 4 h e 2 h para o reator acidogênico enquanto o metanogênico foi mantido constante com TDH fixo de 16 h. Os reatores apresentavam volumes total e útil de 1,2 L e 0,9 L, respectivamente. Utilizou-se lodo oriundo de reator UASB utilizado no tratamento de esgoto sanitário como inóculo e argila expandida triturada (diâmetro entre 2,8 – 3,35 mm) foi empregada como material suporte para a aderência microbiana. O primeiro reator foi operado por 102 dias e o segundo por 51 dias, sendo avaliadas proporções de alimentação com 50% de vinhaça e 50% de melaço, mantendo-se a concentração de DQO afluente fixa em 25 g.L^{-1} . Os resultados indicaram que a produção de hidrogênio foi significativamente influenciada pelo tempo de detenção hidráulica, atingindo seu maior rendimento médio na terceira fase experimental. Observou-se um aumento expressivo da produção volumétrica de hidrogênio de $0,20 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (TDH de 6 h) para $8,90 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (TDH de 2 h), com um incremento do rendimento de $0,74 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ de glicose para $1,12 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ de glicose no TDH de 2h. Quanto à produção de metano, os resultados mostraram rendimento médio de $1,22 \pm 0,64 \text{ L CH}_4/\text{g DQO}$ e produção volumétrica de $1,9 \pm 4,6 \text{ L CH}_4/\text{L}$. Durante a operação do reator acidogênico, foi observada em todas as fases a presença dos ácidos acético (HAc) e etanol (EtOH), com concentrações relativas de HAc variando entre $74,2 \pm 73,0 \%$ no TDH de 6 h, entre $70,2 \pm 54,8 \%$ no TDH de 4 h e $68,7 \pm 64,4 \%$ no TDH de 2 h. Já nas concentrações de EtOH oscilaram entre $25,8 \pm 11,5 \%$ no TDH 6 h, entre $29,8 \pm 9,6\%$ no TDH 4 h e $31,3 \pm 11,8 \%$ no TDH 2 h. Os dados evidenciam o potencial da co-digestão de vinhaça e melaço em duas fases para geração de biohitano, configurando uma alternativa viável e sustentável para produção de energia renovável.

Palavras-chave: Co-digestão. Reatores anaeróbios de leiteo fluidizado. Produção de hidrogênio. Produção de metano. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The search for alternative and sustainable energy sources has intensified, especially in the context of the energy transition and the need to reduce dependence on fossil fuels. Among these alternatives, biohythane stands out, a biological mixture of hydrogen (H_2) and methane (CH_4) generated through the anaerobic digestion of organic waste. Its combustion mainly results in the emission of water vapor, in addition to presenting a higher energy content compared to fossil fuels. Moreover, its production from renewable substrates, such as industrial and domestic waste rich in carbohydrates, becomes a promising solution for clean energy generation. In this scenario, the present research aimed to evaluate the production of biohythane in anaerobic fluidized bed reactors (AFBRs), using the co-digestion of vinasse and sugarcane molasses as substrate. These agro-industrial residues, originating from sugarcane processing, have high carbon concentrations, favoring anaerobic digestion and the conversion of organic matter into biogas. Molasses, a byproduct rich in organic matter, is widely used in biogas production by biological processes, while vinasse, resulting from ethanol production, also stands out as a potential source for biohythane generation. Thus, the integration of these residues in anaerobic systems constitutes a viable and environmentally sustainable alternative for renewable energy generation. For the study, two AFBRs were operated under progressive increase of the organic loading rate (OLR), with hydraulic retention times (HRT) varying between 6 h, 4 h, and 2 h for the acidogenic reactor while the methanogenic reactor was maintained constant with fixed HRT of 16 h. The reactors had total and useful volumes of 1.2 L and 0.9 L, respectively. Sludge from a UASB reactor used in domestic sewage treatment was used as inoculum and crushed expanded clay (diameter between 2.8 – 3.35 mm) was employed as support material for microbial adhesion. The first reactor was operated for 102 days and the second for 51 days, with feed proportions of 50% vinasse and 50% molasses, maintaining the influent COD concentration fixed at 25 g.L^{-1} . The results indicated that hydrogen production was significantly influenced by the hydraulic retention time, reaching its highest average yield in the third experimental phase. A significant increase in volumetric hydrogen production was observed from $0.20 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (HRT of 6 h) to $8.90 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (HRT of 2 h), with an increase in yield from $0.74 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1} \text{ glucose}$ to $1.12 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1} \text{ glucose}$ at HRT of 2 h. As for methane production, the results showed an average yield of $1.22 \pm 0.64 \text{ L CH}_4/\text{g COD}$ and volumetric production of $1.9 \pm 4.6 \text{ L CH}_4/\text{L}$. During the operation of the acidogenic reactor, the presence of acetic acid (HAc) and ethanol (EtOH) was observed in all phases, with relative HAc concentrations varying between $74.2 \pm 73.0\%$ at HRT of 6 h, between $70.2 \pm 54.8\%$ at HRT of 4 h and $68.7 \pm 64.4\%$ at HRT of 2 h. As for EtOH concentrations, they ranged between $25.8 \pm 11.5\%$ at HRT 6 h, between $29.8 \pm 9.6\%$ at HRT 4 h and $31.3 \pm 11.8\%$ at HRT 2 h. The data highlight the potential of co-digestion of vinasse and molasses in two phases for biohythane generation, constituting a viable and sustainable alternative for renewable energy production.

Keywords: Co-digestion. Anaerobic fluidized bed reactors. Hydrogen production. Methane production. Agro-industrial waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas simplificadas do processo produtivo de etanol e de açúcar e subprodutos. ...	16
Figura 2: Métodos de produção de hidrogênio.	19
Figura 3: Principais palavras-chaves em estudos relativos à digestão anaeróbia entre 2019-2022.	21
Figura 4: Etapas da digestão anaeróbia.	24
Figura 5: Fluxograma das etapas e atividades desenvolvidas ao longo da pesquisa.	31
Figura 6: Tratamento térmico do lodo oriundo de efluente utilizado no tratamento de esgoto sanitário por um reator UASB.	36
Figura 7: Esquema de instalação dos reatores anaeróbio de leito fluidificado (RALF ₁ e RALF ₂).	39
Figura 8: Reatores anaeróbio de leito fluidificado (RALF ₁ e RALF ₂) em operação.	39
Figura 9: Bombas de alimentação e recirculação respectivamente utilizadas na operação dos reatores.	40
Figura 10: Variação do pH afluente e efluente em função do TDH no RALF ₁	47
Figura 11: Variação da Concentração de Afluente e Efluente Carboidratos Totais em Função do TDH.	49
Figura 12: Variação da DQO no afluente e efluente no RALF ₁	51
Figura 13: Produção volumétrica e rendimento H ₂ em função do TDH.	55
Figura 14: Variação das Concentrações de Etanol e Ácido Acético.	58
Figura 15: Variação do pH afluente e efluente do RALF ₂ metanogênico.	61
Figura 16: Variação da DQO afluente, efluente e eficiência do RALF ₂	63
Figura 17: Alcalinidade média afluente e efluente do RALF ₂	66
Figura 18: Evolução do rendimento e da taxa de produção de metano no RALF ₂	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que utilizaram a co-digestão na produção de Biohitano e Bionergia (H ₂ e CH ₄).	15
Tabela 2: Frequência de monitoramento das análises/amostras no reator anaeróbio.	32
Tabela 3: Limites de detecção dos metabólitos solúveis (ácidos e álcoois).	35
Tabela 4: Características da argila expandida utilizada nos reatores anaeróbios de leito fluidizado.	37
Tabela 5: Fases experimentais de operação do RALF ₁ e do RALF ₂	42
Tabela 6: Características da vinhaça e melaço utilizado nesse estudo.	44
Tabela 7: Vazão teórica e aplicada em função do TDH.	46
Tabela 8: Valores médios do pH afluente e efluente em função do TDH no RALF ₁	46
Tabela 9: Valores médios da Concentração de Afluente e Efluente Carboidratos Totais em função do TDH.	48
Tabela 10: Valores médios de DQO no afluente e efluente e eficiência de conversão por fase do RALF ₁	50
Tabela 11: COV médias no afluente e no efluente e eficiência no RALF ₁	52
Tabela 12: Produção Volumétrica e Rendimento de Hidrogênio em função do TDH.	54
Tabela 13: Distribuição de Metabólitos Solúveis em Função do TDH no RALF ₁	56
Tabela 14: Concentrações de Etanol e Ácido no RALF ₁	57
Tabela 15: DQO média no afluente e no efluente e eficiência de conversão no RALF ₂	62
Tabela 16: COV médias no afluente e no efluente e eficiência no RALF ₂	64
Tabela 17: Alcalinidade médias no afluente e no efluente no RALF ₂	66
Tabela 18: Médias do rendimento e da produção de metano, eficiência de remoção e TDH no RALF ₂	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnSBBR	Biorreator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais
APHA	Métodos Padrões para Análise de Águas e Efluentes
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado
CTEC	Centro de Tecnologia
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EtOH	Etanol
H ₂	Hidrogênio
Hac	Acetato
Hbut	Butirato
Hpr	Propionato
HPR	Taxa de Produção de Hidrogênio
HY	Rendimento de Hidrogênio
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
N ₂	Nitrogênio
Q	Vazão volumétrica
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
SMP	Metabólitos Solúveis Produzidos
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
TCO	Taxa de Carregamento Orgânico
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente de Manta de Lodo
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
V _{mf}	Velocidade mínima de fluidização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 GERAL.....	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Biohitano	13
3.2 Subprodutos da indústria sucroalcooleira.....	16
3.2. Produção de Hidrogênio	18
3.3. Reatores anaeróbios.....	20
3.4. Microrganismos envolvidos no processo de degradação anaeróbia da matéria orgânica	20
3.5. Digestão Anaeróbia.....	21
3.6.1 pH	27
3.6.2 Tempo de detenção hidráulica (TDH)	28
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Substratos	31
4.1.1 Caracterização físico-química da vinhaça e do melaço.....	32
4.2 Análise dos Afluentes e Efluentes do RALF	32
4.3 Análise dos metabólitos solúveis.....	35
4.4 Inóculo.....	36
4.5 Material Suporte	37
4.6 Configurações do RALFs	38
4.7 Testes operacionais iniciais e partida do RALF	40
4.8 Operação do RALF.....	41
4.9 Cálculo da Eficiência de Conversão e Produção Energética do Biohitano	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Caracterização Físico-Química da vinhaça e melaço bruto.....	44
5.2 Desempenho e Monitoramento do reator acidogênico	45
5.3.1 pH do RALF ₁	46
5.3.2 Concentração de carboidratos no RALF ₁	48
5.3.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) RALF ₁	50
5.3.4 Efeito da carga orgânica volumétrica na produção de hidrogênio	52
5.3.5 Produção Volumétrica e Rendimento de Hidrogênio em função do TDH	54

5.3.7 Produção de metabólitos.....	56
5.4 Desempenho e monitoramento do reator metanogênico RALF ₂	61
5.4.1 Produção de Metano	61
5.4.2 pH do RALF ₂	61
5.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) do RALF ₂	62
5.4.4 Carga Orgânica Volumétrica (COV) no RALF ₂	64
5.4.5 Alcalinidade e ácidos voláteis totais.....	65
5.4.6 Produção e rendimento do metano	67
6. Avaliação da Eficiência de Conversão de Energia	68
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais demandas da sociedade contemporânea é a busca por fontes de energias renováveis, que minimizem os impactos ambientais causados pela exploração intensiva de combustíveis fósseis. Nesse contexto, a produção de biocombustíveis, por meio da digestão anaeróbia, surge como uma alternativa sustentável e eficaz de gerar energia renovável (Karki *et al.*, 2021; Khanal *et al.*, 2021)

Nesse sentido, as rotas fermentativas apresentam grande potencial e atratividade, pois consistem em um processo de baixo custo, livre de poluição, com reduzido gasto energético e uma variedade de microrganismos e substratos que podem atuar como fonte produtora do gás (Peixoto *et al.*, 2011; Santos, 2014; Nualsri *et al.*, 2016; Xu; Zhou; Yu, 2022).

Uma das principais aplicações do biogás é a produção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4), que são transportadores de energia com alto potencial para diversos setores (Mohd Kopli; Hassim, 2023). Segundo Song *et al.* (2020) esses dois gases (H_2 e o CH_4) são os principais constituintes de energia gasosa e possuem elevado potencial calorífico energético e são amplamente aplicados e explorados na indústria química e no processamento.

O processo fermentativo e a produção de biogás em reatores anaeróbios consistem em várias etapas (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), a partir das quais, por meio dos devidos controles operacionais da digestão anaeróbia, substratos ricos em matéria orgânica podem ser convertidos em biogás (metano e CO_2) e em outros produtos de alto valor agregado como hidrogênio (Lü *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021; Ramprakash *et al.*, 2022).

No sistema de dois estágios, a fase hidrolítico-acidogênica é segregada da fase metanogênica, permitindo a otimização da conversão biológica e resultando na produção simultânea de bio-hidrogênio (H_2 , 10-15%) e biogás enriquecido em metano (CH_4 , 50-85%), além de CO_2 (10-40%) e traços de sulfeto de hidrogênio. Em comparação ao sistema de um estágio, a configuração de dois estágios aprimora significativamente a recuperação de H_2 , aumenta a eficiência na produção de CH_4 e reduz o tempo de detenção hidráulica, tornando o processo mais dinâmico e sustentável (Ali *et al.*, 2024).

Evidencia-se que a utilização de diversos reatores, é uma das formas de produzir por via biológica, dentre eles, o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) se destaca como uma alternativa promissora, pois já demonstrou eficiência e viabilidade em diversos estudos realizados por diferentes autores (Amorim, 2016; Dornelles *et al.*, 2020; Menezes, 2023; Özkaya *et al.*, 2019; Silva, 2021, 2023). Esses pesquisadores averiguaram que vários fatores

influenciam na capacidade produtiva de biogás por fermentação anaeróbia, tais como: o tipo de matéria orgânica utilizada como substrato, pH, a temperatura do processo, taxa de carregamento orgânico (TCO), tempo de detenção hidráulica (TDH) e tratamento do inóculo (Nualsri *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2021).

Uma dessas combinações é o processo denominado biohitano, que consiste na produção integrada de hidrogênio e metano em dois estágios consecutivos: no primeiro estágio, ocorre a produção de hidrogênio; no segundo estágio, ocorre a produção de metano, utilizando o efluente do primeiro estágio como substrato.

O hitano, uma mistura de hidrogênio-metano com concentração de hidrogênio de 10% a 30% em volume, está ganhando destaque como um combustível valioso para veículos devido ao complemento vantajoso de H_2 e CH_4 que compensa as desvantagens e problemas um do outro. Hythane foi produzido para maximizar a recuperação de calor e aumentar a utilização de hidrogênio. Os gases produzidos em várias fases do processo também podem ser combinados para produzir um combustível atualizado conhecido como biohitano (Mohd Kopli; Hassim, 2023).

Essa tecnologia pode ser aplicada ao tratamento de resíduos e subprodutos da agroindústria, que possuem alto potencial de aproveitamento para a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia, devido a presença de substratos ricos em carboidratos (Chandrasekhar *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2021; Cremonez *et al.*, 2021; Karki *et al.*, 2021; Khanal *et al.*, 2021). Entre esses subprodutos, destacam-se a vinhaça e o melaço de cana de açúcar, provenientes da indústria sucroalcooleira, que apresentam características favoráveis para esse processo (Adarme *et al.*, 2019; Bernal *et al.*, 2017; Fuess *et al.*, 2022).

O melaço é altamente rico em glicose, sacarose e frutose, essas características o torna um substrato adequado para a digestão anaeróbia fermentativa. Vários pesquisadores têm estudado o potencial do melaço para essa finalidade (Pereyra, 2019; Almeida *et al.*, 2022; Vandenberghe *et al.*, 2022; De Menezes *et al.*, 2023). Porém, o uso isolado desse material pode comprometer o processo digestivo devido à sua elevada concentração de nitrogênio e de sais. Assim, a combinação com outro substrato pode favorecer o processo anaeróbio (Albanez *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2024; Zhang; Wang; Jiang, 2021).

Já o subproduto da produção de etanol, a vinhaça, possui elevados teores de carbono e nutrientes, o que favorece a digestão anaeróbia. No entanto, os altos níveis de potássio, sulfato, compostos fenólicos e melanoidinas podem prejudicar a biodegradabilidade, tornando-a tóxica para o processo digestivo (De Godoi *et al.*, 2019; García-Depraect *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021, Gois *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços recentes no estudo da digestão anaeróbia para a valorização energética de resíduos agroindustriais, ainda persiste uma lacuna significativa quanto à produção integrada de biohitano a partir da co-digestão desses substratos em sistemas de dois estágios operando com reatores de leito fluidizado. Tendo em vista que, a maioria dos estudos disponíveis na literatura concentra-se na produção isolada de metano ou hidrogênio, frequentemente utilizando substratos sintéticos ou operando em reatores convencionais de um único estágio. Além disso, embora os resíduos líquidos da indústria sucroalcooleira sejam abundantes e tenham elevado potencial energético, suas características contrastantes, como o alto teor de açúcares fermentescíveis no melaço e a presença de compostos inibitórios na vinhaça, tornam desafiador seu uso isolado na digestão anaeróbia.

Diante desse contexto, a pesquisa investigou a viabilidade da co-digestão de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fluidificado, visando à produção de biohitano em dois estágios. Para tanto, foi implementado um sistema acidogênico-metanogênico integrado, submetido a diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH) e carga orgânica volumétrica (COV), com o objetivo de identificar as melhores condições operacionais para maximizar a conversão dos resíduos em biocombustíveis, contribuindo assim para o aproveitamento sustentável de subprodutos da cadeia sucroenergética.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a produção de biohitano a partir da vinhaça e melaço de cana de açúcar utilizando reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALFs) operados em série em um sistema acidogênico-metanogênico, combinado.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho da vinhaça e melaço de cana de açúcar na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF₁);
- Avaliar a produção de metano em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF₂) a partir do reaproveitamento do efluente do reator acidogênico (RALF₁);
- Avaliar o efeito de diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH) na remoção de DQO em ambos os reatores sobre a produção de biogás.
- Avaliar a formação de metabólitos líquidos (ácidos acético, butírico, propiônico, capróico e etanol) no RALF₁;
- Comparar o desempenho dos reatores em termos de consumo de substratos, rendimento, produção e vazão volumétrica de hidrogênio no RALF₁, bem como a vazão volumétrica de metano no RALF₂;
- Avaliar os efeitos da carga orgânica volumétrica (COV) para ambos os reatores;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biohitano

O bio-hidrogênio e o biometano configuram-se como biocombustíveis de destaque, notadamente por suas elevadas densidades energéticas de 141 MJ kg^{-1} e 50 MJ kg^{-1} , respectivamente. Além de sua aplicação direta, o bio-hidrogênio demonstra potencial como aditivo para aprimorar a qualidade da combustão de outros gases de origem biológica. Um dos principais benefícios da produção integrada desses dois combustíveis em um sistema sequencial de duas etapas reside no aumento da eficiência de recuperação energética, que pode alcançar de 10 a 43%. Ademais, a combinação desses gases viabiliza a obtenção do biohitano, o que permite potencializar simultaneamente o rendimento e a eficiência globais do processo. Desse modo, o biohitano surge como uma fonte de energia renovável promissora, caracterizada pela geração de elevado aporte energético com reduzida emissão de poluentes (Abdur Rawoof *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, o hitano pode ser obtido por meio de processos termoquímicos que utilizam o gás natural como matéria-prima. No entanto, essa rota tecnológica é intensiva em consumo energético e permanece atrelada à disponibilidade de combustíveis fósseis, o que compromete sua sustentabilidade a longo prazo. Em contraste, uma alternativa mais alinhada com os princípios da economia circular é a produção de biohitano por digestão anaeróbia em dois estágios. Nessa abordagem integrada, o primeiro estágio é dedicado à geração de hidrogênio, enquanto o segundo promove a produção de metano, permitindo uma valorização mais completa dos substratos orgânicos. Tal estratégia biotecnológica tem sido amplamente reconhecida na literatura por seus benefícios potenciais, tanto do ponto de vista energético quanto ambiental (Ghosh e Kar, 2024; Abdur Rawoof *et al.*, 2021; Lunprom *et al.*, 2019).

Além da viabilidade técnica de sua produção, o composto apresenta características que o tornam particularmente vantajoso como biocombustível, por ser formado por metano enriquecido com 5 a 25% de hidrogênio em volume, representa uma alternativa energética promissora, especialmente no setor de transportes. Introduzido no início da década de 1990 pela Hydrogen Component Inc. (HCI), o termo passou a designar esse blend gasoso resultante de pesquisas voltadas à utilização combinada de gás natural comprimido (GNC) e hidrogênio em motores de combustão interna (Ghimire *et al.*, 2017).

Do ponto de vista funcional, a incorporação do hidrogênio ao metano não apenas amplia a faixa de inflamabilidade da mistura, considerando que o hidrogênio é cerca de oito vezes mais inflamável que o metano, como também favorece uma combustão mais eficiente, reduz

significativamente as emissões de poluentes tóxicos, como os óxidos de nitrogênio (NO_x), apresenta características desejáveis, como alta reatividade, baixa temperatura e tempo de ignição, além de promover maior recuperação energética e desempenho ambiental aprimorado (Hans e Kumar, 2019; Ghosh e Kar, 2024).

Recentemente, diversos estudos têm explorado a produção de biohitano a partir de diferentes substratos e processos. Sun *et al.* (2019) realizaram uma avaliação do ciclo de vida da produção industrial de biohitano a partir de microalgas e resíduos alimentares, destacando que o balanço energético líquido do processo apresentou uma relação de entrada e saída de energia de 0,24. Além disso, a fotossíntese das microalgas ajudou a mitigar as emissões de CO₂, absorvendo 49 g CO₂-eq MJ⁻¹, enquanto os principais emissores foram a geração de eletricidade (41,6%) e a liberação de CO₂ durante o tratamento com água pressurizada (27,8%).

Outra abordagem inovadora foi desenvolvida por Nguyen *et al.* (2022), que investigaram a produção de biohitano a partir de esterco suíno e resíduos de abacaxi utilizando um sistema anaeróbio de câmara dupla com microrganismos imobilizados. Nesse estudo, o tempo de detenção hidráulica (TDH) influenciou significativamente a eficiência da fermentação, com um pico de 60,5% de hidrogênio na mistura gasosa em TDH de 6 horas e recuperação energética de 42,63 kJ/L-dia.

Meenaa *et al.* (2019) destacaram os desafios enfrentados na digestão anaeróbia de resíduos do processamento de alimentos, como a presença de compostos inibidores e variações de pH que impactam a produção de hidrogênio e metano. Já Liu *et al.* (2018) enfatizaram a necessidade de otimização da engenharia de bioprocessos para viabilizar a escala industrial do biohitano, especialmente no que se refere à funcionalização do reator de produção de hidrogênio e à eficiência energética da fermentação em dois estágios.

Diante dos avanços no campo da bioenergia, estratégias que ampliem a eficiência da digestão anaeróbia têm recebido atenção crescente. Nesse sentido, combinações sinérgicas de substratos orgânicos têm se mostrado promissoras por contribuírem para o equilíbrio nutricional do processo fermentativo, otimizando parâmetros como o pH e a relação carbono/nitrogênio (C/N), fundamentais para a maximização da produção de bio-hidrogênio (Harirchi *et al.*, 2022)

Entretanto, a eficácia dessas abordagens está condicionada a um rigoroso controle das características físico-químicas dos substratos utilizados. Estudos, como o de Harirchi *et al.* (2022), evidenciam que desequilíbrios na composição da mistura, como baixas concentrações de sólidos voláteis ou elevada biodegradabilidade, podem resultar no acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs), culminando na inibição da atividade microbiana e, consequentemente, na redução da eficiência do processo. Outros trabalhos também analisaram o uso da co-digestão

como estratégia para otimizar a produção de bio-hidrogênio e biometano (H_2 e CH_4), conforme sintetizado na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos que utilizaram a co-digestão na produção de Biohitano e Bionergia (H_2 e CH_4).

Referência	Substratos	Condições operacionais	Resultados
Suksong <i>et al.</i> , 2015	efluente da indústria de óleo de palma + bagaço vazio de palma e torta do decanter	Inóculo de H_2 : 60 °C, pH 5,5, 24h. Inóculo de CH_4 : POME 1:1 + $NaHCO_3$, pH 7–7,5. Digestão em duas etapas a 60 °C: H_2 (pH 5,5, F/M 4,0), CH_4 (pH 7,0, F/M 1,5). Frascos de 500 mL, 200 mL úteis, 12–30% ST, 60–150 gSV/L.	A co-digestão de efluente de palma (POME) com 10% de casca de dendê (DC) ou 10% de fibra do cacho vazio (EFB) gerou 16 mL H_2 /gSV e 1,4 m ³ de hidrogênio por tonelada. No segundo estágio, os rendimentos de metano foram de 391 mL CH_4 /gSV (DC) e 240 mL CH_4 /gSV (EFB).
Pinto <i>et al.</i> , 2018	Pó de café verde + Pergaminho de café + Torta desengordurada de café e Vinhaça	Reatores de 3,7–4,3 L, operados a 55 °C por 55 dias, com agitação. Cargas: 0,16–0,37 kgSV/m ³ .d. Inóculo: lodo de vinhaça (pH 7,79; DQO 20,5 g/L).	O pó de café verde gerou biohitano com 31,45% de H_2 (4º dia) e 0,14 mL CH_4 /gSV (20–25 dias). A torta com vinhaça produziu 32% de H_2 (9º–32º dia). O pergaminho com vinhaça gerou 0,21 mL CH_4 /gSV.
Chu <i>et al.</i> , 2020	Esterco suíno + resíduos de abacaxi	Dois reatores anaeróbios contínuos agitados (CSABR) Reator H_2 DQO inicial de 64.56 g/L e TDH de 4 horas. Reator CH_4 com DQO de 37.7 ± 1.9 g/L e TDH de 3.	O CSABRH gerou 599.0 ± 77.8 mL/LR-d de H_2 . O efluente alimentou o CSABRC, que produziu 174.6 ± 9.4 mL/LR-d de CH_4 (O sistema atingiu 85% de remoção de DQO e 2495.1 mL/d de biogás.
Ribeiro <i>et al.</i> , 2024	Vinhaça + melaço	TCO: 5 a 27,5 kg DQO.m ³ .d ⁻¹ - TDH: 24h (RMT), 4h (RAT) e 20h (RST/RSM)	Separação de fases aumentou o potencial energético em cargas >22,5 g DQO.L ⁻¹ . No RAT, a produção máxima de H_2 foi 115,17 mL H_2 .L ⁻¹ .h ⁻¹ . O RST gerou 205,6 kJ.d ⁻¹
Yapicioğlu, 2025	Efluente de cervejaria + pó de malte	Dois biorreatores em regime contínuo foram operados em condições mesofílicas (35 °C), sendo um acidogênico (HR) com TDH de 4, 6 e 8 horas e pH 5,5, e outro metanogênico (MR) com TDH de 3 d e pH 7,5.	A adição de pó de malte aumentou a produção de hidrogênio em 59,6%, com taxa máxima de 511 mL H_2 L ⁻¹ d ⁻¹ , rendimento de 8 mL H_2 /g DQO e TCO de 5521 mg DQO L ⁻¹ d ⁻¹ .

