

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ALVARO FERREIRA MONTEIRO**

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO POME:  
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E AUMENTO DE ESCALA

RIO DE JANEIRO

2026

ALVARO FERREIRA MONTEIRO

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO POME:  
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E AUMENTO DE ESCALA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência.

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Coorientadora: Mariana de Oliveira Faber

Coorientadora: Denise Maria Guimarães Freire

RIO DE JANEIRO

2026

## CIP - Catalogação na Publicação

M775p Monteiro, Alvaro Ferreira  
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO  
POME: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E AUMENTO DE ESCALA /  
Alvaro Ferreira Monteiro. -- Rio de Janeiro, 2026.  
103 f.

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão.  
Coorientadora: Mariana de Oliveira Faber.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica, 2026.

1. POME. 2. hidrogênio. 3. metano. 4.  
fermentação. 5. digestão anaeróbia. I. Santana  
Ferreira-Leitão, Viridiana, orient. II. de Oliveira  
Faber, Mariana, coorient. III. Título.

ALVARO FERREIRA MONTEIRO

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO POME:  
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS E AUMENTO DE ESCALA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viridiana Santana Ferreira-Leitão – INT**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Maria Perpétua de Oliveira Santos - UFRJ**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Maria Fortes Gottschalk - EMBRAPA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Antunes Pereira Langone - UERJ**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder a bênção de concluir o mestrado em uma instituição renomada como a UFRJ, cercado de pessoas tão especiais.

À minha orientadora, Dra. Viridiana Ferreira-Leitão, pela confiança depositada em mim, antes mesmo de eu me tornar seu aluno de mestrado. Sou grato pela relação de respeito e liberdade construída ao longo desse período, e também por todo o carinho, apoio e incentivo. Sua liderança e forma de trabalhar são inspiradoras.

À minha orientadora e grande amiga, Dra. Mariana Faber, por sua orientação dentro e fora do laboratório. Por saber separar o pessoal do profissional, sendo exigente e honesta na medida certa. Obrigado pela agradável companhia em todos os almoços, eventos e viagens.

À minha orientadora, Dra. Denise Freire, pelas valiosas contribuições, críticas, compreensão e pelo inigualável bom humor.

À minha primeira orientadora no INT, Dra. Ayla Sant'Ana, por ter me escolhido para fazer parte do LABIC há quase dez anos e por todos os ensinamentos transmitidos desde então.

Aos meus pais, Marioneide e Newton, que sempre se dedicaram e se doaram para que eu tivesse condições de me dedicar aos estudos. Agradeço por todo o amor e apoio que sempre me ofereceram, sem os quais não seria possível concluir mais esta etapa.

Aos meus irmãos, Vinícius e Alessandro, por serem meus companheiros desde sempre e por torcerem pelo meu sucesso.

Às minhas tias, Marilena e Ivanilda, por sempre me incentivarem a buscar crescimento profissional e por vibrarem com cada uma das minhas conquistas.

Aos meus amados primos emprestados, Willian Monteiro e Mariana Monteiro, por estarem ao meu lado em momentos tão importantes da minha vida. Por terem compartilhado comigo a dura rotina de quem vive longe do trabalho, mas também por serem exemplos de dedicação e perseverança. Sou muito grato por todas as felizes coincidências que nos aproximaram, porque é um privilégio poder chamá-los de amigos.

Ao meu professor de Farmacognosia favorito, Gabriel Martins, por ter me incentivado a seguir na pós-graduação desde quando eu ainda era um graduando bem resistente à ideia.

Aos meus queridos amigos da sala 2, Roberta Espinheira, Marina Tomasini e Gabriel Haguihara, que além de terem minha admiração como profissionais, também

ocupam um lugar especial no meu coração. Obrigado pelo companheirismo que vai além do laboratório.

Aos membros da minha querida sala 4, Carolina Reis, Davi Marconi, Franciny Pires (minha rede de apoio), Ingrid Miguez e Jéssica Thiesen, por proporcionarem um ambiente alegre e descontraído, além de todo o apoio e auxílio mútuo no desenvolvimento das atividades.

Aos membros da equipe GALP 76 que atuaram no LABIC, Caroline Ribeiro (querida Pola), Daniel Fasheun, Gabriel dos Santos, Lucas de Freitas, Ronaldo Rodrigues e Stella Buback, pela colaboração, troca de conhecimentos e contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais membros do amado LABIC, que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido, criando um ambiente acolhedor, colaborativo e estimulante.

Aos membros da equipe GALP 76 que atuaram no LaBiM, pelas contribuições e pelo apoio durante as atividades relacionadas a este projeto.

Ao INT, pela infraestrutura disponibilizada, essencial para a realização deste trabalho.

À empresa Sinochem/PRIO, pela bolsa concedida durante parte do mestrado.

À empresa Petrogal, à ANP e à EMBRAPPII, por financiarem o projeto do qual este trabalho foi derivado e pela bolsa concedida durante o mestrado.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro.

*“Dream on, but don’t imagine they’ll all come true”*

Billy Joel

## RESUMO

No Brasil, estima-se a geração anual de cerca de 1,8 milhão de toneladas de POME (*palm oil mill effluent*), efluente complexo produzido em grandes volumes na indústria de óleo de palma. Devido ao seu alto teor de matéria orgânica, apresenta elevado potencial para conversão em bioenergia, especialmente na forma de hidrogênio ( $H_2$ ) e metano ( $CH_4$ ), configurando-se como alternativa sustentável para mitigação de impactos ambientais. Esta dissertação teve como objetivo avaliar a produção biológica de  $H_2$  e  $CH_4$  a partir de POME, investigando parâmetros operacionais e aumento do volume do reator. Na etapa de produção de  $H_2$ , avaliou-se o efeito do pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio e a influência da microbiota nativa do POME. O pré-tratamento do lodo mostrou-se essencial para maximizar a produção de  $H_2$ , ao inibir consumidores deste gás e selecionar populações mais eficientes. Embora a microbiota do POME também produza  $H_2$ , sua presença não influenciou significativamente, indicando que a esterilização do POME é desnecessária. Os melhores resultados de produção de  $H_2$  foram obtidos após 44 horas de fermentação a 35 °C, com carga orgânica inicial de 40 g<sub>DQO</sub>/L e alívio de pressão ao longo do processo, a saber, produção específica de 1401 N-mL/L, rendimento de 36 N-mL/L·g<sub>DQO</sub> e produtividade de 32 N-mL/L·h. Além disso, os ensaios em diferentes volumes de reator (300, 600, 1100 e 7000 mL) tiveram desempenhos comparáveis, observando-se relação linear entre o volume do reator e o volume total de  $H_2$  produzido, o que evidencia a robustez do processo e sua viabilidade para maiores escalas. Para a produção de  $CH_4$ , foram comparadas a digestão anaeróbia direta (a partir do POME) e a digestão sequencial (a partir do efluente da produção de  $H_2$ ). Esta apresentou desempenho superior, atingindo produção específica de 3873 N-mL/L em 35 dias, valor 27% superior ao obtido com a digestão direta em 63 dias. Adicionalmente, o potencial energético global do processo sequencial foi 62% maior, confirmando as vantagens da separação das etapas para um melhor aproveitamento energético do POME. Embora estudos adicionais em escalas mais próximas às industriais ainda sejam necessários, os resultados obtidos demonstram a viabilidade técnica da produção integrada de  $H_2$  e  $CH_4$  a partir de POME. A abordagem proposta configura-se como alternativa promissora para a valorização deste efluente, contribuindo para a diversificação da matriz energética e para o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis no setor agroindustrial.

Palavras-chave: POME, hidrogênio, metano, fermentação, digestão anaeróbia.



## ABSTRACT

In Brazil, it is estimated that approximately 1.8 million tons of POME (palm oil mill effluent) are generated annually. This complex effluent is produced in large volumes by the palm oil industry and, due to its high organic matter content, presents significant potential for conversion into bioenergy, particularly in the form of hydrogen ( $H_2$ ) and methane ( $CH_4$ ), thus representing a sustainable alternative for mitigating environmental impacts. This dissertation aimed to evaluate the biological production of  $H_2$  and  $CH_4$  from POME by assessing operational parameters and larger volume reactors. In the  $H_2$  production stage, the effect of thermal pretreatment of anaerobic sludge and the influence of the native microbiota of POME were evaluated. Sludge pretreatment proved essential to maximize  $H_2$  production by inhibiting hydrogen-consuming microorganisms and selecting more efficient fermentative populations. Although the microbiota naturally present in POME was also capable of producing  $H_2$ , its presence did not significantly influence the system's performance, indicating that POME sterilization is unnecessary. The best  $H_2$  production results were obtained after 44 hours of fermentation at 35 °C, with an initial organic load of 40 g<sub>COD</sub>/L and pressure release throughout the process, achieving a specific production of 1401 N-mL/L, a yield of 36 N-mL/L·g<sub>COD</sub>, and a productivity of 32 N-mL/L·h. Furthermore, experiments conducted at different reactor volumes (300, 600, 1100, and 7000 mL) showed comparable performance, with a linear relationship observed between reactor volume and total  $H_2$  production, demonstrating process robustness and scalability potential. For  $CH_4$  production, direct anaerobic digestion (from POME) and sequential digestion (from the effluent of the  $H_2$  production stage) were compared. The sequential approach showed superior performance, reaching a specific production of 3873 N-mL/L in 35 days, which was 27% higher than that obtained through direct digestion after 63 days. Additionally, the overall energy potential of the sequential process was 62% greater, confirming the advantages of phase separation for improved energy recovery from POME. Although further studies at near-industrial scales are still required, the results demonstrate the technical feasibility of integrated  $H_2$  and  $CH_4$  production from POME. The proposed approach represents a promising alternative for valorizing this effluent, contributing to energy matrix diversification and the development of more sustainable solutions in the agro-industrial sector.

Keywords: POME, hydrogen, methane, fermentation, anaerobic digestion.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Produção de óleo de palma de 2015 a 2024 (A) no mundo e (B) no Brasil..                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| Figura 2 – Esquema representativo das etapas do processamento dos frutos da palmeira até a obtenção do óleo de palma, bem como os principais pontos de geração de POME. ....                                                                                                                                                                                                                  | 21 |
| Figura 3 – Sistemas de tratamento do POME abertos para a atmosfera, os quais são comumente empregados nas indústrias de óleo de palma. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 22 |
| Figura 4 – Esquema representativo das principais etapas da digestão anaeróbia, a saber, hidrólise, acidogênese/ $\beta$ -oxidação, acetogênese/homoacetogênese e metanogênese, destacando as principais vias de degradação de monossacarídeos e ácidos graxos. ....                                                                                                                           | 24 |
| Figura 5 – Esquema representativo do processo de digestão anaeróbia sequencial utilizando lodo anaeróbio pré-tratado como inóculo na etapa acidogênica, em que há produção de $H_2$ , $CO_2$ e do efluente da produção de $H_2$ (EPH), e lodo anaeróbio <i>in natura</i> é usado como inóculo da etapa metanogênica, em que há produção de $CH_4$ e $CO_2$ . ....                             | 29 |
| Figura 6 – Esquema de classificação do hidrogênio por cores, segundo a matéria-prima de origem e o processo de obtenção empregado. ....                                                                                                                                                                                                                                                       | 32 |
| Figura 7 – Produção de biometano no Brasil. (A) Localização das instalações autorizadas no país e (B) volume de matéria-prima processada e de biometano produzido de 2020 a 2025. ....                                                                                                                                                                                                        | 40 |
| Figura 8 – Esquema representativo das atividades experimentais realizadas nesta dissertação e das perguntas associadas às definições necessárias para as etapas subsequentes. ....                                                                                                                                                                                                            | 44 |
| Figura 9 – Imagens dos reatores utilizados nos experimentos. (A) Reatores manométricos de vidro de 300, 600 e 1100 mL e (B) reator STR de 7000 mL. ....                                                                                                                                                                                                                                       | 47 |
| Figura 10 – Imagens do (A) digestor anaeróbio da estação de tratamento de esgoto, (B) ponto de coleta e (C) lodo anaeróbio coletado. ....                                                                                                                                                                                                                                                     | 52 |
| Figura 11 – Imagens do (A) ponto de coleta do POME e (B) POME coletado. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 55 |
| Figura 12 – Imagens das placas obtidas no ensaio de microgotas para as amostras de POME <i>in natura</i> e pré-tratado termicamente, inoculadas em meio PDA (à esquerda) e TSA (à direita), após 24 horas (acima) e 196 horas de incubação (abaixo). ....                                                                                                                                     | 58 |
| Figura 13 – Produção específica e produtividade de $H_2$ utilizando diferentes cargas orgânicas iniciais (10, 20 e 30 gDQO/L), lodo pré-tratado (10 gSSV/L), pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 24 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL. As barras representam a produção específica (eixo y esquerdo) e os círculos representam a produtividade (eixo y direito). .... | 62 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14 – Produção específica de H <sub>2</sub> ao longo do tempo em reatores com alívio de pressão, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), cargas orgânicas iniciais de POME de 30 e 40 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 44 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL. Os quadrados representam os valores experimentais e a linha contínua representa o ajuste do modelo de Gompertz. ....                                    | 66 |
| Figura 15 – Tipos de agitação utilizados nos experimentos. (A) Sistema de agitação orbital, empregado nos experimentos com reatores manométricos de vidro e (B) sistema de agitação por pás, empregado nos experimentos com reator do tipo STR.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 68 |
| Figura 16 – Cinética da fermentação do POME a 35 °C durante 44 h, com carga orgânica inicial de 40 g <sub>DQO</sub> /L, agitação a 100 rpm em um reator STR de 7000 mL e alívio de pressão. (A) Produção específica de H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> ; (B) concentrações de glicerol, 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico, e a evolução do pH no meio.....                                                                                                                                                | 69 |
| Figura 17 – Produção de H <sub>2</sub> a partir de POME, comparando reatores manométricos de vidro (300, 600 e 1100 mL) e agitação orbital (160 rpm) com reator STR (7000 mL) e agitação por pás (100 rpm). A comparação inclui a produção total de H <sub>2</sub> (N-mL, barras pretas, eixo y esquerdo), a produção específica de H <sub>2</sub> (N-mL/L, barras cinza, eixo y esquerdo) e a produtividade (N-mL/L.h, círculos brancos, eixo y direito) em 44 h. Condições: pH 5,5, 35 °C, com alívio de pressão. .... | 71 |
| Figura 18 – Comparação entre a digestão anaeróbia (A) direta, tendo POME <i>in natura</i> como matéria-prima, e (B) sequencial, tendo o efluente da fermentação do POME como matéria-prima. Ensaio com duração de 63 dias, usando como inóculo lodo anaeróbio <i>in natura</i> (6 g <sub>SSV</sub> /L), carga orgânica inicial de 18 g <sub>DQO</sub> /L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL. ....                                                                               | 75 |
| Figura 19 – Perfis de concentração de ácido acético (HAc) e ácido butírico (HBut) ao longo de 35 dias de digestão (A) direta, partindo do POME <i>in natura</i> , e (B) sequencial, partindo do efluente da fermentação do POME, usando lodo anaeróbio <i>in natura</i> como inóculo, carga orgânica inicial de 18 g <sub>DQO</sub> /L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL. ....                                                                                                 | 77 |
| Figura 20 – Produção de CH <sub>4</sub> utilizando o EPH durante 35 dias. (A) Produção específica de CH <sub>4</sub> e CO <sub>2</sub> e (B) concentração de AGVs no meio. Condições: lodo anaeróbio <i>in natura</i> como inóculo, carga orgânica inicial de 18 g <sub>DQO</sub> /L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reator STR de 7000 mL. ....                                                                                                                                                                      | 79 |
| Figura 21 – Esquema representativo das atividades experimentais realizadas nesta dissertação e suas respectivas conclusões. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 82 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Características do lodo anaeróbio usado neste trabalho. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 53 |
| Tabela 2 – Características do POME usado neste trabalho em comparação aos dados da literatura.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 56 |
| Tabela 3 – Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> a partir do POME, usando como inóculo lodo anaeróbio <i>in natura</i> ou pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), carga orgânica inicial de 10 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 24 h, em reatores manométricos de vidro de 300 mL.....                        | 59 |
| Tabela 4 – Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> a partir do POME <i>in natura</i> e pré-tratado termicamente, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), carga orgânica inicial de 30 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 40 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL..... | 61 |
| Tabela 5 – Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> a partir do POME em diferentes temperaturas (35 e 50 °C), usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), cargas orgânicas iniciais de 10 e 30 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm por 22 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL.....     | 64 |
| Tabela 6 – Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> a partir do POME sem alívio e com alívio de pressão, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), carga orgânica inicial de 30 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por até 44 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL. ....     | 65 |
| Tabela 7 – Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> a partir do POME em reatores manométricos de vidro de 300, 600 e 1100 mL, usando como inóculo lodo pré-tratado termicamente (10 g <sub>SSV</sub> /L), carga orgânica inicial de 40 g <sub>DQO</sub> /L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por até 44 h.....                                       | 67 |
| Tabela 8 – Comparação dos rendimentos da produção biológica de hidrogênio a partir de POME e parâmetros de processo em sistemas em batelada: dados deste estudo e de relatos da literatura. ....                                                                                                                                                                     | 73 |
| Tabela 9 – Comparação entre os teores de carga orgânica solúvel inicial e no tempo de 35 dias dos processos de digestão anaeróbia direta e sequencial, usando lodo anaeróbio <i>in natura</i> como inóculo, carga orgânica inicial total de 18 g <sub>DQO</sub> /L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL. ....                 | 78 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                                |                                                                                          |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| AGV                            | Ácido graxo volátil                                                                      |
| ANP                            | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis                              |
| ART                            | Açúcares redutores totais                                                                |
| CH <sub>4</sub>                | Metano                                                                                   |
| CNPq                           | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico                            |
| CSTR                           | <i>Continuous stirred tank reactor</i> (reator de tanque agitado contínuo)               |
| CO <sub>2</sub>                | Gás carbônico                                                                            |
| COFINS                         | Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social                                   |
| DA                             | Digestão anaeróbia                                                                       |
| DBO                            | Demanda bioquímica de oxigênio                                                           |
| DQO                            | Demanda química de oxigênio                                                              |
| EMPRAPII                       | Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial                                     |
| EPH                            | Efluente da produção de hidrogênio                                                       |
| ETE                            | Estação de tratamento de esgoto                                                          |
| FAPERJ                         | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro                                |
| GEE                            | Gás do efeito estufa                                                                     |
| H <sub>2</sub>                 | Hidrogênio                                                                               |
| H <sub>2</sub> S               | Gás sulfídrico                                                                           |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Ácido fosfórico                                                                          |
| HAc                            | Ácido acético                                                                            |
| HBut                           | Ácido butírico                                                                           |
| HPLC                           | <i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência) |
| N                              | Nitrogênio elementar                                                                     |
| NaOH                           | Hidróxido de sódio                                                                       |
| O&G                            | Óleos e graxas                                                                           |
| OLR                            | <i>Organic loading rate</i> (taxa de carga orgânica)                                     |
| PDA                            | <i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)                                       |
| PIS                            | Programa de Integração Social                                                            |
| POME                           | <i>Palm oil mill effluent</i> (efluente da produção do óleo de palma)                    |
| SSF                            | Sólidos suspensos fixos                                                                  |
| SST                            | Sólidos suspensos totais                                                                 |
| SSV                            | Sólidos suspensos voláteis                                                               |
| STR                            | <i>Stirred tank reactor</i> (reator de tanque agitado)                                   |
| TRH                            | Tempo de residência hidráulica                                                           |
| TRL                            | <i>Technology readiness level</i> (nível de maturidade tecnológica)                      |
| TSA                            | <i>Tryptone soy agar</i> (ágar triptona de soja)                                         |
| UASB                           | <i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> (reator anaeróbio de fluxo ascendente)            |

## SUMÁRIO

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                    | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                          | <b>18</b> |
| 2.1 O ÓLEO DE PALMA E O POME.....                                                            | 18        |
| 2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA .....                                                                 | 23        |
| 2.2.1 Principais Etapas da Digestão Anaeróbia .....                                          | 23        |
| 2.2.2 Parâmetros que Influenciam a Digestão Anaeróbia .....                                  | 26        |
| 2.2.3 Digestão Anaeróbia Sequencial.....                                                     | 28        |
| 2.3 HIDROGÊNIO.....                                                                          | 30        |
| 2.4 METANO.....                                                                              | 38        |
| <b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                  | <b>42</b> |
| <b>4 OBJETIVOS.....</b>                                                                      | <b>43</b> |
| 4.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                     | 43        |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                              | 43        |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                            | <b>44</b> |
| 5.1 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO.....                                                  | 45        |
| 5.2 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO POME .....                                                    | 45        |
| 5.2.1 Parâmetros Físico-Químicos .....                                                       | 45        |
| 5.2.2 Técnica de Microgota.....                                                              | 45        |
| 5.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DE POME .....                                                     | 46        |
| 5.3.1 Condições Gerais de Fermentação.....                                                   | 46        |
| 5.3.2 Efeito do Pré-Tratamento do Inóculo no Desempenho da Fermentação .....                 | 47        |
| 5.3.3 Avaliação da Necessidade de Pré-Tratamento do POME para a Produção de Hidrogênio ..... | 47        |
| 5.3.4 Influência da Carga Orgânica Inicial na Produção de Hidrogênio .....                   | 48        |
| 5.3.5 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio.....                                   | 48        |
| 5.3.6 Influência da Pressão Interna do Reator na Produção de Hidrogênio.....                 | 48        |
| 5.3.7 Ensaios de Produção de Hidrogênio em Diferentes Volumes de Reator .....                | 49        |
| 5.4 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO POME.....                                                 | 49        |
| 5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....                                                                  | 49        |
| 5.6 CÁLCULOS.....                                                                            | 50        |
| 5.6.1 Cálculo do Volume de Gás Produzido.....                                                | 50        |
| 5.6.2 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos .....                                                 | 51        |
| 5.6.3 Cálculo do Potencial Energético .....                                                  | 51        |
| <b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                        | <b>51</b> |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO .....                                                                  | 51 |
| 6.2 CARACTERIZAÇÃO DO POME.....                                                                             | 54 |
| 6.2.1 Parâmetros Físico-Químicos .....                                                                      | 55 |
| 6.2.2 Técnica de Microgota.....                                                                             | 58 |
| 6.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DE POME MAIS<br>ADEQUADAS PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ..... | 59 |
| 6.3.1 Efeito do Pré-Tratamento do Inóculo no Desempenho da Fermentação .....                                | 59 |
| 6.3.2 Avaliação da Necessidade de Pré-Tratamento do POME para a Produção de<br>Hidrogênio .....             | 60 |
| 6.3.3 Influência da Carga Orgânica Inicial na Produção de Hidrogênio .....                                  | 61 |
| 6.3.4 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio.....                                                  | 63 |
| 6.3.5 Influência da Pressão Interna do Reator na Produção de Hidrogênio.....                                | 65 |
| 6.3.6 Ensaios de Produção de Hidrogênio em Diferentes Volumes de Reator .....                               | 67 |
| 6.4 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO POME.....                                                                | 75 |
| 6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                              | 81 |
| 7 CONCLUSÕES .....                                                                                          | 83 |
| 8 PERSPECTIVAS .....                                                                                        | 83 |
| 9 REFERÊNCIAS .....                                                                                         | 84 |

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2024, a produção mundial de óleo de palma alcançou cerca de 78,5 milhões de toneladas, reafirmando sua posição entre as *commodities* agrícolas de maior volume de produção global (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025). O processo de extração do óleo de palma gera, de forma inerente, diversos resíduos e efluentes, destacando-se o POME (do inglês, *palm oil mill effluent*) como o mais relevante. Devido à sua alta carga orgânica, o POME se torna uma matéria-prima potencial para processos biológicos, como a produção de hidrogênio ( $H_2$ ) e metano ( $CH_4$ ) por meio de fermentação e digestão anaeróbia, respectivamente (Abdullah *et al.*, 2020; Arisht *et al.*, 2022; Imam *et al.*, 2025; Janesch *et al.*, 2021; Sani *et al.*, 2021; Zainal *et al.*, 2020).