Fonte: Autor, 2025.

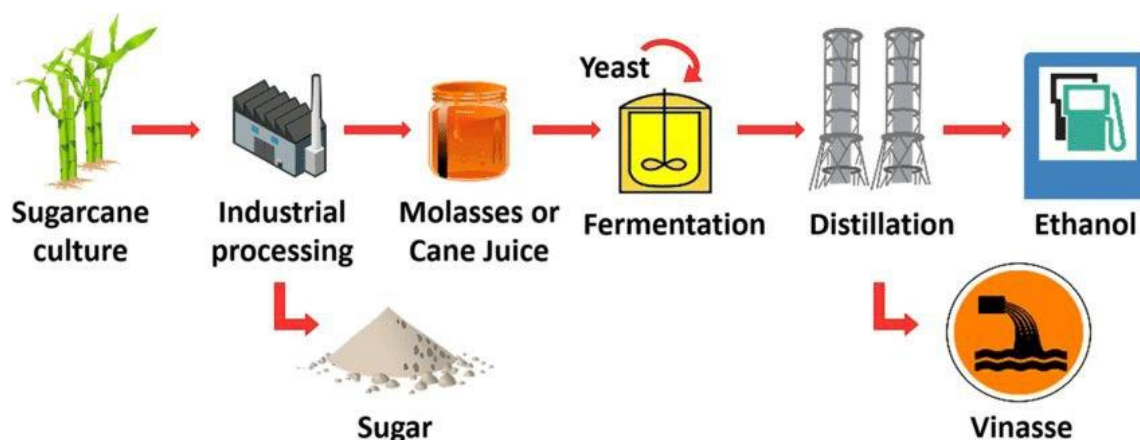
3.2 Subprodutos da indústria sucroalcooleira

A vinhaça gerada na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar representa uma das principais fontes de contaminação ambiental do setor sucroalcooleiro, devido ao seu elevado volume e alta carga de matéria orgânica. Atualmente, a produção global de vinhaça atinge 22,4 gígalitros anuais, o que exige estratégias eficientes de manejo para minimizar seus impactos ambientais (Hurtado *et al.*, 2021; Parsaee *et al.*, 2019).

O descarte inadequado desse resíduo representa um desafio ambiental devido ao seu alto volume e concentração de matéria orgânica e sais dissolvidos (Ribeiro, 2024). A prática predominante de fertirrigação, embora amplamente utilizada, pode resultar em problemas como supersaturação, desestabilização e acidificação do solo, afetando negativamente as comunidades microbianas (Fuess, 2024). Além disso, a elevada carga orgânica da vinhaça implica uma perda de potencial energético quando descartada diretamente no solo.

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol tem proporcionado benefícios econômicos, energéticos e ambientais significativos para o Brasil, conforme ilustrado na figura 1. No entanto, este processo gera grandes volumes de vinhaça, o principal subproduto da destilação do mosto alcoólico (Bordonal *et al.*, 2018; Bernal *et al.*, 2017; Eng Sánchez *et al.*, 2021; Palacios-Bereche *et al.*, 2022). De acordo com Hoarau *et al.* (2018), a cada tonelada de biomassa processada, as indústrias sucroalcooleiras produzem aproximadamente 12 L de etanol, 94 kg de açúcar e geram, como resíduos, 156 L de vinhaça e 250 kg de bagaço, o que corresponde a uma produção de 13 L de vinhaça para cada litro de etanol produzido. Estimou-se que, em 2024, foram gerados aproximadamente 1.742 milhões de m³ de vinhaça.

Figura 1: Etapas simplificadas do processo produtivo de etanol e de açúcar e subprodutos.



Fonte: Godoi *et al.*, 2019.

Vale ressaltar que, a vinhaça é considerada um dos resíduos mais poluentes provenientes da produção de etanol, sendo um resíduo líquido de coloração escura e odor característico. Seu potencial poluidor é substancialmente elevado, sendo cerca de 100 vezes maior do que o esgoto sanitário, devido à alta carga orgânica, à elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e ao baixo pH (entre 3,5 e 5,0). Além disso, a vinhaça contém nutrientes essenciais, como potássio, fósforo e nitrogênio, cuja concentração pode variar conforme a biomassa utilizada no processo de produção do etanol (Hoarau *et al.*, 2018). Em razão de seu grande volume e da presença de nutrientes, a vinhaça tem sido amplamente utilizada no Brasil como fertilizante e para irrigação das próprias plantações de cana-de-açúcar (Bordonal *et al.*, 2018; Palacios-Bereche *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes demonstram que o efluente gerado pela digestão anaeróbia da vinhaça pode ser reutilizado como água de processo na produção de etanol, reduzindo significativamente a demanda hídrica da indústria sucroalcooleira (Hurtado *et al.*, 2021). Essa estratégia não apenas contribui para a sustentabilidade do setor, mas também possibilita a reutilização de nutrientes presentes no efluente, otimizando o processo fermentativo e minimizando os impactos ambientais.

Nesse contexto, a digestão anaeróbia surge como uma alternativa mais eficiente em comparação à fertirrigação, permitindo a conversão da matéria orgânica presente na vinhaça em biogás. Esse processo pode reduzir a carga poluente da vinhaça em até 80% e aumentar a geração de energia nas usinas de cana-de-açúcar em aproximadamente 30% (Fuess *et al.*, 2018; Rego *et al.*, 2022; Bernal *et al.*, 2021; Menezes *et al.*, 2023).

Diversos métodos têm sido empregados para o tratamento e reaproveitamento da vinhaça, incluindo sua reciclagem na fermentação, aplicação no solo como fertilizante (fertirrigação), concentração por evaporação e digestão anaeróbia (Moraes *et al.*, 2015; Christofoletti *et al.*, 2013). Entre essas abordagens, a digestão anaeróbia tem se destacado como a alternativa mais eficiente, pois promove a degradação da matéria orgânica, reduz a carga poluente da vinhaça e possibilita a recuperação de energia por meio da produção de biogás (de Castro *et al.*, 2019; Fuess e Garcia, 2014).

Já o melaço de cana-de-açúcar é amplamente reconhecido como um substrato de elevado potencial para a produção de bioetanol, em virtude de sua alta concentração de açúcares fermentáveis, como glicose, frutose e sacarose (Hawaz *et al.*, 2023). Além disso, trata-se de uma matéria-prima economicamente viável, de ampla disponibilidade e não concorrente com a produção de alimentos. Em comparação com fontes amiláceas e lignocelulósicas, o melaço demanda um pré-tratamento menos intensivo, o que reduz custos e simplifica o processamento.

Sendo um subproduto da indústria sucroalcooleira, o melaço contém diversos fatores essenciais para o crescimento microbiano, incluindo minerais e nutrientes orgânicos, tornando-se uma opção atrativa para a produção industrial de etanol (Hawaz *et al.*, 2023). Entretanto, desafios relacionados à eficiência da conversão do substrato em etanol impactam negativamente o setor etíope de bioetanol, resultando no uso inadequado de recursos e na geração excessiva de resíduos. Diante desse cenário, torna-se imperativo o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas para aprimorar a bioconversão do melaço em etanol.

Para otimizar a biodegradabilidade da vinhaça e potencializar a produção de biogás, a co-digestão anaeróbia tem sido recomendada. Esse método consiste na adição de substratos complementares, promovendo um ambiente mais favorável para a degradação da matéria orgânica e a recuperação energética (Albanez *et al.*, 2018). Estudos recentes demonstram que a co-digestão anaeróbia em dois estágios pode melhorar significativamente a recuperação de metano e a remoção de matéria orgânica, tornando-se uma estratégia promissora para a valorização dos resíduos da indústria sucroalcooleira (Ribeiro *et al.*, 2024).

Rego *et al.* (2022) investigaram a utilização de substratos derivados da cadeia de processamento da cana-de-açúcar para a produção de bio-hidrogênio, incluindo sacarose como substrato teórico, caldo de cana, melaço e vinhaça (Rego *et al.*, 2022; Dos Reis *et al.*, 2015). Com base nesses estudos, a vinhaça pré-tratada, com uma demanda química de oxigênio (DQO) inicial de 25.766 mg L⁻¹, foi diluída para 5.000 mg DQO L⁻¹ para alimentação dos reatores anaeróbios de leito fluidizado termofílico (AFBR-T) e mesofílico (AFBR-M).

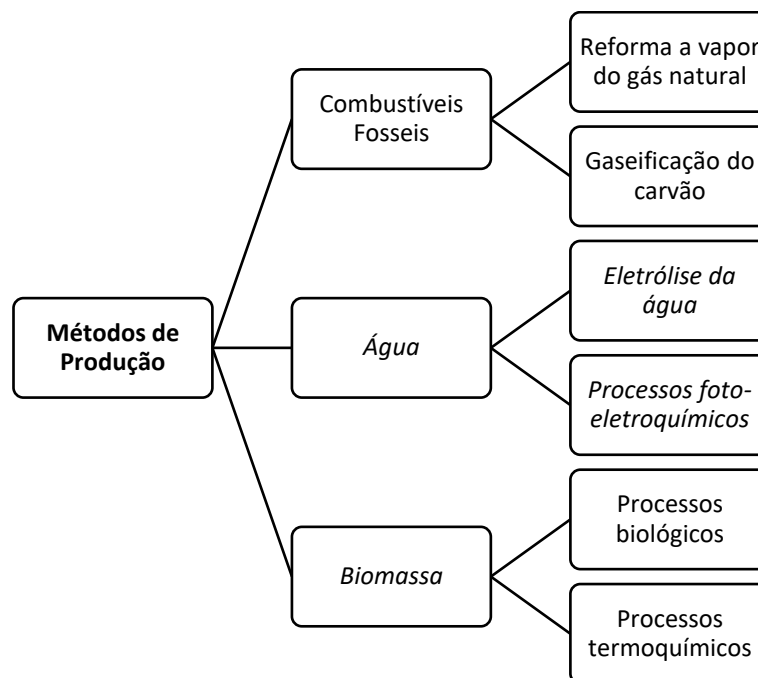
3.2. Produção de Hidrogênio

Uma forma de contribuir para uma matriz energética mais sustentável é utilizar o hidrogênio como substituto de fontes não renováveis. O hidrogênio tem o potencial de reduzir a emissão de carbono e até de tornar alguns países energeticamente independentes (Bárcia; Costa; Carvalho, 2023). O hidrogênio é o combustível gasoso com maior conteúdo energético por unidade de peso (143 kJ/g), sendo considerado uma alternativa promissora para a redução de emissões de gases do efeito estufa já que a partir da sua combustão o único subproduto é a água (Yin; Wang, 2022; Lertsriwong; Glinwong, 2020).

No entanto, para aproveitar esse potencial, é necessário extrair o hidrogênio em sua forma molecular, processo que apresenta consideráveis desafios. Isso porque o elemento, na natureza, raramente se encontra isolado, estando geralmente incorporado a outros compostos. Assim, sua obtenção requer o emprego de métodos físicos ou químicos específicos que

possibilitem a separação e posterior utilização como vetor energético (Campos *et al.*, 2021). Na Figura 2 são apresentados alguns dos principais processos de obtenção deste gás.

Figura 2: Métodos de produção de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de EPE (2022).

O hidrogênio pode ser obtido a partir de diferentes fontes, como combustíveis fósseis, biomassa e água, mediante processos de conversão físicos, químicos ou biológicos (Bharathiraja *et al.*, 2016). No entanto, a maior parte da produção mundial de hidrogênio utiliza métodos convencionais que emitem grandes quantidades de dióxido de carbono e geram um grande impacto ambiental, pois liberam cerca de 560 milhões de toneladas de dióxido de carbono por ano. Estima-se que cerca de 96% do hidrogênio produzido mundialmente seja proveniente de processos termoquímicos convencionais, com destaque para a reforma a vapor do gás natural (48%), a reforma de nafta e óleo pesado (30%) e a gaseificação do carvão (18%). Em contraste, apenas 4% do hidrogênio é gerado por rotas mais sustentáveis, como a eletrólise da água (3%) e processos biológicos a partir da biomassa (1%) (Agyekum *et al.*, 2022; Osman *et al.*, 2022).

3.2.3 A partir de biomassa

A obtenção de biogás a partir do uso de microrganismos é uma tecnologia de baixo custo e baixo consumo energético que envolve a produção biológica de hidrogênio. Essa produção

ocorre principalmente por meio de três processos: fotossíntese (biofotólise e fotodecomposição de compostos orgânicos), fotofermentação e fermentação escura, também denominada digestão anaeróbia. Segundo Amorim (2009) e Bharathiraja *et al.* (2016), esses processos dependem da atuação de enzimas (nitrogenase, Fe-hidrogenase e Ni-hidrogenase) que catalisam a reação.

Nessa perspectiva a obtenção de hidrogênio por meio da digestão anaeróbia é um processo biológico que envolve a fermentação de biomassas. Neste caso, ele é produzido nas etapas acidogênica e acetogênica. Sendo assim, a integração das três fases iniciais da digestão, denominada fermentação na ausência de luz, é um método eficiente que proporciona vantagens energéticas e ambientais, pois permite o uso de águas residuais como fonte econômica de matéria-prima renovável, favorecendo o seu tratamento e a geração de energia sem a dependência de fonte luminosa (Chaves *et al.*, 2021; Niz *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2016).

3.3. Reatores anaeróbios

Entre os diversos tipos de reatores empregados no processo digestivo anaeróbio, destacam-se: o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF), o reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB), o reator de filtração anaeróbia, o reator de digestão anaeróbia de contato, o biorreator anaeróbio com deflexão (ABR), o reator contínuo de tanque agitado (CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor*), o reator de leito granular expandido (EGSB – *Expanded Granular Sludge Bed*) e o sistema ultrassônico de membrana anaeróbia (UMAS) (Ohimain e Izah, 2017).

O RALF consiste em um sistema onde partículas de dimensões menores (0,2 a 10 mm), mantidas em leito fluidizado por meio de fluxo ascendente, funcionam como suporte para fixação dos microrganismos que realizam a decomposição do substrato afluente, à medida que este percorre o recheio de partículas, possibilitando a degradação biológica dos compostos orgânicos. Estes reatores são compostos por uma zona de reação, onde ocorre a degradação do material orgânico, a formação do biofilme e a produção do biogás e por uma zona de sedimentação, responsável pela separação das partículas e decantação do efluente na parte superior do reator (Niciura, 2005).

3.4. Microrganismos envolvidos no processo de degradação anaeróbia da matéria orgânica

Segundo Mishra *et al.* (2019), as bactérias fermentativas que mais contribuem para a produção de bio-hidrogênio são: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*,

aparece em 58 artigos (78,4%) e metano em 43 (58,1%), destacando a ênfase em biocombustíveis. O termo hidrogênio é mencionado em 26 artigos (35,1%) e produção de hidrogênio em 27 (36,5%), evidenciando o crescente interesse por tecnologias alternativas.

Termos como digestão anaeróbia em duas etapas (28 ocorrências, 37,8%) e fermentação (23 ocorrências, 31,1%) também são frequentes. Já temas como tempo de retenção hidráulica (9 ocorrências, 12,2%) e ácidos graxos voláteis (12 ocorrências, 16,2%) têm menor destaque. Finalmente, inoculação (5 ocorrências, 6,8%) e co-digestão (6 ocorrências, 8,1%) aparecem com menor frequência, indicando uma exploração mais pontual desses tópicos.

De acordo Ramos (2020); Manyi-Loh *et al.* (2013), a digestão anaeróbia configura-se como um processo biológico de alta complexidade, no qual substratos orgânicos poliméricos são progressivamente decompostos em moléculas mais simples na ausência de oxigênio. Essa conversão é mediada por uma sucessão coordenada de atividades metabólicas realizadas por quatro grupos funcionais de microrganismos interconectados, os quais atuam em consórcio no interior do digestor anaeróbio. Essa degradação ocorre em quatro etapas sequenciais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, nas quais atuam, respectivamente, bactérias hidrolíticas, fermentativas, acetogênicas e arqueias metanogênicas (Silva; Nadai; Oliveira, 2020).

A interação simbiótica ou o mutualismo microbiano entre os diferentes grupos de microrganismos é a base desse processo. Compreender o papel de cada grupo de microrganismos e otimizar a eficiência das reações de acordo com os limites termodinâmicos é essencial para aprimorar esse processo. Além disso é um complexo processo de mineralização e bioestabilização da matéria orgânica, que envolve diversos grupos de microrganismos com recíproca interação por trocas de substratos, e cada grupo com capacidades fisiológicas distintas. Ou seja, interagem promovendo a transformação de compostos orgânicos complexos em compostos simples, resultando principalmente, na produção de metano e dióxido de carbono. Como resultado desta fermentação ocorre a liberação de biogás e a produção de biofertilizante (Moraes *et al.*, 2015).

Segundo Fuess (2017), a digestão anaeróbia é um processo em que a matéria orgânica é transformada em uma mistura gasosa pela ação sintrófica de diversas populações de microrganismos. Essa mistura gasosa, denominada biogás, é composta principalmente por metano e dióxido de carbono, além de pequenas frações de hidrogênio, nitrogênio e sulfeto de hidrogênio, possuindo alto potencial energético devido à presença do CH₄ e do H₂. Isso ocorre porque os gases presentes no biogás têm elevado calor de combustão (Oliveira, 2019).

Ao longo do processo, compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídeos, são transformados em moléculas mais simples, até que sejam degradados e convertidos, principalmente, em gases, como metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). Parte desses gases desprendem-se do meio, que geralmente é aquoso, originando o biogás. Dessa forma, o material orgânico é parcialmente transformado, removido da fase líquida e transferido para a fase gasosa, proporcionando a estabilização dos resíduos

Uma forma de aprimorar o desempenho do tratamento anaeróbio é dividir o processo em duas fases distintas. Essa proposta foi feita originalmente por Pohland e Ghosh (1971), que sugeriram separar fisicamente as fases de acidogênese e metanogênese em dois reatores diferentes, de modo a criar condições ambientais adequadas para cada grupo de microrganismos envolvidos em cada fase. Dessa forma, espera-se aumentar a estabilidade e facilitar o controle geral do processo (Hallenbeck; Ghosh, 2009). Outra característica relevante das duas séries de reatores, um dedicado à produção de ácidos e outro à conversão em metano, reside em seus benefícios operacionais significativos, como elevada taxa de carga volumétrica, estabilidade operacional consistente e a geração simultânea de H_2 e CH_4 (Chen *et al.*, 2019).

Os quatro estágios de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese ocorrem em sucessão em um único reator para decomposição de matérias orgânicas e produção de biogás, que consiste principalmente de metano (CH_4 , 45-70%), dióxido de carbono (CO_2 , 25-50%), nitrogênio (N_2 , 0-5%), amônia (0-0,5%) e sulfeto de hidrogênio (0-0,05%) (Ali *et al.*, 2022). Vários substratos são usados para produzir hidrogênio, como materiais ricos em açúcar, ricos em amido, ricos em celulose ou resíduo (Lunprom *et al.*, 2019).

No entanto, a digestão anaeróbia separa em dois estágios o hidrolítico-acidogênico do metanogênico para produzir biohitano, que é composto de CH_4 (50-55%), hidrogênio (H_2 , 10-15%), CO_2 (30-40%), e traços de sulfeto de hidrogênio. Em comparação com os métodos convencionais, a digestão anaeróbia não só melhora a recuperação de H_2 , mas também aumenta a produção de produção de CH_4 e diminui o tempo de digestão. É essencial investigar a geração de biohitano por meio desse recurso (Ali *et al.*, 2022).

Para Huang *et al.* (2021) a fermentação anaeróbia em dois estágios, separa a acidificação/ hidrogenogênese (primeiro estágio) da metanogênese (segundo estágio) mostrou maior recuperação de energia e menor tempo de fermentação para converter biomassa residual em biohitano do que a fermentação anaeróbia única tradicional (Liu *et al.*, 2018).

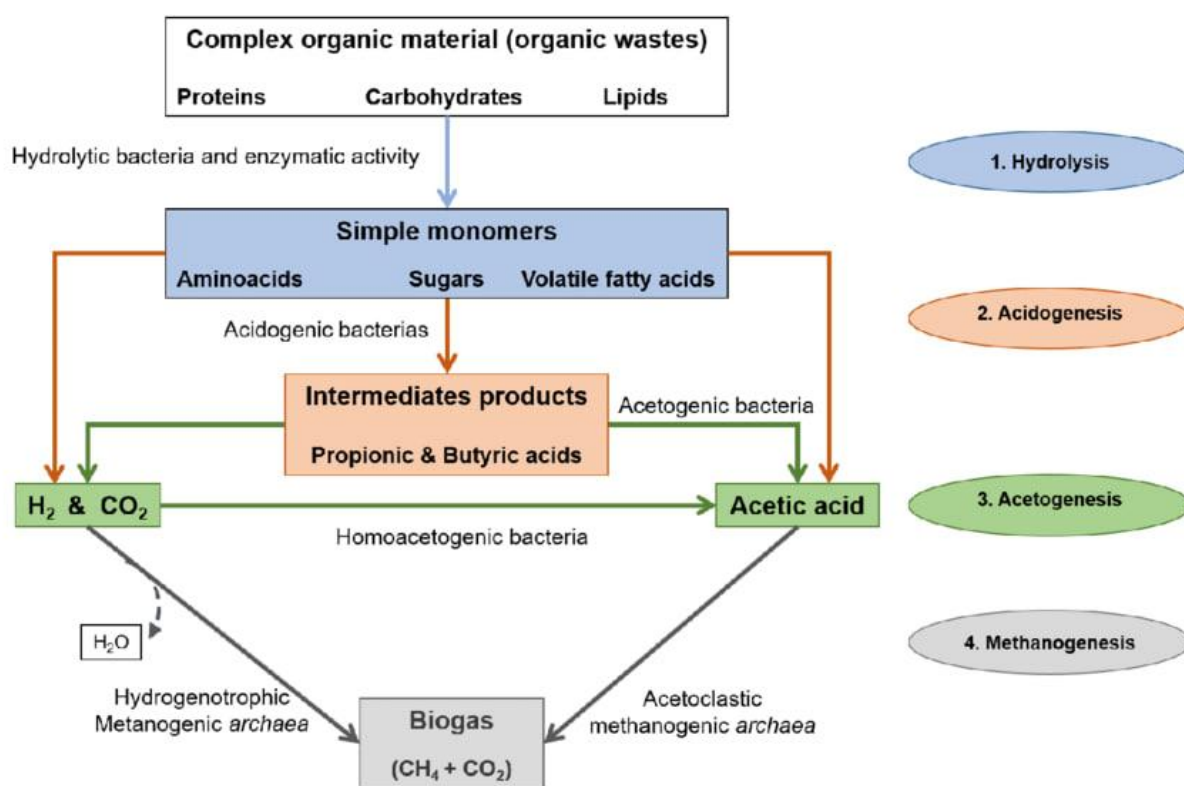
A maioria das pesquisas tem se concentrado no monitoramento da digestão anaeróbia para produção de CH_4 , embora tenha havido relatórios limitados sobre o monitoramento do processo de bio-hidrogênio, que é uma etapa crítica na fermentação e um produto energético

valioso. Ao contrário da produção de biometano por digestão anaeróbia, os reatores de produção de H_2 acumulam ácidos graxos voláteis em pH baixo.

Considerando essa perspectiva, a vinhaça pode ser tratada de forma biológica por meio da digestão anaeróbia, que apresenta vantagens em relação à digestão aeróbia. Entre elas, destacam-se o menor consumo de energia, pois não requer aeração, o que reduz os custos operacionais e a geração de lodo. Importa salientar que esse processo possibilita também a produção de ácidos orgânicos, como o acético, o butírico e o propiônico, com valor comercial, além da recuperação de energia na forma de metano, em reatores metanogênicos, ou de hidrogênio, em reatores acidogênicos (Couto, 2021).

Sob tal perspectiva, a digestão anaeróbia consiste na forma simplificada de quatro processos biológicos: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, Figura 4. Duas destas etapas são importantes para o aproveitamento energético da vinhaça e do melaço convertendo substratos orgânicos por meio de uma comunidade microbiana complexa: a acidogênese, produzindo H_2 , e a metanogênese, produzindo CH_4 .

Figura 4: Etapas da digestão anaeróbia.



Fonte: McCarty (1964); Lettinga, (1995); Gahlot *et al.*, (2021).

A hidrólise da matéria orgânica complexa constitui uma etapa fundamental no processo de biodegradação anaeróbia, sendo o estágio inicial da digestão anaeróbia. Nesse contexto, a transformação de substratos orgânicos insolúveis, como carboidratos, proteínas e lipídeos, em monômeros e polímeros solúveis é catalisada por enzimas extracelulares, incluindo celulasas, proteases e lipases, secretadas por microrganismos fermentativos. Esse processo permite a conversão de proteínas em aminoácidos, lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa e polissacarídeos em açúcares simples (Lohani; Havukainen, 2017).

Os microrganismos envolvidos na hidrólise são predominantemente bactérias facultativas, capazes de sobreviver em condições aeróbias e anaeróbias. No entanto, a hidrólise representa um processo limitante na taxa de digestão de substratos com elevada concentração de sólidos suspensos (SS) e alta demanda química de oxigênio (DQO). Essa limitação não está necessariamente relacionada à atividade enzimática, mas sim à disponibilidade da superfície acessível dos substratos e à sua estrutura físico-química. Ademais, em condições de baixas temperaturas, a hidrólise pode restringir a eficiência global do processo e, conseqüentemente, influenciar o projeto de reatores anaeróbios (Lohani; Havukainen, 2017; Van Lier; Mahmoud; Zeeman, 2008). Dentre as bactérias com capacidade hidrolítica, os gêneros como *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Butyvirbio*, *Bacillus*, *Acetivibrio* e *Eubacterium* atuam nessa etapa (Parkin; Owen, 1986; Das; Veziroglu, 2001).

Os produtos da hidrólise são fundamentais para a subsequente fase acidogênica, onde são metabolizados por bactérias acidogênicas. Embora a hidrólise seja predominantemente um processo biológico na digestão anaeróbia, também pode ocorrer por vias eletroquímicas. No entanto, substratos complexos, como lignina, celulose e hemicelulose, apresentam elevada resistência à degradação devido à sua estrutura química robusta, exigindo a adição de enzimas específicas para otimização da hidrólise (Meegoda *et al.*, 2018).

A taxa da hidrólise pode atuar como fator limitante do processo, embora estudos indiquem que a metanogênese também possa ser um fator determinante, dependendo da relação entre microrganismos hidrolíticos e metanogênicos. Diante da relevância da hidrólise para a cinética da digestão anaeróbia, diversos estudos têm se concentrado em estratégias de otimização desse processo, incluindo pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos, especialmente em substratos com elevada composição lignocelulósica. A temperatura ótima da hidrólise situa-se entre 30 e 50°C, com pH ideal variando entre 5 e 7. No entanto, não há evidências de que a atividade hidrolítica seja favorecida em pH inferior a 7 (Meegoda *et al.*, 2018).

A acidogênese representa a segunda etapa da digestão anaeróbia, na qual os produtos da hidrólise, como aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa e açúcares simples, são convertidos principalmente em AGVs, como acetato (CH_3COOH), propionato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) e butirato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), além de hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3) (Lohani; Havukainen, 2017). A composição dos produtos depende das condições do reator, como pH e remoção eficiente do H_2 por microrganismos metanogênicos. Quando a metanogênese é inibida, há acúmulo de produtos mais reduzidos, como propionato e butirato, levando à acidificação do sistema e possível falha do reator (Meegoda *et al.*, 2018).

Na etapa seguinte, a acetogênese, os AGVs produzidos na acidogênese são convertidos em acetato, CO_2 e H_2 por bactérias acetogênicas. A reação de conversão do butirato ocorre conforme a equação: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 6\text{H}_2$. Já o propionato é convertido conforme a equação: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$. Além disso, a homoacetogênese permite a produção de acetato a partir de CO_2 e H_2 : $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$.

Esse equilíbrio depende da interação sintrófica entre bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas, que consomem H_2 e mantêm a pressão parcial em níveis adequados para favorecer a acetogênese. O controle dessas variáveis é essencial para otimizar a conversão de matéria orgânica e evitar a inibição do processo (Meegoda *et al.*, 2018).

A metanogênese, a última etapa, ocorre em condições rigorosamente anaeróbias. As arqueias metanogênicas acetoclásticas transformam o acetato em metano, enquanto as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas fazem essa transformação a partir de CO_2 e hidrogênio, em processos que liberam calor. As primeiras respondem por 70% do metano total produzido, e as segundas pelo restante.

Dessa maneira, a digestão anaeróbia é considerada uma alternativa atraente para o tratamento da vinhaça e obtenção de energia. Porém, as diferentes configurações de reatores anaeróbios e estratégias operacionais para garantir estabilidade na produção de biogás e qualidade da vinhaça biodigerida são questões que precisam ser pesquisadas e aprimoradas (Barros *et al.*, 2017; Kiani Deh Kiani *et al.*, 2022).

Muitos estudos indicam os parâmetros operacionais a serem controlados num processo de digestão anaeróbia, sendo alguns deles o pH, a COV, o TDH, a quantidade de ácidos voláteis, o potencial de oxirredução, a alcalinidade e a razão de nutrientes (C:N:P) e temperatura, sendo este último um fator crítico que influencia a eficiência e a estabilidade desse processo, pois regula a atividade das bactérias que produzem hidrogênio e altera as demandas de nutrientes, a formação de metabólitos finais (Hans e Kumar, 2019).

3.6 Indicadores que influenciam a digestão anaeróbia em reatores

3.6.1 pH

A influência do pH nos processos fermentativos é um fator determinante na eficiência da produção de biogás, especialmente no que se refere à geração de hidrogênio e metano. O controle adequado desse parâmetro é essencial, uma vez que regula as vias metabólicas predominantes, influenciando diretamente a conversão dos substratos e a distribuição dos produtos finais. A otimização do pH torna-se, portanto, uma etapa crítica no projeto de sistemas anaeróbios, garantindo a viabilidade do processo e a maximização do rendimento energético.

Nesse contexto, Dareioti *et al.* (2022) conduziram experimentos em batelada, utilizando uma mistura de substratos composta por fração sólida (FS) e lama de chorume de milho (LCM) na proporção de 95:5 (v/v), para avaliar o impacto do pH na produção de hidrogênio e na composição dos metabólitos formados. Os testes foram realizados em diferentes condições de pH (4,5, 5,0, 5,5 e 6,0), evidenciando que a produção de hidrogênio em pH 4,5 foi mínima, atingindo apenas 40,75 mL. Esses resultados corroboram com achados da literatura, segundo os quais valores de pH mais ácidos podem restringir a atividade metabólica dos microrganismos hidrogenotróficos devido a efeitos inibitórios (Bioresource Technology Reports, 2022).

A máxima produção de hidrogênio foi registrada em pH 5,0, alcançando 1706,69 mL. Entretanto, ao elevar o pH para 5,5 e 6,0, a produção foi reduzida para 1045,53 e 1358,83 mL, respectivamente, indicando que valores superiores ao ótimo podem alterar as vias metabólicas e comprometer a eficiência do processo (Dareioti *et al.*, 2022). Além disso, os testes revelaram a ausência de metano, reforçando que apenas a acidogênese estava ativa nas condições experimentais.

Gensollen *et al.* (2022) destacam que o pH é um dos principais parâmetros responsáveis pelo controle da acetogênese e metanogênese em digestores anaeróbios de dois estágios. Estudos anteriores apontam que a degradação da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos por fermentação escura atinge a maior produção de hidrogênio em pH 5,0 (Ghimire, 2016). De maneira semelhante, Wang *et al.* (2014) observaram que a degradação de sólidos voláteis e a maximização da produção de metano ocorrem em pH 4,7 em digestores anaeróbios de dois estágios, sem produção de hidrogênio na primeira etapa.

Embora a faixa de pH ideal para produção de hidrogênio e metano esteja bem estabelecida, a distribuição e a concentração dos AGVs formados dependem tanto do pH quanto da natureza dos substratos empregados. A composição dos AGVs é um indicativo das vias

metabólicas ativas no sistema: a predominância de ácido butírico favorece a produção de hidrogênio, enquanto a fermentação acidogênica, caracterizada pelo acúmulo de ácido acético, tende a aumentar a geração de metano na digestão anaeróbia de dois estágios (Chen *et al.*, 2021).

3.6.2 Tempo de detenção hidráulica (TDH)

A influência do TDH em reatores anaeróbios é um fator determinante na eficiência da digestão anaeróbia, afetando diretamente a absorção do substrato, a população microbiana e as vias metabólicas envolvidas no processo (Vo; Lay; Lin, 2019; Wang *et al.*, 2013). Nesse sentido, a modulação do TDH pode otimizar a produção de biogás, mas sua redução excessiva pode comprometer a estabilidade do sistema devido ao efeito inibitório de AGVs sobre os microrganismos metanogênicos (Franke-Whittle *et al.*, 2014).

No entanto, a utilização de biorreatores apresenta desafios relacionados à inibição causada por altas concentrações de AGVs, que podem ser tóxicas para os produtores de hidrogênio e, conseqüentemente, resultar em baixos rendimentos de metano (Vo; Lay; Lin, 2019). Para mitigar tais limitações, sistemas de fermentação de múltiplos estágios, como biorreatores de dois compartimentos, têm sido desenvolvidos visando a maior eficiência na conversão de substratos em biogás. Esses sistemas, geralmente configurados como reatores de tanque agitado continuamente (CSTR), destacam-se pela simplicidade do design e pela capacidade de segmentar processos metabólicos distintos (Bolzonella *et al.*, 2018).

O TDH é fundamental na manutenção do equilíbrio entre as fases acidogênica e metanogênica. Em compartimentos dedicados à produção de hidrogênio, variações no TDH afetam diretamente a taxa de produção de hidrogênio (HPR). Estudos indicam que TDHs mais curtos favorecem a produção de hidrogênio, como observado na redução progressiva de 0,6 para 0,12, que resultou em um aumento significativo na produção de H₂ (Elbeshbishy *et al.*, 2017). Além disso, o pH do meio influencia diretamente a atividade microbiana. Valores superiores a 6,5 podem favorecer o consumo de hidrogênio por homoacetogênicos e metanogênicos, reduzindo sua disponibilidade para fermentação hidrogenotrófica.

Em estudo conduzido por Reyna-Gómez *et al.* (2021), a evolução do pH durante a co-digestão de resíduos orgânicos demonstrou uma correlação direta com o TDH. Para um tempo de retenção de 24 h, o pH final foi 5,01, enquanto TDHs menores resultaram em valores mais ácidos (pH 4,70 para 12 h e pH 4,55 para 6 h). A estabilização do pH em 5,5, observada no TDH de 24 h, favoreceu a maior produção de bio-hidrogênio (BH₂), evidenciando que a

manutenção de um ambiente levemente ácido é essencial para otimizar a geração do gás. Já a remoção de sólidos voláteis (SV) apresentou comportamento distinto para cada condição operacional, com reduções de 32,4%, 10,4% e 20% para TDHs de 24 h, 12 h e 6 h, respectivamente (Reyna-Gómez *et al.*, 2021).

Em contrapartida o estudo de Dareioti *et al.* (2022) avaliou os valores de pH e TDH para a digestão anaeróbia em dois estágios de uma mistura de solução de sorgo biomassa com esterco líquido de vaca (95:5 v/v). Testes em batelada indicaram que o maior rendimento de bio-hidrogênio ($0,92 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ de carboidratos consumidos) ocorreu em pH 5,0, enquanto a máxima degradação de carboidratos e produtividade de AGV foram observadas em pH 6,0. A análise do efeito do TDH revelou que a produção de H_2 atingiu um rendimento máximo de $1,68 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ de carboidratos consumidos em TDH 5, com produtividade de $0,13 \text{ L/LR}\cdot\text{d}$. Já a produção de metano apresentou taxa máxima de $0,44 \text{ L/LR}\cdot\text{d}$ em TDH de 25 dias, com rendimento de $295,3 \text{ mL CH}_4/\text{g SV}$ adicionado. Entretanto, a redução do TDH para 20 dias resultou em inibição e/ou sobrecarga do processo, evidenciada pelo acúmulo de AGVs e declínio na produtividade de CH_4 .

4. METODOLOGIA

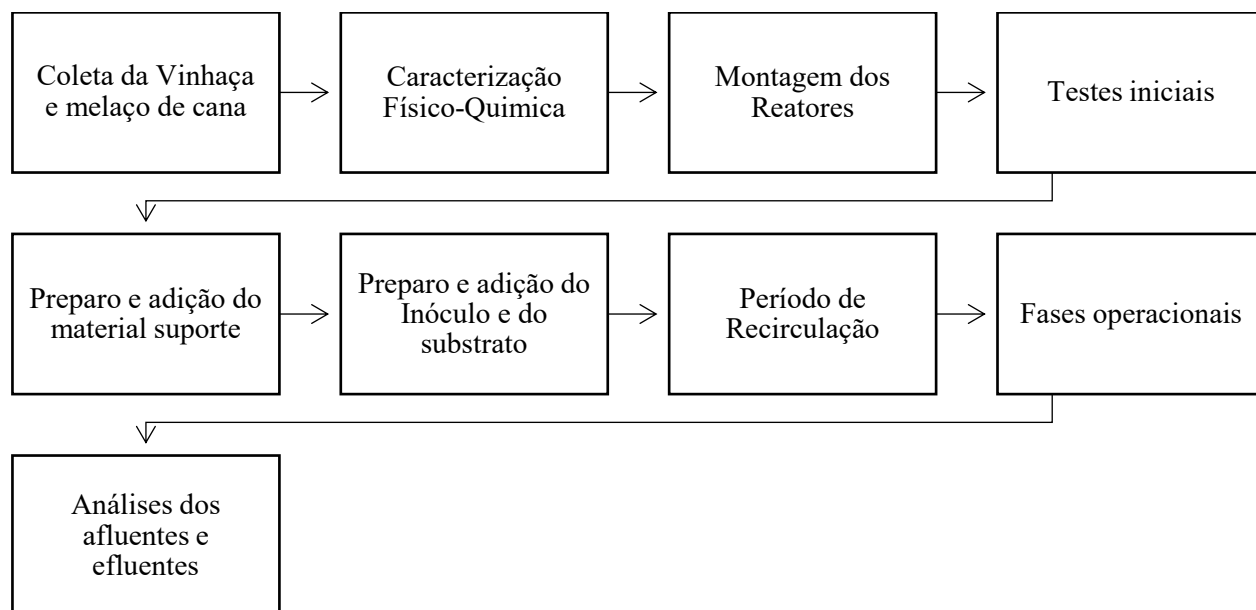
Neste estudo, abordam-se os substratos empregados como matérias-primas para a produção de biohitano, detalhando-se sua caracterização físico-química. Além disso, descreve-se a origem do inóculo, incluindo o tratamento prévio ao qual foi submetido. O material suporte utilizado para promover a aderência da biomassa também é discutido, juntamente com as principais configurações e modos operacionais adotados para o Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF). Os ensaios preliminares e o processo de partida do reator, bem como a adição dos substratos e suas propriedades caracterizadoras são apresentados de forma sequencial e estruturada.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Ambiental (LCA) – FORPETRO, situado no Centro de Tecnologia (CTEC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Campus A/C Simões. As atividades analíticas ocorreram em dois laboratórios distintos: no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), para análises físico-químicas, e no LCA, para avaliações físicas e cromatográficas.

Inicialmente, a metodologia envolveu a coleta dos efluentes destinados à co-digestão (vinhaça e melaço), seguida pela caracterização desses efluentes. Essa caracterização incluiu a quantificação da carga poluidora, utilizando-se parâmetros como o pH, a Demanda Química de Oxigênio (DQO), o teor de carboidratos, sulfato e fósforo.

Para a condução dos experimentos, optou-se por um sistema combinado acidogênico-metanogênico, objetivando a produção de hidrogênio e metano em dois estágios distintos. Os reatores anaeróbios de leito fluidizado foram, portanto, designados como RALF₁ (acidogênico) e RALF₂ (metanogênico). O RALF₁ foi alimentado com vinhaça e melaço oriundos do processamento da cana-de-açúcar, enquanto o RALF₂ recebeu o efluente tratado do RALF₁, configurando um sistema sequencial de tratamento. A Figura 5 ilustra, por meio de um fluxograma, as principais etapas metodológicas desta pesquisa, sintetizando o fluxo operacional adotado.

Figura 5: Fluxograma das etapas e atividades desenvolvidas ao longo da pesquisa.



Fonte: Autor, 2025.

4.1 Substratos

A escolha dos efluentes provenientes do setor industrial de processamento de cana-de-açúcar fundamenta-se em sua elevada carga de matéria orgânica, um dos principais requisitos para a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia. Dessa forma, os substratos utilizados no processo fermentativo, visando à produção de hidrogênio e metano, consistiram em uma mistura de melaço de cana-de-açúcar e vinhaça, ambos subprodutos da indústria sucroalcooleira, amplamente utilizados na produção de refinamento de açúcar e biocombustíveis, respectivamente.

No caso da vinhaça, a coleta foi realizada na usina de cana-de-açúcar em 17 de outubro de 2024. O material coletado foi acondicionado em recipientes plásticos com capacidade variando entre 5 e 20 L e armazenado sob refrigeração a -15 °C, garantindo a preservação de suas características físico-químicas até o momento do uso experimental. Ao longo do experimento, foram realizadas coletas adicionais, totalizando aproximadamente 210 L de vinhaça.

O melaço de cana-de-açúcar, por sua vez, também foi coletado em uma usina de cana-de-açúcar. Assim como a vinhaça, o melaço foi armazenado em um recipiente plástico apropriado, assegurando sua conservação e evitando fermentações indesejadas antes da aplicação nos reatores.

A proporção específica entre os substratos será apresentada no item referente às condições operacionais. Nesse mesmo sentido, o cuidado com a seleção criteriosa das matérias-primas, aliado ao armazenamento adequado, constituiram etapas essenciais para assegurar a estabilidade do processo fermentativo e otimizar a eficiência na conversão da matéria orgânica em biogás.

4.1.1 Caracterização físico-química da vinhaça e do melaço

A caracterização inicial dos substratos empregados no estudo, melaço e vinhaça, foi realizada por meio da determinação da demanda química de oxigênio (DQO), potencial hidrogeniônico (pH) e teores de sulfato, fósforo, sólidos e carboidratos. A composição físico-química desses substratos foi monitorada periodicamente ao longo do experimento, sendo as análises conduzidas conforme os protocolos estabelecidos pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2017).

4.2 Análise dos Afluentes e Efluentes do RALF

Durante todo o experimento, foram realizadas coletas periódicas do afluente e do efluente do reator anaeróbio, bem como monitoramento da produção volumétrica dos gases gerados, visando a avaliação do desempenho dos reatores. As análises foram conduzidas conforme detalhado na Tabela 2, permitindo a identificação de variações nos parâmetros operacionais e sua influência sobre os processos fermentativos.

Tabela 2: Frequência de monitoramento das análises/amostras no reator anaeróbio.

Análises	Frequência	
	RALF ₁	RALF ₂
pH e vazão	Diariamente	Diariamente
DQO	2 vezes/semana	2 vezes/semana
Carboidratos	2 vezes/semana	2 vezes/semana
Ácidos orgânicos e alcoóis	2 vezes/semana	-
Alcalinidade	-	2 vezes/semana
Produção Volumétrica do gás	2 vezes/semana	2 vezes/semana

Fonte: Autor, 2025.

As determinações de pH e Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram conduzidas para ambos os reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF₁ e RALF₂), utilizando-se amostras líquidas representativas de cada fase operacional. A determinação da concentração de

carboidratos foi realizada exclusivamente para o reator acidogênico (RALF₁), a fim de acompanhar a dinâmica da matéria orgânica solúvel durante o processo fermentativo. Já a alcalinidade foi avaliada apenas no reator metanogênico (RALF₂), considerando sua relevância no monitoramento da estabilidade do processo biológico e da capacidade tamponante do sistema.

A concentração de carboidratos foi quantificada por meio da metodologia proposta por Dubois *et al.* (1956), posteriormente corroborada por Lee e Stringfellow (2019) e Lima *et al.* (2016). Esse método baseia-se na reação de açúcares simples e complexos, bem como seus derivados, com fenol e ácido sulfúrico concentrado, gerando uma coloração amarelo-alaranjada estável, permitindo a quantificação espectrofotométrica da concentração de carboidratos, expressa em mg glicose/L. Nesse contexto, a eficiência da remoção de carboidratos ao longo do processo fermentativo foi calculada com base na concentração inicial (afluente) e final (efluente), conforme descrito na Equação 1.

$$\text{Conversão de carboidrato (\%)} = \frac{100 * (\text{carboidrato}_{\text{afluente}} - \text{carboidrato}_{\text{efluente}})}{\text{carboidrato}_{\text{afluente}}} \quad (1)$$

A vazão volumétrica de hidrogênio (VH₂) e metano (VCH₄) foi determinada a partir da média aritmética dos volumes de H₂ e CH₄ medidos consecutivamente em intervalos de um minuto por medida, calculada com base na metodologia proposta por Peixoto (2008), que consiste em medir o volume de gás gerado pelo reator anaeróbio usando um medidor de gás. Com base nesses valores, foi possível calcular a taxa de produção de hidrogênio (HPR) e metano (MPR) e o rendimento de ambos, conforme a equação 2 a 5.

$$HY = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido(mol)}}{\text{Quantidade de glicose consumida(mol)}} \quad (2)$$

$$HPR = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido(L)}}{TDH \text{ (h)} \times \text{Volume útil do reator(L)}} \quad (3)$$

$$MPR = \frac{\text{Quantidade de CH}_4 \text{ produzido (L)}}{TDH \text{ (h)} \times \text{Volume útil do reator(L)}} \quad (4)$$

$$MY = \frac{\text{Quantidade de CH}_4 \text{ produzido(L)}}{\text{Quantidade de DQO consumida (g)}} \quad (5)$$

A formulação matemática dos principais parâmetros utilizados nesta pesquisa, incluindo o rendimento de hidrogênio (HY), a taxa de produção de hidrogênio (HPR), a taxa de produção de metano (MPR) e o rendimento de metano (MY) foram empregados para avaliar a eficiência do processo, permitindo a análise quantitativa do desempenho dos reatores na conversão dos substratos em biogás. O volume de H₂, por exemplo, é obtido pela média aritmética de dez ou mais medições consecutivas, cada uma com duração de um minuto. Somado a isso, a Equação 3 permite estimar a HPR a partir do volume de H₂ produzido, do tempo de medição e do volume útil do reator.

Com base na adaptação metodológica de Ribeiro (2024), o monitoramento da produção de biogás foi realizado com uma frequência de duas medições semanais, abrangendo a determinação dos volumes totais de hidrogênio (H₂) no reator acidogênico (RALF₁) e de metano (CH₄) no reator metanogênico (RALF₂). A medição da vazão volumétrica de hidrogênio foi conduzida pelo método de quantificação direta, utilizando um medidor M Lima Engenharia, com tempo de coleta variando entre 10 e 15 minutos.

Para a determinação do volume total de biogás, adotou-se a metodologia descrita por Walker *et al.* (2009), baseada no deslocamento de uma coluna contendo solução salina acidificada. A acidificação e salinização dessa solução tiveram como objetivo minimizar a dissolução do biogás no meio líquido, garantindo maior precisão na quantificação volumétrica dos gases produzidos, ou seja, foi realizada por meio por um medidor de vazão de gás e um recipiente contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 molL⁻¹. Essa solução atua como agente seletivo na remoção do dióxido de carbono (CO₂) do biogás, permitindo a passagem exclusiva dos gases de interesse. Esse método também foi utilizado por Chaves (2018) e Pereyra (2019).

Os principais indicadores de desempenho avaliados no sistema foram a vazão volumétrica de hidrogênio, a vazão volumétrica de metano, o rendimento de metano e o rendimento de hidrogênio. Esses parâmetros estão diretamente relacionados à eficiência do processo de digestão anaeróbia e à produtividade dos reatores biológicos.

No RALF₂, foi implementada a utilização do bicarbonato de sódio, com o objetivo de manter o pH dentro da faixa ideal para a etapa metanogênica que, que se situa entre 6,5 e 8,5 (Zhang *et al.* 2023). Inicialmente, a dosagem de tamponante foi fixada em 1 gL⁻¹. No entanto, devido a oscilações no pH, possivelmente ocasionadas pelo acúmulo de ácidos voláteis durante a conversão da matéria orgânica, tornou-se necessária uma correção progressiva da alcalinidade. Assim, a dosagem foi ajustada para valores entre 8 e 10 gL⁻¹, garantindo condições favoráveis para a atividade metanogênica e a estabilidade do processo anaeróbio.

4.3 Análise dos metabólitos solúveis

A caracterização dos metabólitos solúveis produzidos no reator acidogênico foi realizada por cromatografia líquida, empregando um cromatógrafo Shimatzu modelo GC 2010, equipado com o software GC Solution e um amostrador headspace HS-20 (Shimadzu). A detecção foi conduzida por ionização de chama (FID), utilizando uma coluna HP-INNOWAX (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) e hidrogênio como gás de arraste. As amostras líquidas de destinadas à determinação de acetona, álcoois e ácidos, foram preparadas utilizando o efeito salting-out.

Para isso, em tubos de 10 mL com tampa rosqueável e septo de silicone branco e azul, foram adicionados 1 g de NaCl, 2 mL da amostra, 70 µL de solução de isobutanol a 1 g/L, 100 µL de ácido crotônico a 700 mg/L e 200 µL de ácido sulfúrico 2 M, conforme metodologia descrita por Adorno *et al.* (2014). Essa abordagem analítica permitiu a quantificação dos principais ácidos orgânicos voláteis (AOVs), incluindo ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico, proporcionando uma avaliação detalhada da dinâmica fermentativa no ambiente reacional.

A Tabela 3 apresenta os limites de detecção dos metabólitos solúveis analisados por cromatografia gasosa conforme metodologia proposta por Ribani *et al.* (2004).

Tabela 3: Limites de detecção dos metabólitos solúveis (ácidos e álcoois).

Metabólitos	Limite de detecção (mg/L)
Etanol	32,72
Acetona	35,63
Metanol	27,78
nButanol	34,98
Acético	54,58
Propiônico	12,90
Isobutírico	20,48
Butírico	16,63
Isovalérico	27,94
Valérico	29,14
Capróico	15,57

Fonte: Calculado de acordo com Ribani *et al.* (2004).

4.4 Inóculo

Os reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF) foram inoculados com lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB utilizado no tratamento de esgoto sanitário. O lodo foi previamente armazenado sob refrigeração, em temperatura controlada entre 1 e 5 °C, visando preservar suas características microbiológicas até o momento da inoculação.