Na digestão anaeróbia convencional em estágio único, tanto o  $H_2$  quanto o  $CH_4$  podem ser formados, em um processo mediado por consórcios microbianos presentes no lodo anaeróbio de estações de tratamento de esgoto. Entretanto, enquanto o  $CH_4$  constitui o produto final do processo biológico, o  $H_2$  é gerado como metabólito intermediário e posteriormente consumido nas etapas subsequentes. Nesse contexto, uma estratégia sistemática para a produção simultânea ou sequencial de ambos os gases a partir de uma mesma matéria-prima consiste na separação da digestão anaeróbia em dois estágios distintos, operados em reatores independentes, os quais diferem quanto ao consórcio microbiano predominante e aos produtos de interesse (Janesch *et al.*, 2021). Para favorecer a etapa acidogênica, o consórcio microbiano presente no lodo anaeróbio é, em geral, submetido a pré-tratamentos com o objetivo de promover o enriquecimento seletivo de micro-organismos produtores de  $H_2$ , ao mesmo tempo em que se inibem populações consumidoras desse gás. Como resultado dessa seleção, obtém-se um biogás composto predominantemente por  $H_2$  e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), além de um efluente caracterizado por elevada concentração de ácidos graxos voláteis (An, Xu e Dai, 2024; Hans e Kumar, 2019). Na etapa metanogênica subsequente, as arqueias metanogênicas, presentes no lodo anaeróbio não submetido a pré-tratamento, convertem esses intermediários orgânicos em um biogás constituído predominantemente por  $CH_4$  e  $CO_2$  (An, Xu e Dai, 2024; Hans e Kumar, 2019). A digestão anaeróbia em dois estágios pode levar ao aumento da produção de  $CH_4$  e da produtividade, melhorando assim a recuperação energética global processo (Hans e Kumar, 2019; Zheng e Li, 2024).

O  $H_2$  e o  $CH_4$  desempenham papéis centrais na transição energética global devido às suas propriedades como vetores energéticos de baixa emissão de carbono e à sua



versatilidade de uso, abrangendo desde a geração de eletricidade e calor até aplicações industriais e de transporte. Estudos recentes destacam que a produção biotecnológica desses gases a partir de resíduos orgânicos representa uma rota sustentável de valorização de biomassa e de redução de resíduos, alinhada com os princípios de economia circular e de redução de gases de efeito estufa (GEEs). Por exemplo, a produção biológica de  $H_2$  via fermentação se mostra uma alternativa promissora aos métodos convencionais de produção de  $H_2$ , sem a necessidade de condições severas de temperatura e pressão, o que pode reduzir impactos ambientais e custos operacionais (Antukh *et al.*, 2022). Simultaneamente, a produção de biometano por meio de digestão anaeróbia de resíduos e efluentes orgânicos tem se consolidado não apenas como fonte de energia renovável com alto potencial de rendimento energético, mas também como estratégia integrada de gestão de resíduos (Galih Pangestu, Razzak e Uddin, 2025). A conjugação dessas abordagens biotecnológicas atende à crescente demanda por combustíveis limpos e representa um caminho importante para diversificar a matriz energética, reduzir a dependência de combustíveis fósseis e promover modelos energéticos sustentáveis e mais resilientes.

Apesar de amplamente estudada, a produção de  $H_2$  a partir do POME ainda se encontra predominantemente em níveis intermediários de maturidade tecnológica (TRL 3 a 5), sendo necessário avançar para estágios de desenvolvimento em nível de protótipo para viabilizar sua aplicação em escala industrial (Yusnitati *et al.*, 2024).

O aproveitamento e a valorização do POME têm sido estudados no Laboratório de Biocatálise, Bioprodutos e Bioprocessos do Instituto Nacional de Tecnologia (LABIC/INT) desde 2015, inicialmente fazendo parte da linha de pesquisa bio $H_2$ , que posteriormente foi ampliada para produção de biogás a partir de resíduos agroindustriais. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo avaliar as principais variáveis do processo que influenciam a produção de  $H_2$  via fermentação do POME, com foco no pré-tratamento do inóculo, na carga orgânica inicial, na temperatura de operação e no efeito do alívio de pressão sobre a produção de  $H_2$ . No início do desenvolvimento desta dissertação, os experimentos de fermentação eram realizados em frascos de 300 mL. Uma grande contribuição deste trabalho foi o aumento para reatores de 7 L. Além disso, o trabalho explorou o potencial para a produção de  $CH_4$  a partir do POME em comparação à estratégia de digestão sequencial, que parte do efluente gerado durante a etapa de produção de  $H_2$ .

Neste primeiro capítulo, foi apresentado o tema da dissertação. O capítulo 2 traz a revisão bibliográfica, contemplando os principais conceitos necessários à compreensão do estudo. No capítulo 3, é apresentada a justificativa, destacando a relevância e a importância desta pesquisa. Os objetivos são descritos no capítulo 4, enquanto a metodologia adotada para alcançá-los é detalhada no capítulo 5. Os resultados obtidos e suas respectivas discussões são apresentados no capítulo 6. As principais conclusões do trabalho constam no capítulo 7 e, por fim, sugestões de trabalhos futuros no capítulo 8.

Esta pesquisa foi financiada pela Petrogal Brasil S.A. (ANP 23497-1), Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII), e apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (306978/2022) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (E-26/210.791/2021).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

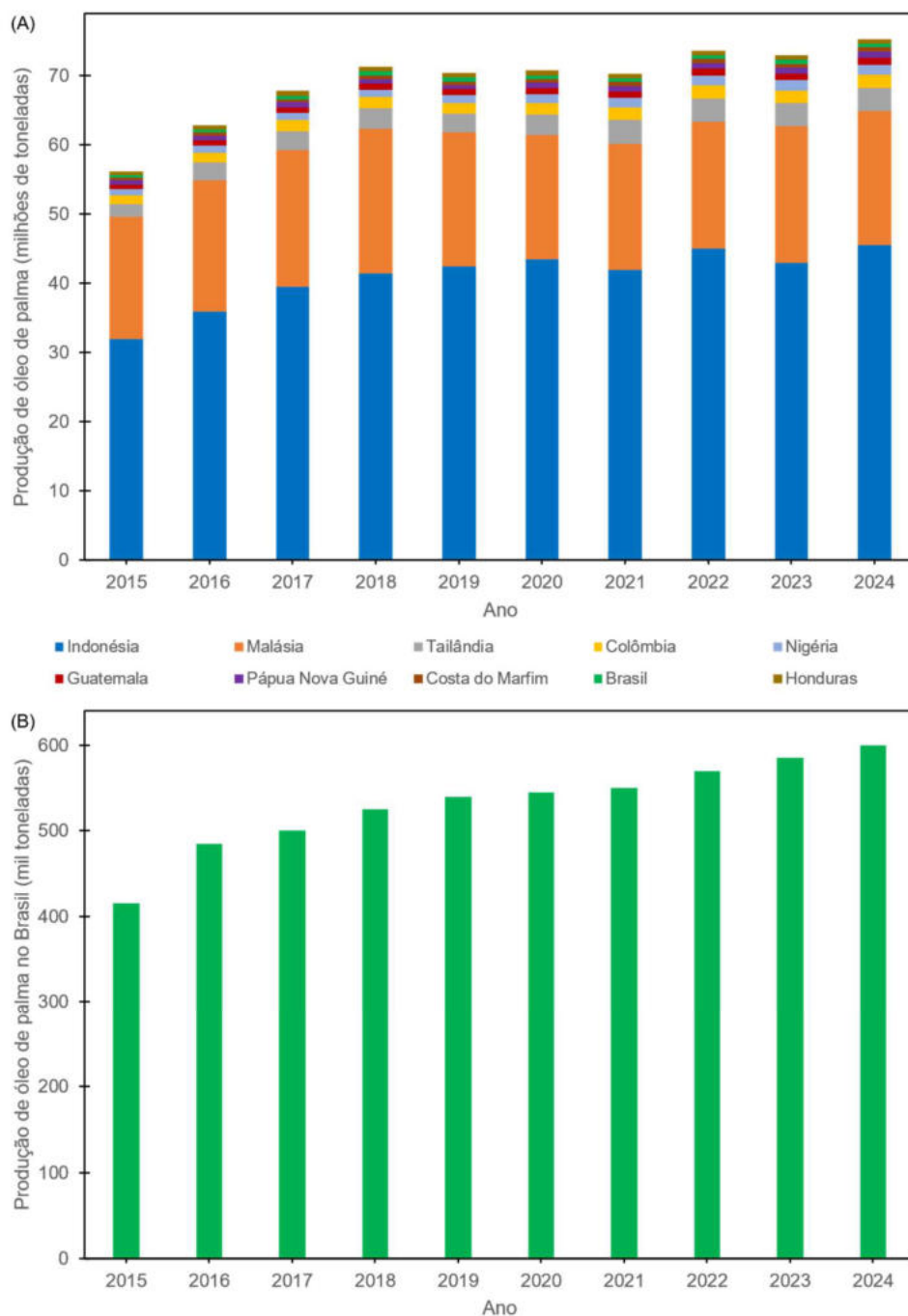
### **2.1 O ÓLEO DE PALMA E O POME**

O óleo de palma, também conhecido no Brasil como óleo de dendê, é um dos óleos vegetais mais produzidos e consumidos no mundo, em razão de seu elevado rendimento por área cultivada e de sua ampla aplicação nos setores alimentício, cosmético, farmacêutico, químico e energético (Alhaji *et al.*, 2024). Extraído do fruto da palmeira conhecida como dendezeiro (*Elaeis guineensis*), esse óleo apresenta produtividade significativamente superior à de outras oleaginosas (como soja, canola e girassol), podendo alcançar valores entre 4 e 4,5 t de óleo por hectare, o que reforça sua competitividade global e seu papel estratégico no suprimento de óleos vegetais (Alhaji *et al.*, 2024; Bhatia *et al.*, 2025).

A produção global de óleo de palma tem apresentado crescimento contínuo nas últimas décadas, impulsionada pelo aumento da demanda por alimentos processados, biocombustíveis e oleoquímicos. Em 2024, a produção mundial atingiu aproximadamente 78,5 milhões de toneladas (Figura 1A), sendo fortemente concentrada no Sudeste Asiático, com Indonésia e Malásia respondendo por mais de 80% da produção global (Ayompe *et al.*, 2025; FAO, 2025). Essa concentração geográfica levanta preocupações ambientais e sociais, especialmente relacionadas ao desmatamento e às emissões de gases de efeito estufa (GEEs), ao mesmo tempo em que intensifica o debate sobre práticas agrícolas sustentáveis e certificações ambientais.

A Figura 1 mostra que a produção de óleo de palma no Brasil segue o mesmo perfil de produção mundial. Houve um aumento na produção entre 2015 e 2018, seguido de estabilização. Cabe destacar que não houve retração durante a pandemia, uma vez que o setor alimentício, principal consumidor de óleo de palma, esteve entre os menos impactados no período, evidenciando a robustez da indústria do óleo de palma.

**Figura 1** – Produção de óleo de palma de 2015 a 2024 (A) no mundo e (B) no Brasil.

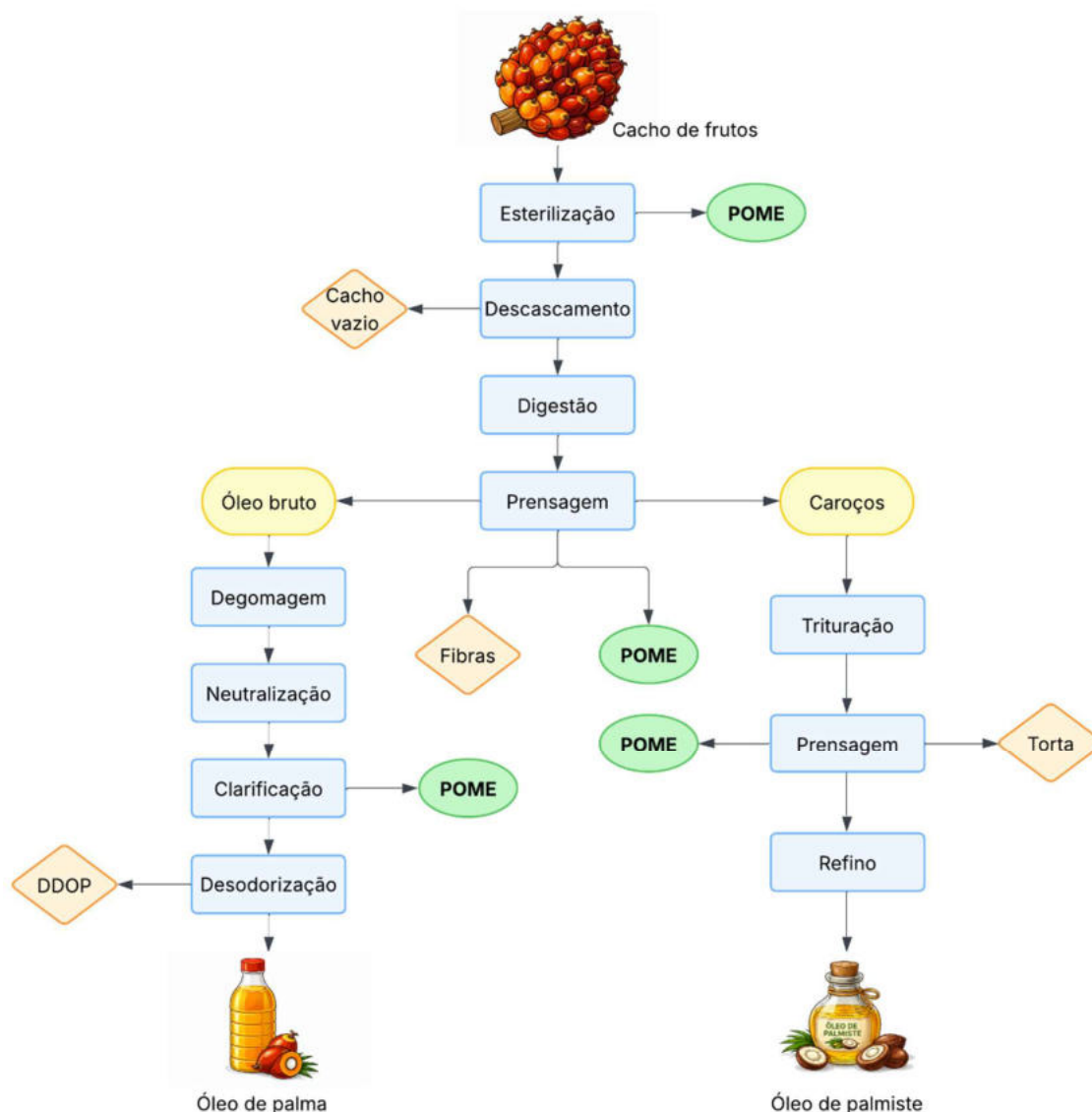


Fonte dos dados: FAO (2025).

No contexto brasileiro, o óleo de palma tem ganhado relevância econômica, social e ambiental, sobretudo na região Norte, com destaque para o estado do Pará, onde as condições climáticas favorecem o cultivo de *E. guineensis* (Araújo-Gomes *et al.*, 2024). Nos últimos dez anos, a produção nacional cresceu cerca de 47%, alcançando aproximadamente 600 mil toneladas em 2024 (Figura 1B). A expansão da cadeia produtiva do dendê no Brasil tem sido associada à geração de empregos, à inclusão de agricultores familiares e ao desenvolvimento regional, além de representar uma alternativa estratégica para a diversificação da matriz agrícola e energética nacional (Araújo-Gomes *et al.*, 2024; Ayompe *et al.*, 2025). Além disso, o aumento da produção doméstica reduz a dependência de importações de óleos vegetais e amplia a disponibilidade de matéria-prima para biocombustíveis e produtos de maior valor agregado, fortalecendo a bioeconomia brasileira.

Entretanto, a produção de óleo de palma está associada à geração de grandes volumes de resíduos, especialmente o efluente conhecido como POME (sigla do inglês *palm oil mill effluent*). Esse efluente é gerado principalmente durante as etapas de esterilização dos frutos, prensagem e clarificação do óleo (Figura 2), apresentando elevada carga orgânica e sendo produzido em grandes proporções. Estima-se que, para cada tonelada de óleo de palma produzida, sejam geradas entre 2,5 e 3,5 toneladas de POME, tornando-o um dos principais desafios ambientais da indústria de óleo de palma (Mohammad *et al.*, 2021; Sarwani *et al.*, 2019).

**Figura 2** – Esquema representativo das etapas do processamento dos frutos da palmeira até a obtenção do óleo de palma, bem como os principais pontos de geração de POME.



Fonte dos dados: Mba, Dumont e Ngadi (2015); Ong *et al.*, (2021)

O POME é caracterizado por altos valores de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de conter sólidos suspensos, óleos e graxas, nutrientes como nitrogênio e fósforo, e diversos compostos orgânicos dissolvidos. Valores de DQO frequentemente superiores a 40.000 mgO<sub>2</sub>/L e de DBO acima de 20.000 mgO<sub>2</sub>/L são reportados na literatura, evidenciando seu elevado potencial poluidor (Bhatia *et al.*, 2025; Sarwani *et al.*, 2019). Embora o POME não seja considerado tóxico em termos de compostos recalcitrantes ou metais pesados, seu descarte inadequado pode causar severos impactos ambientais, incluindo eutrofização de corpos d'água, depleção do oxigênio dissolvido e comprometimento de ecossistemas aquáticos (Ayompe *et al.*, 2025).

**Figura 3** – Sistemas de tratamento do POME abertos para a atmosfera, os quais são comumente empregados nas indústrias de óleo de palma.



Fonte: Islam et al. (2018); King et al. (2019).

Tradicionalmente, o tratamento do POME (Figura 3) tem sido realizado por meio de sistemas de lagoas anaeróbias, facultativas e aeróbias em série, devido à simplicidade operacional e ao baixo custo de implantação (Mohammad *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2010). No entanto, esses sistemas demandam grandes áreas e estão associados à emissão significativa de metano, um GEE com elevado potencial de aquecimento global, especialmente quando não há captura e aproveitamento energético do biogás gerado (Mohammad *et al.*, 2021; Sarwani *et al.*, 2019).

Em resposta a essas limitações, pesquisas recentes têm investigado alternativas tecnológicas mais eficientes e sustentáveis, como reatores anaeróbios de alta taxa, digestão anaeróbia em duas etapas, além de processos integrados envolvendo pré-tratamentos físico-químicos e etapas biológicas avançadas (Bhatia *et al.*, 2025; Sarwani *et al.*, 2019). Essas abordagens visam aumentar a remoção de matéria orgânica, reduzir o tempo de retenção hidráulica e possibilitar a recuperação de energia.

Além do enfoque no controle da poluição, o POME tem sido cada vez mais reconhecido como uma matéria-prima promissora para a recuperação de energia e de produtos de valor agregado. De forma geral, a literatura evidencia que o POME deixou de ser visto apenas como um passivo ambiental e passou a ser reconhecido como um recurso estratégico, cujo manejo adequado é fundamental para a sustentabilidade ambiental, energética e econômica da indústria de óleo de palma (Ayompe *et al.*, 2025; Ho *et al.*, 2025; Sarwani *et al.*, 2019).

Devido ao seu elevado teor de matéria orgânica biodegradável, o POME vem sendo explorado para a produção de biogás, hidrogênio biológico, ácidos orgânicos voláteis e biomassa microbiana, em consonância com os conceitos de biorrefinaria e economia

circular (Ho *et al.*, 2025; Sarwani *et al.*, 2019). O aproveitamento energético do POME por meio da digestão anaeróbia tem demonstrado potencial para reduzir custos operacionais, mitigar impactos ambientais e agregar valor à cadeia produtiva do óleo de palma (Cardoso, Alves e Serafim, 2024).

## 2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

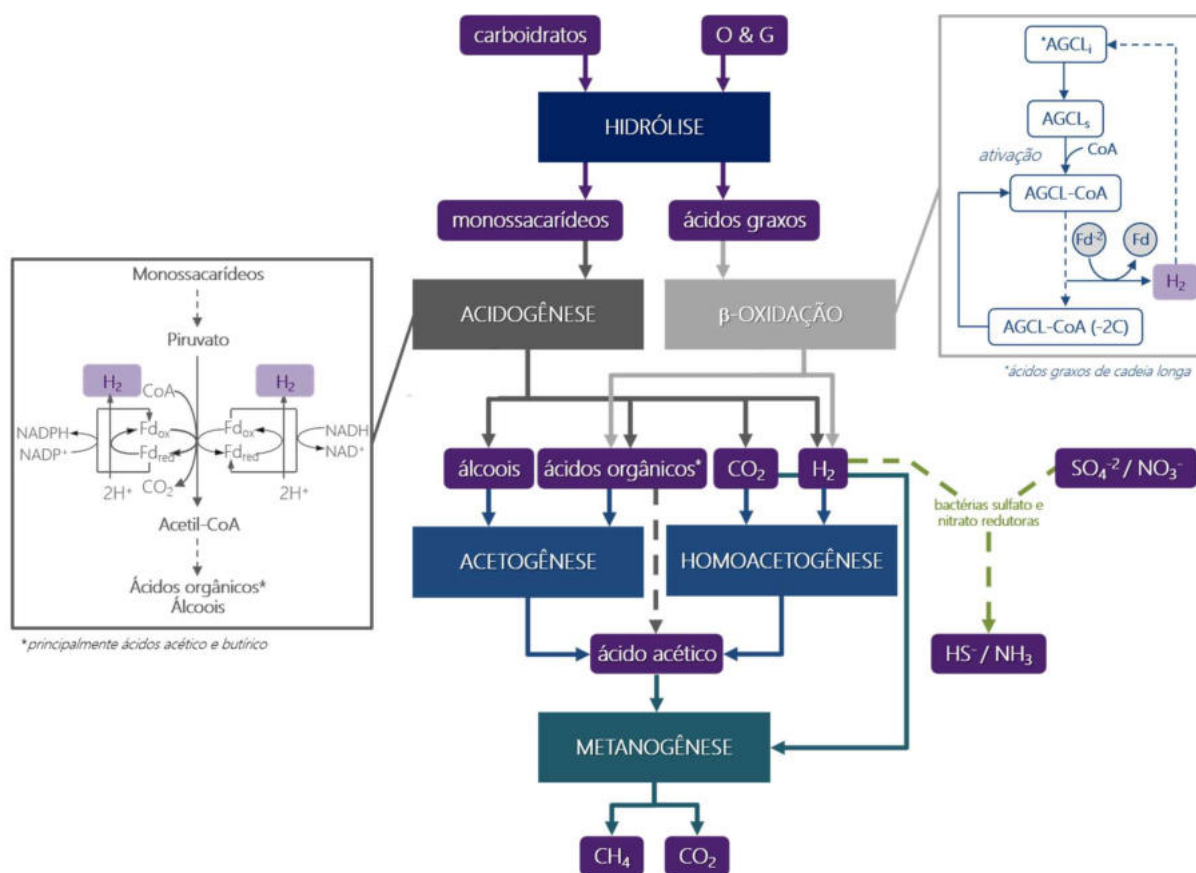
### 2.2.1 Principais Etapas da Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico amplamente estudado e aplicado para o tratamento de resíduos orgânicos e efluentes industriais, no qual consórcios microbianos convertem a matéria orgânica em biogás, uma mistura composta principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), na ausência de oxigênio (Anukam *et al.*, 2019; Richard *et al.*, 2019). Esse processo ocorre naturalmente em ambientes anaeróbios, como sedimentos, pântanos e trato digestivo de ruminantes, e vem sendo explorado tecnologicamente como uma alternativa sustentável para o manejo de resíduos, recuperação de energia e mitigação de impactos ambientais associados ao descarte inadequado de efluentes ricos em matéria orgânica (Abdelgadir *et al.*, 2014; Santos, Pires e Okada, 2024).