Para a fase acidogênica do sistema (RALF₁), o lodo foi submetido a um pré-tratamento térmico com o objetivo de inibir a atividade de microrganismos metanogênicos, responsáveis pela conversão do hidrogênio e do carbono do meio em metano (Rawoof *et al.*, 2021). Esse tratamento térmico favorece a seleção de bactérias formadoras de esporos produtoras de hidrogênio, garantindo um ambiente propício à fermentação acidogênica (Kim *et al.*, 2006; Maintinguer *et al.*, 2008). O procedimento consistiu no aquecimento do lodo a 90 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento imediato em banho de gelo até atingir 25 °C, Figura 6, conforme metodologia descrita por Maintinguer *et al.*, (2008) e adaptada por Kim *et al.*, (2006).

Figura 6: Tratamento térmico do lodo oriundo de efluente utilizado no tratamento de esgoto sanitário por um reator UASB.



Fonte: Autor, 2025.

Após a realização do pré-tratamento térmico, o lodo foi misturado ao substrato (vinhaça e melaço) e submetido a um processo de recirculação contínua por 48 horas. Esse procedimento teve como finalidade promover a adesão da biomassa microbiana ao material suporte, facilitando a colonização e o estabelecimento das comunidades microbianas no meio reacional.

Para a fase metanogênica (RALF₂), a inoculação foi realizada sem a necessidade de tratamento térmico prévio, uma vez que o objetivo principal desse estágio era a produção de

metano. Dessa forma, o lodo foi utilizado in natura, mantendo a integridade da microbiota metanogênica necessária para a conversão dos produtos gerados no RALF₁ em biogás enriquecido em metano.

4.5 Material Suporte

O material suporte empregado neste estudo foi a argila expandida, cuja escolha se justifica pelo seu desempenho satisfatório na produção de hidrogênio e metano em estudos prévios (Barros *et al.*, 2010; Reis e Silva, 2011; Amorim, 2013; Martins, 2015), bem como pela facilidade de aquisição e pelo baixo custo. Além disso, suas propriedades físicas, como leveza e resistência mecânica, favorecem sua aplicação em sistemas biológicos de tratamento de efluentes.

A determinação da velocidade mínima de fluidização e da vazão de recirculação do meio suporte foi realizada com base em dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga, seguindo a metodologia proposta por Amorim (2009), 1,30 vezes maior que a velocidade mínima de fluidização. Os valores obtidos para essas variáveis, bem como outras características físicas relevantes da argila expandida empregada, encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Características da argila expandida utilizada nos reatores anaeróbios de leito fluidizado.

Parâmetro	Valor
Diâmetro médio	2,8–3,35 mm
Densidade	1,50 g/cm ³
Velocidade mínima de fluidização (VMf)	1,24 cm/s
Propriedades	Rugosidade e porosidade

Fonte: Adaptado de Amorim *et al.*, 2009; Reis e Silva, 2011.

A fim de garantir a adequação das partículas ao processo reacional, a argila expandida foi inicialmente adquirida sob a forma de pedras destinadas ao uso em jardinagem, sendo posteriormente submetida a um processo de trituração por meio de um liquidificador industrial e almofariz com pistilo. Esse procedimento permitiu a obtenção de uma granulometria entre 2,8 e 3,35 mm, correspondente às partículas retidas no meio da peneira granulométrica de aço inoxidável.

Para assegurar a seleção das partículas com densidade adequada, foi conduzido um ensaio de separação em meio líquido. Nesse procedimento, as partículas foram imersas em um

recipiente com água, onde aquelas com densidade superior à da água, e que, portanto, permaneceram submersas, foram selecionadas para compor o leito do reator. Em contrapartida, as partículas que flutuaram foram descartadas. Esse critério de seleção é fundamental, uma vez que a densidade levemente superior à da água garante a permanência das partículas de argila na parte inferior do reator, evitando perdas por arraste no fluxo ascendente do sistema. Por conseguinte, foram pesadas e inseridas no RALF₁ cerca de 205,58 g, já no RALF₂ 176,60 g.

A adaptação da microbiota acidogênica foi conduzida *in situ* no próprio reator, utilizando argila expandida como suporte para adesão microbiana. Esse material poroso favorece a imobilização e retenção da biomassa, promovendo maior estabilidade operacional e eficiência na conversão da matéria orgânica.

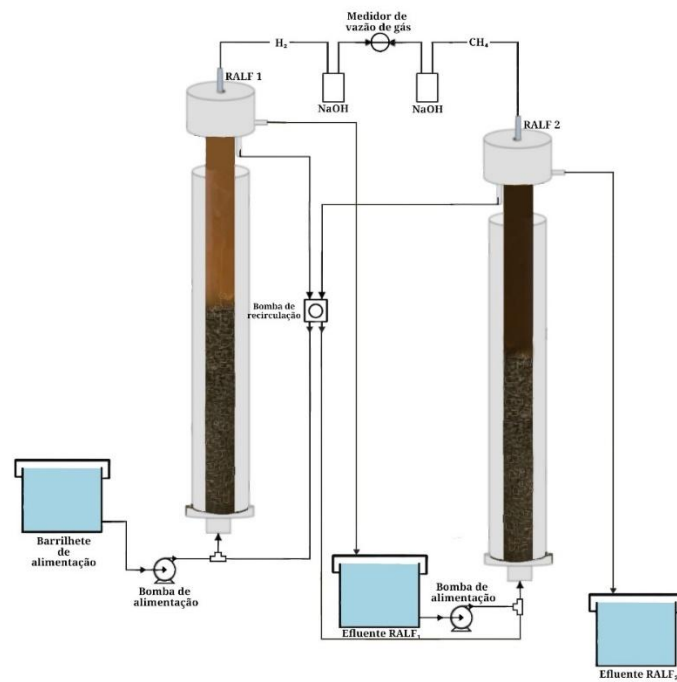
4.6 Configurações do RALFs

O reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) foi empregado neste estudo para a produção do biohitano. Esse sistema reacional caracteriza-se pela utilização de um material suporte inerte, que proporciona a aderência e o crescimento da biomassa microbiana, sendo mantido em suspensão pelo fluxo ascendente do líquido no interior do reator (Busato, 2004). Essa dinâmica favorece a elevada taxa de transferência de substratos e produtos, otimizando a atividade biológica e a eficiência do processo.

A infraestrutura experimental foi conduzida utilizando dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF). Esses sistemas foram instalados em uma configuração integrada, composta por dois reservatórios de armazenamento do afluente, duas bombas de alimentação, uma bomba de recirculação, dois pontos de coleta de efluente e um medidor de gás (M Lima Engenharia Flow), conforme ilustrado nas Figuras 7 e 8. Os reatores foram confeccionados em acrílico transparente, apresentando dimensões de 115 cm de altura, 5 cm de diâmetro interno e 11 cm de diâmetro externo, além de um volume total de 1,2 L. Para permitir a análise separada das frações líquida e gasosa, cada reator foi equipado com um separador gás-líquido.

A alimentação do sistema foi realizada por meio de uma bomba dosadora DOSITEC, modelo DLX MA/A, com vazão máxima de 1 L/h e pressão máxima de 15 Bar. Já a recirculação do fluido foi garantida por uma bomba dosadora ECOSAN, com vazão ajustável entre 10 e 200 L/h e pressão de 6 kg/cm², de acordo as informações disponibilizadas pelo fabricante e ilustrado na Figura 9. O barrilete de alimentação do RALF₁ foi armazenado sob refrigeração a 20 °C, com o objetivo de evitar a fermentação precoce dos substratos antes da introdução no reator.

Figura 7: Esquema de instalação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado ($RALF_1$ e $RALF_2$).



Fonte: Autor, 2025.

Figura 8: Reatores anaeróbios de leito fluidificado ($RALF_1$ e $RALF_2$) em operação.



Fonte: Autor, 2025.

Figura 9: Bombas de alimentação e recirculação respectivamente utilizadas na operação dos reatores.



Fonte: Autor, 2025.

4.7 Testes operacionais iniciais e partida do RALF

Antes do início da operação, foi realizado um teste de estanqueidade do sistema, no qual o reator foi preenchido integralmente com água, garantindo a inexistência de vazamentos. O volume de água necessário para completar o preenchimento do reator nessa condição correspondeu ao volume útil do sistema. Após essa verificação, o material suporte foi inserido até atingir uma altura média entre 33 e 37 cm, correspondente aproximadamente à metade da zona reacional do reator, conforme descrito por Amorim (2009).

A vazão de recirculação foi determinada a partir do produto entre a área da base do reator e a velocidade de recirculação do inóculo. Esse fluxo foi ajustado diretamente na bomba de recirculação para promover a circulação contínua do inóculo entre o barrilete de entrada e o reator, portanto, a vazão foi ajustada de forma distinta para cada reator, sendo de $1,9 \text{ L.min}^{-1}$ para o RALF₁ e $1,8 \text{ L.min}^{-1}$ para o RALF₂.

No reator acidogênico (RALF₁), foi alimentado uma mistura reacional com 10 L (1 L de lodo tratado previamente; 9 L de uma mistura equimolar de melaço e vinhaça a uma concentração fixada em 25 gDQO.L^{-1}), não houve a necessidade de correção do pH, visto que a mistura já estava em um pH em torno de 4,50.

Para o reator metanogênico (RALF₂), foi adicionado 10 L de solução (1 L de lodo; 7 L de efluente do reator acidogênico (70%) e 2 L de uma solução equimolar de vinhaça e melaço (20%)), sendo necessário a adição de 10g de bicarbonato de sódio, correspondendo a 1 g por litro de efluente tratado, para a correção do pH que ficou em torno de 6,50.

Os reatores permaneceram em recirculação contínua por um período de 48 h, permitindo a adaptação microbiológica e a estabilização do biofilme no material suporte antes da operação contínua do sistema. Esse procedimento teve como finalidade a adaptação microbiológica e a estabilização do biofilme no material suporte antes do início efetivo da alimentação do sistema.

Para otimizar as condições fluidodinâmicas do sistema, a velocidade mínima de fluidização (V_{mf}) das partículas de argila expandida foi determinada com base nos parâmetros experimentais descritos por Amorim (2009). Considerando a necessidade de garantir um regime de fluidização adequado, adotou-se um fator de segurança de 1,3 vezes a V_{mf} , estabelecendo-se um valor de referência de $1,24 \text{ cm s}^{-1}$, resultando em uma velocidade operacional de $1,612 \text{ cm s}^{-1}$. Esse ajuste permitiu a manutenção de uma distribuição homogênea do material suporte no leito, otimizando a transferência de massa e o contato entre substrato e microrganismos.

A velocidade de recirculação do inóculo foi estabelecida experimentalmente como 30% superior à velocidade de mínima fluidificação da argila. O controle da recirculação foi realizado por meio da regulação da vazão da bomba responsável pelo escoamento interno do reator, sendo monitorada continuamente por um medidor de vazão acoplado ao sistema. Essa estratégia assegurou a manutenção das condições hidrodinâmicas ideais, favorecendo a estabilidade da biomassa aderida e a eficiência da conversão bioquímica dos substratos fermentescíveis.

4.8 Operação do RALF

A operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF_1 e RALF_2) foram conduzidas de forma contínua, com alimentação diária de substratos à base de melaço e vinhaça diluídos, na proporção 50:50, ou seja, 50% para cada substrato, mantidos em temperatura ambiente. A metodologia experimental adotada foi adaptada de Chaves *et al.* (2018; 2025) e fundamentada no estudo de Nualsri *et al.* (2016), que investigou a produção de hidrogênio e metano em reatores de mistura completa (CSTR) e fluxo ascendente (UASB), respectivamente, utilizando xarope de cana-de-açúcar e melaço com concentração de 25 gDQOL^{-1} .

A carga orgânica volumétrica (COV) foi monitorada por meio da variação progressiva do tempo de detenção hidráulica (TDH), sendo esse um fator determinante na eficiência do processo anaeróbio. O TDH de cada fase operacional foi calculado com base na relação entre o volume útil do reator e a vazão aplicada. Adicionalmente, a taxa de carga orgânica (TCO) foi determinada pelo quociente entre a demanda química de oxigênio (DQO) do afluente fixada em 25 gDQOL^{-1} e o respectivo TDH, conforme expressa a Equação 6. A TCO real aplicada foi obtida a partir da DQO real medida no afluente dividida pelo TDH real (Equação 7), enquanto a TCO real removida foi calculada com base na diferença entre a DQO do afluente e a do efluente, dividida pelo TDH real (Equação 8).

$$TCO_{\text{Teórica Aplicada}} (\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}) = \frac{DQO_{\text{Teórica Afluente}} (\text{g.L}^{-1})}{TDH_{\text{Teórico}} (\text{d})} \quad (6)$$

$$TCO_{\text{Real Aplicada}} (\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}) = \frac{DQO_{\text{Real Afluente}} (\text{g.L}^{-1})}{TDH_{\text{Real}} (\text{d})} \quad (7)$$

$$TCO_{\text{Real Removida}} (\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}) = \frac{[DQO_{\text{Real Afluente}} - DQO_{\text{Efluente}}] (\text{g.L}^{-1})}{TDH_{\text{Real}} (\text{d})} \quad (8)$$

O RALF₁, responsável pela produção de hidrogênio, operou sob três diferentes fases experimentais, com TDH de 6 h (vazão de 2,5 mL.min⁻¹), 4 h (vazão de 3,7 mL.min⁻¹) e 2 h (Vazão de 7,5 mL.min⁻¹). Já o RALF₂, destinado à produção de metano, foi submetido a um TDH fixo de 16 h. As vazões teóricas utilizadas em cada fase foram calculadas conforme a equação 9, enquanto a verificação do TDH real foi realizada com base na equação 10.

$$Vazão_{\text{Teórica}} (\text{mL.h}^{-1}) = \frac{\text{Volume útil do reator (mL)}}{TDH_{\text{Teórico}} (\text{h})} \quad (9)$$

$$TDH_{\text{Real}} (\text{h}) = \frac{\text{Volume útil do reator (mL)}}{Vazão_{\text{Real}} (\text{mL.h}^{-1})} \quad (10)$$

Cada etapa operacional teve duração variável entre 49 e 11 dias, totalizando aproximadamente 102 dias de monitoramento. A Tabela 5 apresenta o delineamento experimental com as condições específicas adotadas para cada fase de operação.

Tabela 5: Fases experimentais de operação do RALF₁ e do RALF₂.

Fase experimental	Tempo de operação (dias)	TDH _{teórico} (horas)	DQO _{teórica} (g.L ⁻¹)	Vazão _{teórica} (mL.h ⁻¹) / (mL.min ⁻¹)
1	49	6	25	150 / 2,5
2	42	4	25	225 / 3,7
3	11	2	25	450 / 7,5
RALF ₂ (Única)	51	16	25	56,25 / 0,9

Fonte: Autor, 2025.

4.9 Cálculo da Eficiência de Conversão e Produção Energética do Biohitano

A eficiência de conversão energética do biohitano, foi estimada com base na metodologia proposta por Nguyen *et al.* (2022), adaptada do modelo teórico desenvolvido por Zhang *et al.* (2020). Esse cálculo fundamenta-se na razão entre a energia efetivamente

produzida pelos gases gerados no processo de digestão anaeróbia e o conteúdo energético potencial presente nos substratos orgânicos utilizados, nomeadamente, a vinhaça e o melaço. Para esse fim, a fórmula empregada para o cálculo da eficiência energética (E), encontra-se expressa em percentual na equação 11.

Nessa equação, VH_2 e VCH_4 representam os volumes de hidrogênio e metano produzidos (em mL), respectivamente, enquanto QH_2 e QCH_4 correspondem aos poderes caloríficos específicos de cada gás, sendo 12,86 J/mL para o H_2 e 35,82 J/mL para o CH_4 (Zhang *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2022). Já os termos Q_{VIN} e Q_{MEL} referem-se ao conteúdo energético da vinhaça e do melaço (em J/g), enquanto m_{VIN} e m_{MEL} denotam as massas (em g) desses substratos adicionados ao sistema reacional.

É importante destacar que os valores utilizados para os conteúdos energéticos dos substratos foram estimados a partir da literatura especializada. No caso da vinhaça, consideraram-se dois valores: 6400 J/g (valor bruto) e 4500 J/g (valor líquido), conforme dados fornecidos por Akram *et al.* (2015). Para o melaço, foi adotado o valor de 2450 J/g, baseado nos estudos de Utchariyajit *et al.* (2019). A consideração desses dados visa garantir maior precisão na estimativa do aproveitamento energético real do sistema.

Complementarmente, para uma análise mais abrangente do desempenho energético do processo, também foi calculada a taxa de produção de energia (em $\text{kJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Este parâmetro foi obtido por meio da multiplicação das taxas volumétricas de produção de hidrogênio (HPR) e metano (MPR) pelos respectivos poderes caloríficos dos gases envolvido

$$\text{Conversão de biohitano (\%)} = \frac{VH_2 * QH_2 + VCH_4 * QCH_4}{Q_{VIN} * m_{VIN} + Q_{MEL} * m_{MEL}} * 100 \quad (11)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo da operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF₁ e RALF₂), alimentados com substratos à base de vinhaça e melaço. As análises abrangeram a caracterização dos substratos, a evolução dos parâmetros operacionais, como vazão e pH, bem como a eficiência do processo em termos de remoção de demanda química de oxigênio (DQO), carboidratos totais e sólidos suspensos.

Além disso, são discutidos os rendimentos e a produção volumétrica dos gases hidrogênio (H₂) e metano (CH₄), bem como as concentrações de metabólitos solúveis gerados durante a digestão anaeróbia. Para o reator metanogênico (RALF₂), avaliou-se, ainda, a alcalinidade, fator determinante para a estabilidade do processo.

Os dados experimentais são apresentados de forma estruturada, por meio de tabelas contendo os valores médios de cada fase operacional e gráficos que evidenciam o comportamento dos parâmetros ao longo do tempo. A análise dos resultados foi realizada em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) e do tempo de detenção hidráulica (TDH), permitindo compreender a relação entre as condições operacionais e o desempenho dos reatores.

5.1 Caracterização Físico-Química da vinhaça e melaço bruto

As análises físico-químicas que caracteriza o efluente tratado foram conduzidas conforme metodologias previamente descritas e os resultados são sintetizados na Tabela 6, possibilitando uma avaliação detalhada da eficiência do sistema na conversão dos substratos em biogás e metabólitos intermediários.

Tabela 6: Características da vinhaça e melaço utilizado nesse estudo.

Parâmetro		Melaço	Vinhaça
Carboidratos totais		554,6 gL ⁻¹	7,90 gL ⁻¹
DQO _{total}		959 gL ⁻¹	30,41 gL ⁻¹
Fósforo		243 gL ⁻¹	-
Sulfato		11,26 gL ⁻¹	-
Ph		5,22	4,5
Sólidos suspensos	Totais	1000,74 gL ⁻¹	984,87 gL ⁻¹
	Voláteis	917,58 gL ⁻¹	974,228 gL ⁻¹
	Fixos	83,15 gL ⁻¹	10,65 gL ⁻¹

Fonte: Autor, 2025.

O melaço apresenta carboidratos totais ($554,6 \text{ gL}^{-1}$ no presente estudo vs. 970 gL^{-1} em Chaves, 2018), enquanto a vinhaça exibe valores muito inferiores ($7,90 \text{ gL}^{-1}$ no presente estudo vs. $10,23 \text{ gL}^{-1}$ Chaves, 2018). A DQO total é notavelmente maior no melaço (959 gL^{-1} vs. $1.088.760 \text{ gL}^{-1}$ em Chaves, 2018), contrastando com a vinhaça ($30,41 \text{ gL}^{-1}$ nesse estudo vs. $39, \text{ gL}^{-1}$ Chaves, 2018).

Tibúrcio *et al.* (2025) observaram que o melaço apresentou valores significativamente mais elevados de demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos voláteis totais (SVT) em comparação à vinhaça. Os valores de DQO e SVT para o melaço foram de $1.169,57 \text{ gDQO/L}$ e $806,40 \text{ mg/L}$, respectivamente, enquanto para a vinhaça esses valores foram de $40,07 \text{ gDQO/L}$ e $23,90 \text{ mg/L}$.

Quanto ao fósforo, o melaço apresenta concentrações relevantes (243 gL^{-1}). Volpi *et al.* (2021) destacaram a variabilidade na composição dos resíduos agroindustriais, evidenciada pela diferença no teor de fósforo (P) entre os lotes de vinhaça analisados. No lote 2, o teor de P foi consideravelmente inferior ao detectado no lote 1, embora ambos os valores estivessem dentro da ampla faixa relatada na literatura ($4\text{--}250 \text{ gL}^{-1}$).

Cortez *et al.* (2020) e Takeda *et al.* (2022) ressaltam que o pH do melaço pode variar entre 5 e 7, dependendo da aplicação industrial, o que pode demandar a realização de pré-tratamentos ácido ou alcalino para adequação do substrato. Em contraste, a vinhaça é um efluente caracterizado por sua coloração escura, odor marcante, pH ácido, alta temperatura e elevada concentração de sólidos minerais e orgânicos. As propriedades da vinhaça, tais como demanda química de oxigênio ($50\text{--}150 \text{ g/L}$), concentração de sólidos voláteis ($20\text{--}60 \text{ g/L}$) e teor de carboidratos ($4,6\text{--}10,2 \text{ g/L}$), apresentam grande variabilidade, influenciadas pela natureza e composição da matéria-prima, bem como pelas condições operacionais do processo industrial.

5.2 Desempenho e Monitoramento do reator acidogênico

A investigação sobre a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizando vinhaça e melaço como substratos foi conduzida ao longo de 102 dias, abrangendo três distintas fases operacionais, cada uma caracterizada por um (TDH) específico. As condições experimentais foram estabelecidas com TDH de 6h (49 dias de operação), 4h (42 dias) e 2h (11 dias), respectivamente. A transição entre as fases foi realizada somente após a estabilização da conversão dos substratos em hidrogênio, garantindo que o sistema atingisse uma dinâmica operacional aparente e sustentável.

O controle do TDH ao longo do experimento foi conduzido por meio da regulação da vazão, ajustada de acordo com o volume operacional do reator (900 mL). As taxas de alimentação foram definidas a partir da relação entre o volume do reator e o TDH correspondente, sendo rigorosamente monitoradas para assegurar a aderência aos parâmetros estabelecidos. A Tabela 7 apresenta as vazões teóricas calculadas e os valores efetivamente aplicados durante as diferentes fases experimentais.

Tabela 7: Vazão teórica e aplicada em função do TDH.

TDH (horas)	Vazão Média (mL.h ⁻¹)
6	150,64 ± 54,34
4	251,37 ± 65,32
2	406,45 ± 64,38

Fonte: Autor, 2025.

5.3.1 pH do RALF₁

A evolução do pH durante a operação do reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF₁) está apresentada na Tabela 8 e ilustrada na Figura 10. O pH médio global do afluente foi de 4,26, apresentando variações entre 4,19 (para um TDH de 2 horas) e 4,35 (para um TDH de 6 horas). Já o efluente apresentou uma média de pH de 3,88, com valores que variaram entre 4,16 (para um TDH de 6 horas) e 3,76 (para um TDH de 2 horas). Esses valores demonstram que o pH permaneceu dentro da faixa considerada adequada para a produção biológica de hidrogênio, conforme reportado na literatura $3,5 \leq \text{pH} \leq 5,5$ (Chaves, 2018).

Tabela 8: Valores médios do pH afluente e efluente em função do TDH no RALF₁.

TDH (horas)	pH Afluente	pH Efluente
6	4,35 ± 0,16	4,16 ± 0,35
4	4,24 ± 0,25	3,72 ± 0,18
2	4,19 ± 0,17	3,76 ± 0,09

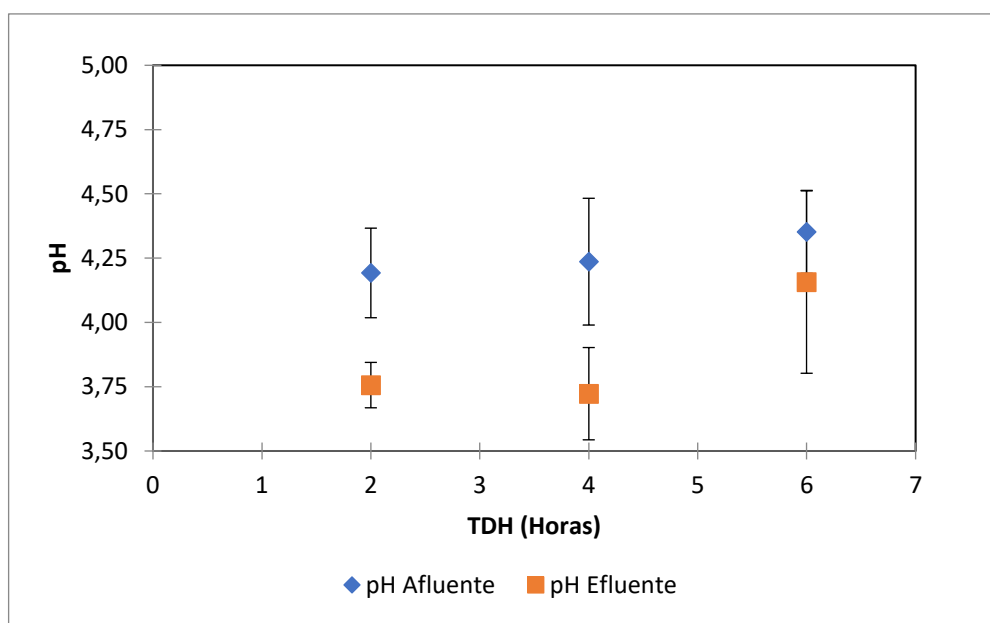
Fonte: Autor, 2025

Ainda na Tabela 8, apresenta a variação do pH do afluente em cada fase operacional do RALF₁, indicando que as flutuações foram mínimas, o que corrobora sua adequação para a fermentação acidogênica e consequente produção de hidrogênio. Como estratégia de controle

para mitigar essa interferência, o reservatório de alimentação foi submetido a um regime de refrigeração, mantendo a solução a uma temperatura entre 19 e 20 °C. Entretanto, observou-se que a solução vinhaça-melaço, devido ao tempo de armazenamento, começou a sofrer fermentação espontânea, impactando tanto o pH do efluente quanto a adaptação da microbiota acidogênica.