Do ponto de vista ambiental, a DA desempenha um papel fundamental na redução da carga orgânica, expressa por parâmetros como DQO e DBO, ao mesmo tempo em que possibilita a conversão de resíduos em energia renovável. Em comparação com processos aeróbios convencionais, a DA apresenta menor consumo energético, menor produção de lodo excedente e maior potencial de recuperação energética, tornando-se especialmente atrativa para o tratamento de efluentes agroindustriais e resíduos com elevada concentração de matéria orgânica (Anukam *et al.*, 2019; Santos, Pires e Okada, 2024).

O processo de DA, representado pelo esquema da Figura 4, é classicamente descrito em quatro etapas bioquímicas interdependentes: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Richard *et al.*, 2019). Na etapa de hidrólise, polímeros complexos como carboidratos, proteínas e lipídios são convertidos em compostos solúveis menores (açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos) por meio da ação de enzimas extracelulares produzidas por bactérias hidrolíticas (Cabeza, Lier e Steen, 2023). Essa etapa é frequentemente limitante, especialmente quando a matéria-prima apresenta elevada fração lignocelulósica ou lipídica.

**Figura 4** – Esquema representativo das principais etapas da digestão anaeróbia, a saber, hidrólise, acidogênese/ $\beta$ -oxidação, acetogênese/homoacetogênese e metanogênese, destacando as principais vias de degradação de monossacarídeos e ácidos graxos.



Fonte: Traduzido e adaptado de Soares et al. (2024).

Na sequência, a acidogênese envolve a fermentação desses compostos solúveis por bactérias acidogênicas, resultando na formação de ácidos graxos voláteis (AGVs), álcoois, hidrogênio ( $H_2$ ),  $CO_2$  e outros metabólitos intermediários (Anukam *et al.*, 2019). Esses produtos são então convertidos durante a acetogênese em acetato,  $H_2$  e  $CO_2$ , compostos diretamente assimiláveis pelas arqueias metanogênicas. Por fim, na metanogênese, arqueias estritamente anaeróbias convertem acetato (via rota acetoclástica) ou  $H_2$  e  $CO_2$  (via rota hidrogenotrófica) em metano, constituindo o principal componente energético do biogás (An, Xu e Dai, 2024; Hans e Kumar, 2019).

Além das etapas clássicas descritas anteriormente, vias metabólicas específicas como a  $\beta$ -oxidação, homoacetogênese e as reações de redução de sulfato e nitrato desempenham papéis importantes na dinâmica microbiana e no destino dos intermediários orgânicos. A  $\beta$ -oxidação corresponde à degradação microbiana de ácidos graxos de cadeia longa em compostos mais simples, principalmente acetato e  $H_2$ ,



ocorrendo em associação sintrófica com micro-organismos metanogênicos. Inicialmente, esses ácidos são ativados às suas respectivas formas acil-CoA e degradados sequencialmente pela via da  $\beta$ -oxidação. Durante esse processo, ocorre a remoção sucessiva de unidades de dois carbonos na forma de acetil-CoA, com geração de equivalentes redutores, como NADH e FADH<sub>2</sub> (Shi *et al.*, 2025). Em ambientes anaeróbios, bactérias sintróficas, como aquelas pertencentes aos gêneros *Syntrophomonas* e *Syntrophus*, catalisam essa oxidação sob condições de baixa pressão parcial de H<sub>2</sub>, uma vez que, do ponto de vista termodinâmico, a degradação isolada de ácidos graxos é energeticamente desfavorável (o acúmulo de H<sub>2</sub> aumentaria a energia livre da reação, interrompendo o processo) (Schink, 1997). Assim, a remoção contínua e eficiente do H<sub>2</sub> produzido, realizada por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, desloca o equilíbrio da reação, tornando-a termodinamicamente viável. Esse acoplamento metabólico permite a conversão subsequente dos intermediários formados em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, sustentando a estabilidade do processo anaeróbio (Shi *et al.*, 2025).

Já a homoacetogênese envolve a redução de CO<sub>2</sub> com H<sub>2</sub> para formar acetato pela via de Wood–Ljungdahl, sendo competitiva em condições de pH e temperatura específicas. Dessa forma, esta rota pode consumir uma fração significativa do H<sub>2</sub> produzido durante a fermentação, reduzindo o rendimento líquido disponível caso essa rota predomine (Saady, 2013). De forma geral, a homoacetogênese contribui para o balanço de carbono quando a metanogênese direta está desfavorecida, além de influenciar o acúmulo de ácidos e a distribuição dos fluxos de carbono (Pan *et al.*, 2021).

As reações de redução de sulfato, mediadas por bactérias redutoras de sulfato, competem com os metanogênicos por intermediários como H<sub>2</sub> e acetato, o que pode reduzir a produção de CH<sub>4</sub> ao desviar elétrons para a formação de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em vez de CH<sub>4</sub>, sendo particularmente relevante em efluentes ricos em sulfato ou em ambientes anóxicos com múltiplos aceptores de elétrons (Paulo, Stams e Sousa, 2015). Semelhantemente, a redução de nitrato e seus derivados (como nitrito e óxido nítrico) por consórcios microbianos também pode ocorrer em sistemas anaeróbios e influenciar as redes de fluxo eletrônico, alterando a disponibilidade de H<sub>2</sub> e afetando a simbiose com metanogênicos, sobretudo em presença de nitrogênio oxidado comoceptor alternativo (Heo *et al.*, 2025; Wu, M. *et al.*, 2024). Assim, quando o objetivo é maximizar a produção de H<sub>2</sub>, é fundamental inibir os micro-organismos redutores de sulfato e nitrato, os quais fazem uso destas vias competitivas e reduzem o rendimento do processo. Essas vias representam maneiras pelas quais a microbiota anaeróbia redistribui carbono e

elétrons, impactando diretamente a eficiência da conversão de matéria orgânica em CH<sub>4</sub> e determinando a estabilidade do processo digestivo.

### 2.2.2 Parâmetros que Influenciam a Digestão Anaeróbia

A DA depende de consórcios microbianos complexos e sintróficos, em que diferentes grupos (hidrolíticos, acidogênicos, acetogênicos, metanogênicos) executam etapas específicas (Harirchi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). A composição da matéria-prima, a disponibilidade de nutrientes e os níveis de amônia e sulfato moldam fortemente a estrutura da comunidade, mais do que o inóculo inicial em condições de longo prazo. Estudos mostram que, mesmo partindo de inóculos distintos, digestores operados sob as mesmas condições convergem para uma comunidade central, indicando que parâmetros operacionais são os principais reguladores da microbiota e da funcionalidade do sistema (Peces *et al.*, 2018).

Parâmetros como pH, temperatura, OLR e tipos de substrato modulam a abundância relativa de arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, bem como de bactérias fermentativas e acetogênicas, influenciando diretamente a rota metabólica predominante e, portanto, o desempenho em termos de estabilidade e rendimento de biogás (Harirchi *et al.*, 2022). A compreensão e o manejo desses fatores são apontados como centrais para otimizar a DA em cenários de resíduos sólidos orgânicos e efluentes complexos (Náthia-Neves *et al.*, 2018; Zamri *et al.*, 2021).

A natureza e composição da matéria-prima são determinantes para a taxa de hidrólise, etapa frequentemente limitante da DA (Menzel, Neubauer e Junne, 2020; Zamri *et al.*, 2021). A razão carbono/nitrogênio (C/N) influencia diretamente a produção de AGVs e a formação de amônia: C/N muito baixa favorece acúmulo de amônia e inibição, enquanto C/N muito alta leva à limitação de nitrogênio e baixa atividade microbiana, sendo a codigestão uma estratégia recorrente para ajustar esse parâmetro (Ferdeş *et al.*, 2023; Meegoda *et al.*, 2018).

A temperatura afeta a atividade de bactérias e arqueias metanogênicas. Em digestores em duas fases, temperaturas moderadas (25–35 °C) aumentam a produção de biogás e a atividade microbiana, enquanto temperaturas mais baixas (~20 °C) reduzem drasticamente a acidogênese e metanogênese (Wang *et al.*, 2019). Estudos em digestão de dejetos de frango com alta carga sólida demonstram que temperaturas elevadas, combinadas com altos teores de sólidos, aumentam a formação de amônia livre e AGVs, o que reduz a produção de CH<sub>4</sub> e favorece a acidificação (Chen *et al.*, 2025).

O pH influencia diretamente o equilíbrio entre formação de AGVs e consumo por metanogênicos. Desvios acentuados, geralmente associados ao acúmulo de AGVs, inibem a microbiota, sobretudo metanogênica (Harirchi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). Fatores como OLR (sigla do inglês *organic loading rate*) e o TRH são cruciais: OLR muito baixa resulta em subaproveitamento do reator, enquanto OLR elevada causa sobrecarga orgânica, acúmulo de AGVs e queda de pH. A manutenção de um balanço entre alta OLR e TRH suficiente é indicada como condição para maximizar o rendimento de CH<sub>4</sub> sem comprometer a estabilidade (Meegoda *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2023).

A amônia é um dos inibidores mais relevantes na DA de resíduos ricos em nitrogênio. O acúmulo de amônia livre, associada a pH elevado e altas temperaturas, afeta especialmente a metanogênese acetoclástica, levando ao acúmulo de acetato e, por retroalimentação, de propionato, valerato e outros ácidos de cadeia longa (Peng *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). Estudos mostram que, sob excesso de amônia, há quebra da rede metabólica ordenada e substituição de bactérias acetogênicas e metanogênicas sensíveis por populações mais tolerantes; porém, em níveis muito altos de amônia, a oxidação sintrófica de propionato é severamente suprimida, com queda superior a 65% no rendimento de CH<sub>4</sub> (Peng *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

O acúmulo de AGVs em si é outro fator crítico. Propionato e butirato possuem conversão termodinamicamente desfavorável sob condições padrão, tornando sua degradação etapa limitante e dependente de cooperação sintrófica com metanogênicos (Zhang *et al.*, 2023). Concentrações elevadas de AGVs reduzem o pH, inibem acetogênicos e metanogênicos e podem levar ao colapso do sistema (Harirchi *et al.*, 2022). Além disso, a presença de outros compostos tóxicos (sulfetos, metais pesados, ácidos graxos de cadeia longa) pode causar inibição direta dos micro-organismos, sendo frequentemente incorporados em modelos cinéticos como fatores de inibição (Keucken *et al.*, 2018).

Sendo um processo em múltiplas etapas, a DA é altamente sensível a condições físico-químicas, características da matéria-prima e dinâmica microbiana. A eficiência e a estabilidade do reator dependem do balanço entre essas etapas e da manutenção de um ambiente adequado para os micro-organismos envolvidos (Meegoda *et al.*, 2018; Zamri *et al.*, 2021). A configuração e o tipo de reator anaeróbio também exercem influência significativa sobre a eficiência do processo. Sistemas como lagoas anaeróbias, reatores UASB (sigla do inglês *upflow anaerobic sludge blanket*), CSTR (sigla do inglês *continuous stirred tank reactor*), reatores anaeróbios de membranas e reatores de leito

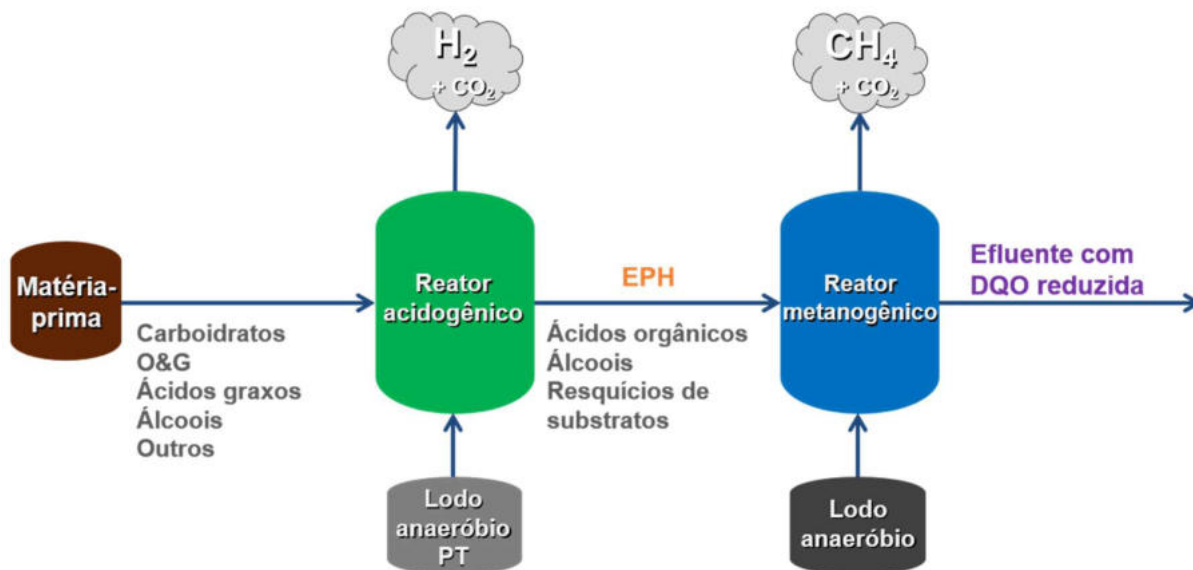
fixo ou granular apresentam diferentes capacidades de retenção de biomassa, resistência a choques de carga e eficiência na produção de biogás (Santos, Costa e Ferreira, 2023). A escolha do reator deve considerar as características do efluente, os objetivos do tratamento e as restrições econômicas e operacionais.

Entre as principais vantagens da digestão anaeróbia, destacam-se a elevada eficiência na remoção de matéria orgânica, a produção de biogás como fonte de energia renovável, a redução de emissões de GEEs e a geração de um digestato com potencial uso agrícola como fertilizante, desde que atendidos os critérios ambientais e sanitários (Santos, Pires e Okada, 2024). Por outro lado, o processo apresenta limitações, como a longa fase de adaptação, sensibilidade a variações de carga e pH, possível inibição por compostos tóxicos ou altas concentrações de amônia e sulfetos, além de menor eficiência na remoção de nutrientes quando comparado a processos aeróbios (Anukam *et al.*, 2019). Para contornar essas limitações, uma abordagem que tem recebido crescente atenção na literatura é a divisão da DA em duas etapas sequenciais.

### 2.2.3 Digestão Anaeróbia Sequencial

A digestão anaeróbia sequencial é uma estratégia que divide o processo de digestão em duas etapas: uma primeira etapa acidogênica voltada à produção de  $H_2$ , conhecida como fermentação, seguida por uma etapa metanogênica para conversão dos metabólitos residuais presentes no efluente da produção de  $H_2$  (EPH) em  $CH_4$  (Sarwani *et al.*, 2019). Essa separação permite a operação sob condições específicas e otimizadas para cada consórcio microbiano, maximizando a produção de  $H_2$  na etapa acidogênica, e de  $CH_4$  na etapa metanogênica. Essa abordagem aumenta a eficiência metabólica ao evitar interações indesejadas, como a inibição por ácidos orgânicos. Assim, a primeira etapa atua como um pré-tratamento biológico da matéria-prima, com pH mais ácido e menor tempo de retenção, favorecendo os micro-organismos produtores de  $H_2$ , enquanto a metanogênese é mantida sob condições mais estáveis na etapa subsequente. O esquema da Figura 5 representa o processo de DA sequencial.

**Figura 5** – Esquema representativo do processo de digestão anaeróbia sequencial utilizando lodo anaeróbio pré-tratado como inóculo na etapa acidogênica, em que há produção de  $H_2$ ,  $CO_2$  e do efluente da produção de  $H_2$  (EPH), e lodo anaeróbio *in natura* é usado como inóculo da etapa metanogênica, em que há produção de  $CH_4$  e  $CO_2$ .



Fonte: Elaboração própria.

Diversos estudos têm demonstrado que a DA sequencial resulta em aumento da produção total de biogás e da concentração de  $CH_4$  quando comparada à abordagem direta, além de permitir a valorização de diferentes produtos energéticos dentro do conceito de biorrefinaria (Janesch *et al.*, 2021; Sarwani *et al.*, 2019). Em sistemas de codigestão de resíduos alimentares e lodo ativado, por exemplo, a separação das etapas acidogênica e metanogênica promoveu um aumento de cerca de 35% na produção total de biogás, além de elevar a fração de  $CH_4$  de cerca de 61% no processo convencional para aproximadamente 70% na configuração em duas etapas, efeito atribuído ao maior acúmulo e conversão eficiente de AGVs no estágio metanogênico (Baldi, Pecorini e Iannelli, 2019). Do ponto de vista energético, estudos recentes indicam que a digestão em duas etapas pode alcançar rendimentos superiores de  $CH_4$ , como valores em torno de 341,1 mL/g<sub>DQOremovido</sub>, bem como maiores taxas volumétricas de produção e potenciais energéticos globais mais elevados, evidenciando a maior eficiência da conversão bioenergética (Devens *et al.*, 2025). Adicionalmente, a separação das fases metabólicas confere maior robustez ao processo sob condições de altas cargas orgânicas, permitindo a operação estável sem acidificação excessiva, com manutenção do equilíbrio ácido-básico e melhor desempenho energético, o que reforça as vantagens da DA sequencial para a valorização de resíduos orgânicos (Zheng e Li, 2024). Essa abordagem é

particularmente promissora para efluentes agroindustriais com elevada biodegradabilidade, como o POME, resíduos alimentares e efluentes ricos em carboidratos.

A literatura também reporta estudos que abordam a produção sequencial de CH<sub>4</sub> a partir de POME como matéria-prima. Em sistema termofílico de duas etapas, Sani et al. (2021) obtiveram rendimento máximo de 334,6 mL CH<sub>4</sub>/g<sub>DQO</sub> em batelada e 250,3 mL CH<sub>4</sub>/g<sub>DQO</sub> em regime contínuo, com aumento de cerca de 39% no rendimento energético total em relação à digestão em uma única etapa (Sani *et al.*, 2021). Mahmod e colaboradores (2020) realizaram a DA contínua do EPH do POME em um reator CSTR operado em condições termofílicas, a qual alcançou taxas de produção de CH<sub>4</sub> de aproximadamente 4,3 L/L<sub>POME</sub>·dia, com rendimento de cerca de 256,8 L/kg<sub>DQO</sub>consumida quando operado com TRH de 2 dias, indicando alta eficiência de conversão (Mahmod *et al.*, 2020).

Dessa forma, a digestão anaeróbia, especialmente quando integrada a estratégias de produção sequencial de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, consolida-se como uma tecnologia-chave no contexto da economia circular e das biorrefinarias, ao aliar tratamento eficiente de resíduos, recuperação energética e mitigação de impactos ambientais, contribuindo para sistemas produtivos mais sustentáveis e resilientes (Richard *et al.*, 2019; Santos, Pires e Okada, 2024; Sarwani *et al.*, 2019).

## 2.3 HIDROGÊNIO

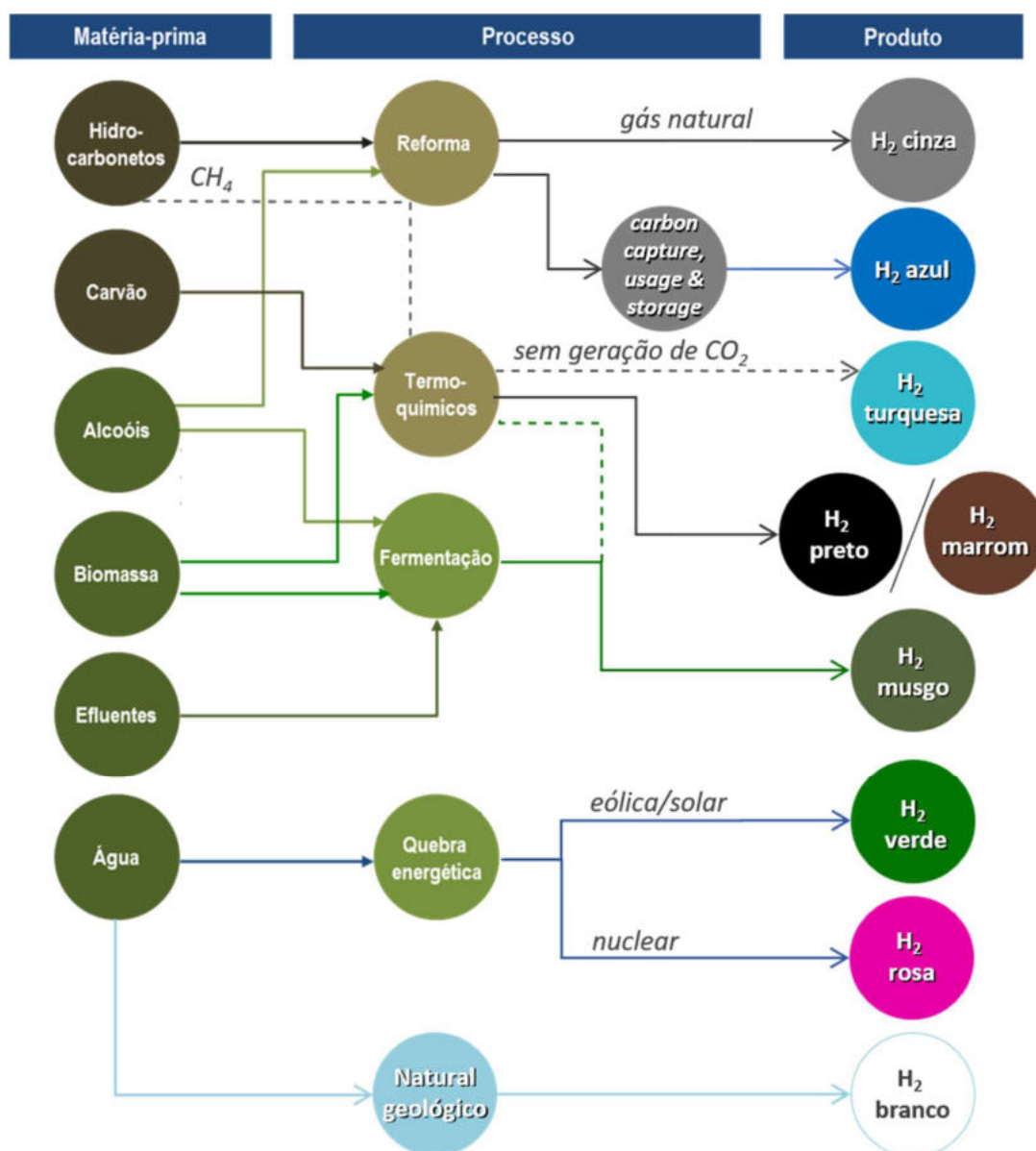
O hidrogênio (H<sub>2</sub>) tem ganhado destaque como vetor energético estratégico e insumo industrial essencial no contexto de uma economia de baixo carbono. Sua elevada densidade energética por unidade de massa (120 MJ/kg), aliada ao fato de que sua combustão gera apenas água como subproduto (Equação 1), confere ao H<sub>2</sub> um papel central nas estratégias globais de descarbonização (Bashir *et al.*, 2025), já que combustíveis comumente utilizados como CH<sub>4</sub>, gasolina e diesel possuem densidades energéticas bem menores (50, 44 e 43 MJ/kg, respectivamente) (Wallington *et al.*, 2025). Atualmente, o H<sub>2</sub> é considerado um elo fundamental entre os setores elétrico, industrial e de transporte, atuando como elemento de acoplamento setorial na transição energética.



Do ponto de vista de mercado, o  $H_2$  é amplamente utilizado como insumo industrial na síntese de amônia para fertilizantes, na hidrogenação de óleos e gorduras, no refino de petróleo e na produção de metanol (Vergara *et al.*, 2024). Mais recentemente, sua aplicação tem se expandido para células a combustível destinadas à geração de eletricidade estacionária e ao transporte pesado, incluindo ônibus, caminhões e aplicações marítimas e aéreas (Bashir *et al.*, 2025). Estimativas indicam que a demanda global por este gás, impulsionada por políticas climáticas e metas de neutralidade de carbono, atingirá cerca de 180 Mt até 2030 (Marzouk, 2023; Yusaf *et al.*, 2022), podendo chegar a 600 Mt até 2050 em cenários climáticos rigorosos (Marzouk, 2023; Terlouw *et al.*, 2024), sendo 400 Mt um valor de referência comum para um mundo com emissões líquidas zero (Terlouw *et al.*, 2024; Tonelli *et al.*, 2023).

Apesar de seu potencial ambiental, a produção atual de  $H_2$  ainda é majoritariamente baseada em rotas fósseis. Aproximadamente 95% do  $H_2$  produzido mundialmente provém da reforma a vapor do metano, da oxidação parcial de hidrocarbonetos ou da gaseificação do carvão, processos associados a elevadas emissões de  $CO_2$  (Aydin *et al.*, 2021; Bashir *et al.*, 2025). Assim, a produção de  $H_2$  pode ser classificada conforme a rota tecnológica empregada e a intensidade de emissões associadas, sendo comumente identificada por um sistema de cores (Figura 6).

**Figura 6** – Esquema de classificação do hidrogênio por cores, segundo a matéria-prima de origem e o processo de obtenção empregado.



Fonte dos dados: International Energy Agency (2023); EPE (2021).

O H<sub>2</sub> cinza é produzido principalmente pela reforma a vapor do CH<sub>4</sub> ou reforma autotérmica, utilizando gás natural como matéria-prima, sem captura de CO<sub>2</sub>, o que resulta em emissões significativas. O H<sub>2</sub> azul emprega as mesmas rotas fósseis, porém com captura e armazenamento de carbono, reduzindo parcialmente as emissões. Os hidrogênios preto e marrom são produzidos por gaseificação de carvão, sem captura de carbono. A distinção é apenas quanto ao tipo de carvão utilizado, sendo o preto a partir do betuminoso e o verde a partir do linhito, sendo o impacto ambiental elevado em ambos os casos. O H<sub>2</sub> verde é obtido por eletrólise da água utilizando eletricidade proveniente de fontes renováveis, apresentando potencial de baixíssima emissão de carbono ao longo



do ciclo de vida. Há ainda o H<sub>2</sub> turquesa, produzido por pirólise do CH<sub>4</sub> com geração de carbono sólido, e o rosa, derivado de eletrólise alimentada por energia nuclear. Há também o H<sub>2</sub> branco, o qual é encontrado naturalmente no subsolo, formado por processos geológicos e acumulado em reservatórios naturais (International Energy Agency, 2023; Dincer e Acar, 2014).

O termo “H<sub>2</sub> verde musgo” não é uma classificação oficialmente padronizada na literatura internacional, mas vem sendo utilizado, sobretudo no Brasil, para designar o H<sub>2</sub> produzido por rotas biotecnológicas, especialmente a partir de biomassa, biogás ou resíduos orgânicos. Diferentemente do H<sub>2</sub> verde convencional, enfatiza a origem biológica do carbono e da matéria-prima, estando associado a processos como reforma de biogás, gaseificação de biomassa, fermentação e rotas híbridas integradas à digestão anaeróbia (EPE, 2021).

Nesse contexto de rotas de produção de H<sub>2</sub> menos poluentes, o Brasil instituiu o Marco Legal para Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono, por meio da Lei nº 14.948/2024, que cria um regime especial de incentivos (Rehidro) para empresas que produzem H<sub>2</sub> de baixo carbono, com isenção tributária e incentivos fiscais para equipamentos e infraestrutura associados ao setor (BRASIL, 2024a). A regulamentação está prevista para reduzir custos iniciais e fomentar a tecnologia no país. O Programa Nacional de Hidrogênio, coordenado pelo Ministério de Minas e Energia, define ações estratégicas de curto, médio e longo prazo para consolidar o Brasil como produtor competitivo de H<sub>2</sub> de baixo carbono até 2030 e 2035 (BRASIL, 2026). A estratégia inclui estímulo à pesquisa, desenvolvimento tecnológico, formação de *hubs* regionais e criação de infraestrutura. A Lei nº 14.990/2024 complementa o quadro normativo ao instituir o Programa de Desenvolvimento do Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono, que prevê créditos fiscais de até R\$18,3 bilhões entre 2028 e 2032 para projetos de H<sub>2</sub> de baixo carbono que cumpram metas de redução de emissões e agregação à cadeia produtiva nacional (BRASIL, 2024b).

No Brasil, a produção de H<sub>2</sub> tem avançado por meio de projetos industriais e parcerias entre setores público e privado, ainda que muitos deles estejam em fases iniciais de desenvolvimento ou de investimento. Um dos exemplos mais emblemáticos é o projeto de H<sub>2</sub> verde planejado pela Fortescue na Zona de Processamento de Exportação de Pecém, no Ceará, com previsão de investimento de R\$ 17,5 bilhões e capacidade potencial de até 2,1 GW de eletrólise alimentada por fontes renováveis, com início de operações estimado para 2028, refletindo a atratividade do país para grandes empreendimentos no setor de H<sub>2</sub>

de baixo carbono (BRASIL, 2024d). Além desse, o país conta com outros projetos anunciados em diferentes estados, incluindo parcerias como as envolvendo Atlas Agro, Petrobras, Eletrobras, CSN, Neoenergia e Vale, que estão integrados em programas de desenvolvimento regional e *hubs* industriais voltados ao H<sub>2</sub>, e com planos que totalizam investimentos na ordem de centenas de bilhões de reais até 2030, abrangendo também projetos de fertilizantes e combustíveis verdes que utilizam H<sub>2</sub> produzido por eletrólise (BRASIL, 2025c).

As rotas tecnológicas em desenvolvimento no país concentram-se majoritariamente na eletrólise da água utilizando eletricidade gerada por fontes renováveis, que caracteriza o chamado H<sub>2</sub> verde ou H<sub>2</sub> de baixa emissão de carbono, conforme definido no marco legal instituído pela Lei nº 14.948/2024 e pela atuação da ANP na sua regulamentação (BRASIL, 2025a). Esta rota é promovida pelo crescimento da capacidade de geração solar, eólica e hidrelétrica no país e está sendo a base para a concepção de *hubs* de hidrogênio que integram produção, armazenamento e derivados, como amônia verde (Ministério de Minas e Energia, 2024). Adicionalmente, o Brasil explora rotas alternativas com potencial competitivo, como a reforma de etanol para produção de H<sub>2</sub> renovável e a utilização de correntes de biogás e biomassa como insumos biológicos ou híbridos, embora essas ainda não estejam plenamente difundidas em escala industrial (BRASIL, 2025a).

Entretanto, persistem lacunas tecnológicas e estruturais relevantes que limitam a implantação plena dessa cadeia produtiva. A produção de equipamentos críticos (como eletrolisadores) ainda depende fortemente de importações, o que eleva os custos iniciais e torna a cadeia nacional de suprimentos vulnerável a flutuações externas (BRASIL, 2025c). A infraestrutura de transporte, armazenamento e distribuição de H<sub>2</sub> ainda é incipiente, o que restringe o uso mais amplo do gás em setores industriais e em mercados fora dos grandes polos de produção (Ministério de Minas e Energia, 2024). Além disso, a necessidade de recursos financeiros substanciais, de uma base técnica qualificada e de coordenação tecnológica entre pesquisa e indústria são apontados como desafios adicionais, exigindo esforços contínuos de investimento e capacitação para tornar o Brasil competitivo em mercados domésticos e de exportação (BRASIL, 2025c).

Entre as alternativas mais sustentáveis de produção de H<sub>2</sub>, destaca-se a produção biológica, que utiliza micro-organismos capazes de converter substratos orgânicos em H<sub>2</sub> sob condições relativamente brandas de temperatura e pressão. As principais rotas biológicas incluem a fermentação, a fotofermentação, a biofotólise direta e indireta, e as

células eletroquímicas microbianas (Aydin *et al.*, 2021; Sarwani *et al.*, 2019). Dentre essas, a fermentação tem recebido maior atenção científica e tecnológica, devido à sua simplicidade operacional, maior taxa de produção volumétrica e aplicabilidade a uma ampla variedade de resíduos e efluentes orgânicos.

Na fermentação, micro-organismos anaeróbios, como espécies dos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter* e *Thermotoga*, convertem carboidratos, proteínas e lipídios em  $H_2$ , ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético e butírico),  $CO_2$  e pequenas quantidades de solventes (Aydin *et al.*, 2021). Esse processo apresenta vantagens relevantes quando comparado a outras rotas biológicas, como a independência de luz, menor tempo de retenção hidráulica e maior robustez operacional (Bashir *et al.*, 2025). Nesse contexto, a eficiência da fermentação para produção de  $H_2$  depende diretamente da composição e da atividade da comunidade microbiana envolvida, tornando a escolha do inóculo um fator determinante para o desempenho do processo.

O lodo anaeróbio proveniente de estações de tratamento de esgoto (ETE) destaca-se, portanto, como uma alternativa promissora de inóculo em processos fermentativos voltados à produção biológica de  $H_2$ , principalmente devido à sua elevada diversidade microbiana e à presença de comunidades já adaptadas a ambientes estritamente anaeróbios e ricos em matéria orgânica (Litti *et al.*, 2021). Estudos recentes apontam que esse tipo de inóculo contém consórcios microbianos capazes de converter diferentes substratos orgânicos em  $H_2$  e ácidos orgânicos, tornando-o uma alternativa tecnicamente viável e economicamente atrativa para sistemas de produção biológica de  $H_2$  (Zhang *et al.*, 2023; Wang & Yin, 2022).

As comunidades microbianas presentes em lodos de digestores anaeróbios são tipicamente dominadas por bactérias do filo Firmicutes, com destaque para o gênero *Clostridium* e outros relacionados, que são reconhecidos por sua alta capacidade de degradar carboidratos complexos e contribuir para a produção de  $H_2$  como metabólito intermediário da acidogênese (Hu, Zhou e Shen, 2024; Wu, H. *et al.*, 2024). Esses perfis bacterianos também incluem membros dos filos Bacteroidetes e Proteobacteria, que participam ativamente da degradação de compostos orgânicos e da liberação de metabólitos fermentativos que alimentam vias produtoras de  $H_2$  no consórcio microbiano (Rahman *et al.*, 2021). Durante a adaptação e operação de digestores, a abundância relativa desses grupos aumenta, refletindo a importância de comunidades hydrogenogênicas facultativas ou estritas para o desempenho do processo, sobretudo quando estratégias de pré-tratamento incluem a supressão de arqueias metanogênicas e

micro-organismos consumidores de  $H_2$  para favorecer o acúmulo desse gás (Hu, Zhou e Shen, 2024; Rahman *et al.*, 2021).

Entre as principais vantagens do uso de lodo anaeróbio de ETE como inóculo destacam-se sua ampla disponibilidade, baixo custo e diversidade metabólica, que permite a utilização de diferentes tipos de resíduos orgânicos como substrato (Silva-Martínez *et al.*, 2025). Além disso, a utilização de culturas mistas reduz a necessidade de condições estéreis e aumenta a robustez operacional do sistema. Por outro lado, a variabilidade na composição microbiana do lodo pode resultar em flutuações no rendimento de  $H_2$ , dificultando a padronização do processo (Pachapur *et al.*, 2019). Outro desafio relevante é a competição metabólica com micro-organismos consumidores de  $H_2$ , como metanogênicos e homoacetogênicos, o que frequentemente exige a aplicação de pré-tratamentos e/ou de controle de pH para maximizar a seletividade para produção de  $H_2$ . Adicionalmente, o biogás produzido contém  $CO_2$  e outros gases, demandando etapas posteriores de purificação quando se objetiva  $H_2$  de maior pureza.

Além da composição e pré-tratamento do inóculo, a eficiência da produção biológica de  $H_2$  depende fortemente da otimização de parâmetros como pH, temperatura, TRH, concentração e tipo de substrato. Valores de pH entre 5,0 e 6,5 e temperaturas mesofílicas (30–45 °C) ou termofílicas (50–70 °C) são frequentemente reportados como ideais para maximizar a atividade hidrogenogênica e minimizar vias metabólicas competitivas, como a metanogênese (Aydin *et al.*, 2021; Sarwani *et al.*, 2019). Estratégias como pré-tratamento térmico, ácido ou alcalino do lodo anaeróbio são amplamente empregadas para suprimir micro-organismos consumidores de  $H_2$  e favorecer populações produtoras (Pachapur *et al.*, 2019).

A carga orgânica inicial exerce influência determinante na fermentação voltada à produção biológica de  $H_2$ , podendo tanto favorecer o aumento do rendimento de  $H_2$  quanto provocar efeitos inibitórios, como sobrecarga de substrato e acidificação do meio reacional (Albuquerque *et al.*, 2024; Mokhtarani, Zanganeh e Moghtaderi, 2025).

A temperatura exerce influência crítica sobre a produção de  $H_2$ , uma vez que afeta o crescimento microbiano, a atividade enzimática, a solubilização de substratos e a estrutura da comunidade microbiana. Condições mesofílicas tendem a favorecer a formação de  $H_2$ , especialmente por bactérias do gênero *Clostridium*, enquanto temperaturas termofílicas mais elevadas podem resultar em maiores rendimentos, embora impliquem riscos de alterações nas vias metabólicas predominantes e aumento dos custos operacionais do processo (Karadag e Puhakka, 2010; Woon *et al.*, 2023; Zhao *et al.*,

2024). Portanto, é importante investigar a temperatura adequada dependendo das características da matéria-prima e do inóculo em cada sistema.

A pressão interna em reatores operados em batelada influencia diretamente a produção de  $H_2$  durante a fermentação, uma vez que o acúmulo excessivo de gás eleva a pressão parcial de  $H_2$ , podendo inibir a atividade da enzima hidrogenase e redirecionar as vias metabólicas para processos como solventogênese ou homoacetogênese, deslocando o equilíbrio reacional de formação para consumo de  $H_2$ . Em contraste, estratégias de alívio ou controle da pressão interna têm demonstrado potencial para aumentar o rendimento do processo (Cazier *et al.*, 2015; Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2023; Fasheun *et al.*, 2024).

Além disso, a integração da fermentação com processos subsequentes, como digestão anaeróbia metanogênica ou recuperação de ácidos orgânicos, tem sido proposta como estratégia para maximizar a recuperação energética total do sistema (Bashir *et al.*, 2025; Sarwani *et al.*, 2019).

Mesmo com todos esses desafios, diversos estudos recentes demonstram o elevado potencial de resíduos agroindustriais e efluentes orgânicos como substratos para a produção de  $H_2$  biológico, reforçando o alinhamento desse processo com os princípios da economia circular. Resíduos ricos em carboidratos facilmente degradáveis, como restos de frutas e hortaliças, resíduos citrícolas, efluentes da indústria de amido e resíduos lignocelulósicos pré-tratados, têm apresentado rendimentos promissores de  $H_2$  (Menezes *et al.*, 2024; Sarwani *et al.*, 2019). A literatura também relata diversos trabalhos de produção de  $H_2$  por fermentação usando o POME como matéria-prima. Akhbari e colaboradores (2019) avaliaram o processo em batelada e, por meio de modelagem via metodologia de superfície de resposta, obtiveram rendimento máximo de cerca de 3,63 mol  $H_2$ /mol glicose equivalente, com remoção de DQO de 58,3% após 24 h, sob pH 6,0 e temperatura de 35–40 °C, evidenciando o potencial do efluente como fonte de carbono para geração de  $H_2$  (Akhbari *et al.*, 2019). Em sistemas contínuos, o uso de POME em biorreatores termofílicos também mostrou desempenho promissor. Em um reator UASFF (sigla do inglês *upflow anaerobic sludge fixed film*) operado entre 37 e 57 °C, sem adição de outros substratos, o POME foi convertido em  $H_2$  com rendimento de 0,95 L  $H_2$ /gDQOremovida, taxa de produção de 10,39 L/d e remoção de DQO de 35,9%, confirmando a viabilidade do tratamento simultâneo do efluente e recuperação energética (Zainal *et al.*, 2022). Um estudo de pré-tratamento químico comparativo mostrou que o uso de  $H_3PO_4$  2,5% (m/v) em POME aumentou a concentração de carboidratos solúveis em

70% e o rendimento de  $H_2$  em 2,35 vezes em relação ao POME *in natura* (Arisht *et al.*, 2022). Em batelada, as melhores condições (pH 5,5, 60 °C) geraram 1,69 mol  $H_2$ /mol carboidrato total e 0,208 mmol/L.h, enquanto em reator CSTR contínuo, nas mesmas condições, o rendimento foi 50% maior.

Sendo assim, a produção biológica de  $H_2$  a partir de resíduos e efluentes orgânicos representa uma rota promissora e ambientalmente sustentável, ao mesmo tempo em que contribui para a redução da poluição, mitigação de emissões de GEEs e diversificação da matriz energética. A consolidação dessa tecnologia depende do avanço em pesquisas voltadas à otimização de processos, integração em biorrefinarias e avaliação técnico-econômica em escala industrial.

## 2.4 METANO

O metano ( $CH_4$ ), um hidrocarboneto de cadeia simples, é o principal componente do gás natural, podendo representar até 90% de sua composição, e possui elevada densidade energética volumétrica, o que o torna um combustível estratégico para geração de calor, eletricidade e como matéria-prima para a indústria química e petroquímica (Bakkaloglu e Hawkes, 2024). Além de sua ampla utilização na produção de energia, o  $CH_4$  é empregado na síntese de amônia, metanol e  $H_2$ , sendo um insumo fundamental para setores como fertilizantes, refino e produção de combustíveis sintéticos (Nesterenko *et al.*, 2023). Nos últimos anos, o  $CH_4$  renovável, especialmente sob a forma de biogás e biometano, tem ganhado relevância no contexto da transição energética. O biometano, obtido a partir da purificação do biogás, apresenta composição semelhante à do gás natural fóssil e pode ser injetado em redes de distribuição existentes ou utilizado diretamente em motores, caldeiras e sistemas de cogeração, bem como em aplicações veiculares (Bakkaloglu e Hawkes, 2024). Essa compatibilidade confere ao biometano uma grande vantagem competitiva frente a outros combustíveis renováveis, ao permitir a utilização de infraestruturas já estabelecidas. No Brasil, a exigência de qualidade do biometano para injeção em redes de gás natural ou para uso veicular está regulada pela ANP por meio das Resoluções ANP nº 886/2022 e ANP nº 906/2022. Essas resoluções estabelecem especificações de composição do biometano, incluindo o conteúdo mínimo de  $CH_4$ , para que o biogás purificado seja reconhecido como biometano e possa ser injetado na malha de gás natural ou ser comercializado como combustível no país (BRASIL, 2025b). Segundo a regulamentação atual, para que o biogás purificado seja

classificado como “biometano” no Brasil e, por consequência, seja elegível para injeção e comercialização, ele deve conter teor de metano superior a 90 % de sua composição volumétrica, com limites estritos para dióxido de carbono e outras impurezas.

Nesse contexto, o Brasil detém um potencial técnico estimado de cerca de 84,6 bilhões de m<sup>3</sup> de biogás por ano, derivado de uma diversidade de resíduos agroindustriais, urbanos e pecuários, o que representa uma importante oportunidade de contribuição para a segurança energética e redução de emissões de GEEs (Fernández *et al.*, 2026). Entretanto, no ano de 2024, a capacidade instalada em operação era de 4,7 bilhões de Nm<sup>3</sup> por ano (CIBiogás, 2025), o que representa apenas 5,6% do potencial técnico estimado, evidenciando um subaproveitamento significativo dos recursos disponíveis e uma oportunidade estratégica para fortalecer a matriz energética e promover a sustentabilidade.

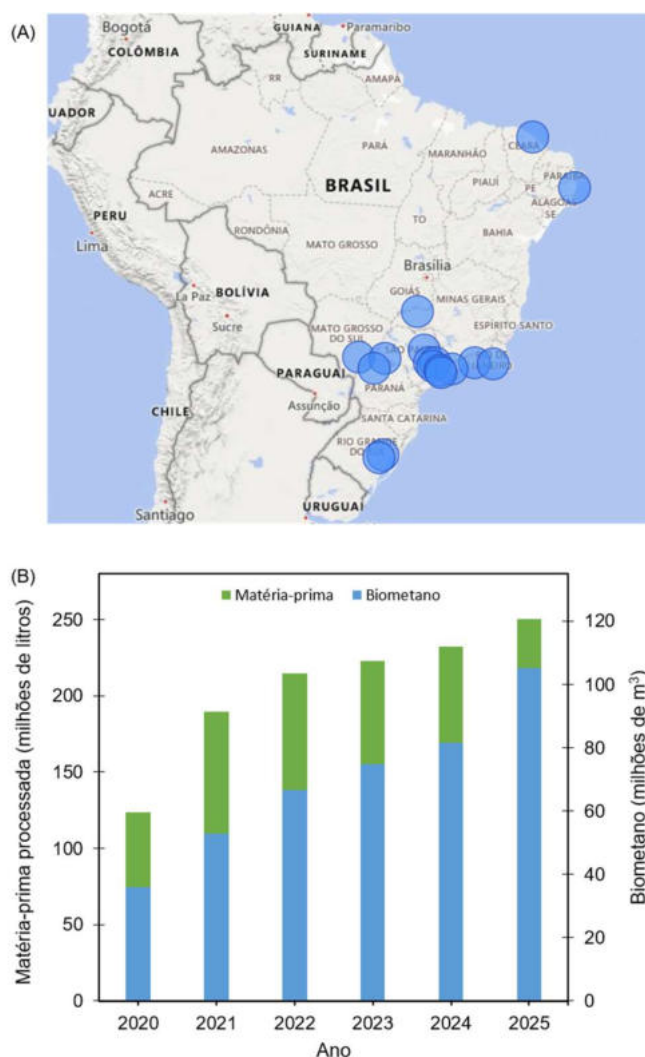
No âmbito regulatório e legislativo, o país tem estruturado um arcabouço jurídico progressivo para fomentar a produção e utilização de biogás e biometano. O Decreto nº 11.003/2022 instituiu a Estratégia Federal de Incentivo ao Uso Sustentável de Biogás e Biometano, com o objetivo de reduzir emissões de CH<sub>4</sub>, incentivar ações de implantação de biodigestores, sistemas de purificação de biogás e fomentar a pesquisa científica e tecnológica no setor (BRASIL, 2022a). A Lei nº 14.993/2024, conhecida como Lei do Combustível do Futuro, ampliou esse arcabouço ao instituir o Programa Nacional de Descarbonização do Produtor e Importador de Gás Natural e de Incentivo ao Biometano, que estimula a pesquisa, produção, comercialização e uso de biometano na matriz energética brasileira, com metas anuais de redução de emissões de GEEs a partir de 2026, iniciando em 1% e podendo alcançar até 10% (BRASIL, 2024c).