A Figura 10 evidencia o comportamento do pH ao longo da operação do reator, revelando a manutenção do meio ácido, fundamental para a conversão eficiente da matéria orgânica em hidrogênio. No entanto, variações pontuais no pH, atribuídas a possíveis vazamentos ou obstruções por biopolímeros, foram detectadas. Apesar dessas oscilações, a produção de hidrogênio não foi comprometida, pois o pH permaneceu dentro da faixa amplamente reconhecida como ideal para a produção biológica de hidrogênio ($3,5 \leq \text{pH} \leq 5,5$), conforme reportado por Chaves (2018).

Figura 10: Variação do pH afluente e efluente em função do TDH no RALF₁.



Fonte: Autor, 2025.

Em estudos semelhantes, a produção de hidrogênio por meio da co-digestão anaeróbia de palha de arroz e lodo de esgoto demonstrou viabilidade mesmo em condições de pH reduzido, sem comprometer a estabilidade do processo. Conforme Kim *et al.* (2012), a faixa de pH entre 4,5 e 5,5 favoreceu a inibição de bactérias consumidoras de hidrogênio, resultando em maior eficiência na geração do biogás.

Albanez *et al.* (2018) investigaram a produção de hidrogênio por co-digestão de vinhaça e melaço em um reator AnSBBR, evidenciando o impacto direto da vinhaça na acidificação do

meio. A adição desse substrato reduziu o pH e aumentou a concentração de ácidos voláteis totais, reforçando sua natureza altamente acidificada. A geração de ácidos voláteis ocorreu em todas as condições, característica da fase acidogênica essencial à produção de hidrogênio. O sistema manteve estabilidade, com um pH médio de $4,5 \pm 0,2$ no efluente, demonstrando condições favoráveis à conversão fermentativa da matéria orgânica.

Estudos anteriores, como o de Yeshanew *et al.* (2016), corroboram a influência do pH na eficiência da produção de biohitano. Os autores avaliaram um sistema integrado de digestão anaeróbia com reatores de tanque continuamente agitado (CSTR) e leito fixo (AFBR) e observaram uma tendência decrescente da taxa de produção de hidrogênio durante os primeiros 15 dias de operação, associada à redução do pH de 6,1 para aproximadamente 4,5. Essa acidificação foi atribuída à solubilização intensificada da matéria orgânica e ao acúmulo de ácidos voláteis, o que afetou negativamente a atividade das bactérias fermentativas. Além disso, a recirculação do efluente do AFBR para o CSTR foi apontada como uma estratégia eficaz para fornecer alcalinidade ao sistema, mantendo o pH em intervalos ótimos (5,0–5,3) para as bactérias produtoras de hidrogênio.

5.3.2 Concentração de carboidratos no RALF₁

A Tabela 9 apresenta a variação das concentrações de carboidratos totais, expressos em glicose, nas correntes afluente e efluente do reator, considerando diferentes (TDHs). Observou-se que a concentração afluente variou de 15992 mgL^{-1} (TDH de 2 h) a 19590 mgL^{-1} (TDH de 6 h), evidenciando um incremento de 22,48% ao longo do tempo de operação. Por outro lado, a concentração efluente variou de 4978 mgL^{-1} (TDH de 2 h) a 7023 mgL^{-1} (TDH de 6 h), o que representa um aumento de 41,05% entre os extremos avaliados.

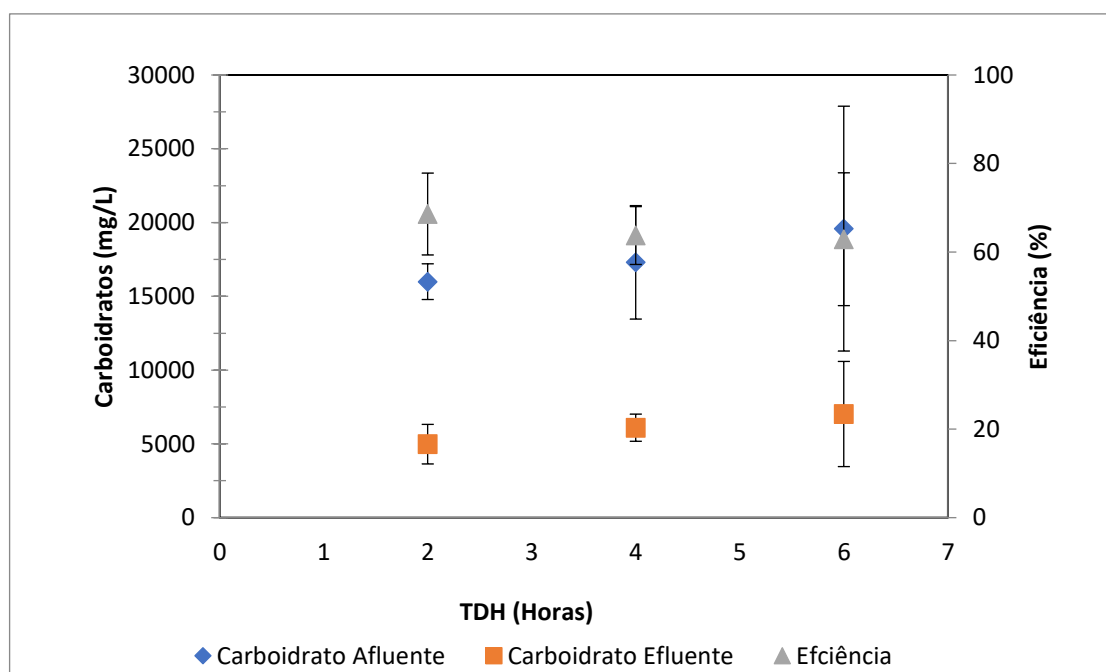
Tabela 9: Valores médios da Concentração de Afluente e Efluente Carboidratos Totais em função do TDH.

TDH (horas)	Afluente (mgL^{-1})	Efluente (mgL^{-1})	Eficiência (%)
6	19590 ± 8296	7023 ± 3563	$62,90 \pm 15$
4	17304 ± 3844	6097 ± 921	$63,73 \pm 6,53$
2	15992 ± 1209	4978 ± 1341	$68,59 \pm 9,25$

Fonte: Autor, 2025

A eficiência de conversão de carboidratos totais apresentou um comportamento crescente com a redução do TDH. No TDH de 6 h, a taxa de remoção foi de $62,90 \pm 15\%$, aumentando para $63,73 \pm 6,53\%$ no TDH de 4 h e atingindo seu valor máximo de $68,59 \pm 9,25\%$ no TDH de 2 h. Ao analisar a variação percentual na Figura 11, observa-se que a eficiência de remoção aumentou 1,32% ao passar de 6 h para 4 h, enquanto a maior variação ocorreu entre 4 h e 2 h, com um acréscimo de 7,63% na taxa de remoção. No total, a eficiência de conversão dos carboidratos aumentou 8,97% entre os extremos operacionais (6 h e 2 h), evidenciando que a redução do TDH favoreceu o metabolismo microbiano e, consequentemente, a degradação da carga orgânica.

Figura 11: Variação da Concentração de Afluente e Efluente Carboidratos Totais em Função do TDH.



Fonte: Autor, 2025.

A menor eficiência foi registrada no TDH de 6 h, o que pode estar associado a uma menor taxa de renovação do substrato, possibilitando a acumulação de metabólitos inibidores no meio reacional e possivelmente devido a variações na composição da vinhaça utilizada como substrato, coletada em diferentes pontos do processo produtivo. Já no TDH de 2 h, a maior taxa de remoção sugere que o tempo de detenção hidráulica mais curto resultou em um ambiente mais dinâmico, promovendo uma maior conversão da matéria orgânica disponível.

Santos *et al.* (2014) investigaram o efeito do TDH na produção de hidrogênio termofílico (55 °C) em um reator anaeróbio de leito fluidizado (AFBR), utilizando diferentes proporções de vinhaça e glicose (5.000 mg DQO L⁻¹). Os resultados indicaram que a conversão

máxima de carboidratos (52,6%) foi obtida com um TDH de 8 horas e uma composição de 67% de glicose e 33% de vinhaça. Com a redução do TDH de 8 para 2 horas, a conversão manteve-se em 50%, diminuindo para 41% em um TDH de 1 hora, evidenciando o impacto do tempo de retenção na eficiência do processo. Os dados aqui obtidos indicaram tendência oposta: a eficiência aumentou de 62,90% para 68,59% com a redução do TDH de 6 para 2 horas.

Ramos e Silva (2018) avaliaram os efeitos do TDH e da cofermentação de vinhaça e soro de queijo na produção de hidrogênio utilizando reatores anaeróbios de leito fluidizado (AFBR-V e AFBR-V-CW). O AFBR-V foi operado por 240 dias, enquanto o AFBR-V-CW permaneceu em operação por 270 dias. A conversão de carboidratos no AFBR-V variou entre $49,2 \pm 10,1\%$ no TDH de 2 horas e $58,4 \pm 5,7\%$ no TDH de 6 horas.

No AFBR-V-CW, a conversão de carboidratos aumentou de $42,9 \pm 7,8\%$ para $77,1 \pm 4,9\%$ com o aumento da relação soro de queijo:vinhaça (CW:V) de 2:10 para 10:10 g L⁻¹. Esse incremento na conversão de carboidratos foi atribuído à maior disponibilidade de substratos provenientes do soro de queijo, que favoreceu a atividade microbiana e intensificou o processo fermentativo. No caso deste estudo a elevação na conversão de carboidratos pode ser relacionada à co-digestão, reconhecida por Ramos e Silva (2018) como estratégia eficaz para intensificar a atividade fermentativa.

5.3.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) RALF₁

A demanda química de oxigênio (DQO) afluenta apresentou uma média global de 28.154 mg/L, enquanto a DQO média do efluente foi de 19.767 mg/L, resultando em uma eficiência média de remoção de 30% ao longo das diferentes fases operacionais do reator acidogênico. A Tabela 10 apresenta a variação da DQO afluenta e efluente em função do tempo de detenção hidráulica (TDH), bem como a eficiência de conversão da matéria orgânica.

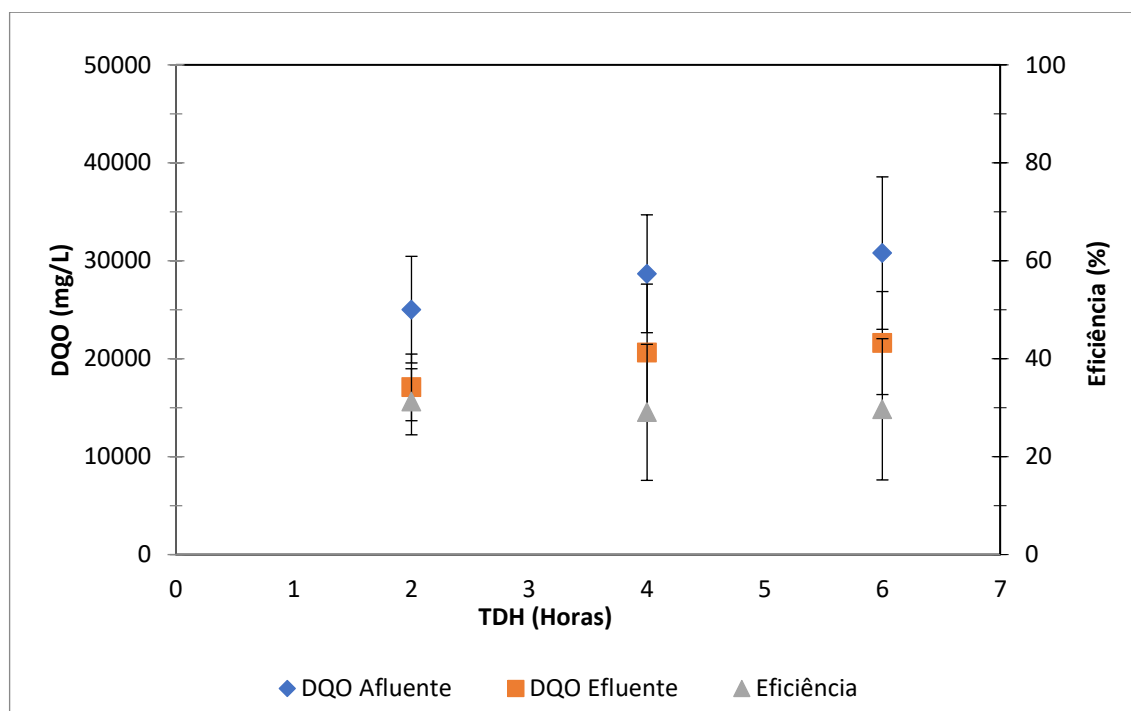
Tabela 10: Valores médios de DQO no afluenta e efluente e eficiência de conversão por fase do RALF₁.

TDH (h)	DQO Afluenta (mg/L)	DQO Efluente (mg/L)	Eficiência (%)
6	30783 ± 7782	21600 ± 5259	30 ± 14
4	28671 ± 6016	20627 ± 6993	29 ± 14
2	25008 ± 5446	17073 ± 3405	31 ± 7

Fonte: Autor, 2025.

A concentração de DQO, como pode-se observar na Figura 12, no afluente variou entre 30783 mg/L (TDH de 6 h) e 25008 mg/L (TDH de 2 h), representando uma diferença de 18,8% entre os valores extremos. A DQO no efluente, por sua vez, oscilou entre 21600 mg/L (TDH de 6 h) e 17073 mg/L (TDH de 2 h), o que corresponde a uma diferença de 20,9%. A eficiência de remoção de matéria orgânica foi maior no TDH de 2 h (31%), seguido do TDH de 6 h (30%) e do TDH de 4 h (29%).

Figura 12: Variação da DQO no afluente e efluente no RALF₁.



Fonte: Autor, 2025.

O RALF₁ apresentou sua maior taxa de remoção da DQO no TDH de 2 horas, com uma eficiência de 31%. Nos TDHs de 6, 4 e 2 horas, observou-se uma variação na taxa de conversão, resultando em uma média de aproximadamente 30%. O menor desempenho foi registrado no TDH de 4 horas, que apresentou a menor eficiência de remoção da matéria orgânica (29%), possivelmente devido a variações na composição do afluente e no tempo de contato do substrato com a biomassa ativa.

Li e Li (2019) avaliaram a coprodução de hidrogênio e metano em um sistema de digestão anaeróbia de dois estágios (CSTR-IC) utilizando efluentes de melaço. A remoção de demanda química de oxigênio (DQO) no reator CSTR variou entre 32% e 36%, uma vez que as substâncias orgânicas geradas durante a acidificação e hidrólise, como AGVs e etanol, permaneceram no efluente. Além disso, a ausência de produção de metano nesse estágio do

processo evidenciou a predominância da fase acidogênica, essencial para a conversão subsequente dos intermediários metabólicos.

Nesta premissa, apesar das variações na concentração da DQO, a eficiência de remoção se manteve relativamente constante entre os diferentes TDHs, com uma variação percentual máxima de 2 pontos percentuais. Isso indica que a conversão biológica da matéria orgânica ocorreu de forma estável, mesmo diante das flutuações na composição do substrato.

A estabilidade dos valores sugere que a adaptação microbiana no reator acidogênico foi eficiente, permitindo a manutenção da remoção da carga orgânica, apesar das diferenças nas características da vinhaça utilizada como substrato. Já a pequena variação na eficiência, indica que o sistema operou dentro de um regime de estabilidade, sem comprometer a conversão da matéria orgânica, mesmo com mudanças na composição do afluente (Barcelos *et al.*, 2022).

5.3.4 Efeito da carga orgânica volumétrica na produção de hidrogênio

A caracterização do comportamento operacional do reator anaeróbio em distintas condições de TDH revela tendências significativas na dinâmica da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada e remanescente. Os dados experimentais apresentados na Tabela 11 indicam que a variação da COV afluente e do TDH desempenha um papel fundamental na eficiência do sistema e na estabilidade do processo fermentativo voltado para a produção de hidrogênio.

Tabela 11: COV médias no afluente e no efluente e eficiência no RALF₁.

TDH (h)	COV Afluente (g DQO/L d)	COV Efluente (g DQO/L d)	Eficiência (%)
6	176,65 ± 65,95	118,35 ± 38,09	29,66
4	259,92 ± 97,26	187,46 ± 88,24	29,05
2	344,37 ± 62,10	233,89 ± 27,23	31,20

Fonte: Autor, 2025.

A análise dos dados demonstra que, à medida que o TDH diminui, há um aumento na COV aplicada, passando de 176,65 g DQO/L d para 344,37 g DQO/L d, o que indica uma maior taxa de carga orgânica sendo introduzida no sistema. Consequentemente, observa-se também um incremento na COV remanescente, o que pode ser atribuído à redução do tempo disponível para a degradação da matéria orgânica dentro do reator. A menor permanência do substrato no meio reacional compromete a conversão completa dos compostos orgânicos, resultando em maiores concentrações residuais no efluente.

A redução progressiva do TDH de 6 para 2 horas, a COV afluenta aumenta substancialmente. Essa elevação na carga orgânica indica uma maior pressão de substrato sobre o reator acidogênico (RALF₁), o que, em princípio, poderia impulsionar a atividade metabólica das comunidades microbianas fermentativas responsáveis pela produção de hidrogênio.

De fato, a maior produção volumétrica de hidrogênio foi observada sob TDH de 2 horas, atingindo $8,90 \pm 2,71 \text{ L H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$, evidenciando que, em condições de maior COV, o sistema foi capaz de manter as taxas de produção. Esse resultado sugere que o aumento da carga orgânica, favoreceu a fermentação acidogênica e, conseqüentemente, a geração de bio-hidrogênio.

No entanto, este incremento na produção ocorre concomitantemente com um aumento das concentrações de matéria orgânica remanescente no efluente, que passou de $118,35 \pm 38,09 \text{ g DQO/L}\cdot\text{d}$ para $233,89 \pm 27,23 \text{ g DQO/L}\cdot\text{d}$, à medida que o TDH foi reduzido. Como resultado, a eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF₁ manteve-se relativamente baixa e constante, variando apenas de 29,05% a 31,20%, mesmo diante do aumento da COV.

Em termos de eficiência, nota-se uma variação não linear, o TDH de 6 horas apresentou uma eficiência de (29,66%), enquanto o menor valor foi registrado para o TDH de 4 horas (29,05%). Houve, portanto, uma queda inicial, seguida de um aumento mais expressivo, com o maior valor observado no TDH de 2 horas (31,20%).

Esse comportamento pode ser explicado por múltiplos fatores, incluindo a taxa de conversão dos substratos fermentáveis, a adaptação da microbiota anaeróbia e a possível inibição causada por elevados teores de COV no sistema.

Estudos anteriores indicam que a influência da COV na produção de hidrogênio. Corona e Razo-Flores (2018) investigaram a produção contínua de hidrogênio e metano a partir do hidrolisado enzimático do bagaço de *Agave tequilana* em processo sequencial. Na etapa acidogênica, a carga orgânica volumétrica (COV) foi o principal parâmetro operacional avaliado. Mantendo-se a COV em $44 \text{ g DQO/L}\cdot\text{dia}$ e controlando-se a homoacetogênese por meio da agitação, obteve-se uma taxa volumétrica de produção de hidrogênio (VHPR) de $6 \text{ L H}_2/\text{L}\cdot\text{dia}$, equivalente a $1,34 \text{ kJ/g}$ de bagaço.

Anzola-Rojas, Fuess e Zaiat (2024) demonstraram que o ajuste específico da COV permitiu a produção estável e contínua de H_2 em reatores de leito compactado ($2,2 \pm 0,2 \text{ L H}_2/\text{L}\cdot\text{dia}$) e estruturado ($1,0 \pm 0,3 \text{ L H}_2/\text{L}\cdot\text{dia}$). O controle da biomassa foi essencial para a estabilidade operacional, embora a atividade fermentativa tenha sido prejudicada no leito estruturado, com inibição parcial da via homoacetogênica, que respondeu por menos de 30%

do ácido acético total. Já no presente estudo a presença de ácido acético foi constante ao longo do processo, e o controle da COV foi decisivo para a estabilidade operacional.

Resultados semelhantes foram obtidos por Saidi, Hamdi e Bouallagui (2023), que avaliaram a digestão anaeróbia de resíduos de tâmara em dois estágios com COVs crescentes. A maior taxa volumétrica de produção de hidrogênio (0,76 L H₂/L.dia) e o maior rendimento específico (81 L H₂/kg SV) foram alcançados com uma COV elevada de 11,74 g SV/L.dia.

5.3.5 Produção Volumétrica e Rendimento de Hidrogênio em função do TDH

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para esses parâmetros ao longo do experimento. Os resultados demonstram um aumento expressivo na produção volumétrica de hidrogênio com a redução do TDH, corroborando estudos anteriores que indicam maior eficiência do processo fermentativo sob tempos de detenção mais curtos.

Tabela 12: Produção Volumétrica e Rendimento de Hidrogênio em função do TDH.

TDH (Horas)	Produção Volumétrica de Hidrogênio (L.h ⁻¹ L ⁻¹)	Rendimento de Hidrogênio (mol H ₂ .mol glicose ⁻¹)
6	0,20 ± 0,13	0,74 ± 0,49
4	1,03 ± 0,20	0,81 ± 0,38
2	8,90 ± 2,71	1,12 ± 0,01

Fonte: Autor, 2025.

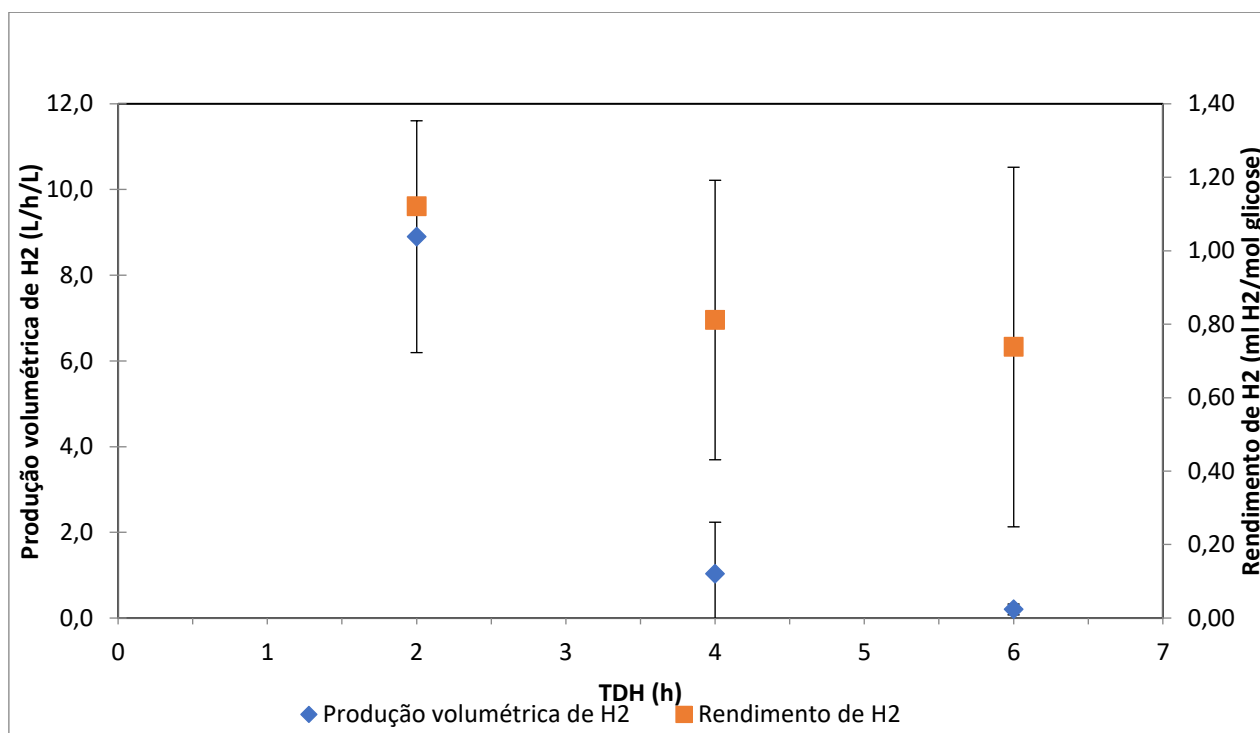
A produção volumétrica de hidrogênio aumentou significativamente de 0,20 L.h⁻¹L⁻¹ (TDH de 6 h) para 8,90 L.h⁻¹L⁻¹ (TDH de 2 h), 44,5 vezes maior em relação ao valor inicial. Esse comportamento pode ser atribuído à maior taxa de renovação do meio reacional, favorecendo a acidogênese e o metabolismo de bactérias produtoras de hidrogênio (Cabrol *et al.*, 2017).

O rendimento de hidrogênio seguiu a mesma tendência, evidenciando um aumento progressivo com a redução do TDH. Observou-se um incremento de 0,74 mol H₂mol⁻¹ de glicose no TDH de 6 h para 1,12 mol H₂mol⁻¹ de glicose no TDH de 2 h. Ao reduzir o TDH para 2 h, foi possível alcançar um rendimento máximo de 1,12 mol H₂mol⁻¹ de glicose, indicando que o sistema operou em condições favoráveis para a conversão da matéria orgânica em hidrogênio.

Portanto, no experimento obteve-se uma média global de $3,38 \text{ L.h}^{-1}\text{L}^{-1}$ para a produção volumétrica de hidrogênio e de $0,89 \text{ mol H}_2\text{mol}^{-1}$ de glicose para o rendimento do processo. Esses valores reforçam a influência direta do tempo de detenção hidráulica na eficiência do sistema, evidenciando que menores TDHs promovem uma intensificação da produção.

A produção volumétrica de hidrogênio e seu rendimento em função do tempo de detenção hidráulica (TDH) foram avaliados, conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13: Produção volumétrica e rendimento H_2 em função do TDH.



Fonte: Autor, 2025.

Ramos e Silva (2018) observaram que a redução do tempo de retenção hidráulica ($\text{TRH} < 6 \text{ h}$) resultou na diminuição do rendimento de hidrogênio (HY) e da taxa de produção de hidrogênio (HPR). O valor máximo de HY ($1,01 \pm 0,06 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$) foi registrado no TRH de 6 horas, indicando que tempos de retenção mais curtos comprometem a eficiência da produção de hidrogênio. Além disso, a fermentação no RALF_1 , foram predominantemente conduzidas pela via metabólica acética, evidenciando a importância desse percurso na bio-hidrogênese. Em contrapartida, nesse experimento a redução do TDH aumentou a produção.

Rego *et al.* (2022) investigaram a bioconversão da vinhaça de cana-de-açúcar pré-tratada em hidrogênio, utilizando reatores anaeróbios de leito fluidizado. O maior rendimento ($1,06 \pm 0,15 \text{ mmol H}_2 \text{ g DQO}^{-1}$) e a máxima taxa de produção ($6,42 \pm 1,46 \text{ L H}_2 \text{ dia}^{-1} \text{ L}^{-1}$) foram alcançados no TDH de 2 h, com maior $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ nos efluentes dos reatores. Os resultados

indicam que o pré-tratamento e o ajuste operacional podem otimizar a etapa acidogênica da digestão anaeróbia da vinhaça, promovendo maior geração de hidrogênio.

Reis *et al.* (2015) reportaram um HY máximo de $3,07 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$ em um AFBR operando a 22°C , no TDH de 6 horas, utilizando uma relação vinhaça:glicose de 1:3, com $5.000 \text{ mg DQO L}^{-1}$. Esses resultados reforçam o potencial da vinhaça como substrato para a bio-hidrogênese em diferentes condições operacionais.

5.3.7 Produção de metabólitos

A vinhaça e o melaço configuram-se como matrizes orgânicas de elevada complexidade, cuja composição pode variar significativamente em função das condições sazonais e das especificidades operacionais inerentes ao processamento do açúcar e do etanol. Essas variações influenciam diretamente as rotas fermentativas microbianas, modulando a produção de metabólitos secundários, incluindo alcoóis e ácidos orgânicos.

No presente estudo, a operação do Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF₁) resultou na detecção de etanol (EtOH) e ácido acético (HAc) como os principais produtos metabólicos, sendo suas concentrações monitoradas ao longo do (TDH). Os dados apresentados indicam uma relação inversamente proporcional entre o TDH e a produção de etanol, evidenciando um incremento em sua concentração à medida que o TDH foi reduzido, Tabela 13.

Tabela 13: Distribuição de Metabólitos Solúveis em Função do TDH no RALF₁.

TDH (h)	EtOH (%)	HAc (%)
6	25,8	74,2
4	29,8	70,2
2	31,3	68,7

Fonte: Autor, 2025

Sob condições de TDH reduzido (2 h), a concentração de etanol atingiu seu pico ($31,3 \text{ mg/L}$), o que pode ser atribuído à intensificação da glicólise, favorecendo a conversão de açúcares fermentescíveis em etanol. Concomitantemente, a redução na concentração de ácido acético sugere um possível desvio metabólico, no qual o fluxo de carbono é preferencialmente direcionado para a produção de etanol em detrimento da acidogênese (Ezeji *et al.*, 2010).

A predominância do ácido acético ao longo do experimento pode ser justificada pelo papel central desse metabólito na fermentação anaeróbia, sendo frequentemente acumulado em sistemas nos quais a metanogênese encontra-se inibida ou limitada (Yin *et al.*, 2022). Tal padrão é compatível com a hipótese de que a acidogênese se estabeleceu como rota metabólica majoritária nas condições operacionais avaliadas.

Nesse sentido, a presença do ácido acético nos metabólitos solúveis indica uma preferência da via fermentativa acética na produção de hidrogênio, conforme descrito na equação correspondente. Os dados experimentais revelaram que a maior concentração desse ácido foi observada no Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 6 horas, atingindo 7393,6 mg/L (equivalente a 123,1 mM). Esse achado sugere que, sob essas condições operacionais, a conversão dos substratos favoreceu predominantemente a formação de ácido acético, consolidando sua importância na rota metabólica envolvida na bioprodução de hidrogênio (Harirchi *et al.*, 2022).

Adicionalmente, verificou-se que a presença de etanol em todas as fases do experimento decorre, possivelmente, da natureza do resíduo utilizado. Como esses substratos utilizados são oriundos do setor sucroalcooleiro, é plausível que esse composto não tenha sido exclusivamente gerado pela digestão anaeróbia, mas sim represente um constituinte inerente da matéria-prima utilizada. Essa hipótese é reforçada pela observação de concentrações elevadas de etanol mesmo em condições que favorecem a acidogênese, sugerindo um impacto significativo da composição inicial do substrato nos perfis metabólicos obtidos.

Os dados quantitativos obtidos para o etanol e o ácido acético, expressos tanto em mg/L quanto em mmol/L, são apresentados na Tabela 14. Vale ressaltar que para o ácido acético, reflete a variabilidade inerente ao processo fermentativo e as condições operacionais empregadas (Yin *et al.*, 2022).

Tabela 14:Concentrações de Etanol e Ácido no RALF₁.

TDH (h)	EtOH (mg/L)	EtOH (mmol/L)	HAC (mg/L)	HAC (mmol/L)
6	1968,6 ± 528,9	42,7 ± 11,5	7393,6 ± 4386,2	123,1 ± 73,0
4	2394,5 ± 441,1	52,0 ± 9,6	7345,2 ± 3293,4	122,3 ± 54,8
2	2052,6 ± 544,1	44,6 ± 11,8	5863,3 ± 3865,1	97,6 ± 64,4

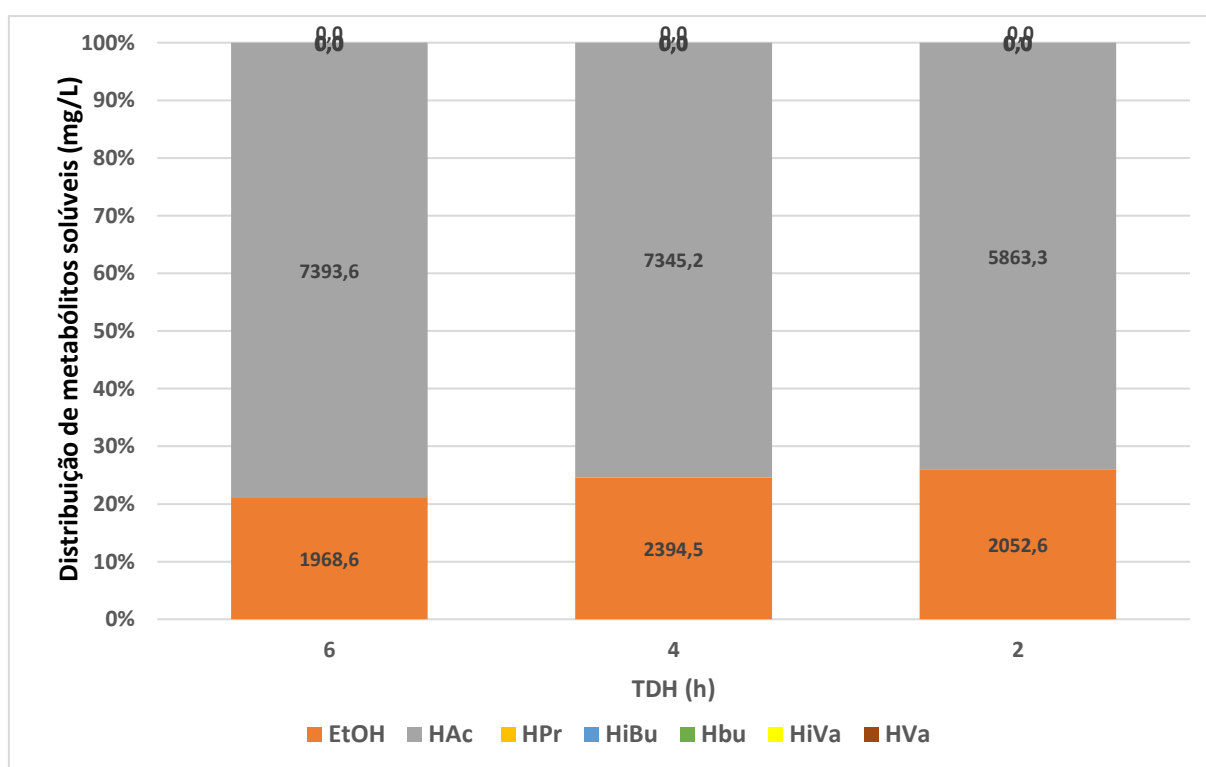
Fonte: Autor, 2025

Os substratos resultantes do setor sucroalcooleiro divergem em suas características físico-química, por exemplo a vinhaça é considerada um substrato orgânico complexo, onde

sua composição pode sofrer alterações no decorrer de cada safra e em procedimentos operacionais do processamento do açúcar e do etanol. Devido a isso, as rotas fermentativas e os ácidos orgânicos podem sofrer alterações.

De acordo com a Figura 14, onde pode-se observar a concentração acumulada de metabolitos (mg/L) à medida que o TDH diminui (6; 4; 2h). Constatou-se que em todas as fases houve a presença do ácido acético e de etanol, visto que o maior índice em relação ao ácido acético foi obtido no TDH de 6h e para o etanol foi para o TDH de 4h. Os demais metabólitos se apresentaram em concentrações menores em comparação aos anteriormente mencionados.

Figura 14: Variação das Concentrações de Etanol e Ácido Acético.



Fonte: Autor, 2025.

A presença de ácidos carboxílicos, especialmente o ácido acético, indica a predominância de rotas metabólicas específicas que favorecem a geração de hidrogênio. Conforme demonstrado pela equação correspondente, a maior concentração de ácido acético foi observada no tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas, atingindo 7393,6 mg/L (123,1 mM), enquanto a maior concentração de etanol foi registrada no TDH de 4 horas, com 2394,5 mg/L (52,0 mM). Esses achados evidenciam um direcionamento para a via fermentativa acética, fundamental para a maximização da produção de hidrogênio.

Os resultados dos metabólitos solúveis demonstram que, neste estudo, as maiores concentrações dos ácidos individualizados foram influenciadas pelo aumento da COV e que a

rota predominante para produção de hidrogênio foi a da fermentação acética. Além disso, o que difere este estudo dos demais relatados é a necessidade de controlar a manutenção dos microrganismos acidogênicos e prevenir a contaminação de outros organismos não produtores de hidrogênio.

Somado a isso, a formação expressiva de ácido acético, observada neste estudo, pode ser atribuída, em parte, à ocorrência da via metabólica da homoacetogênese, a qual envolve a conversão de H_2 e CO_2 em acetato. Essa rota metabólica tanto compete com a produção de hidrogênio, como também representa um importante mecanismo de consumo de H_2 , o que pode justificar a limitação nos rendimentos obtidos (Ren *et al.*, 2022; Tsapekos, Alvarado-Morales e Angelidaki, 2022).

Embora a literatura aponte que, teoricamente, a fermentação que gera apenas ácido acético poderia alcançar um rendimento máximo de 4 mol H_2 /mol de hexose, tal eficiência raramente é atingida em condições reais, devido à complexidade dos fatores que regulam o sistema (Sharma, 2019). Nesse contexto, o ácido acético apresenta duplo papel: ao mesmo tempo em que é um marcador de fermentação eficiente, pode também atuar como agente inibidor da produção de hidrogênio. Os mecanismos de inibição estão associados à acidificação do meio, aumento da força iônica e, principalmente, à presença de ácido acético não dissociado, que compromete a viabilidade celular e a atividade metabólica das bactérias produtoras de H_2 (Yin *et al.*, 2022).

Estudos recentes demonstram que a inibição provocada pelo ácido acético pode afetar diretamente as vias de fermentação, levando à alteração do perfil metabólico, à inibição de microrganismos produtores de hidrogênio e à redução global do rendimento do processo (Yin *et al.*, 2022). Além disso, práticas como a cofermentação vêm sendo sugeridas como alternativas para diluir os inibidores presentes em resíduos orgânicos complexos, como lodo de esgoto ou substratos oriundos da indústria farmacêutica, promovendo a atenuação dos efeitos inibitórios e, conseqüentemente, otimizando a produção de H_2 (Yang e Wang, 2021, Yin *et al.*, 2021).

Cabe destacar que, independentemente das condições experimentais, a formação de inibidores metabólicos é um fenômeno comum nos sistemas fermentativos, sendo frequentemente relacionada à inibição por retroalimentação (feedback inhibition). Nessa perspectiva, estratégias de controle como o ajuste *in situ* do pH, extração de AGVs e diluição do meio de fermentação, vêm sendo investigadas como medidas mitigadoras (Yin *et al.*, 2022).

Constatou-se que a presença de etanol em todas as fases deu-se provavelmente pelo fato do resíduo ser proveniente do setor sucroalcooleiro, sendo provável que eles não tenham

sido gerados pela digestão anaeróbia e, sim, sejam característicos da composição da vinhaça e do melaço.

Estudos anteriores reforçam a relevância dessas vias metabólicas na produção de hidrogênio. De Souza Moraes *et al.* (2019) destacam que o etanol constitui o principal produto das vias solventogênicas em todas as condições, com valores variando entre 2,7 e 5,2 g/L. A maior produtividade de etanol foi observada no ensaio B3 na condição ATV ($30,17 \pm 3,34$ mg/L.h), confirmando que a vinhaça se apresenta como um substrato viável para a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e álcoois de valor agregado. Durante a fase acidogênica, a produção de ácido acético e butírico ocorre de forma exponencial, sendo o acúmulo desses compostos responsável pela redução do pH ($<5,0$), o que favorece a transição para a fase solventogênica (De Souza Moraes *et al.*, 2019).

Os resultados também corroboram com os achados de Couto *et al.* (2020), que identificaram etanol em concentrações de aproximadamente 270 mg/L em apenas algumas amostras. A limitação do processo solventogênico pode estar associada à baixa concentração do metabolismo específico do gênero *Clostridia*. Além disso, os autores observaram que as concentrações de metanol e etanol diminuíram significativamente no final da fermentação, indicando sua conversão para ácido acético via acetogênese pela via de Wood-Ljungdahl.

Albarez *et al.* (2016) também evidenciaram a predominância do ácido acético em todas as condições avaliadas, reforçando que uma alta relação HAc/HBu é um parâmetro indicativo da produção eficiente de hidrogênio em sistemas acidogênicos. Em seu estudo, verificou-se que o aumento da concentração do afluente resultou em um incremento da produção de ácido acético. Os valores registrados foram entre 3,2 - 14,8 mg/L, evidenciando uma tendência crescente sob determinadas condições operacionais, enquanto a fração molar de hidrogênio apresentou um comportamento dinâmico, variando entre 6% e 39%, conforme as condições experimentais.

A análise das condições experimentais revelou que, na condição 8, em que o reator operou em modo de lote, houve um aumento contínuo na concentração de ácido acético e etanol ao longo do ciclo. Já na condição 9, em que o reator operou em modo de lote alimentado, foi observada uma diminuição da concentração de ácido acético durante o período inicial de alimentação (1,5h), justificada pela diluição do meio em função do aumento do volume de líquido no reator. No entanto, após esse período, verificou-se um aumento na concentração de ácido acético durante as últimas 1,5 h, atribuível à geração pelo metabolismo fermentativo (Albarez *et al.*, 2016).

5.4 Desempenho e monitoramento do reator metanogênico RALF₂

5.4.1 Produção de Metano

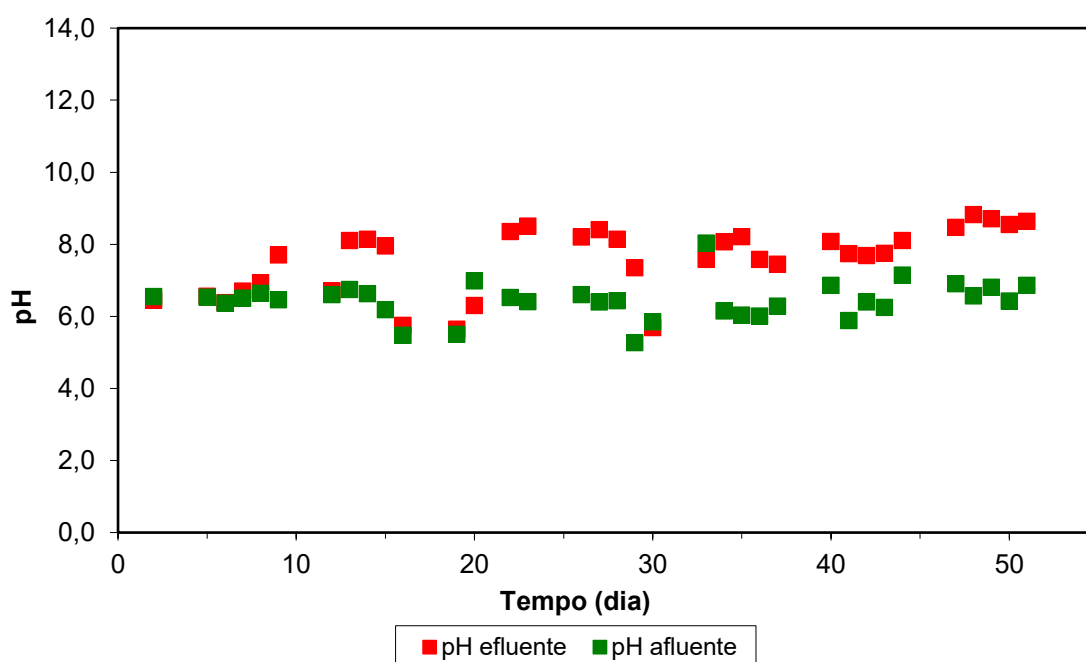
O reator anaeróbio de leito fluidificado metanogênico (RALF₂) foi operado por 51 dias, durante os quais passou por um período de adaptação e posteriormente um TDH fixo de 16 horas. Ao longo desse período, observou-se a progressiva adaptação do sistema e a viabilidade da conversão dos substratos em metano, indicando condições favoráveis para a estabilização do processo metanogênico.

5.4.2 pH do RALF₂

A estabilidade do pH constitui um fator determinante para a eficiência do processo metanogênico, uma vez que as arqueias metanogênicas possuem um intervalo ótimo de desenvolvimento em condição de neutralidade, pH entre 6,5 e 8,0 (Lay, Li, & Noike, 1998; Menzel; Neubauer; Junne, 2020; Berhe; Leta, 2023).

De acordo com a Figura 15, o pH do afluente foi em média, de 6,43 ($\pm 0,51$), enquanto o pH do efluente atingiu 7,58 ($\pm 0,92$). Os valores de pH do afluente e do efluente, evidenciam o efeito do tamponamento no meio reacional.

Figura 15: Variação do pH afluente e efluente do RALF₂ metanogênico.



Fonte: Autor, 2025.

Valores próximos desse experimento foram encontrados na literatura, Tibúrcio *Neto et al.* (2025) demonstraram que o controle do pH foi determinante para a estabilidade do processo anaeróbio na co-digestão de melaço e vinhaça para a produção de metano. Segundo os autores na ausência de ajustes adequados, o acúmulo de ácidos graxos voláteis comprometeria a atividade das arqueias metanogênicas, prejudicando a conversão da matéria orgânica em biogás. Ainda de acordo com o estudo, a correção do pH ao longo do experimento estabilizou os valores entre 7,33 e 7,65, criando um ambiente propício para a produção de metano. Inicialmente, o pH ácido da vinhaça e do melaço, combinado com a alcalinidade moderada do inóculo (6,38), não garantiu condições ideais para a metanogênese, que, segundo Zhang *et al.* (2023), ocorre de forma eficiente na faixa de pH entre 6,5 e 8,5.

Em relação a Figura 15, demonstra-se a evolução do pH ao longo do período experimental. Durante a fase inicial, observou-se uma oscilação considerável nos valores de pH, atribuída à insuficiente capacidade tamponante do bicarbonato adicionado. Essa instabilidade pode ser justificada pelo desequilíbrio entre a produção de ácidos voláteis e a capacidade de neutralização da solução tamponante, afetando temporariamente a atividade metanogênica. Com a adaptação realizada após a fase inicial do TDH para 16 horas, houve uma redução progressiva das flutuações, indicando uma resposta positiva à regulação do pH por meio do ajuste na dosagem de bicarbonato. Esse controle eficaz do pH é fundamental para garantir condições adequadas para a bioconversão do substrato orgânico em metano, maximizando a eficiência do processo biotecnológico.

5.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) do RALF₂

A Tabela 15 apresenta os valores médios da DQO no afluente e no efluente do reator metanogênico (RALF₂), bem como a eficiência de conversão do sistema operando com um TDH de 16 horas.

Tabela 15: DQO média no afluente e no efluente e eficiência de conversão no RALF₂.

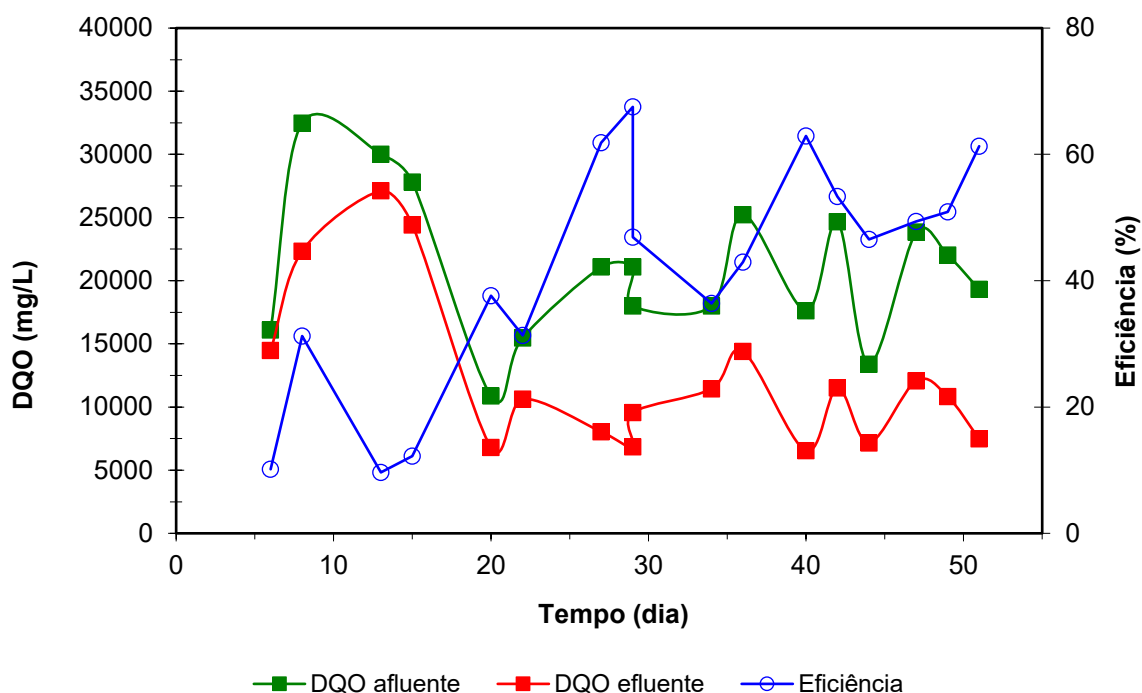
TDH (h)	DQO Afluente (mg/L)	DQO Efluente (mg/L)	Eficiência (%)
16	21001± 5848	12448± 6380	42 ±18

Fonte: Autor, 2025

Os resultados ilustrados na Figura 16, evidenciam que a DQO do afluente foi de 21.001 (± 5.848) mg/L, enquanto a DQO do efluente foi reduzida para 12.448 (± 6.380) mg/L. A

eficiência média de remoção da DQO foi de 42% (± 18), embora os valores indiquem uma atividade de degradação orgânica em curso, associada à expressiva variabilidade observada, sugere um sistema ainda em processo de estabilização, possivelmente condicionado por fatores como a adaptação do consórcio microbiano e as flutuações na carga orgânica (Zhang *et al.*, 2023).

Figura 16: Variação da DQO afluente, efluente e eficiência do RALF₂.



Fonte: Autor, 2025.

Nesse contexto, a atividade metanogênica, embora presente, revela-se funcionalmente limitada. Resultados semelhantes foram reportados por Serrano-Meza *et al.* (2024), ao investigar a produção de biometano e a restauração da microbiota metanogênica após falha de pH em um reator anaeróbio de batelada sequencial (A-SBR) tratando vinhaça de tequila. Os autores observaram eficiências médias de remoção de DQO na faixa de 40–45%, mesmo diante de oscilações operacionais significativas. A análise da cinética do processo revelou que, após as primeiras 48 horas de operação quando a maior parte da matéria orgânica foi degradada e os AGV atingiram seu pico, a atividade metanogênica permaneceu limitada, sendo acompanhada por uma desaceleração na remoção adicional de DQO e pela diminuição dos AGV para níveis próximos aos iniciais.

Essa limitação foi atribuída a desequilíbrios nutricionais e à lenta reestruturação da população metanogênica (Serrano-Meza *et al.*, 2024), aspectos que também podem estar

associados à instabilidade observada no presente estudo. Dessa forma, estratégias como ajustes na relação C/N, controle da carga orgânica e otimização da microbiota podem ser implementadas para aprimorar o desempenho do sistema.

Barbosa *et al.* (2022) avaliaram a produção de metano em reatores anaeróbios operados com vinhaça e melaço, destacando a influência do substrato na eficiência do processo. Na Fase III, com alimentação exclusivamente de vinhaça, a taxa de carregamento orgânico (TCO) aumentou gradualmente de 5 para 19 kg DQO·m⁻³·dia⁻¹ em 65 dias, exigindo maior tempo para estabilização do sistema. A remoção média de DQO foi de 82,5% ± 9,2, com rendimento médio de metano de 0,17 L CH₄·g⁻¹ DQO e produção volumétrica de 1,19 ± 0,17 L CH₄·L⁻¹·dia⁻¹, abaixo do potencial esperado. A transição do melaço para a vinhaça reduziu a eficiência metanogênica, possivelmente devido à reorganização da cadeia sintrófica.

Oliveira *et al.* (2020) observaram comportamento semelhante em sistemas termofílicos, registrando remoções de DQO de 76% ± 2% e 62% ± 15%, e associando a queda na produção de metano ao desvio do fluxo metabólico para o crescimento microbiano.