Dentro dessas políticas públicas, destaca-se o Programa Metano Zero, que visa promover a produção sustentável de biogás e biometano a partir de resíduos orgânicos urbanos e rurais, com linhas de crédito, facilitação de acesso a financiamento e estímulos fiscais, incluindo a inclusão de projetos de biometano no Regime Especial de Incentivos para o Desenvolvimento da Infraestrutura, com suspensão de PIS/COFINS na aquisição de equipamentos e materiais (BRASIL, 2022b). Além disso, iniciativas como o Projeto de Fomento ao Aproveitamento Energético de Biogás no Brasil (PROBIOGÁS), resultado de cooperação entre governos brasileiro e alemão, atuam na melhoria das condições regulatórias, integração entre pesquisa e indústria e capacitação de profissionais, fortalecendo a cadeia nacional de tecnologia em biogás e biometano (BRASIL, 2023). Recentemente, iniciativas legislativas em tramitação no Congresso também buscam

incluir o biogás entre os incentivos à energia renovável para pequenos produtores, incentivando a geração descentralizada e o acesso a tecnologias por agricultores familiares (BRASIL, 2025c).

No panorama industrial e empresarial, a produção biológica de  $\text{CH}_4$  no Brasil é caracterizada por um número crescente de plantas e empresas no setor. Dados da ANP indicam a existência de diversas plantas de biometano autorizadas e em construção em diferentes estados, evidenciando um movimento de expansão do setor e de diversificação de matérias-primas para além de resíduos urbanos, incluindo subprodutos agroindustriais (Portal Energia e Biogás, 2025). Pelo mapa da Figura 7A, é possível perceber que a maior parte das 18 instalações autorizadas está concentrada nas regiões Sul e Sudeste do país.

**Figura 7** – Produção de biometano no Brasil. (A) Localização das instalações autorizadas no país e (B) volume de matéria-prima processada e de biometano produzido de 2020 a 2025.



Fonte dos dados: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2026).



Além disso, a Figura 7B indica que a produção de biometano apresentou crescimento expressivo entre 2020 e 2025, com aumento de aproximadamente 104%. Observa-se também o aumento da eficiência de aproveitamento da matéria-prima, com incremento do volume de biometano produzido de 0,29 para 0,42 m<sup>3</sup>/L de matéria-prima processada.

Algumas empresas envolvidas neste setor são especializadas, como a ZEG Biogás, que atua no estado de São Paulo com produção e comercialização de biogás e biometano a partir da DA de resíduos orgânicos. Há também grandes projetos, como a planta Biometano Verde Paulínia S.A. (Onebio), fruto de parceria entre grupos empresariais (Edge e Orizon), com capacidade prevista de até 225.000 m<sup>3</sup> de biometano por dia, financiada pelo BNDES com recursos do Fundo Clima e destinados à mitigação de emissões e expansão da economia de baixo carbono (BNDES, 2024).

Entre os principais entraves tecnológicos e de mercado, destacam-se ainda os elevados custos iniciais de implantação de biodigestores e plantas de purificação, a necessidade de maior infraestrutura logística para distribuição de biometano (especialmente para mercados fora da malha de gás natural), e a adaptação das tecnologias a escalas diversificadas de produção, desde pequenos sistemas rurais até grandes unidades industriais (Bueno *et al.*, 2025). Apesar desses desafios, a combinação de políticas públicas, incentivos fiscais, programas de cooperação internacional, expansão de plantas autorizadas e iniciativas privadas tem contribuído para consolidar o Brasil como um ambiente promissor para a produção biológica de CH<sub>4</sub> no contexto de transição energética e economia circular.

Do ponto de vista climático, o CH<sub>4</sub> desempenha um papel dual na transição energética. Por um lado, quando liberado diretamente à atmosfera, é um GEE com potencial de aquecimento global significativamente superior ao do dióxido de carbono a curto prazo. Por outro, como o CH<sub>4</sub> tem a maior razão hidrogênio/carbono entre os hidrocarbonetos, ao ser queimado, libera menos CO<sub>2</sub> por unidade de energia gerada (Equação 2) quando comparado a outros combustíveis à base de carbono (Tripathi e Dhar, 2022). Ao ser produzido de forma controlada a partir de fontes renováveis e utilizado como substituto de combustíveis fósseis, o CH<sub>4</sub> pode contribuir para a redução líquida de emissões de GEEs, especialmente ao evitar emissões associadas à decomposição de resíduos orgânicos em aterros e ambientes anaeróbios naturais (Qian *et al.*, 2025; Santos, Costa e Ferreira, 2023).



Historicamente, a principal rota de produção de CH<sub>4</sub> tem sido a extração de gás natural fóssil, envolvendo atividades de perfuração, processamento e transporte, frequentemente associadas a emissões de CH<sub>4</sub> e impactos ambientais relevantes. Em contraste, rotas alternativas vêm ganhando destaque, incluindo a produção de CH<sub>4</sub> sintético (*power-to-methane*) e, sobretudo, a produção biológica por meio da digestão anaeróbia (DA), considerada uma das tecnologias mais maduras e amplamente aplicadas para valorização energética de resíduos orgânicos (Jame *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2025).

A DA é um processo biológico no qual consórcios microbianos convertem matéria orgânica em biogás, composto tipicamente por 50–70% de CH<sub>4</sub> e 30–50% de CO<sub>2</sub>, além de traços de outros gases (Jame *et al.*, 2021).

Diversos tipos de resíduos orgânicos têm sido explorados como matérias-primas para a produção biológica de metano, incluindo resíduos agroindustriais, resíduos alimentares, dejetos animais, lodos de estações de tratamento de esgoto e resíduos sólidos urbanos. Esses materiais apresentam elevado teor de matéria orgânica biodegradável, tornando-se matérias-primas promissoras para geração de energia renovável e tratamento ambiental simultâneo (Qian *et al.*, 2025; Sousa e Rizzatto, 2022).

Apesar dos desafios existentes, a produção biológica de CH<sub>4</sub> a partir de resíduos e efluentes orgânicos configura-se como uma tecnologia consolidada e estratégica no âmbito da economia circular, ao permitir a conversão de resíduos em energia, reduzir a dependência de combustíveis fósseis e mitigar emissões de GEEs, além de possibilitar a valorização do digestato como fertilizante agrícola, desde que atendidos critérios ambientais e sanitários (Santos, Costa e Ferreira, 2023). Nesse contexto, o CH<sub>4</sub> renovável, na forma de biogás ou biometano, destaca-se como um vetor energético relevante na transição para sistemas de baixa emissão de carbono, integrando de maneira eficiente a gestão de resíduos, a produção de energia e o desenvolvimento sustentável.

### 3 JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por fontes renováveis e a necessidade de valorização de resíduos agroindustriais tornam estratégico o estudo da produção biológica de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> a partir do POME. O Brasil gera aproximadamente 1,8 milhão de toneladas de POME por ano, com forte concentração no estado do Pará, principal polo nacional da cadeia do óleo

de palma. Apesar desse expressivo potencial energético, a região ainda não dispõe de plantas dedicadas à produção biológica de  $H_2$  ou  $CH_4$ , o que evidencia uma lacuna tecnológica e de infraestrutura no aproveitamento energético desse efluente. Considerando que o POME apresenta elevada carga orgânica e alto potencial bioquímico de conversão, sua utilização em processos biológicos, como fermentação para produção de  $H_2$  seguida de digestão anaeróbia para geração de  $CH_4$ , configura uma alternativa promissora sob a perspectiva ambiental e energética. Além de mitigar impactos ambientais associados ao descarte inadequado do efluente, a energia produzida poderia suprir total ou parcialmente às próprias plantas de processamento de óleo de palma e contribuir para o abastecimento energético das comunidades locais, promovendo o desenvolvimento regional, a redução de emissões de GEE e o fortalecimento da bioeconomia amazônica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção biológica de  $H_2$  e  $CH_4$  utilizando POME como matéria-prima e lodo anaeróbio como inóculo.

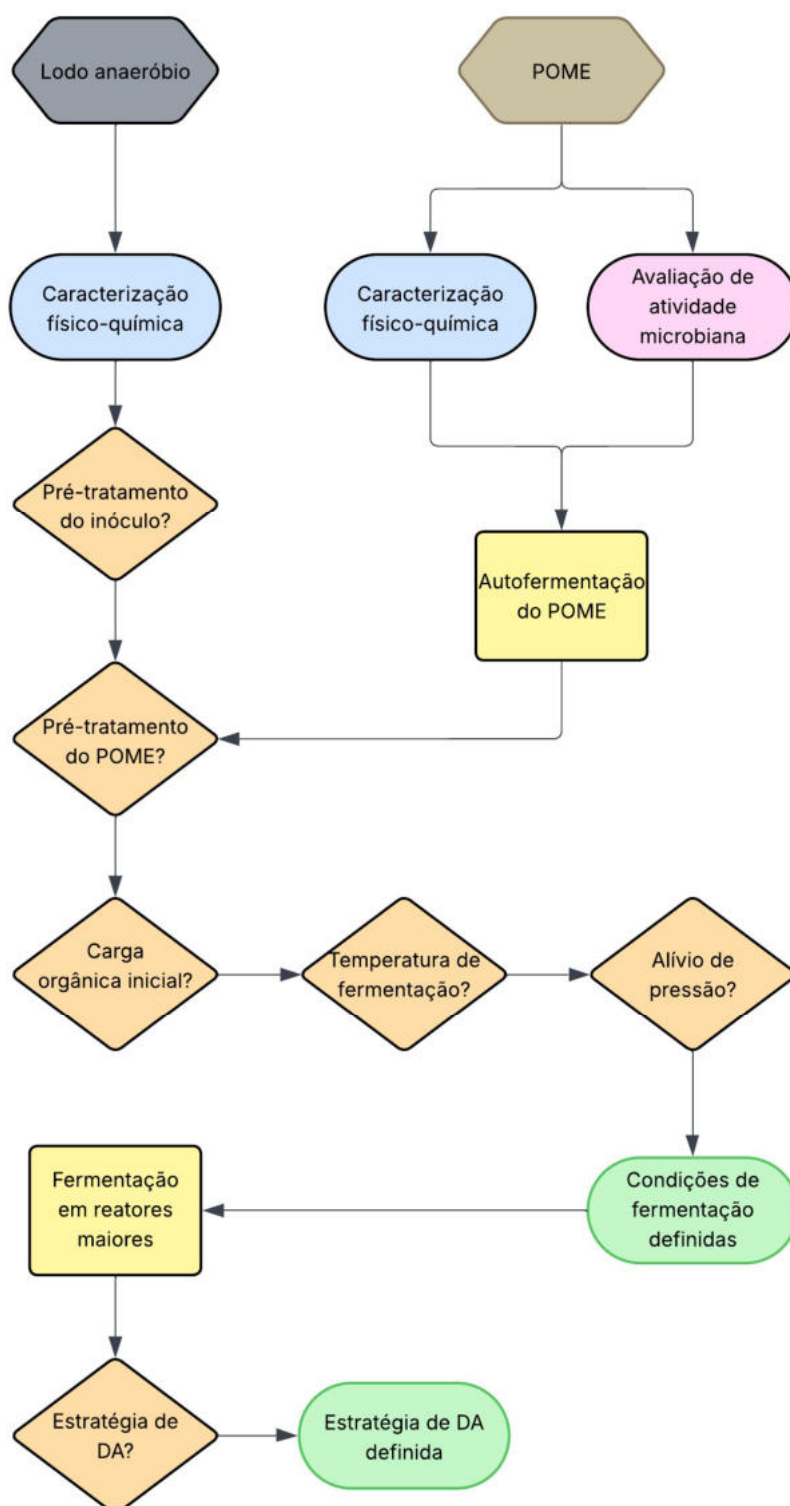
### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o inóculo e a matéria-prima, a saber, lodo anaeróbio e o POME;
- Avaliar a necessidade do pré-tratamento do inóculo para a produção de  $H_2$ ;
- Avaliar a influência da microbiota nativa do POME e a necessidade de tratamento deste material previamente à fermentação;
- Determinar a carga orgânica inicial para fermentação;
- Comparar a fermentação em condições mesofílica e termofílica;
- Avaliar a estratégia de alívio de pressão do reator durante a fermentação;
- Avaliar a produção de  $H_2$  em reatores manométricos de vidro de 300 mL, 600 mL e 1100 mL e em reator STR (sigla do inglês *stirred tank reactor*) de 7000 mL;
- Comparar a digestão anaeróbia de POME nas abordagens direta e sequencial para produção de  $CH_4$ .

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades experimentais foram conduzidas de acordo com o esquema representado na Figura 8.

**Figura 8** – Esquema representativo das atividades experimentais realizadas nesta dissertação e das perguntas associadas às definições necessárias para as etapas subsequentes.



Fonte: Elaboração própria.

## 5.1 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO

O lodo anaeróbio usado como inóculo para a produção de  $H_2$  e  $CH_4$  foi obtido de um digestor anaeróbio localizado em uma estação de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro, Brasil. O inóculo foi caracterizado quanto aos sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos fixos (SSF) e demanda química de oxigênio (DQO), seguindo métodos padrão (APHA, 2005). A fim de conhecer o inóculo de forma mais aprofundada, a amostra também foi analisada pela empresa Oceanus quanto aos seguintes parâmetros: DBO (SMWW 5210 B), carbono (SMWW 5310 B), nitrogênio (ASTM D5176-08 e SMWW 4500-NH<sub>3</sub> F), enxofre (SMWW 4500-SO<sub>4</sub>-2 E), óleos e graxas (SMWW 5520 D), e fósforo, potássio, cálcio magnésio, cobre e zinco (EPA 6020 B/200.8).

## 5.2 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DO POME

O POME foi fornecido por uma empresa brasileira de óleo de palma. O efluente foi coletado no estado do Pará, Brasil, e, para preservar suas características físico-químicas, armazenado a 4 °C até o uso.

### 5.2.1 Parâmetros Físico-Químicos

O efluente foi caracterizado quanto a sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos fixos (SSF) e demanda química de oxigênio (DQO), seguindo métodos padrão (APHA, 2005). A fim de conhecer a matéria-prima de forma mais aprofundada, a amostra também foi analisada pela empresa Oceanus quanto aos seguintes parâmetros: DBO (SMWW 5210 B), carbono (SMWW 5310 B), nitrogênio (ASTM D5176-08 e SMWW 4500-NH<sub>3</sub> F), enxofre (SMWW 4500-SO<sub>4</sub>-2 E), óleos e graxas (SMWW 5520 D), e fósforo, potássio, cálcio magnésio, cobre e zinco (EPA 6020 B/200.8). Além disso, o POME também foi caracterizado por HPLC e microCG conforme descrito na seção 5.5.

### 5.2.2 Técnica de Microgota

Tendo em vista a hipótese de o POME possuir uma microbiota nativa capaz de influenciar o processo de fermentação, foi realizado o ensaio de plaqueamento por microgotas. Essa metodologia tem por objetivo quantificar os micro-organismos

presentes em determinada amostra, de forma econômica em termos materiais e de tempo (Barbosa *et al.*, 1995).

Foram preparadas placas contendo meio de cultura PDA (sigla do inglês *potato dextrose agar*) para o crescimento de fungos e meio TSA (sigla do inglês *tryptone soy agar*) para o crescimento de bactérias que, após diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  e plaqueamento das amostras, foram incubadas em estufa a 32 °C por 196 horas. Durante esse tempo, as placas foram retiradas periodicamente da incubadora e analisadas quanto à presença de unidades formadoras de colônia (UFC).

Foram inoculadas placas em triplicata com amostras de POME *in natura* e POME pré-tratado (100 °C, 60 min).

### 5.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DE POME

#### 5.3.1 Condições Gerais de Fermentação

Para todos os ensaios de produção de  $H_2$ , o meio foi preparado de modo a atingir uma concentração de lodo de 10 gssv/L e o pH foi ajustado para 5,5, o qual favorece a atividade das bactérias produtoras de  $H_2$ , usando NaOH 10 M. Em triplicata, os reatores foram preenchidos com meio até 45% de seu volume total, deixando 55% de espaço livre. Antes do início do processo, os reatores foram purgados com  $N_2$  por 1 minuto para garantir um ambiente anaeróbio. No caso dos experimentos em reatores manométricos de vidro (Figura 9A), estes foram incubados em *shaker* sob agitação orbital a 160 rpm. No caso do reator do tipo STR (sigla do inglês *stirred tank reactor*), como o mecanismo de agitação é por pás (Figura 9B), foi feita uma avaliação preliminar (sem réplicas) da velocidade de agitação considerando os valores de 100, 160 e 300 rpm.

**Figura 9** – Imagens dos reatores utilizados nos experimentos. (A) Reatores manométricos de vidro de 300, 600 e 1100 mL e (B) reator STR de 7000 mL.



Fonte: Acervo do autor.

Durante os ensaios, amostras líquidas foram coletadas periodicamente e analisadas conforme descrito na seção 5.5. Amostras gasosas também foram coletadas ao longo dos ensaios e analisadas conforme descrito na seção 5.5.

### 5.3.2 Efeito do Pré-Tratamento do Inóculo no Desempenho da Fermentação

Para avaliar a influência do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de  $H_2$  a partir de POME, o lodo anaeróbico foi aquecido a 65 °C durante 30 minutos e depois deixado resfriar até a temperatura ambiente (Fasheun *et al.*, 2024). Foram realizados experimentos em reatores manométricos de vidro de 300 mL, os quais foram preenchidos com POME e lodo anaeróbico pré-tratado ou *in natura*, na proporção  $DQO_{POME}:SSV_{LODO}$  de 1:1, correspondendo à carga orgânica inicial de 10  $g_{DQO}/L$  e incubados a 35 °C por 24 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1.

### 5.3.3 Avaliação da Necessidade de Pré-Tratamento do POME para a Produção de Hidrogênio

Para avaliar o potencial de produção de  $H_2$  da microbiota nativa do POME, foram realizados experimentos em reatores manométricos de vidro de 300 mL, os quais foram preenchidos apenas com 135 mL de POME diluído a uma concentração de 10  $g_{DQO}/L$  e incubados a 35 °C, sem adição de inóculo, por 24 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1.

Para avaliar o impacto da microbiota nativa do POME na produção de  $H_2$ , foram realizados experimentos em reatores manométricos de vidro de 300 mL, os quais foram preenchidos com 135 mL de POME pré-tratado (100 °C, 60 min) ou *in natura* e lodo anaeróbio pré-tratado, carga orgânica inicial de 10 g<sub>DQO</sub>/L e incubados a 35 °C por 40 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1.

#### **5.3.4 Influência da Carga Orgânica Inicial na Produção de Hidrogênio**

Para avaliar o impacto da carga orgânica inicial na produção de  $H_2$ , foram realizados experimentos em reatores manométricos de vidro de 300 mL e cargas orgânicas iniciais de 10, 20 ou 30 g<sub>DQO</sub>/L de POME, os quais foram preenchidos com 135 mL de POME e lodo anaeróbio pré-tratado e incubados a 35 °C por 24 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1.

#### **5.3.5 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio**

Para avaliar a influência da temperatura da fermentação na produção de  $H_2$ , foram realizados ensaios utilizando reatores manométricos de vidro de 300 mL, os quais foram operados a 35 °C (condição mesofílica) ou 50 °C (condição termofílica). Os reatores foram preenchidos com 135 mL de POME e lodo anaeróbio pré-tratado, cargas orgânicas iniciais de 10 e 30 g<sub>DQO</sub>/L e incubados a 35 °C por 22 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1.

#### **5.3.6 Influência da Pressão Interna do Reator na Produção de Hidrogênio**

Para investigar o efeito da pressão sobre a fermentação, foram utilizados reatores manométricos de vidro de 300 mL, os quais foram preenchidos com 135 mL de POME e lodo anaeróbio pré-tratado, cargas orgânicas iniciais de 30 e 40 g<sub>DQO</sub>/L e incubados a 35 °C por 44 horas. As demais condições estão descritas na seção 5.3.1. Durante a fermentação, à medida que a produção de gás aumentava a pressão interna, duas condições foram testadas. Na primeira condição, foi permitido o acúmulo do gás produzido durante a fermentação, e apenas o volume de gás necessário para análise cromatográfica (CG) foi retirado. Na segunda condição (alívio de pressão), em cada ponto de amostragem, a pressão manométrica do reator foi aliviada para 0,3 bar.



### 5.3.7 Ensaios de Produção de Hidrogênio em Diferentes Volumes de Reator

Para avaliação preliminar da escalabilidade do processo, a fermentação do POME foi conduzida em reatores manométricos de vidro de 600 e 1100 mL, mantendo-se as condições previamente determinadas em reatores de 300 mL, bem como em reator STR com volume de 7000 mL e agitação mecânica por pás.

## 5.4 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO POME

Para todos os ensaios de produção de CH<sub>4</sub>, o meio foi preparado de modo a atingir uma concentração de matéria-prima de 18 g<sub>DQO</sub>/L, concentração de lodo anaeróbio *in natura* de 6 g<sub>SSV</sub>/L e o pH foi ajustado para 7,0, o qual favorece a atividade das arqueias metanogênicas, usando NaOH 10 M. Em triplicata, os reatores foram preenchidos com meio até 45% de seu volume total, deixando 55% de espaço livre. Antes do início do processo, os reatores foram purgados com N<sub>2</sub> para garantir um ambiente anaeróbio e mantidos a uma temperatura constante de 35 °C por 63 dias, sem agitação.

Durante os ensaios, amostras líquidas foram coletadas periodicamente e analisadas conforme descrito na seção 5.5. Amostras gasosas também foram coletadas ao longo dos ensaios e analisadas conforme descrito na seção 5.5.

O efluente da produção de hidrogênio (EPH) foi coletado como sobrenadante do efluente do processo de fermentação (40 g<sub>DQO</sub>/L, 35 °C) por centrifugação a 4.500 rpm durante 10 minutos. O EPH foi utilizado como matéria-prima do ensaio de digestão sequencial em reatores manométricos de vidro de 300 mL. Também foi realizado um ensaio preliminar por 35 dias em reator STR de 7000 mL, mantendo-se as condições anteriores.

O ensaio de digestão direta foi realizado em reatores manométricos de vidro de 300 mL utilizando POME como matéria-prima.

## 5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A composição dos gases produzidos nos processos de fermentação (H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e digestão anaeróbia (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) foi determinada utilizando um sistema Micro GC 990 da Agilent Technologies, equipado com um detector de condutividade térmica (TCD), utilizando as colunas HP-PLOT U (3 m x 0,320 mm x 30 µm) a 90 °C, tendo hélio como gás de arraste, e HP-PLOT Molecular sieve 5V (10 m x 0,32 mm x 12 µm) a 100 °C,

tendo nitrogênio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 90 °C e a temperatura de entrada da amostra de 110 °C (Fasheun *et al.*, 2024).

Os ácidos palmítico e oleico foram analisados por cromatografia gasosa utilizando um sistema Agilent Technologies 7890B com detector de ionização de chama (FID), conforme descrito por Garritano (2017).

O teor de SSV e a DQO foram medidos de acordo com os métodos padrão (APHA, 2005). Os açúcares redutores foram quantificados utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Vasconcelos, Pinto e Aragão, 2013), e a concentração de glicose foi determinada utilizando o kit de glicose oxidase QUIMIGLIX OX (Ebram).

Para quantificar os metabólitos solúveis, os efluentes de fermentação e de digestão foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos e filtrados através de uma membrana Millipore de 0,22 µm. As amostras foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da série Nexera (Shimadzu). O sistema foi equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (BioRad) mantida a 55 °C. A fase móvel consistiu em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, fornecida a uma vazão de 0,6 mL/min. Um detector de índice de refração (RID) foi utilizado para medir ácido acético, ácido butírico, glicerol e 1,3-propanodiol.

## 5.6 CÁLCULOS

### 5.6.1 Cálculo do Volume de Gás Produzido

O volume de gás normalizado foi determinado com base na equação de expansão isotérmica, considerando o comportamento de gás ideal e aplicando o princípio da conservação da energia interna., conforme descrito na equação (3).

$$V_{biogás} = \frac{P_{man} \times V_{hs} \times T_n}{P_{atm} \times (T_n + T)} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: P<sub>atm</sub> representa a pressão atmosférica, P<sub>man</sub> denota a pressão manométrica, V<sub>hs</sub> corresponde ao volume de espaço livre no reator, T<sub>n</sub> é a temperatura nas CNTP (273 K), T é a temperatura do ensaio e V<sub>biogás</sub> se refere ao volume de biogás normalizado.

### 5.6.2 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos

O modelo matemático representado pela equação (4), conhecida como equação de Gompertz modificada, foi empregado para estimar os parâmetros cinéticos da produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (Barrera-Quintero *et al.*, 2017).

$$H(t) = H_{max} \exp^{-\exp \left[ \frac{R_{max} \times e}{H_{max}} \times (\lambda_0 - t) + 1 \right]} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: H é a produção específica de biogás (N-mL/L); H<sub>max</sub> é o volume específico máximo acumulado (N-mL/L); R<sub>max</sub> é a taxa máxima de produção de biogás (N-mL/L.h ou N-mL/L.dia); t é o tempo de incubação (h ou dia); λ<sub>0</sub> é a fase adaptativa (h ou dia); e é a constante de Euler (2,71828).

### 5.6.3 Cálculo do Potencial Energético

Os potenciais energéticos do H<sub>2</sub> e do CH<sub>4</sub> produzidos foram calculados de acordo com a equação (5) a seguir:

$$\varepsilon_p = \frac{V_{gás} \times \rho_{gás} \times PCI_{gás}}{DQO_i} \quad \text{Equação (5)}$$

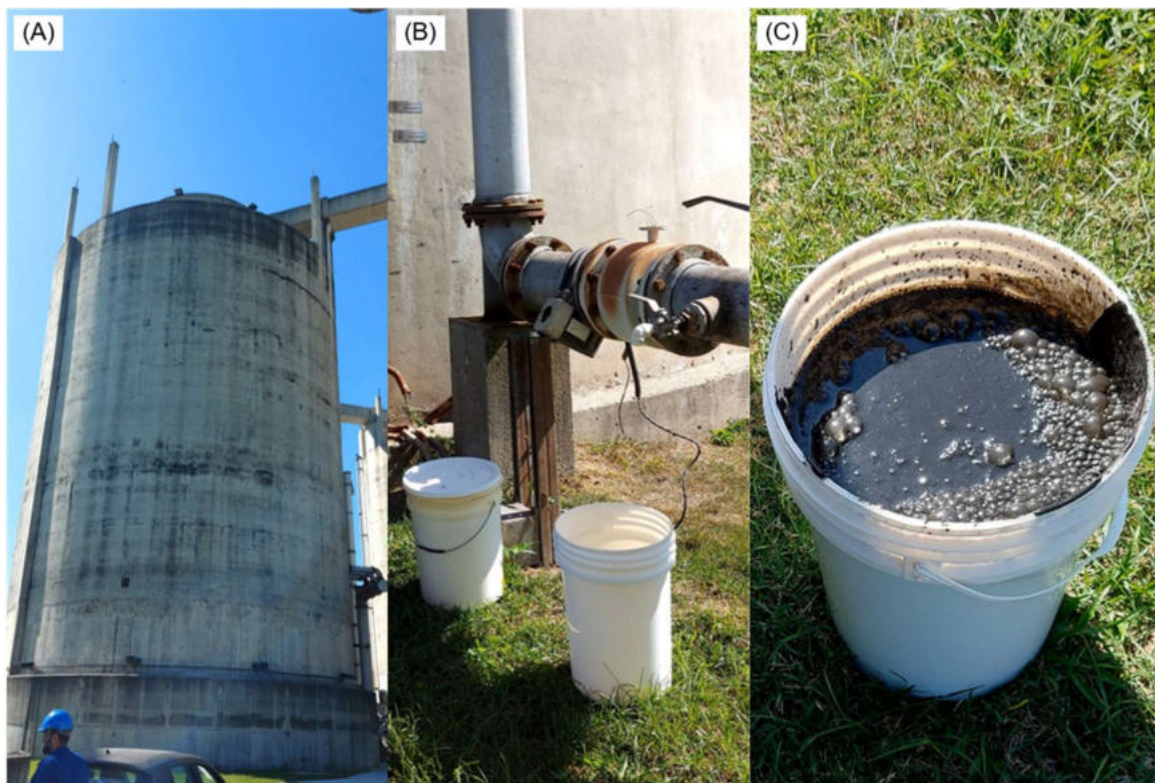
Onde: ε<sub>p</sub> é o potencial energético (kJ/g<sub>DQO</sub>), V<sub>gás</sub> é o volume de gás produzido (m<sup>3</sup>), ρ<sub>gás</sub> é a densidade do gás (g/L), PCI<sub>gás</sub> é o poder calorífico inferior do gás (kJ/kg), e DQO<sub>i</sub> é a massa de DQO adicionada ao reator (g). A densidade e o poder calorífico adotados para calcular o potencial energético foram, respectivamente, 0,09 g/L e 120 kJ/g para H<sub>2</sub>, e 0,72 g/L e 50 kJ/g para CH<sub>4</sub> (Yu e Mandi, 2021).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO

Nesta dissertação, utilizou-se como inóculo o lodo anaeróbico proveniente de uma estação de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro (Figura 10).

**Figura 10** – Imagens do (A) digestor anaeróbio da estação de tratamento de esgoto, (B) ponto de coleta e (C) lodo aneróbio coletado.



Fonte: Acervo do laboratório.

Após a coleta, o lodo foi armazenado a temperatura ambiente e caracterizado de acordo com a descrição da seção 5.1. Os resultados desta caracterização estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Características do lodo anaeróbio usado neste trabalho.

| Parâmetro                    | Unidade | Valor        |
|------------------------------|---------|--------------|
| pH                           | -       | 7,1 ± 0,1    |
| SST                          | g/L     | 47,82 ± 3,28 |
| SSF                          | g/L     | 16,09 ± 1,25 |
| SSV                          | g/L     | 31,73 ± 2,04 |
| DQO total                    | g/L     | 85,02 ± 3,27 |
| DQO solúvel                  | g/L     | 0,61         |
| DBO total                    | g/L     | 4,36         |
| DBO solúvel                  | g/L     | 0,27         |
| Carbono total                | g/L     | 11,13        |
| Carbono solúvel              | g/L     | 0,33         |
| Carbono orgânico total       | g/L     | 1,03         |
| Carbono orgânico solúvel     | g/L     | 0,13         |
| Nitrogênio total             | g/L     | 0,78         |
| Nitrogênio solúvel           | g/L     | 0,59         |
| Nitrogênio amoniacal solúvel | g/L     | 0,47         |
| Sulfato solúvel              | mg/L    | 12           |
| Fósforo inorgânico solúvel   | mg/L    | 23,01        |
| Óleos e graxas totais        | mg/L    | 84           |
| Óleos e graxas solúveis      | mg/L    | 10           |
| Fósforo total                | mg/L    | 380,02       |
| Fósforo solúvel              | mg/L    | 97,94        |
| Potássio total               | mg/L    | 128,25       |
| Potássio solúvel             | mg/L    | 138,22       |
| Cálcio total                 | mg/L    | 580,27       |
| Cálcio solúvel               | mg/L    | 59,51        |
| Magnésio total               | mg/L    | 246,55       |
| Magnésio solúvel             | mg/L    | 41,37        |
| Cobre total                  | mg/L    | 6,98         |
| Cobre solúvel                | mg/L    | 0,07         |
| Zinco total                  | mg/L    | 26,50        |
| Zinco solúvel                | mg/L    | 0,23         |

DQO: demanda química de oxigênio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; SSV: sólidos suspensos voláteis; SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; O&G: óleos e graxas; ART: açúcares redutores totais.

O valor de pH do lodo anaeróbio de 7,1 já era esperado, pois o processo de DA, o qual ocorre nas estações de tratamento de esgoto, acontece em valores de pH próximos ao neutro (Wang *et al.*, 2023).

O teor de sólidos suspensos voláteis (31,73 g/L) é um indicador indireto da matéria orgânica contida no lodo (Arnaiz, Gutierrez e Lebrato, 2006), a qual representa, neste caso, o teor de células microbianas. Este valor é usado no cálculo do volume de lodo que será adicionado como inóculo da fermentação, de modo a ajustar a proporção entre matéria-prima e micro-organismos no início do processo.

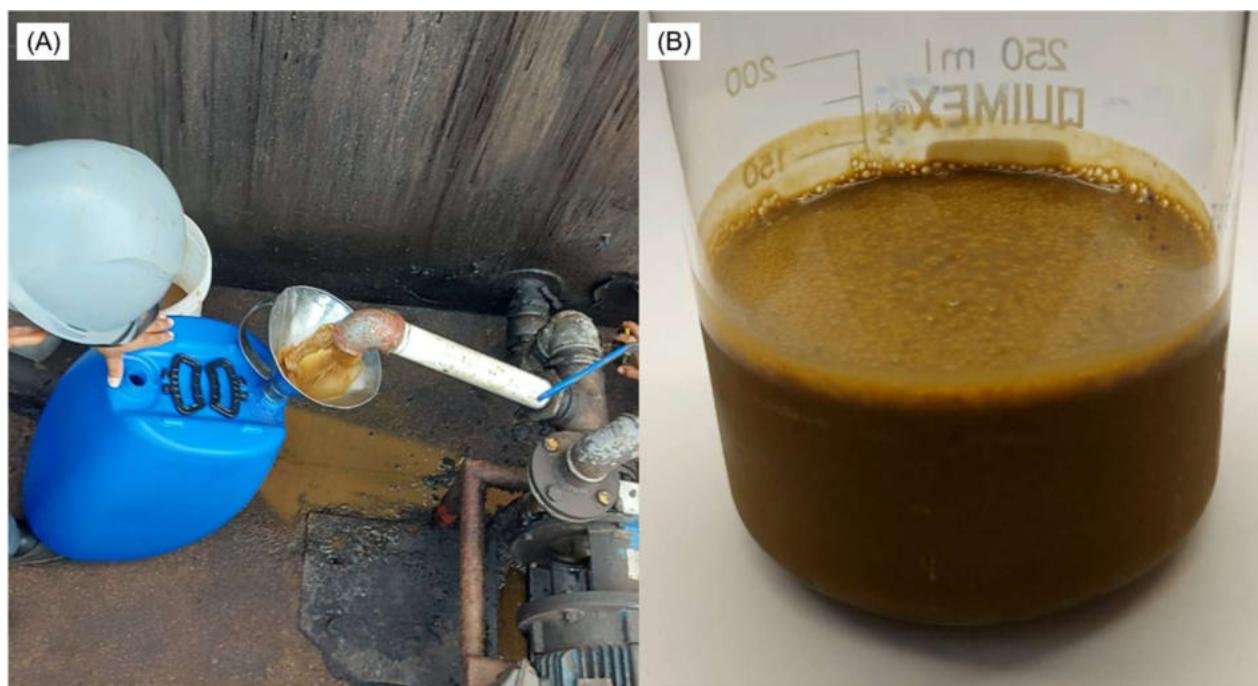
A grande discrepância entre os valores de DQO total (85,02 g/L) e DQO solúvel (0,61 g/L) indica que apenas uma parcela ínfima da matéria orgânica presente no lodo se encontra dissolvida. Isso se confirma pela grande diferença entre os valores de DBO total (4,36 g/L) e DBO solúvel (0,27 g/L), bem como entre os valores de carbono total (11,13 g/L) e carbono solúvel (0,13 g/L). Sendo assim, a contribuição desta matéria orgânica para a DQO inicial do processo fermentativo pode ser considerada desprezível.

Além disso, os teores de micronutrientes solúveis presentes no lodo encontram-se abaixo de 0,6 g/L. Levando em consideração que este lodo é diluído cerca de três vezes para compor o meio com 10 gssv/L, a contribuição desses micronutrientes para a suplementação do meio torna-se ainda menos significativa. Assim, pode-se inferir que o lodo anaeróbio utilizado neste trabalho atua predominantemente como fonte de micro-organismos para os processos de fermentação e DA.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DO POME

As etapas de processamento na indústria do óleo de palma afetam as características físico-químicas do POME. Essas diferenças estão relacionadas ao fruto da palma e à qualidade do óleo, à complexidade do ciclo sazonal da cultura e às operações específicas de cada setor. Seja em uma grande planta industrial, uma unidade de médio porte, uma pequena unidade mecânica ou em um processo tradicional, os detalhes da operação influenciam as características do POME, principalmente no que diz respeito à esterilização do fruto e ao processamento do óleo de palma (Mahmod *et al.*, 2022; Mba, Dumont e Ngadi, 2015a). O POME pode ser gerado em várias etapas do processo de produção do óleo de palma, incluindo a esterilização de cachos de frutos frescos, a separação das cascas e a clarificação do óleo prensado (Ong *et al.*, 2021a). O POME utilizado neste estudo teve origem na esterilização de cachos de frutos frescos e na separação das cascas dos caroços (Figura 11).

**Figura 11** – Imagens do (A) ponto de coleta do POME e (B) POME coletado.



Fonte: Acervo do laboratório.

### 6.2.1 Parâmetros Físico-Químicos

O POME foi extensivamente caracterizado para avaliar suas propriedades físico-químicas e comparar com os dados da literatura, compilados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Características do POME usado neste trabalho em comparação aos dados da literatura.

| Parâmetro           | Este trabalho | Outros trabalhos | Referências                                                                                 |
|---------------------|---------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH                  | 4,5           | 4,21 – 4,95      | [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16]       |
| DQO (g/L)           | 63,4 ± 3,0    | 42,00 – 89,59    | [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17] |
| DBO (g/L)           | 23,6          | 20,38 – 50,36    | [2], [4], [7], [8], [9], [12], [13]                                                         |
| SSV (g/L)           | 11,9 ± 0,2    | 7,71 – 20,00     | [5]                                                                                         |
| SST (g/L)           | 12,9 ± 0,3    | 19,61 – 70,32    | [1], [2], [5], [8], [9], [10], [12], [13], [16]                                             |
| SSF (g/L)           | 1,0 ± 0,2     | 9,31 – 23,00     | [5], [8], [9], [12], [16]                                                                   |
| O&G (g/L)           | 10,5 ± 3,0    | 1,93 – 37,89     | [2], [4], [6], [8], [9], [10], [12], [13], [16]                                             |
| ART (g/L)           | 6,10 ± 0,13   | 0,23 – 10,90     | [1], [12]                                                                                   |
| N total (g/L)       | 1,1           | 0,06 – 1,48      | [1], [2], [3], [4], [5], [6], [8], [10], [14]                                               |
| S total (g/L)       | 0,79          | 0,50 – 0,60      | [18], [19]                                                                                  |
| K total (g/L)       | 0,95          |                  | Este trabalho                                                                               |
| P total (g/L)       | 0,08          |                  | Este trabalho                                                                               |
| C total (g/L)       | 17,65         |                  | Este trabalho                                                                               |
| Glicose (g/L)       | 1,60 ± 0,10   |                  | Este trabalho                                                                               |
| Ác. acético (g/L)   | 0,41 ± 0,04   |                  | Este trabalho                                                                               |
| Ác. butírico (g/L)  | 2,16 ± 0,84   |                  | Este trabalho                                                                               |
| Ác. palmítico (g/L) | 0,78 ± 0,01   |                  | Este trabalho                                                                               |
| Ác. oleico (g/L)    | 1,77 ± 0,02   |                  | Este trabalho                                                                               |

DQO: demanda química de oxigênio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; SSV: sólidos suspensos voláteis; SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; O&G: óleos e graxas; ART: açúcares redutores totais. [1] Abdullah et al., 2020; [2] Akhbari, Ibrahim e Ahmad, 2023; [3] Budiman e Wu, 2016; [4] Chan, Chong e Law, 2012; [5] Domrongpookkaphan, Phalakornkule e Khemkhao, 2021; [6] Garritano et al., 2017; [7] Jadhav et al., 2024; [8] Kadier et al., 2022; [9] Mohd Yusof, Chan e Chong, 2023; [10] Prasertsan et al., 2017; [11] Ramón Vanegas et al., 2024; [12] Rosa et al., 2020; [13] Soo, Wong e Bashir, 2023; [14] Suksong et al., 2020; [15] Wadchasit et al., 2021; [16] Zainal et al., 2020; [17] Akhbari, Ibrahim e Ahmad, 2023; [18] Kan et al., 2024; [19] Poh, Yong e Chong, 2010.

O efluente apresentou coloração amarronzada e forte odor, devido à presença de diversos compostos orgânicos. A concentração DQO foi de 63,4 g/L, valor que se



encontra dentro da faixa determinada por estudos anteriores (42 g/L – 89,59 g/L) e confirma o abundante conteúdo orgânico do POME, confirmando-o como matéria-prima potencial para a produção biológica de  $H_2$  e  $CH_4$ . Além disso, o valor obtido para a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), a saber, 23,6 g/L, indica que apenas de 37% da matéria orgânica contida no POME é biodegradável, caracterizando o POME como um efluente de média biodegradabilidade (Almutairi, 2020).

O teor de glicose (1,60 g/L) e de açúcares redutores (6,10 g/L) revela a presença de substratos mais prontamente disponíveis para serem metabolizados durante os processos de produção de  $H_2$  e  $CH_4$ , o que favorece uma atividade mais rápida das bactérias fermentativas na etapa acidogênica.

O pH do efluente foi de 4,49, um valor ligeiramente ácido que está de acordo com os valores relatados na literatura (4,21 – 4,95). Essa acidez é atribuída à presença de ácidos orgânicos no POME (Gamaraalalage, Sawai e Nunoura, 2019), como os ácidos acético (HAc, 0,41 g/L) e butírico (HBut, 2,16 g/L), e os ácidos graxos de cadeia longa palmítico (0,78 g/L) e oleico (1,77 g/L).

O HBut é produzido na acidogênese por bactérias fermentativas e posteriormente convertido em acetato,  $H_2$  e  $CO_2$  por bactérias sintroficas na acetogênese, enquanto o HAc, principal intermediário da DA, também é formado na acidogênese e é transformado em  $CH_4$  por arqueias metanogênicas acetoclásticas. Já os ácidos graxos de cadeia longa são inicialmente ativados a seus respectivos acil-CoA e degradados sequencialmente pela via da  $\beta$ -oxidação. Esse mecanismo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos representa uma etapa crítica na síntese microbiana de biogás e é uma das principais vias pelas quais intermediários complexos são transformados em substratos da metanogênese durante a DA (Xu *et al.*, 2023).

O POME também possui um conteúdo significativo de óleos e graxas (10,5 g/L), o qual abrange outras substâncias além do ácido palmítico e oleico e podem servir de substrato para a produção de  $H_2$  e  $CH_4$ .

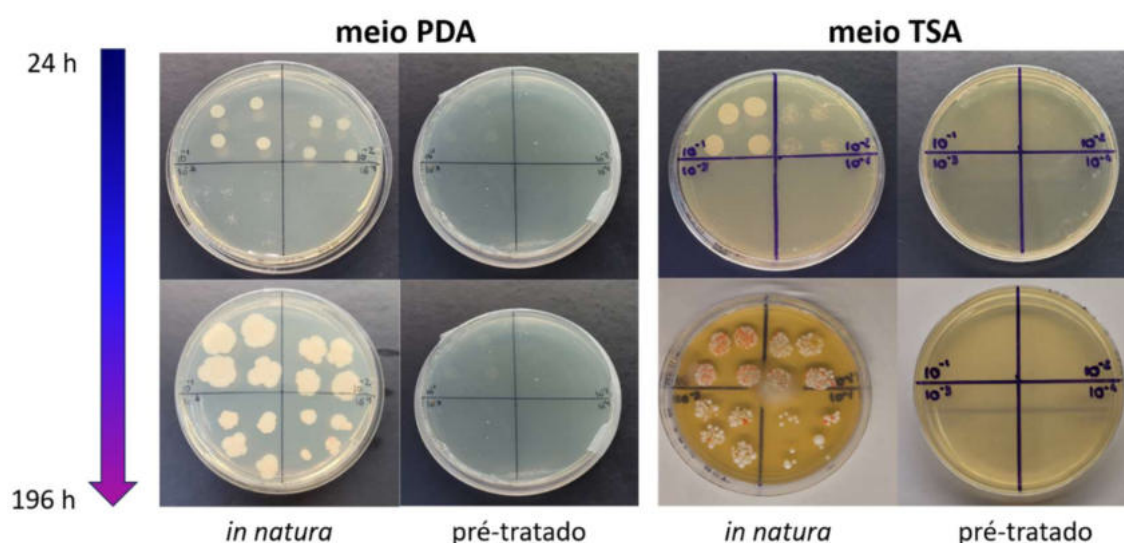
A determinação de SST e SSV do POME resultou em valores de 12,9 g/L e 11,9 g/L, respectivamente, o que indica que aproximadamente 92% dos sólidos suspensos totais presentes no POME são compostos orgânicos e potencialmente biodegradáveis. No entanto, essa fração sólida contém substratos complexos que podem não ser facilmente acessíveis aos micro-organismos sem um pré-tratamento do efluente (Akhbari, Chuen e Ibrahim, 2021; Mahmod *et al.*, 2022). A caracterização dessa fração foi realizada conforme descrito por Sluiter (2012), revelando que, dos 12,9 g de sólidos

presentes em 1 L de efluente, 4,27 g eram glicose. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a realizar esse tipo de caracterização da fração sólida do POME. Esses sólidos provavelmente provêm da etapa de esterilização do fruto no início do processo industrial e do processamento do óleo de palma, o que também explicaria o teor de açúcar solúvel no POME.

### 6.2.2 Técnica de Microgota

Os micro-organismos presentes no POME podem competir ou cooperar simbioticamente, dependendo do seu metabolismo, influenciando a produção de  $H_2$  por meio de fermentação (Mehi Gaspari Augusto *et al.*, 2024). Para avaliar a microbiota aeróbia nativa, foi realizado o ensaio de microgota do POME *in natura* e do POME pré-tratado (Figura 12) em meio de cultura PDA (sigla do inglês *potato dextrose agar*) e em meio TSA (sigla do inglês *tryptone soy agar*).

**Figura 12** – Imagens das placas obtidas no ensaio de microgotas para as amostras de POME *in natura* e pré-tratado termicamente, inoculadas em meio PDA (à esquerda) e TSA (à direita), após 24 horas (acima) e 196 horas de incubação (abaixo).



Fonte: Acervo do laboratório.

O ensaio realizado com POME *in natura* revelou uma microbiota ativa após 24 horas nos dois meios de cultura avaliados, com uma contagem de  $6,95 \times 10^5$  UFC em meio PDA e  $1,47 \times 10^5$  UFC em meio TSA. Contagens na ordem de  $10^5$  UFC indicam uma população microbiana robusta, típica de culturas ativas ou amostras com carga microbiana relevante (Yu *et al.*, 2025). O meio PDA, mais rico em carboidratos e com pH

ácido, normalmente favorece a proliferação de fungos (Wang e Kuzyakov, 2024) e promoveu maior crescimento de micro-organismos do que o meio TSA. Isso sugere que a microbiota presente se adapta melhor ou cresce mais rapidamente no ambiente de composição tipo PDA do que em TSA.

Como não houve crescimento microbiano no ensaio realizado com POME pré-tratado (Figura 12), conclui-se que as condições de pré-tratamento avaliadas (100 °C, 60 min) foram suficientes para inativar a microbiota aeróbia nativa do POME. Adicionalmente, na seção 6.3.2 foram realizados ensaios que avaliam a necessidade desse pré-tratamento para a produção de H<sub>2</sub>.