5.4.4 Carga Orgânica Volumétrica (COV) no RALF₂

De acordo com a Tabela 16 observa-se que, sob um TDH de 16 horas, a COV afluyente média foi de 43,14 ± 14,80 g DQO/L.d, enquanto a COV efluente média atingiu 25,40 ± 13,83 g DQO/L.d. Esses resultados indicam que, apesar de uma redução substancial da carga orgânica ao longo do tratamento, ainda há uma fração residual significativa no efluente, sugerindo que o sistema pode não estar operando em sua máxima eficiência para a conversão de matéria orgânica em biogás.

Tabela 16: COV médias no afluyente e no efluente e eficiência no RALF₂.

TDH (h)	COV Afluyente (g DQO/L d)	COV Efluente (g DQO/L d)	Eficiência (%)
16	43,14 ± 14,80	25,40 ± 13,83	41,89

Fonte: Autor, 2025

A eficiência média do processo foi de 41,89%, evidenciando uma conversão parcial da matéria orgânica afluyente em biogás, predominantemente metano. A variabilidade expressa pelo desvio padrão sugere flutuações nas condições operacionais, que podem estar relacionadas à adaptação microbiana, à distribuição da biomassa no leito fluidizado e a possíveis limitações na transferência de massa dentro do reator.

Reatores anaeróbios de leito fluidizado operando com cargas elevadas e substratos complexos, como vinhaça e melaço, frequentemente apresentam eficiências variáveis durante a fase de transição para o regime estacionário. Ribeiro *et al.* (2025) avaliaram a co-digestão anaeróbia de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar (proporção 1:1) em reator termofílico de leito fluidizado (AFBR), operado com TD) fixo de 24 horas e COVs variando de 5 a 27,5 kg DQO/m³.dia. A eficiência de remoção de matéria orgânica variou de 56% a 84%, sendo o rendimento máximo de metano (272,6 mL CH₄/g DQO removido) observado a 7,5 kg DQO/m³.dia. Já a maior taxa de produção de metano (4,0 L CH₄/L.dia) e o maior potencial energético (250,5 kJ/dia) ocorreram com uma COV de 20 kg DQO/m³.dia. Apesar da estabilidade operacional até 22,5 kg DQO/m³.dia, observou-se um declínio na eficiência metanogênica em 27,5 kg DQO/m³.dia devido ao acúmulo de compostos orgânicos inibitórios.

De forma semelhante, Siqueira, Damiano e Silva (2013) estudaram um reator anaeróbio de leito fluidizado operado com partículas de poliestireno e alimentado com vinhaça resultante do melaço de cana. O reator, operado a 30 °C com TDH de 24 horas, foi submetido a COVs entre 3,33 e 26,19 kg DQO/m³.dia. A eficiência de remoção de DQO variou de 51% a 70%, com desempenho máximo obtido em uma COV de 13,93 ± 2,18 kg DQO/m³.dia. O aumento progressivo da COV resultou em maior conversão da matéria orgânica até o limite de estabilidade do sistema, evidenciando a importância do controle da carga afluyente.

Corroborando esses achados, Gómez, Martin e Michel (2011) investigaram a digestão anaeróbia de lodo de esgoto municipal em digestores mesofílicos, e observaram que o aumento da COV promoveu maior conversão da matéria orgânica e incremento na taxa volumétrica de metano (1,4 ± 0,1 L CH₄/L.dia) com uma carga de 5,0 g SV/L.dia. A eficiência de conversão manteve-se estável, com média de 0,57 ± 0,07 L CH₄/g SV removido, sugerindo resiliência do processo frente à elevação da carga orgânica até determinado limite.

5.4.5 Alcalinidade e ácidos voláteis totais

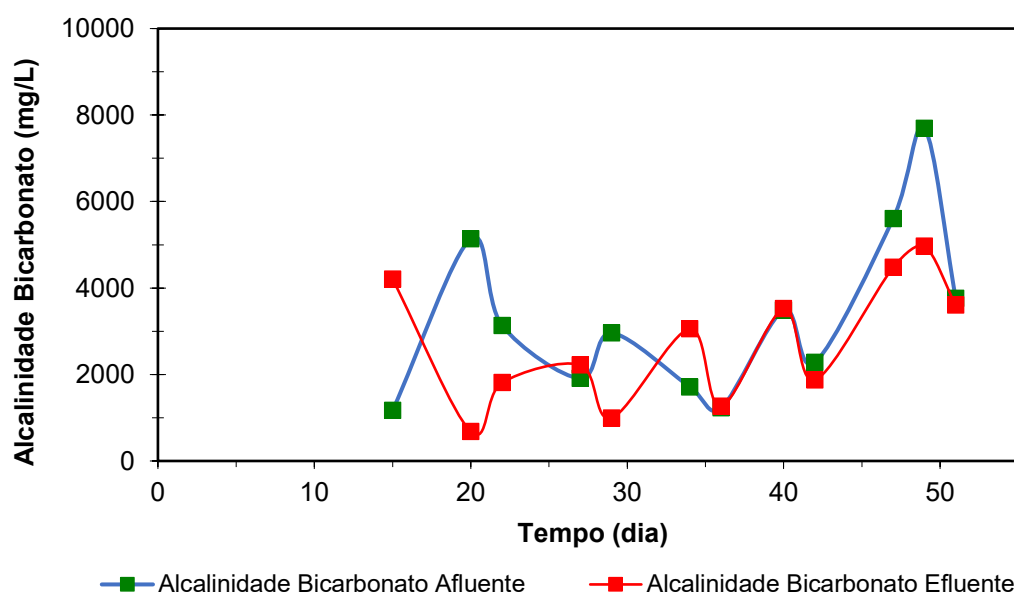
A alcalinidade desempenha um papel fundamental na estabilidade do sistema anaeróbio, uma vez que influencia diretamente a capacidade tamponante do meio e, conseqüentemente, a manutenção do pH em níveis adequados para a atividade metanogênica. Os valores médios de alcalinidade do afluyente e do efluente do reator RALF₂ são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Alcalinidade médias no afluente e no efluente no RALF₂.

TDH (h)	AB média afluente mg CaCO ₃ /L	AB média efluente mg CaCO ₃ /L
16	3.339 ± 1.970	2.722 ± 1.444

Fonte: Autor, 2025.

Os resultados indicam que a alcalinidade média do afluente foi de 3.339 (± 1.970) mg CaCO₃/L, enquanto a alcalinidade média do efluente atingiu 2.722 (± 1.444) mg CaCO₃/L. Observou-se um comportamento crescente da alcalinidade à medida que o sistema começou a ser tamponado com a adição de bicarbonato de sódio. Entretanto, conforme evidenciado na Figura 17, o controle e a manutenção da estabilidade do sistema no RALF₂ apresentaram desafios, especialmente nas fases iniciais, onde houve oscilações consideráveis na alcalinidade. Apenas no estágio final do TDH, a estabilidade foi alcançada, sugerindo que a adaptação microbiológica e o ajuste da dosagem de bicarbonato foram essenciais para a mitigação das oscilações.

Figura 17: Alcalinidade média afluente e efluente do RALF₂.

Fonte: Autor, 2025.

Valença *et al.* (2021) apontam que o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) é eficiente para tamponar reatores anaeróbios, pois neutraliza rapidamente a acidificação causada pelos AGVs e mantém o pH estável entre 6,5 e 7,2. Isso acelera o início da metanogênese e favorece a atividade microbiana, especialmente em resíduos alimentares. No entanto, para garantir a estabilidade do pH em torno da neutralidade, Gerardi (2003) e Metcalf e Eddy (2016) indicam que a alcalinidade total deve estar entre 1000 e 5000 mg/L, o que é essencial para equilibrar a

produção de CO_2 dissolvido na fase líquida como ácido carbônico (H_2CO_3). Vale ressaltar, que o bicarbonato nem sempre garante a maior produção de metano e, em altas concentrações, pode prejudicar o equilíbrio microbiano. Assim, é importante considerar não só a regulação do pH, mas também o impacto na microbiota e no rendimento final de metano.

Chen *et al.* (2015) compararam fontes de alcalinidade na digestão anaeróbia de resíduos alimentares e mostraram que o lodo de cal da indústria de papel (LMP) foi o mais eficiente, gerando 251 ml $\text{CH}_4/\text{g SV}$, com baixo acúmulo de AGVs (50 mg/L). O carbonato de cálcio (CaCO_3) produziu 197 ml $\text{CH}_4/\text{g SV}$ e o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 156 ml $\text{CH}_4/\text{g SV}$, mas com maior acúmulo de AGVs (320 mg/L), indicando impacto negativo no sistema. Todos mantiveram o pH entre 7,1 e 7,6 e níveis seguros de amônio ($\text{NH}_4^+-\text{N} < 420 \text{ mg/L}$). No presente estudo, o bicarbonato manteve o pH entre 6,43 e 7,58, mostrando que a escolha da fonte alcalinizante é crucial para otimizar a digestão anaeróbia.

5.4.6 Produção e rendimento do metano

O rendimento de metano (MY) e a taxa de produção de metano (MPR) são parâmetros essenciais para avaliar a eficiência do processo, assim como a remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO), que reflete a degradação da carga orgânica no sistema. A Tabela 18 apresenta os valores médios desses parâmetros operacionais para o reator metanogênico RALF₂, operando sob um Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 16 h.

Tabela 18: Médias do rendimento e da produção de metano, eficiência de remoção e TDH no RALF₂.

TDH (h)	MY (L $\text{CH}_4/\text{g DQO}$)	MPR (L $\text{CH}_4/\text{L h}$)	Eficiência de remoção de DQO (%)
16	$1,22 \pm 0,64$	$1,9 \pm 4,6$	42 ± 18

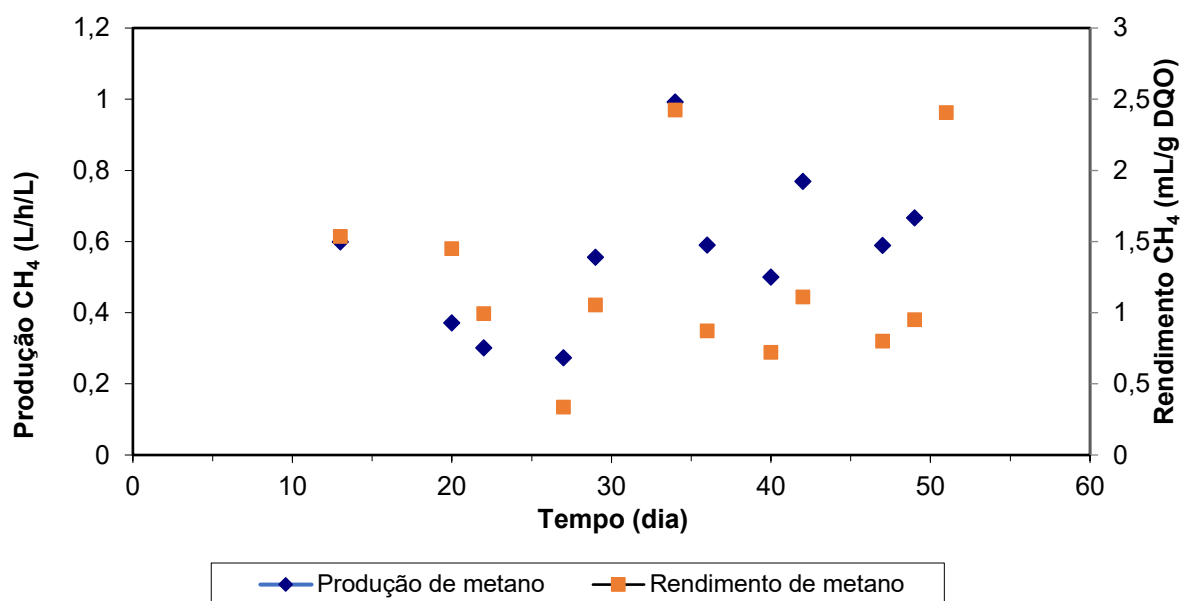
Fonte: Autor, 2025.

Os resultados evidenciam que o rendimento médio de metano (MY) foi de $1,22 \pm 0,64$ L $\text{CH}_4/\text{g DQO}$, enquanto a produção volumétrica de metano (MPR) atingiu $1,9 \pm 4,6$ L $\text{CH}_4/\text{L h}$. A elevada variabilidade nos valores de MPR pode ser atribuída às oscilações no metabolismo microbiano, influenciado por fatores como a carga orgânica aplicada e a estabilidade do pH no meio reacional (Jia *et al.*, 2023; Jia *et al.*, 2024). A eficiência média de remoção da DQO foi de $42 \pm 18\%$, indicando que parte significativa da matéria orgânica foi convertida em biogás, embora haja margem para otimização do processo.

A Figura 18 ilustra a evolução do rendimento e da taxa de produção de metano ao longo do tempo de operação. Observou-se que, nos estágios iniciais, a produção de metano apresentou

variações consideráveis, sugerindo um período de adaptação da microbiota metanogênica às condições operacionais. Com a progressão do experimento, houve uma estabilização gradual dos valores, sinalizando um ajuste na atividade metabólica do consórcio microbiano responsável pela metanogênese.

Figura 18: Evolução do rendimento e da taxa de produção de metano no RALF₂.



Fonte: Autor, 2025.

Santana Junior *et al.* (2019) corroboram com os resultados deste estudo, ao demonstrarem que a produção de metano em reatores UASB operando com vinhaça e melaço pode ser altamente variável, refletindo diretamente oscilações no metabolismo microbiano. O estudo relata que, embora o sistema tenha alcançado uma produção volumétrica de metano de até 0,365 m³ CH₄/m³·dia, essa performance oscilou conforme as condições operacionais, como a taxa de carga orgânica e o controle de pH, afetando também a estabilidade do processo. Além disso, a eficiência de remoção de DQO variou amplamente, alcançando picos de 80%, mas com valores médios inferiores, o que aponta para a possibilidade de melhorias.

6. Avaliação da Eficiência de Conversão de Energia

A eficiência de conversão de energia foi determinada com base nos volumes produzidos de hidrogênio (3380 mL) e metano (1900 mL), cujos respectivos poderes caloríficos foram considerados como 12,86 J·mL⁻¹ e 35,82 J·mL⁻¹. A energia total recuperada foi de 111,56 kJ·L⁻¹, já a energia potencial de entrada estimada em 173,75 kJ·L⁻¹, derivada da co-digestão de

melaço e vinhaça. Com base nesses dados, a eficiência de conversão de energia alcançada foi de 64,2%. Esse resultado indica uma conversão bioenergética, destacando a efetividade do processo de co-digestão dos resíduos da cana-de-açúcar sob as condições avaliadas, e sugere que o equilíbrio entre a carga orgânica e a composição dos substratos exerce influência direta sobre o desempenho energético do sistema.

No presente estudo, no TDH de 6 obteve-se uma energia gerada total de 70,63 kJ e uma eficiência de conversão de 40,66%. Enquanto Nguyen *et al.* (2022), foi utilizada uma mistura de dejetos suínos e resíduos de abacaxi na proporção 1:1, resultando em uma relação C/N de 30:1 para avaliar a produção combinada de $1240 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ de H_2 e $812 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ de CH_4 em TDH de 6 horas, o que resultou em uma recuperação energética de $42,63 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e eficiência de 7,36%. A diferença pode ser atribuída ao maior volume de biogás obtido neste estudo, bem como à composição mais energética da mistura substrato, sugerindo que o ajuste fino da carga orgânica e a escolha estratégica dos resíduos têm impacto direto sobre a eficiência bioenergética do sistema.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciam o potencial do sistema anaeróbio em duas fases para a produção simultânea de hidrogênio e metano, utilizando como substratos o melaço e a vinhaça de cana-de-açúcar. Observou-se que o desempenho volumétrico foi satisfatório tanto em termos de rendimento quanto na taxa de produção dos gases, indicando viabilidade técnica da co-digestão desses resíduos agroindustriais.

A vinhaça, demonstrou ser um substrato de elevada complexidade e instabilidade composicional, o que reforça a necessidade de um controle rigoroso das variáveis operacionais. No entanto, a co-digestão com o melaço mostrou-se vantajosa, corroborando diversos estudos que apontam benefícios da digestão anaeróbia em duas etapas, principalmente na recuperação de energia e na remoção mais eficiente da matéria orgânica. Apesar de a vinhaça apresentar alta concentração de carboidratos, característica promissora para fermentações hidrogenogênicas, os dados revelaram que essa carga orgânica favoreceu inicialmente a formação de ácidos voláteis e alcoóis. Dessa forma, o tempo de detenção hidráulica (TDH) e a carga orgânica volumétrica (COV) emergem como variáveis críticas no direcionamento metabólico e na eficiência da produção de hidrogênio.

No que tange à segunda etapa do sistema, voltada à produção de metano, observou-se que o efluente do reator acidogênico (RALF₁) ainda apresentava considerável quantidade de matéria orgânica residual, passível de conversão metanogênica. No entanto, a produção de metano foi limitada, possivelmente devido às elevadas concentrações de ácidos voláteis totais (AVT) e às oscilações de pH durante a operação do reator metanogênico (RALF₂). Ainda assim, os resultados indicam a possibilidade técnica de conversão metanogênica do efluente acidogênico, desde que haja um controle mais preciso das variáveis de operação, principalmente o pH.

A influência do TDH sobre a produção de hidrogênio foi expressiva: à medida que o TDH foi reduzido, observou-se um aumento significativo na produção volumétrica de H₂, de 0,20 L·h⁻¹·L⁻¹ (TDH de 6 h) para 8,90 L·h⁻¹·L⁻¹ (TDH de 2 h), representando um aumento de 44,5 vezes maior que o inicial. Essa tendência pode ser atribuída ao favorecimento de vias fermentativas mais rápidas e à minimização de inibições causadas pelo acúmulo de subprodutos, como os ácidos orgânicos. Em contrapartida, a produção de metano mostrou-se eficiente em fase única com o TDH de 16 h, resultado das condições operacionais propícias à degradação dos metabólitos intermediários.

Do ponto de vista da COV, verificou-se uma relação entre o aumento e a produção/rendimento de hidrogênio. O incremento da COV de 176,65 para 344,17 g DQO/L·d, aliado à redução do TDH de 6 para 2 h, promoveu um aumento no rendimento de hidrogênio, passando de $0,74 \pm 0,49$ para $1,12 \pm 0,01$ mol H₂/mol glicose. Este resultado reforça a importância do controle sinérgico entre a carga orgânica e o tempo de retenção, uma vez que altas concentrações de substrato favorecem a via fermentativa acética, principal rota de geração de H₂. Em contraste, a elevação da COV média de $43,14 \pm 14,80$ g DQO/L·d para $25,40 \pm 13,83$ g DQO/L·d na etapa metanogênica resultou na produção volumétrica (MPR de $1,9 \pm 4,6$ L CH₄/L·h) quanto no rendimento (MY de $1,22 \pm 0,64$ L CH₄/g DQO), com eficiência de remoção de DQO limitada a $42 \pm 18\%$.

Durante todas as fases de operação do RALF₁, foram detectadas concentrações relevantes de ácido acético (HAc) e etanol (EtOH), evidenciando a predominância da fermentação acética como rota metabólica. As proporções relativas de HAc variaram de $74,2 \pm 73,0 \%$ (TDH 6 h) a $68,7 \pm 64,4 \%$ (TDH 2 h), enquanto o EtOH apresentou uma tendência de aumento com a redução do TDH, atingindo $31,3 \pm 11,8 \%$ no TDH de 2 h. É importante destacar que, embora a maior concentração de ácido acético (123,1 mM ou 7393,6 mg/L) tenha sido registrada no TDH de 6 h, com média de COV aplicada de $176,65 \pm 65,95$ g DQO/L·d, essa condição não favoreceu os melhores indicadores de produção e rendimento de hidrogênio. Tal fato pode ser explicado pelo acúmulo excessivo de metabólitos, que possivelmente causaram efeitos inibitórios sobre as comunidades microbianas produtoras de hidrogênio.

Portanto, os melhores resultados para a produção de hidrogênio foram alcançados no TDH de 2 h, com produção média de $8,90 \pm 2,71$ L·h⁻¹·L⁻¹, enquanto a produção de metano obteve-se um rendimento médio (MY) de $1,22 \pm 0,64$ L CH₄/g DQO e MPR de $1,9 \pm 4,6$ L CH₄/L·h. Estes achados reforçam a relevância da estratégia de digestão anaeróbia em duas fases e indicam que a otimização de parâmetros operacionais como TDH e COV é crucial para maximizar a eficiência de conversão de resíduos orgânicos em biocombustíveis limpos.

REFERÊNCIAS

- ABDUR RAWOOF, S. A.; KUMAR, P. S.; VO, D.-V. N.; DEVARAJ, T.; SIVANESAN, S. Biohythane as a high potential fuel from anaerobic digestion of organic waste: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 152, p. 111700, dez. 2021.
- ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; GABRIEL FILHO, J. B.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Use of anaerobic co-digestion as an alternative to add value to sugarcane biorefinery wastes. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121443, 2019.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 07, p. 406–414, 2014.
- AGYEKUM, E. B. et al. A Critical Review of Renewable Hydrogen Production Methods: Factors Affecting Their Scale-Up and Its Role in Future Energy Generation. **Membranes**, v. 12, n. 2, p. 173, 1 fev. 2022.
- ALBA, J. L. **Modelagem e validação de reator anaeróbio gaslift utilizando fluidodinâmica computacional**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2022.
- ALBANEZ, R. **Codigestão de vinhaça e melão em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio**. 2015. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D. Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27–41, 2018.
- ALI, M. M.; MUSTAFA, A. M.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; DANHASSAN, U. A.; LIN, H.; CHOE, U.; SHENG, K.; WANG, K. Biohythane production from tofu processing residue via two-stage anaerobic digestion: operational conditions and microbial community dynamics. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1–20, 14 maio 2022.
- AKRAM, M.; TAN, C. K.; GARWOOD, R.; THAI, S. M. Vinasse – A potential biofuel – Cofiring with coal in a fluidised bed combustor. **Fuel**, v. 158, p. 1006-1015, 2015.
- ALMEIDA, P. DE S. et al. Producing hydrogen from the fermentation of cheese whey and glycerol as cosubstrates in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 31, p. 14243–14256, 12 abr. 2022.
- AMORIM, E. L. C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2009.

APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. In American Public Health Association, 2017.

ARUN, J.; SASIPRABA, T.; GOPINATH, K. P.; PRIYADHARSINI, P.; NACHIAPPAN, S.; NIRMALA, N.; DAWN, S. S.; NGUYỄN, T. L.; PUGAZHENDHI, A. Influence of biomass and nanoadditives in dark fermentation for enriched bio-hydrogen production: A detailed mechanistic review on pathway and commercialization challenges. **Fuel**, v. 327, p. 125112, 1 nov. 2022.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Specific Organic Loading Rate Control for Improving Fermentative Hydrogen Production. **Fermentation**, v. 10, n. 4, p. 213, 14 abr. 2024.

BARBOSA, M. Y. U.; ALVES, I.; DEL NERY, V.; SAKAMOTO, I. K.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Methane production in a UASB reactor from sugarcane vinasse: shutdown or exchanging substrate for molasses during the off-season? **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, p. 102664, 2022.

BARCELOS, S. T. V.; FERREIRA, I. F. L.; COSTA, R. B.; MAGALHÃES FILHO, F. J. C.; RIBEIRO, A. A.; CEREDA, M. P. Startup of UASB reactor with limestone fixed bed operating in the thermophilic range using vinasse as substrate. **Renewable Energy**, v. 196, p. 610–616, ago. 2022.

BÁRCIA, G. S.; COSTA, T. E. DE Q.; CARVALHO, R. B. DE. FEL 1: projeto conceitual de uma planta de produção de Amônia a partir do Biometano. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 6, p. 20086–20109, 15 jun. 2023.

BERHE, S.; LETA, S. Anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes using anaerobic sequencing batch reactor for bio-energy recovery: Focus on process performance and stability of the methanogenic step. **Journal of Water Process Engineering**, v. 54, p. 103993, 1 ago. 2023.

BERNAL, A. P.; SANTOS, I. F. S.; SILVA, A. P. M.; BARROS, R. M.; RIBEIRO, E. M. Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO₂ emissions. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 260–271, 2017.

BARROS, V. G. de; DUDA, R. M.; VANTINI, J. da S.; OMORI, W. P.; FERRO, M. I. T.; OLIVEIRA, R. A. de. Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 371–381, nov. 2017.

BHARATHIRAJA, B.; SUDHARSANAA, T.; BHARGHAVI, A.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R. Biohydrogen and biogas - an overview on feedstocks and enhancement process. **Fuel**, v. 185, p. 810-828, 2016.

BOLZONELLA, D.; BATTISTA, F.; CAVINATO, C.; GOTTARDO, M.; MICOLUCCI, F.; LYBERATOS, G.; PAVAN, P. Recent developments in biohythane production from household food wastes: A review. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 311–319, jun. 2018.

BORDONAL, R. de O.; CARVALHO, J. L. N.; LAL, R.; FIGUEIREDO, E. B. de; OLIVEIRA, B. G. de; LA SCALA JUNIOR, N. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 2018 **38:2**, v. 38, n. 2, p. 1–23, 27 fev. 2018.

CABROL, L.; MARONE, A.; TAPIA-VENEGAS, E.; STEYER, J.-P.; RUIZ-FILIPPI, G.; TRABLY, E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 043, p. 158–181, 2017.

PRADO, V. B. C. D. Produção de hidrogênio como fonte de energia e estratégia de gestão de resíduos e mudanças climáticas. 16 nov. 2021.

CAVASINI, R.; LASCHI, D.; TAVARES, A. R.; LIMA, G. P. P. Carbohydrate reserves on postharvest of lisianthus cut flowers. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 1, p. 12–18, jan. 2018.

CHANDRASEKHAR, K. et al. Waste based hydrogen production for circular bioeconomy: Current status and future directions. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122920, 1 abr. 2020.

CHEN, S.; ZHANG, J.; WANG, X. Effects of alkalinity sources on the stability of anaerobic digestion from food waste. **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, v. 33, n. 11, p. 1033–1040, 21 nov. 2015.

CHAVES, T. C. **Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

CHAVES, T. C.; GOIS, G. N. S. B.; PEITER, F. S.; VICH, D. V.; AMORIM, E. L. C. de.. Biohydrogen production in an AFBR using sugarcane molasses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 2, p. 307–316, 26 fev. 2021.

CHAVES, T. C.; PEITER, F. S.; GOIS, G. N. S. B.; TELLES, N. L. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; AMORIM, E. L. C. Synergistic effects on biohydrogen production from vinasse and molasses co-digestion: Influence of mixture composition on process stability. **Energy**, v. 329, p. 136677, 15 ago. 2025.

CHU, C.-Y.; VO, T.-P.; CHEN, T.-H. A novel of biohythane gaseous fuel production from pineapple peel waste juice in two-stage of continuously stirred anaerobic bioreactors. **Fuel**, v. 279, p. 118526, 2020.

CORONA, V. M.; RAZO-FLORES, E. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 334–341, 2018.

COUTO, P. T. DO. **Estudo da utilização do ADM1 como plataforma de modelagem para reatores em batelada empregados no processamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências

da Engenharia Ambiental Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

COUTO, P. T.; ENG, F.; NAESSENS, W.; NOPENS, I.; ZAIAT, M.; RIBEIRO, R. Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217-6230, 2020.

CORTEZ, L. A. B.; BALDASSIN, R.; DE ALMEIDA, E. Energy from sugarcane. **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**, p. 117-139, 1 jan. 2020.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 1 dez. 2013.

CREMONEZ, P. A.; TELEKEN, J. G.; MEIER, T. R. W.; ALVES, H. J. Two-stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, p. 111854, 2021.

DAREIOTI, M.A.; TSIGKOU, K.; VAVOURAKI, A.I.; KORNAROS, M. Hydrogen and methane production from anaerobic co-digestion of sorghum and cow manure: effect of pH and hydraulic retention time. **Fermentation**, v. 8, p. 304, 2022.

DAS, D.; VEZIRAOĞLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, n. 1, p. 13-28, 2001.

DE CASTRO, T. M.; TORRES, D. G. B.; ARANTES, E. J.; CARVALHO, K. Q.; PASSIG, F. H.; CHRIST, D.; GOTARDO, J. T.; GOMES, S. D. Anaerobic co-digestion of industrial landfill leachate and glycerin: methanogenic potential, organic matter removal and process optimization. **Environmental Technology**, v. 41, n. 20, p. 2583-2593, 5 set. 2020.

DE MENEZES, C. A.; ALMEIDA, P. S.; DELFORNO, T. P.; OLIVEIRA, V. M.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Relating biomass composition and the distribution of metabolic functions in the co-fermentation of sugarcane vinasse and glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 24, p. 8837-8853, 19 mar. 2023.

DE SOUZA MORAES, B.; DOS SANTOS, G. M.; DELFORNO, T. P.; FUESS, L. T.; DA SILVA, A. J. Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 594-601, 2019.

DE VRIEZE, J.; PLOVIE, K.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Co-digestion of molasses or kitchen waste with high-rate activated sludge results in a diverse microbial community with stable methane production. **Journal of environmental management**, v. 152, p. 75-82, 1 abr. 2015.

DORNELLES, H. DE S.; MOTTERAN, F.; SAKAMOTO, I. K.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. 4-Nonylphenol degradation changes microbial community of scale-up Anaerobic Fluidized Bed Reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 267, p. 110575, 1 ago. 2020.

DOS REIS, C. M.; CAROSIA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498–8509, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, A.K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

ELBESHBISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H. S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656–668, 2017

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Nota Técnica EPE/DPG/SPG/03/2022 – Hidrogênio Turquesa: produção a partir da pirólise do gás natural**. Rio de Janeiro, abr. 2022.

EZEJI, T.; MILNE, C.; PRICE, N. D.; BLASCHEK, H. P. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1697–1712, 22 fev. 2010.

FERREIRA, T. B.; RÊGO, G. C.; RAMOS, L. R.; SOARES, L. A.; SAKAMOTO, I. K.; PIRES, L. O.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 41, p. 18908–18917, 11 out. 2018.

FRANKE-WHITTLE, I. H.; WALTER, A.; EBNER, C.; INSAM, H. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2080–2089, nov. 2014.

FUESS, L. T.; LENS, P. N. L.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Exploring potentials for bioresource and bioenergy recovery from vinasse, the “new” protagonist in Brazilian sugarcane biorefineries. **BioChem**, v. 2, n. 4, p. 374–411, 2022.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. **Environmental Technology**, v. 35, n. 3, p. 333–339, 2014.

GARCÍA-DEPRAECT, O.; DIAZ-CRUCES, V. F.; LEÓN-BECERRIL, E. Upgrading of anaerobic digestion of tequila vinasse by using an innovative two-stage system with dominant lactate-type fermentation in acidogenesis. **Fuel**, v. 280, p. 118606, 2020.

GAHLOT, P.; AHMED, B.; TIWARI, S. B.; ARYAL, N.; KHURSHEED, A.; KAZMI, A. A.; TYAGI, V. K. Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: Mechanism and application. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, p. 101056, nov. 2020.

GENSOLLEN, G.; POURCHER, A.-M.; DUEDAL, A.-L.; PICARD, S.; LE ROUX, S.; PEU, P. Impact of pH in the first-stage of a two-stage anaerobic digestion on metabolic pathways and methane production. **Bioresource Technology Reports**, v. 20, p. 101256, dez. 2022.

GERARDI, M. H. The microbiology of anaerobic digesters. 1. ed. **Somerset, NJ: Wiley**, 2003.

GHIMIRE, A.; KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; SHOBANA, S.; SARATALE, G. D.; KIM, H.-W.; LUONGO, V.; ESPOSITO, G.; MUÑOZ, R. Bio-hythane production from microalgae biomass: Key challenges and potential opportunities for algal bio-refineries. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 525–536, out. 2017.

GHIMIRE, A.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; TRABLY, É.; ESCUDIÉ, R.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, abr. 2015.

GHOSH, S.; KAR, D. Biohythane: a potential biofuel of the future. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, p. 2957–2975, 2024.

GODOI, L. A. G. de; FUESS, L. T.; DELFORNO, T. P.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. Characterizing phenol-removing consortia under methanogenic and sulfate-reducing conditions: potential metabolic pathways. **Environmental Technology**, v. 40, n. 24, p. 3216–3226, 2019.

GOIS, G. N. S. B.; MACÊDO, W. V.; PEITER, F. S.; CHAVES, T. C.; SALES, V.; BARBOSA, P. A. M. A.; ABUD, A. K. S.; AMORIM, E. L. C. Evaluation of biohydrogen production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor without pH control. **Latin American Applied Research-An international journal**, v. 51, n. 1, p. 63-69, 2021.

GÓMEZ, E.; MARTIN, J.; MICHEL, F. C. Effects of organic loading rate on reactor performance and archaeal community structure in mesophilic anaerobic digesters treating municipal sewage sludge. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 11, p. 1117–1123, 2011.

HANS, M.; KUMAR, S. Biohythane production in two-stage anaerobic digestion system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17363–17380, 2019.

HARIRCHI, S.; WAINAINA, S.; SAR, T.; NOJOURI, S. A.; PARCHAMI, M.; PARCHAMI, M.; VARJANI, S.; KHANAL, S. K.; WONG, J.; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. **Bioengineered**, v. 13, n. 3, p. 6521–6557, 1 mar. 2022.

HAWAZ, E.; TAFESSE, M.; TESFAYE, A.; KIROS, S.; BEYENE, D.; BEKELE, G. K.; BOEKHOUT, T.; GROENWALD, M.; THEELEN, B.; DEGEFE, A.; DEGU, S.; ADMASU, A.; HUNDE, B.; MULETA, D. Optimization of bioethanol production from sugarcane molasses by the response surface methodology using *Meyerozyma caribbica* isolate MJTm3. **Annals of Microbiology**, v. 73, p. 200, 2023.

HOARAU, J.; CARO, Y.; GRONDIN, I.; PETIT, T. Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of water process engineering**, v. 24, p. 11-25, 2018.

HUANG, S.; SHEN, M.; REN, Z. J.; WU, H.; YANG, H.; SI, B.; LIN, J.; LIU, Z. Long-term in situ bioelectrochemical monitoring of biohythane process: Metabolic interactions and microbial evolution. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125119, 1 jul. 2021.

HURTADO, A.; ARROYAVE, C.; PELÁEZ, C. Effect of using effluent from anaerobic digestion of vinasse as water reuse on ethanol production from sugarcane-molasses. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, 101677, 2021.

JIA, R.; YOUNG-CHAE, C.; AN, Z.; KIM, K.; OA, S.-W. Unraveling Anaerobic Digestion Instability: A Simple Index Based on the Kinetic Balance of Biochemical Reactions. **Processes** 2023, Vol. 11, Page 2852, v. 11, n. 10, p. 2852, 27 set. 2023.

JIA, R.; SONG, Y.-C.; AN, Z.; KIM, K.; LEE, C.-Y.; BAE, B.-U. A New Comprehensive Indicator for Monitoring Anaerobic Digestion: A Principal Component Analysis Approach. **Processes** 2024, Vol. 12, Page 59, v. 12, n. 1, p. 59, 2024.

KARKI, R.; CHUENHART, W.; SURENDRA, K. C.; SHRESTHA, S.; RASKIN, L.; SUNG, S.; HASHIMOTO, A. G.; KHANAL, S. K. Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 125001, 1 jun. 2021.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process. Biochemistry**, v. 41, p. 199-207, 2006.

KIANI DEH KIANI, M.; PARSAEE, M.; SAFIEDDIN ARDEBILI, S. M.; PEREDA REYES, I.; FUESS, L. T.; KARIMI, K. Different bioreactor configurations for biogas production from sugarcane vinasse: A comprehensive review. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, p. 106446, 1 jun. 2022.

KIM, M.; YANG, Y.; MORIKAWA-SAKURA, M. S.; WANG, Q.; LEE, M. V.; LEE, D.-Y.; FENG, C.; ZHOU, Y.; ZHANG, Z. Hydrogen production by anaerobic co-digestion of rice straw and sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 4, p. 3142-3149, 2012.

KUMAR KHANAL, S.; LÜ, F.; WONG, J. W. C.; WU, D.; OECHSNER, H. Anaerobic digestion beyond biogas. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125378, 1 out. 2021.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion processes. **Water Environment Research**, v. 70, n. 5, p. 1075-1082, 1 jul. 1998.

LEE, J. Y.; STRINGFELLOW, W. T. Method: Carbohydrate in Produced Water (Colorimetric). 1 jun. 2019.

LERTSRIWONG, S.; GLINWONG, C. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on molasses and agricultural wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 51, p. 26812-26821, out. 2020.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 3-28, mar. 1995.

LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L.; HE, J. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR).

International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, n. 15, p. 3274–3283, 1 out. 2007.

LI, Q.; LI, Y. Coproduction of hydrogen and methane in a CSTR-IC two-stage anaerobic digestion system from molasses wastewater. **Water Science and Technology**, v. 79, n. 2, p. 270–277, 2019.

LIU, Z.; SI, B.; LI, J.; HE, J.; ZHANG, C.; LU, Y.; ZHANG, Y.; XING, X-H. Bioprocess engineering for biohythane production from low-grade waste biomass: technical challenges towards scale up. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 25–31, 2018.

LOHANI, S. P.; HAVUKAINEN, J. Anaerobic Digestion: Factors Affecting Anaerobic Digestion Process. **Energy, Environment, and Sustainability**, p. 343–359, 2018.

LÜ, F.; WANG, Z.; ZHANG, H.; SHAO, L.; HE, P. Anaerobic digestion of organic waste: Recovery of value-added and inhibitory compounds from liquid fraction of digestate. **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125196, 1 ago. 2021.

LUNPROM, S.; PHANDUANG, O.; SALAKKAM, A.; LIAO, Q.; IMAI, T.; REUNGSANG, A. Bio-hythane production from residual biomass of *Chlorella* sp. biomass through a two-stage anaerobic digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 6, p. 3339–3346, fev. 2019.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309–4317, 2008

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; DOURADO, M.; SIMON, M. Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2013, Vol. 10, Pages 4390–4417, v. 10, n. 9, p. 4390–4417, 17 set. 2013.

MARTINS, Juliana Silva. **Produção de hidrogênio e metano em reatores anaeróbicos a partir do efluente do processamento do coco**. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Centro de Tencologia, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

MCCARTY, Perry L.; KUGELMAN, Irwin J.; LAWRENCE, Alonzo Wm. **Ion effects in anaerobic digestion**. Department of Civil Engineering, Stanford Univ., 1964.

MEEGODA, J. N.; LI, B.; PATEL, K.; WANG, L. B. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, p. 2224, 2018.

MEENA, R. A. A.; BANU, J. R.; KANNAH, R. Y.; YOGALAKSHMI, K. N.; KUMAR, G. Biohythane production from food processing wastes – Challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 298, 122449, 2020.

METCALF; EDDY. Wastewater engineering: treatment and resource recovery. New York: **McGraw-Hill Education**, 2016.

MENEZES, C. A. DE. **Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leito fluidificado**. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.

MENZEL, T.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Role of Microbial Hydrolysis in Anaerobic Digestion. **Energies**, v. 13, n. 21, p. 5555, 23 out. 2020.

MISHRA, P.; KRISHNAN, S.; RANA, S.; SINGH, L.; SAKINAH, M.; WAHID, Z. A. Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass. **Energy Strategy Reviews**, v. 24, p. 27–37, abr. 2019.

MOHD KOPLI, P. N. S.; HASSIM, M. H. Operational Conditions affecting Biohythane Production and its Kinetic Model: A Review. **Journal of Energy and Safety Technology (JEST)**, v. 5, n. 2, p. 109–121, 1 fev. 2023.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

MORAES, B. S.; TRIOLO, J. M.; LECONA, V. P.; ZAIAT, M.; SOMMER, S. G. Biogas production within the bioethanol production chain: use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 227–234, 2015.

NICIURA, C. L. **Avaliação do uso da banda de rodagem de pneus inservíveis triturada como suporte ao desenvolvimento de biofilmes em um reator anaeróbio de leito expansível**. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.

NGUYEN, T.-T.; TA, D.-T.; LIN, C.-Y.; CHU, C.-Y.; TA, T. M. N. Biohythane production from swine manure and pineapple waste in a single-stage two-chamber digester using gel-entrapped anaerobic microorganisms. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 60, p. 25245–25255, 15 jul. 2022.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 40, p. 17884–17895, 2016.

OLIVEIRA, D. C. S. **Otimização da produção de biogás a partir da bio digestão da vinhaça de fabricação da cachaça artesanal**. 72p. (Mestrado em Biocombustíveis), UFVJM. 2019.

OLIVEIRA, C. A.; FUESS, L. T.; SOARES, L. A.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Thermophilic biomethanation of sugarcane molasses comparing single and two-stage systems: Process performance and energetic potential. **Bioresource Technology Reports**, v. 100590, 2020.

OSMAN, A. I.; MEHTA, N.; ELGARAHY, A. M.; HEFNY, M.; AL-HINAI, A.; AL-MUHTASEB, A. H.; ROONEY, D. W. Hydrogen production, storage, utilisation and environmental impacts: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, p. 153–188, 2022.

ÖZKAYA, B.; KAKSONEN, A. H.; SAHINKAYA, E.; PUHAKKA, J. A. Fluidized bed bioreactor for multiple environmental engineering solutions. **Water Research**, v. 150, p. 452–465, 1 mar. 2019.

PALACIOS-BERECHE, M. C.; PALACIOS-BERECHE, R.; ENSINAS, A. V.; GARRIDO GALLEGO, A.; MODESTO, M.; NEBRA, S. A. Brazilian sugar cane industry – A survey on future improvements in the process energy management. **Energy**, v. 259, p. 124903, 15 nov. 2022.

PARSAEE, M.; KIANI DEH KIANI, M.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 117–125, 2019.

PEIXOTO, G.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953–8966, 2011.

PEIXOTO, G. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

PEREYRA, D. **Cofermentação de glicerol e melaço como alternativas para produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado**. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2019.

PEREYRA, D. DE L. A. D. et al. Co-fermentation of glycerol and molasses for obtaining biofuels and value-added products. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 4, p. 653–660, 11 dez. 2020.

PINTO, M. P. M.; MUDHOO, A.; NEVES, T. A.; BERNI, M. D.; FORSTER-CARNEIRO, T. Co-digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohydrogen generation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 146–155, 2018.

RAHMAN, S. N. A.; MASDAR, M. S.; ROSLI, M. I.; MAJLAN, E. H.; HUSAINI, T.; KAMARUDIN, S. K.; DAUD, W. R. W. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 137–162, 1 dez. 2016.

RAMOS, L. R. **Aproveitamento energético da vinhaça de cana-de-açúcar pela biodigestão em dois estágios em reatores anaeróbios de leito fluidizado: mesofílico e termofílico**. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia — São Carlos - SP: Universidade Federal de São Carlos, 2020.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 29, p. 13081-13089, 2018.

RAMPRAKASH, B.; LINDBLAD, P.; EATON-RYE, J. J.; INCHAROENSAKDI, A. Current strategies and future perspectives in biological hydrogen production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 168, p. 112773, 1 out. 2022.

REGO, G. C.; FERREIRA, T. B.; RAMOS, L. R.; MENEZES, C. A.; SOARES, L. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 5527–5541, 2022.

REN, Y.; SI, B.; LIU, Z.; JIANG, W.; ZHANG, Y. Promoting dark fermentation for biohydrogen production: Potential roles of iron-based additives. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 3, p. 1499–1515, 8 jan. 2022.

REYNA-GÓMEZ, L. M.; CRUZ-LÓPEZ, A.; ALFARO, J. M.; SUÁREZ-VÁZQUEZ, S. I. Evaluation of the production of biohydrogen during the co-digestion of organic wastes in an upflow hybrid anaerobic reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 425, p. 129235, 2021.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, J. C. **Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum.** 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

RIBEIRO, A. R. **Produção de hidrogênio e metano por meio da codigestão de subprodutos do processamento do setor sucroalcooleiro em reator anaeróbico de leite fluidificado.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024

RIBEIRO, A. R.; DEVENS, K. U.; CAMARGO, F. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Synergizing sugarcane waste valorization: Optimization of two-stage anaerobic co-digestion for enhanced methane recovery and organic matter removal. **Industrial Crops and Products**, v. 221, 119297, 2024.

RIBEIRO, A. R.; DEVENS, K. U.; CAMARGO, F. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Harnessing the energy potential and value-added products from the treatment of sugarcane vinasse: maximizing methane production through co-digestion with sugarcane molasses and enhanced organic loading. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 197, p. 964–988, 2025.

SAIDI, R.; HAMDI, M.; BOUALLAGUI, H. Enhanced hydrogen and methane production from date fruit wastes using semi continuous two-stage anaerobic digestion process with

increasing organic loading rates. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 174, p. 267-275, 2023.

SÁNCHEZ, F. E; FUESS, L. T.; CAVALCANTE, G. S.; ADORNO, M. Â. T.; ZAIAT, Marcelo. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: an application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, pt. 1, 119378, 2021.

SANTANA JUNIOR, A. E.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, p. 117577, 20 nov. 2019.

SANTOS, S. C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. **Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014**, p. 142, 2014.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 17, p. 9000-9011, 2014.

SERRANO-MEZA, A.; MORENO-ANDRADE, I.; ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; DÍAZ-BARAJAS, S. A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L.; GARZÓN-ZÚÑIGA, M. A. Biomethane Production and Methanogenic Microbiota Restoration After a pH Failure in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor (A-SBR) Treating Tequila Vinasse. **Fermentation**, v. 10, n. 11, p. 557, 31 out. 2024.

SILVA, D. J. A.; NADAI, B. DE; OLIVEIRA, D. Q. Geração de energia elétrica a partir de resíduos sanitários urbanos. **Congresso Brasileiro de Automática - CBA**, v. 2, n. 1, 7 dez. 2020.

SILVA, A. B. DA. **Efeito de temperaturas termofílica e hipertermofílica na produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto como cossustratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento — Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

SILVA, A. J. M. DA. **Reatores de biofilme utilizados no tratamento de efluentes e na geração de hidrogênio**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Engenharia Química] Universidade Federal de São Carlos– UFSCar, São Carlos, 2023

SILVA, A. N. da; MACÊDO, W. V.; SAKAMOTO, I. K.; PEREYRA, D. L. D. D.; MENDES, C. O.; MAINTINGUER, S. I.; CAFFARO FILHO, R. A.; DAMIANOVIC, M. H. Z.; VARESCHE, M. B. A.; AMORIM, E. L. C. de. Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 257–264, 1 jan. 2019.

SHARMA, K. Carbohydrate-to-hydrogen production technologies: A mini-review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 138–143, 1 maio 2019.

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogas production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 13, p. 1707–1716, 2013.

SONG, W.; DING, L.; LIU, M.; CHENG, J.; ZHOU, J.; LI, Y.-Y. Improving biohydrogen production through dark fermentation of steam-heated acid pretreated *Alternanthera philoxeroides* by mutant *Enterobacter aerogenes* ZJU1. **Science of The Total Environment**, v. 716, p. 134695, 10 maio 2020.

SRIVASTAVA, R. K.; SHETTI, N. P.; REDDY, K. R.; KWON, E. E.; NADAGOUDA, M. N.; AMINABHAVI, T. M. Biomass utilization and production of biofuels from carbon neutral materials. **Environmental Pollution**, v. 276, p. 116731, 1 maio 2021.

SUKSONG, W.; KONGJAN, P.; O-THONG, S. Biohythane Production from Co-Digestion of Palm Oil Mill Effluent with Solid Residues by Two-Stage Solid State Anaerobic Digestion Process. **Energy Procedia**, v. 79, p. 943–949, 2015.

SUN, C.; XIA, A.; FU, Q.; HUANG, Y.; LIN, R.; MURPHY, J. D. Effects of pre-treatment and biological acidification on fermentative hydrogen and methane co-production. **Energy Conversion and Management**, v. 185, p. 431–441, 2019.

TAKEDA, P. Y.; OLIVEIRA, C. A.; DIAS, M. E. S.; PAULA, C. T.; BORGES, A. V.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Enhancing the energetic potential of sugarcane biorefinery exchanging vinasse and glycerol in sugarcane off-season in an anaerobic reactor. **Renewable Energy**, v. 195, p. 1218-1229, 2022.

TIBÚRCIO NETO, L.; PEITER, F. S.; CHAVES, T. C.; Methane production from anaerobic co-digestion of vinasse and molasses: effects of substrate proportion, COD and alkalizing agent. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 22, p. 1–16, 2025.

TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. H₂ competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea during biomethanation from a combined experimental-modelling approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 107281, 1 abr. 2022.

UTCHARIYAJIT, K.; PANPRASERT, V.; CHAYAWAT, L.; JUNGTHANASOMBAT, W.; JANPROM, P.; CHOATCHUANG, M. Physical properties and calorific value of briquettes produced from Palmyra palm waste with molasses binder. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 639, n. 1, p. 012046, 1 out. 2019.

VALENÇA, R. B.; SANTOS, L. A.; FIRMO, A. L. B.; SILVA, L. C. S.; LUCENA, T. V.; SANTOS, A. F. M. S.; JUCÁ, J. F. T. Influence of sodium bicarbonate (NaHCO₃) on the methane generation potential of organic food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, p. 128390, 2021.

VANDENBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; BITTENCOURT, G. A.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; VIEIRA, S.; KARP, S. G.; SYDNEY, E. B.; CARVALHO, J. C. de; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 167, p. 112721, 1 out. 2022.

VAN LIER, J. B.; MOHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic wastewater treatment. In: HENZE, M. et al. (ed.). *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. London: IWA Publishing, 2008.

VASCONCELOS, E. A. F.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1260–1271, 1 dez. 2016.

VO, T.-P.; LAY, C.-H.; LIN, C.-Y. Effects of hydraulic retention time on biohythane production via single-stage anaerobic fermentation in a two-compartment bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121869, 2019.

VOLPI, M. P. C.; FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; FRANCO, T. T.; MORAES, B. S. Operational and biochemical aspects of co-digestion (co-AD) from sugarcane vinasse, filter cake, and deacetylation liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 8969–8987, 2021.

WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresour. Technol.** v. 100, n. 24, p. 6339–6346, Dez. 2009.

WANG, B.; LI, Y.; WANG, D.; LIU, R.; WEI, Z.; REN, N. Simultaneous coproduction of hydrogen and methane from sugary wastewater by an “ACSTRH–UASBMet” system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 19, p. 7774–7779, 2013.

XU, X.; ZHOU, Q.; YU, D. The future of hydrogen energy: Bio-hydrogen production technology. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 79, p. 33677–33698, 15 set. 2022.

YANG, G.; WANG, J. Biohydrogen production by co-fermentation of antibiotic fermentation residue and fallen leaves: Insights into the microbial community and functional genes. **Bioresource Technology**, v. 337, 1 out. 2021.

YIN, Y.; SONG, W.; WANG, J. Inhibitory effect of acetic acid on dark-fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 364, p. 128074, 1 nov. 2022.

YIN, Y.; WANG, J. Production of biohydrogen. **Biofuels and Biorefining: Volume 1: Current Technologies for Biomass Conversion**, p. 283–337, 1 jan. 2022.

YESHANEW, M. M.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Production of biohythane from food waste via an integrated system of continuously stirred tank and anaerobic fixed bed reactors. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 312–322, 2016.

YAPICIOĞLU, P. S. Anaerobic co-digestion of brewery wastewater and malt dust for biohythane production: A biohydrogen production boosting method. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2025.

ZHANG, S.; WANG, J.; JIANG, H. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128860, 1 jun. 2021.

ZHANG, H.; FU, Z.; GUAN, D.; ZHAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; XIE, J.; SUN, Y.; GUO, L.; WANG, D. A comprehensive review on food waste anaerobic co-digestion: current situation and research prospect. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 179, p. 546–558, 2023.

ZHANG, Z.; XU, C.; ZHANG, Y.; LU, S.; GUO, L.; ZHANG, Y.; LI, Y.; HU, B.; HE, C.; ZHANG, Q. Cohesive strategy and energy conversion efficiency analysis of bio-hythane production from corncob powder by two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122746, 1 mar. 2020.