### 6.3 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DE POME MAIS ADEQUADAS PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

#### 6.3.1 Efeito do Pré-Tratamento do Inóculo no Desempenho da Fermentação

A seleção e preparação adequadas do inóculo estão entre os fatores críticos que devem ser avaliados na produção de H<sub>2</sub> por fermentação. De forma geral, o pré-tratamento do lodo anaeróbio costuma aumentar muito o rendimento de H<sub>2</sub>, ao suprimir micro-organismos hidrogenotróficos e enriquecer o inóculo com hidrogenogênicos (Hu *et al.*, 2023; Jalil *et al.*, 2025). Entretanto, há cenários em que o pré-tratamento do lodo não se faz necessário (Luo *et al.*, 2010; Penteado *et al.*, 2013). Portanto, o impacto do pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio na produção de H<sub>2</sub> a partir de POME foi avaliado, utilizando uma carga orgânica inicial de 10 g<sub>DQO</sub>/L a 35 °C por 24 horas.

Os resultados demonstraram uma melhora substancial na produção de H<sub>2</sub> ao usar lodo anaeróbio pré-tratado termicamente em comparação ao lodo *in natura* (Tabela 3).

**Tabela 3** – Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> a partir do POME, usando como inóculo lodo anaeróbio *in natura* ou pré-tratado termicamente (10 g<sub>SSV</sub>/L), carga orgânica inicial de 10 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 24 h, em reatores manométricos de vidro de 300 mL.

| Tipo de inóculo               | Produção específica de H <sub>2</sub> (N-mL/L) |
|-------------------------------|------------------------------------------------|
| Lodo <i>in natura</i>         | 44 ± 21                                        |
| Lodo pré-tratado termicamente | 214 ± 16                                       |

De acordo com os resultados da Tabela 3, o pré-tratamento do lodo proporcionou uma produção específica de  $H_2$  quase 5 vezes maior do que a obtida com o lodo não tratado. A melhora observada pode ser atribuída ao enriquecimento seletivo de bactérias produtoras de  $H_2$  termorresistentes e formadoras de esporos (por exemplo, do gênero *Clostridium*) (Wang e Yin, 2021), e à supressão de micro-organismos consumidores de  $H_2$  (especialmente metanogênicos) que são mais sensíveis ao calor (Conrad, 2023). Este resultado demonstra a importância do pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio na melhoria da produção de  $H_2$  a partir de POME. Assim, o pré-tratamento térmico do lodo foi integrado como procedimento padrão em todos os experimentos subsequentes de produção de  $H_2$  neste trabalho.

### 6.3.2 Avaliação da Necessidade de Pré-Tratamento do POME para a Produção de Hidrogênio

Para determinar o potencial efeito da microbiota nativa do POME na produção de  $H_2$ , experimentos controle foram realizados com POME (10 g<sub>DQO</sub>/L) sem a adição de inóculo. Curiosamente, foram produzidos  $163 \pm 27$  N-mL/L de  $H_2$  em 24 horas, indicando a presença de micro-organismos produtores de  $H_2$  no próprio efluente. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que isolaram com sucesso micro-organismos produtores de  $H_2$  do POME, como o isolado VT-H1 de *Enterococcus faecalis* (Woraruthai *et al.*, 2024), *Clostridium butyricum* Eb6 (Ling, 2009) e *Bacillus* da cepa PUNAJAN1 (Mishra, 2018). Aka e coautores, ao investigarem a diversidade de micro-organismos do POME de quatro localidades geográficas da Costa do Marfim, também relataram a presença de *Clostridium* sp. em amostras de POME, espécies conhecidas por produzirem  $H_2$  (Aka *et al.*, 2021).

Para avaliar esse fenômeno mais detalhadamente e determinar se os micro-organismos nativos competiriam com a microbiota do lodo anaeróbio ou complementariam sua atividade, foram realizados ensaios comparativos de produção de  $H_2$  por 40 horas, usando lodo anaeróbio pré-tratado como inóculo e POME (30 g<sub>DQO</sub>/L) *in natura* ou pré-tratado termicamente como matéria-prima (Tabela 4).

**Tabela 4** – Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> a partir do POME *in natura* e pré-tratado termicamente, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g<sub>SSV</sub>/L), carga orgânica inicial de 30 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 40 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL.

| Tipo de matéria-prima         | Produção específica de H <sub>2</sub> |
|-------------------------------|---------------------------------------|
|                               | (N-mL/L)                              |
| POME <i>in natura</i>         | 800 ± 47                              |
| POME pré-tratado termicamente | 813 ± 73                              |

A análise estatística da produção cumulativa de H<sub>2</sub> em 40 h pelo teste t de Student não mostrou diferença significativa entre as duas condições ( $p > 0,05$ ). Esse resultado revela que, nas condições estudadas, a microbiota nativa do POME não compete de forma significativa com os micro-organismos produtores de H<sub>2</sub> presentes no inóculo. A não competição pode ser atribuída a vários motivos, como uma provável atividade metabólica complementar entre as duas populações microbianas ou a dominância dos anaeróbios do lodo sobre os micro-organismos nativos do POME, já que lodos anaeróbios podem apresentar concentrações de micro-organismos anaeróbios na ordem de 10<sup>10</sup> UFC/g (Cyprowski et al., 2018).

Portanto, a diferença insignificante na produção de H<sub>2</sub> entre o uso de POME pré-tratado e *in natura* implica que a esterilização do efluente, a qual consome muita energia e aumenta o nível de complexidade operacional, é desnecessária para a produção de H<sub>2</sub> em larga escala a partir de POME quando se utiliza um inóculo eficaz. Essa observação é muito importante em termos de economia e viabilidade do processo em ambientes industriais, pois elimina a necessidade de esterilização do POME antes da etapa de produção de H<sub>2</sub>.

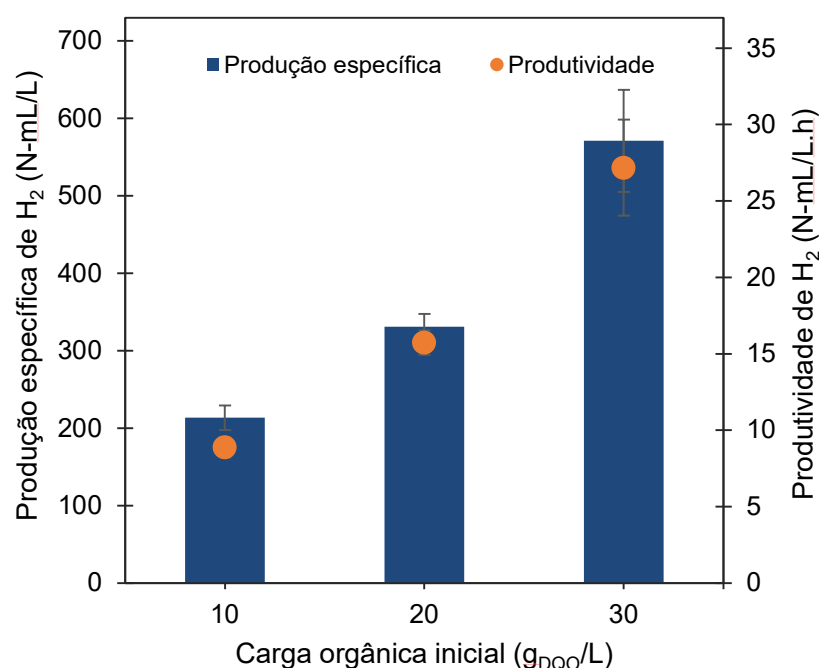
### 6.3.3 Influência da Carga Orgânica Inicial na Produção de Hidrogênio

A carga orgânica desempenha um papel muito importante na eficiência, rendimento e produtividade dos sistemas de produção biológica de H<sub>2</sub>. Para determinar a melhor carga orgânica para a produção de H<sub>2</sub> a partir de POME, foram realizados experimentos com três cargas orgânicas iniciais de 10, 20 e 30 g<sub>DQO</sub>/L a 35 °C.

A partir da Figura 13, fica evidente que o volume de H<sub>2</sub> produzido cresceu de forma significativa com o aumento da carga orgânica. Após 24 horas, a carga orgânica inicial de 10 g<sub>DQO</sub>/L proporcionou o volume específico de 214 ± 16 N-mL/L, enquanto com 20 g<sub>DQO</sub>/L e 30 g<sub>DQO</sub>/L, o volume de produção de H<sub>2</sub> aumentou para 331 ± 17 N-mL/L e 571

$\pm 66$  N-mL/L, respectivamente. Isso pode indicar uma correlação positiva entre a carga orgânica inicial e o volume de produção de  $H_2$ , ou seja, quanto maior a concentração de matéria orgânica no meio, mais substratos disponíveis para as bactérias produtoras de  $H_2$ .

**Figura 13** – Produção específica e produtividade de  $H_2$  utilizando diferentes cargas orgânicas iniciais (10, 20 e 30  $g_{DQO}/L$ ), lodo pré-tratado (10  $g_{SSV}/L$ ), pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 24 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL. As barras representam a produção específica (eixo y esquerdo) e os círculos representam a produtividade (eixo y direito).



Além disso, observou-se que o aumento da carga orgânica também aumentou as taxas de produção de  $H_2$ , conforme indicado pelas produtividades volumétricas de  $8,9 \pm 0,7$  N-mL/L.h,  $15,7 \pm 0,8$  N-mL/L.h e  $27,2 \pm 3,1$  N-mL/L.h a 10, 20 e 30  $g_{DQO}/L$  de POME, respectivamente (Figura 13). Os resultados indicam um aumento proporcional de três vezes na produtividade quando a concentração inicial de POME é elevada de 10  $g_{DQO}/L$  para 30  $g_{DQO}/L$ , o que sugere que as bactérias produtoras de  $H_2$  foram capazes de metabolizar efetivamente as concentrações aumentadas da matéria-prima sem sofrer inibição severa. Zainal e colaboradores (2020) também reportaram uma taxa de produção de  $H_2$  3,8 vezes maior ao aumentar a concentração de POME de 5  $g_{DQO}/L$  para 28  $g_{CDQO}/L$ .

Os rendimentos de  $H_2$  obtidos para as três cargas orgânicas avaliadas foram de  $21 \pm 2$ ,  $17 \pm 1$  e  $19 \pm 2$  N-mL/L. $g_{DQO}$  para as diferentes concentrações iniciais de POME (10, 20 e 30  $g_{DQO}/L$ , respectivamente). Notavelmente, não houve diferença estatística significativa entre os rendimentos de  $H_2$  nas cargas orgânicas de 10 e 30  $g_{DQO}/L$  de acordo

com o teste t de Student ( $p > 0,05$ ), mesmo com o aumento no volume e na produtividade de  $H_2$ . Esses resultados sugerem que, para as cargas orgânicas avaliadas, a eficiência de conversão dos compostos orgânicos do POME em  $H_2$  permaneceu relativamente constante. O rendimento estável na carga orgânica de 30 g<sub>DQO</sub>/L indica que as bactérias produtoras de  $H_2$  podem apresentar vias metabólicas semelhantes em diferentes concentrações de POME, sem inibição por substrato. Portanto, a concentração de 30 g<sub>DQO</sub>/L de POME foi selecionada para experimentos adicionais por proporcionar maior volume de produção de  $H_2$  e produtividade, além de um rendimento semelhante em comparação às demais concentrações de POME. Além disso, em altas concentrações de substrato, pode ser possível reduzir o consumo de água e o volume do reator para aplicações em larga escala, melhorando assim a viabilidade econômica do processo.

#### **6.3.4 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio**

A temperatura é uma variável importante na fermentação, que pode ser mesofílica (30 °C - 45 °C) ou termofílica (50 °C - 70 °C), e afeta o metabolismo microbiano, as atividades enzimáticas e, conseqüentemente, a eficiência da produção de  $H_2$  (Maaroff *et al.*, 2019; Wang e Yin, 2021). As condições termofílicas apresentam vantagens como menor pressão parcial de  $H_2$ , menor risco de contaminação/inibição, viscosidade e tensão superficial reduzidas, o que pode aumentar a decomposição e a transferência de massa (Yusnitati *et al.*, 2024). No entanto, ao processar ou efluentes com ácidos graxos de cadeia longa, temperaturas mais elevadas podem aumentar sua toxicidade para os micro-organismos. Por outro lado, condições mesofílicas são menos dispendiosas e podem prevenir a inibição causada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa na superfície dos micro-organismos, o que dificulta a absorção de nutrientes (Elsamadony *et al.*, 2021).

Assim, foram realizados experimentos para verificar se as condições termofílicas melhorariam ainda mais a produção de  $H_2$  a partir de POME, cujos resultados constam na Tabela 5. Para esses ensaios, foram utilizados lodo anaeróbio pré-tratado termicamente como inóculo, carga orgânica inicial de 10 e 30 g<sub>DQO</sub>/L, tempo de fermentação de 22 horas a 35 °C e 50 °C.

**Tabela 5** – Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> a partir do POME em diferentes temperaturas (35 e 50 °C), usando como inóculo lodo anaeróbico pré-tratado termicamente (10 g<sub>SSV</sub>/L), cargas orgânicas iniciais de 10 e 30 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm por 22 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL.

| Carga orgânica inicial<br>(g <sub>DQO</sub> /L) | Produção específica de H <sub>2</sub><br>(N-mL/L) a 35 °C | Produção específica de H <sub>2</sub><br>(N-mL/L) a 50 °C |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 10                                              | 214 ± 16                                                  | 175 ± 16                                                  |
| 30                                              | 625 ± 45                                                  | 401 ± 3                                                   |

A produção de H<sub>2</sub> foi estatisticamente diferente de acordo com o teste t de Student ( $p < 0,05$ ) para as duas temperaturas avaliadas: com uma carga orgânica inicial de 10 g<sub>DQO</sub>/L, o volume específico produzido a 35 °C foi 22% maior do que o volume obtido em condições termofílicas, enquanto com 30 g<sub>DQO</sub>/L essa diferença foi de 56%.

Esses resultados contrastam com alguns estudos anteriores de produção de H<sub>2</sub> a partir do POME. Por exemplo, tanto Seengenyong e colaboradores (2013) quanto Arisht *et al.* (2022) relataram um aumento na produção de H<sub>2</sub> em condições de termofilia (Arisht *et al.*, 2022; Seengenyong, 2013). No entanto, é importante ressaltar que ambos os trabalhos utilizaram inóculos adaptados a condições termofílicas. Sendo assim, a temperatura de fermentação ideal depende de muitos parâmetros, como a composição da comunidade microbiana, as características da matéria-prima e a adaptação do inóculo a condições específicas de temperatura.

Neste estudo, o melhor desempenho em condições mesofílicas pode ser atribuído a vários fatores. Primeiro, o lodo anaeróbico foi coletado de um digestor anaeróbico mesofílico, o que implica que a comunidade microbiana estaria naturalmente adaptada a tais condições. Embora o pré-tratamento térmico permitisse a seleção de micro-organismos produtores de H<sub>2</sub> esporulantes, a fermentação subsequente a 35 °C proporcionaria a essas bactérias condições mais favoráveis para recuperação e proliferação em comparação com a temperatura mais alta de 50 °C, que poderia impor estresse adicional.

Além disso, as condições termofílicas exigem um maior aporte de energia para aquecimento e, portanto, também podem aumentar os custos operacionais. Assim, as condições mesofílicas podem proporcionar uma dupla vantagem de geração aprimorada de H<sub>2</sub>, juntamente com economia de energia, tornando-as economicamente atraentes para aplicações industriais. Com base nesses resultados, os experimentos subsequentes deste estudo foram conduzidos em condições mesofílicas.



6.3.5 Influência da Pressão Interna do Reator na Produção de Hidrogênio

Além da produção de CH<sub>4</sub>, o H<sub>2</sub> pode ser consumido por outras vias metabólicas durante a DA. Ele pode ser utilizado para produzir amônia, sulfeto e ácido acético por bactérias redutoras de nitrato, bactérias redutoras de sulfato e bactérias homoacetogênicas, respectivamente (Saady, 2013b). Um dos desafios para prevenir o consumo de H<sub>2</sub> é evitar a homoacetogênese, visto que esse processo é conhecido por consumir até 45% do H<sub>2</sub> produzido (Mehi Gaspari Augusto *et al.*, 2024). Portanto, o alívio da pressão em reatores manométricos em batelada poderia mitigar esse fenômeno, deslocando o equilíbrio e removendo o H<sub>2</sub> antes que ele fosse consumido.

Neste trabalho foi observado que o alívio de pressão manométrica no reator aumentou a produção específica de H<sub>2</sub> (Tabela 6).

**Tabela 6** – Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> a partir do POME sem alívio e com alívio de pressão, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 gssv/L), carga orgânica inicial de 30 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por até 44 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL.

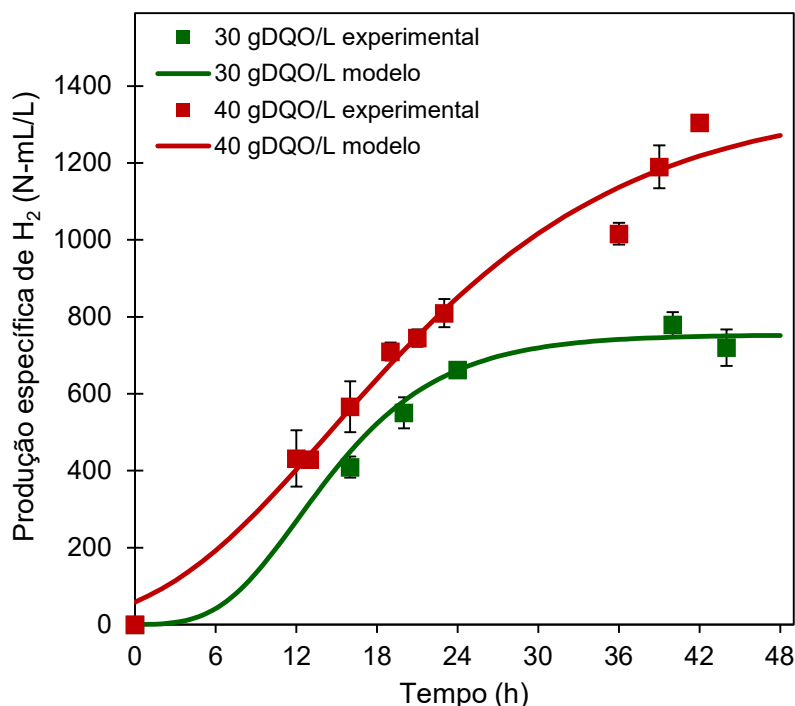
| Condição de pressão | Produção específica de H <sub>2</sub><br>(N-mL/L) em 24 horas | Produção específica de H <sub>2</sub><br>(N-mL/L) em 44 horas |
|---------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Sem alívio          | 644 ± 45                                                      | 619 ± 4                                                       |
| Com alívio          | 663 ± 20                                                      | 720 ± 48                                                      |

Ao longo de 24 horas com 30 g<sub>DQO</sub>/L, a produção específica de H<sub>2</sub> do reator em batelada com alívio de pressão manométrica foi ligeiramente superior à obtida sem alívio de pressão, porém sem diferença estatística pelo teste t de Student ( $p > 0,05$ ). Após 44 horas, essa diferença foi mais significativa: o volume acumulado de H<sub>2</sub> no reator com alívio de pressão continuou a aumentar (atingindo 720 ± 48 N-mL/L), enquanto a produção de H<sub>2</sub> sem alívio de pressão diminuiu (619 ± 4 N-mL/L). Esse fenômeno pode estar associado ao consumo de H<sub>2</sub> via homoacetogênese e/ou aos princípios do equilíbrio químico, uma vez que a remoção de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> estimularia sua produção, de acordo com o princípio de Le Chatelier, o qual também é observado em sistemas bioquímicos (Popović *et al.*, 2026).

Considerando isso, foi levantada a hipótese de que seria viável aumentar a carga orgânica inicial para 40 g<sub>DQO</sub>/L ao utilizar alívio de pressão, visto que se observou um aumento na pressão do reator com uma carga orgânica inicial mais elevada. A Figura 14

compara a produção de  $H_2$  com cargas orgânicas iniciais de 30 g<sub>DQO</sub>/L e 40 g<sub>DQO</sub>/L, ambas com alívio de pressão.

**Figura 14** – Produção específica de  $H_2$  ao longo do tempo em reatores com alívio de pressão, usando como inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente (10 g<sub>SSV</sub>/L), cargas orgânicas iniciais de POME de 30 e 40 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por 44 h em reatores manométricos de vidro de 300 mL. Os quadrados representam os valores experimentais e a linha contínua representa o ajuste do modelo de Gompertz.



Observou-se que, em 16 h, a produção de  $H_2$  com 40 g<sub>DQO</sub>/L ( $567 \pm 66$  N-mL/L) já era superior à obtida com 30 g<sub>DQO</sub>/L ( $410 \pm 27$  N-mL/L). Ao fim da fermentação, essa diferença aumentou de forma mais relevante ( $720 \pm 48$  N-mL/L para 30 g<sub>DQO</sub>/L e  $1305 \pm 3$  N-mL/L para 40 g<sub>DQO</sub>/L), com o rendimento também aumentando de  $24 \pm 2$  N-mL/L.g<sub>DQO</sub> (30 g<sub>DQO</sub>/L) para  $33 \pm 1$  N-mL/L.g<sub>DQO</sub> (40 g<sub>DQO</sub>/L). Esses resultados confirmam que o aumento da carga orgânica, quando gerenciado adequadamente, melhora a eficiência da produção de  $H_2$ .

Além disso, a aplicação da equação de Gompertz modificada (Equação 4) aos dados experimentais apresentou um ótimo ajuste para ambas as cargas orgânicas iniciais, a saber,  $R^2 = 0,991$  para 30 g<sub>DQO</sub>/L e  $R^2 = 0,980$  para 40 g<sub>DQO</sub>/L. Isso significa que o modelo representa bem o processo de produção de  $H_2$  a partir do POME nas condições avaliadas. Além de uma produção máxima quase duas vezes maior (1366 N-mL/L contra 754 N-mL/L), o modelo também prevê uma menor fase adaptativa para o processo com a maior

carga orgânica inicial (1,9 h contra 6,4 h). Por outro lado, a taxa de produção máxima prevista para a fermentação com 30 g<sub>DQO</sub>/L (47,8 mL/L.h) foi cerca de 20% maior do que a prevista para o processo com 40 g<sub>DQO</sub>/L (39,6 mL/L.h).

A realização de um experimento em batelada com uma concentração inicial de 50 g<sub>DQO</sub>/L de POME, mantendo o teor de SSV em 10 g/L, só seria viável aumentando o volume total do meio, o que, conseqüentemente, reduziria o espaço livre do reator e comprometeria a comparabilidade com os demais experimentos. Portanto, 40 g<sub>DQO</sub>/L está muito próximo do limite experimental nas condições avaliadas neste trabalho.

### 6.3.6 Ensaios de Produção de Hidrogênio em Diferentes Volumes de Reator

Após a avaliação dos parâmetros-chave para a produção de H<sub>2</sub> a partir de POME, foram realizados testes de aumento de volume de reator para averiguar o desempenho e a estabilidade do processo em reatores maiores. Para contribuir com esse desenvolvimento tecnológico, primeiramente foram empregados reatores manométricos de vidro de 600 e 1100 mL, utilizando as condições mais apropriadas determinadas nos experimentos anteriores: lodo anaeróbio pré-tratado termicamente como inóculo, temperatura mesofílica (35 °C), concentração de POME *in natura* de 40 g<sub>DQO</sub>/L e estratégia de alívio de pressão. A Tabela 8 exibe os principais resultados obtidos para os três volumes de reator.

**Tabela 7** – Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> a partir do POME em reatores manométricos de vidro de 300, 600 e 1100 mL, usando como inóculo lodo pré-tratado termicamente (10 g<sub>SSV</sub>/L), carga orgânica inicial de 40 g<sub>DQO</sub>/L, pH inicial 5,5, agitação de 160 rpm a 35 °C por até 44 h.

| Volume do reator (mL) | Produção experimental (N-mL/L) | Parâmetros do modelo      |                             |                    |                |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|
|                       |                                | H <sub>max</sub> (N-mL/L) | R <sub>max</sub> (N-mL/L.h) | λ <sub>0</sub> (h) | R <sup>2</sup> |
| 300                   | 1305 ± 3 (42 h)                | 1366,1                    | 39,6                        | 1,85               | 0,980          |
| 600                   | 1402 ± 53 (44 h)               | 1578,1                    | 39,6                        | 1,40               | 0,988          |
| 1100                  | 1284 ± 40 (44 h)               | 1294,2                    | 41,6                        | 1,93               | 0,983          |

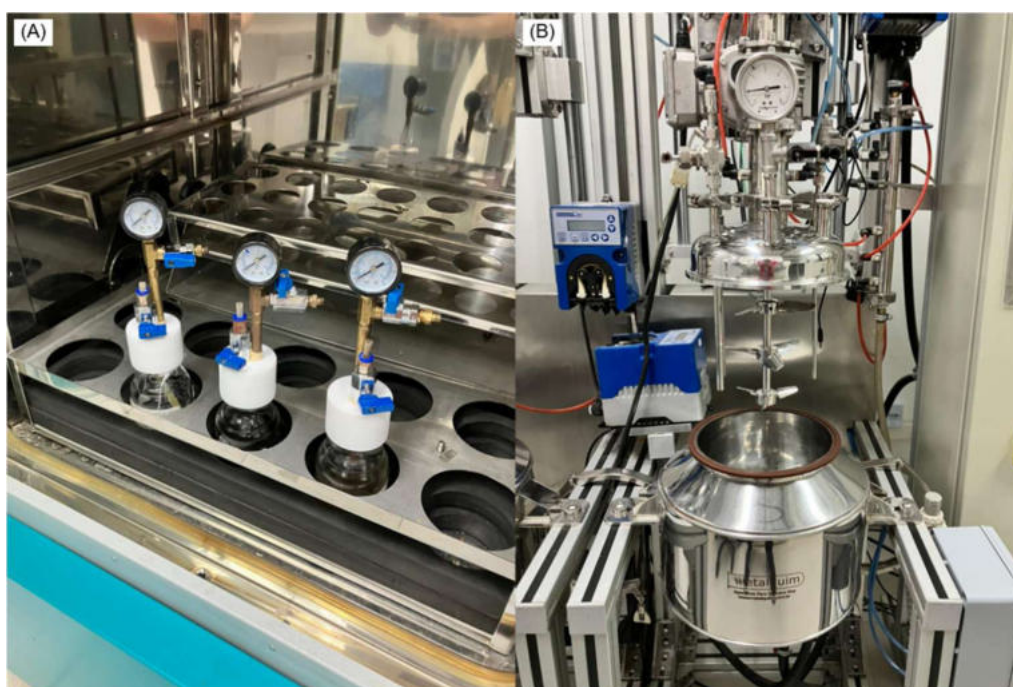
Os altos valores de R<sup>2</sup> (0,980–0,988) confirmam que o modelo de Gompertz modificado descreveu adequadamente os dados experimentais. Além disso, os resultados experimentais indicam que o aumento do volume do reator não afetou significativamente a cinética de produção de H<sub>2</sub>, o que é confirmado pelo fato de a taxa máxima de produção (R<sub>max</sub>) ter permanecido similar entre todos os volumes testados (39,6 – 41,6 N-mL/L.h). O reator de 600 mL apresentou o maior potencial de produção previsto (1578,1 N-mL/L),

sugerindo um desempenho ligeiramente melhor na escala intermediária. A fase adaptativa ( $\lambda_0$ ) permaneceu curta em todos os ensaios (1,40 – 1,93 h), indicando rápida adaptação microbiana. De forma geral, os resultados demonstram que o processo é robusto ao aumento de escala, mantendo um desempenho estável na produção de  $H_2$ .

Sendo assim, a fermentação foi reproduzida em reator STR de 7000 mL nas condições definidas. Além do volume, as diferenças entre este reator e os reatores de manométricos de vidro incluíram os métodos de aquecimento e agitação. Enquanto a temperatura no *shaker* foi controlada pelo ar dentro de uma câmara que é suscetível a uma faixa de variação mais ampla, o STR utiliza uma camisa para aquecer e um fluido para resfriar, o que permite um controle de temperatura mais eficiente e estável.

Além disso, os reatores manométricos de vidro foram incubados em *shaker* com agitação orbital, enquanto o STR possuía um agitador mecânico por pás (Figura 15), projetado para manter uma mistura mais homogênea.

**Figura 15** – Tipos de agitação utilizados nos experimentos. (A) Sistema de agitação orbital, empregado nos experimentos com reatores manométricos de vidro e (B) sistema de agitação por pás, empregado nos experimentos com reator do tipo STR.



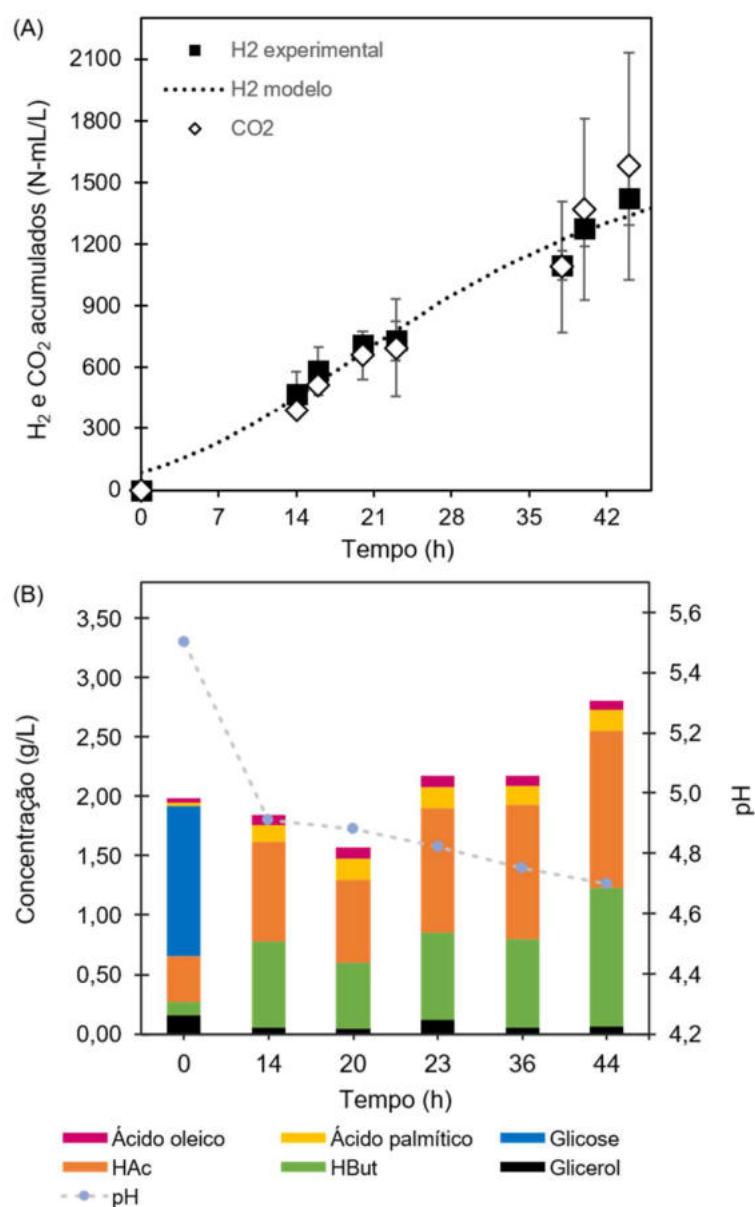
Fonte: Acervo do autor.

Como a transição dos reatores manométricos de vidro para o STR pode apresentar desafios relacionados ao mecanismo de agitação, três diferentes velocidades de agitação, 100, 160 e 300 rpm, foram avaliadas de forma preliminar. Observou-se que o aumento da

agitação resultou em menor produção de  $H_2$  em 37 h, com valores de 1147, 947 e 838 N-mL/L, respectivamente. Isso pode estar associado ao fenômeno de formação de espuma em velocidades de agitação mais elevadas, o que pode levar a dificuldades na transferência de massa durante a fermentação (Elsamadony *et al.*, 2021).

A uma velocidade de agitação de 100 rpm e um tempo de fermentação de 44 h, obteve-se um volume específico de  $H_2$  de  $1423 \pm 130$  N-mL/L (Figura 16A), e um biogás com 40% de  $H_2$  e 39% de  $CO_2$ . A ausência de  $CH_4$  confirmou a eficácia do pré-tratamento térmico na inibição da atividade metanogênica.

**Figura 16** – Cinética da fermentação do POME a 35 °C durante 44 h, com carga orgânica inicial de 40 g<sub>DQO</sub>/L, agitação a 100 rpm em um reator STR de 7000 mL e alívio de pressão. (A) Produção específica de  $H_2$  e  $CO_2$ ; (B) concentrações de glicerol, 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico, e a evolução do pH no meio.

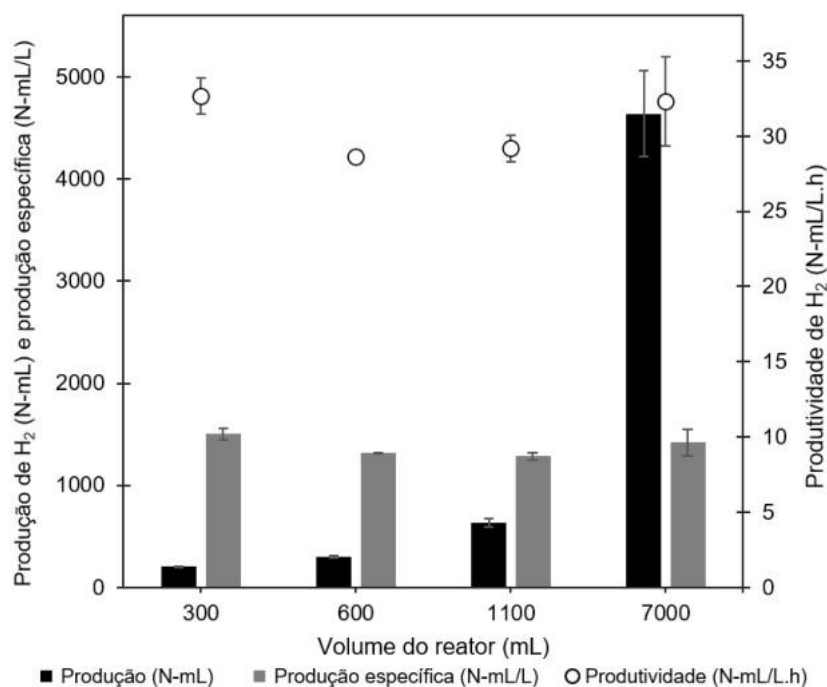


A Figura 16B apresenta a concentração de substratos e metabólitos, e o pH no meio durante a fermentação. O perfil de pH observado durante a fermentação exibiu uma diminuição gradual do pH inicial de 5,50 para um valor final de pH de  $4,70 \pm 0,02$  em 44 horas. Essa redução do pH é atribuída ao acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs), que são gerados principalmente como produtos metabólicos finais juntamente com  $H_2$  durante a fermentação. Os ácidos acético (HAc) e butírico (HBut) foram os principais AGVs produzidos, atingindo concentrações finais de  $1,32 \pm 0,63$  g/L e  $1,17 \pm 0,47$  g/L, respectivamente. Estudos anteriores demonstraram que uma razão molar entre ácido acético e ácido butírico (razão HAc/HBut) superior a 1 indica uma via de fermentação acética, enquanto um valor inferior a 1 indica uma via de fermentação butírica (Hosseinzadeh *et al.*, 2022; Wong, Wu e Juan, 2014). Descontando suas concentrações iniciais, as concentrações de HAc e HBut produzidas durante a fermentação foram de 15,65 mmol/L e 12,03 mmol/L, respectivamente, o que representa uma razão HAc/HBut de 1,20. Isso implica que mais  $H_2$  foi produzido a partir da via acética do que da via butírica, indicando que as condições do processo parecem favorecer a rota com o maior rendimento molar de  $H_2$ .

Adicionalmente, a aplicação da equação de Gompertz modificada (Equação 4) aos dados experimentais apresentou um ajuste satisfatório ( $R^2 = 0,976$ ), implicando que o modelo continua representando bem o processo de produção de  $H_2$  a partir do POME em um reator de maior volume. O modelo previu uma fase adaptativa de 1,6 h, a mesma prevista para o reator de 300 mL. Já a produção máxima foi de  $H_2$  de 1664 N-mL/L, valor cerca de 11% maior que o previsto para o reator de 300 mL.

Para avaliar de forma mais abrangente a escalabilidade do processo de produção de  $H_2$  a partir de POME e determinar as implicações do aumento de escala no processo, foi realizada uma comparação sistemática em diferentes volumes de reator: 300, 600, 1100 e 7000 mL. A Figura 17 apresenta os resultados obtidos nas condições mais promissoras determinadas nas seções anteriores: lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, temperatura mesofílica (35 °C), concentração inicial de POME de 40 g<sub>DQO</sub>/L e alívio de pressão.

**Figura 17** – Produção de H<sub>2</sub> a partir de POME, comparando reatores manométricos de vidro (300, 600 e 1100 mL) e agitação orbital (160 rpm) com reator STR (7000 mL) e agitação por pás (100 rpm). A comparação inclui a produção total de H<sub>2</sub> (N-mL, barras pretas, eixo y esquerdo), a produção específica de H<sub>2</sub> (N-mL/L, barras cinza, eixo y esquerdo) e a produtividade (N-mL/L.h, círculos brancos, eixo y direito) em 44 h. Condições: pH 5,5, 35 °C, com alívio de pressão.



Como esperado, observou-se um aumento no volume total de produção de H<sub>2</sub>, que foi proporcional ao aumento no tamanho do reator. Após 44 horas de fermentação, a produção acumulada de H<sub>2</sub> foi de 203 ± 7 N-mL para reatores de 300 mL, 299 ± 9 N-mL para reatores de 600 mL, 632 ± 40 N-mL para reatores de 1100 mL e 4642 ± 424 N-mL para o reator de 7000 mL. Além disso, os volumes específicos de produção de H<sub>2</sub> nos reatores foram de 1503 ± 55 N-mL/L, 1319 ± 4 N-mL/L, 1284 ± 40 N-mL/L e 1423 ± 130 N-mL/L, respectivamente, não apresentando diferença significativa e indicando excelente escalabilidade do processo.

Análises adicionais revelaram uma forte relação linear entre o volume do reator e a produção total de H<sub>2</sub>, descrita pela Equação 6 com um valor de R<sup>2</sup> de 0,9992.

$$\text{produção de H}_2 \text{ (N-mL)} = 0,6599 \times \text{volume do reator (mL)} \quad \text{Equação (6)}$$

O alto valor de R<sup>2</sup> confirmou que a produção total de H<sub>2</sub> é linearmente escalável com o volume do reator dentro da faixa testada, um resultado que sugere que a aplicação

do processo em reatores de maior volume não acarretaria perda significativa de eficiência. A produtividade de  $H_2$  permaneceu estável em diferentes volumes de reator, com valores de  $33 \pm 1$  N-mL/L·h,  $29 \pm 0,1$  N-mL/L·h,  $29 \pm 1$  N-mL/L·h e  $32 \pm 3$  N-mL/L·h para reatores de 300, 600, 1100 e 7000 mL, respectivamente. O aumento de escala não influenciou a cinética da reação, um sinal promissor para futuras aplicações em escala industrial, contribuindo para a melhoria do gerenciamento de resíduos e a geração de energia renovável em regiões produtoras de óleo de palma.

No entanto, é importante notar que o aumento da escala laboratorial para dimensões industriais pode introduzir desafios adicionais não considerados neste trabalho. Tais desafios incluem limitações de transferência de calor e massa em reatores muito grandes, maior demanda de energia para mistura e controle de temperatura, e possível heterogeneidade na distribuição do substrato e na atividade microbiana (Chezeau e Vial, 2019). Esses aspectos devem ser considerados em estudos futuros para garantir que a produção biológica de  $H_2$  a partir de POME seja viável em escala industrial.

A Tabela 8 apresenta uma comparação dos rendimentos de produção de  $H_2$  obtidos a partir da fermentação em batelada do POME, os quais foram relatados neste estudo e na literatura.



**Tabela 8** – Comparação dos rendimentos da produção biológica de hidrogênio a partir de POME e parâmetros de processo em sistemas em batelada: dados deste estudo e de relatos da literatura.

| Pré-tratamento do POME | Origem do inóculo                                                          | Pré-tratamento do inóculo | Carga orgânica inicial (g <sub>DQO</sub> /L) | Temperatura de fermentação (°C) | Rendimento de H <sub>2</sub> (N-mL/g <sub>DQO</sub> ) | Referência                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| -                      | Estação de tratamento anaeróbia operada em uma indústria de óleo de palma. | Térmico                   | -                                            | 35                              | 9                                                     | (Mohammadi <i>et al.</i> , 2011)          |
| Decantação             | Lagoa anaeróbia de POME                                                    | Térmico                   | 17                                           | 50                              | 24*                                                   | (Zainal <i>et al.</i> , 2018b)            |
| Hidrólise enzimática   | Digestor anaeróbio de estação de tratamento de esgoto                      | Ácido                     | 20                                           | 35                              | 58                                                    | (Garritano, Sá, de, <i>et al.</i> , 2017) |
| -                      | Digestor anaeróbio de estação de tratamento de esgoto                      | Térmico                   | 40                                           | 35                              | 36                                                    | Este estudo                               |

Todos os dados foram transformados de mL/g<sub>DQO</sub> ou mmol/g<sub>DQO</sub> para N-mL/g<sub>DQO</sub> com dados dos manuscritos.

\*N-mL/g<sub>DQO</sub>-consumida.

Zainal e colaboradores (2018a) avaliaram a produção de  $H_2$  variando a temperatura (30-50 °C), a proporção de inóculo e o tempo de fermentação (8-24 h), usando uma metodologia de superfície de resposta para o planejamento dos experimentos. A melhor condição obtida foi de 24 N-mL/g<sub>DQO</sub> em 8 h de fermentação a 50 °C. Os autores também observaram que o melhor rendimento foi obtido com concentrações de POME abaixo de 20 g<sub>DQO</sub>/L. Cabe destacar que o POME utilizado foi previamente submetido a um processo de decantação, responsável pela remoção de grande parte dos sólidos suspensos e pela manutenção da fração orgânica já solubilizada, mais prontamente assimilável pelos micro-organismos. Essa característica pode justificar o menor tempo de fermentação observado em comparação ao presente estudo (44 h), uma vez que a disponibilidade imediata de substratos solúveis tende a acelerar a atividade metabólica acidogênica.

Ainda assim, o rendimento obtido no presente trabalho foi 50% superior, mesmo utilizando um meio com concentração de POME cerca de duas vezes maior. As diferenças observadas entre os resultados podem estar relacionadas não apenas às características específicas do POME, mas também às particularidades do inóculo, como composição microbiana e adaptação aos substratos, e condições operacionais distintas, como estratégia de alívio de pressão.

Mohammadi e colaboradores (2011b) estudaram diferentes pré-tratamentos (químico, ácido, choque térmico, alcalino, congelamento e descongelamento) em lodo anaeróbio para fermentação com POME. O melhor rendimento foi obtido com lodo pré-tratado por choque térmico (9 N-mL/g<sub>DQO</sub>), o que corroboraria o pré-tratamento térmico utilizado no presente trabalho. Entretanto, esse valor de rendimento é significativamente inferior aos demais relatados na literatura, indicando a existência de uma lacuna no ajuste de outros parâmetros do processo fermentativo, cuja otimização é essencial para alcançar desempenhos mais satisfatórios.

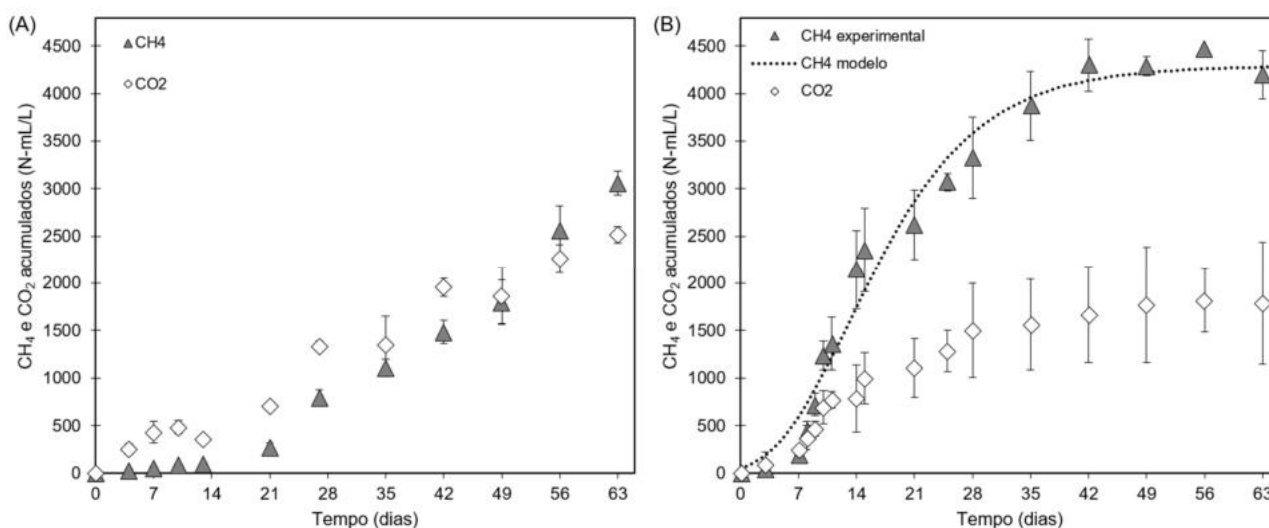
Garritano et al. (2017) investigaram o pré-tratamento de POME com uma preparação enzimática vegetal extraída de sementes dormentes de mamona (*Ricinus communis* L.), o que aumentou o rendimento de  $H_2$  (58 N-mL/g<sub>DQO</sub>) e diminuiu a fase adaptativa em 50% em comparação com o controle. Embora o rendimento reportado tenha sido 61% superior ao obtido neste estudo, a comparação deve considerar diferenças importantes nas condições experimentais. O processo citado foi conduzido com uma carga orgânica inicial 50% menor, o que pode ter reduzido efeitos inibitórios e favorecido o desempenho microbiano. Além disso, houve adição de enzimas ao meio fermentativo, o que aumentou a taxa de hidrólise e a disponibilidade de substratos solúveis, contribuindo para um rendimento mais elevado.

Outro fator relevante é a diferença de escala, já que o estudo comparado utilizou volume de meio significativamente menor (45 mL) em relação aos 3850 mL empregados neste trabalho. Sistemas menores tendem a apresentar melhor controle operacional e menor heterogeneidade, o que pode impactar positivamente os resultados. Assim, as distinções quanto à carga orgânica, suplementação enzimática e volume reacional limitam a comparabilidade direta e reforçam que o presente estudo foi conduzido sob condições mais desafiadoras e próximas de aplicações em maior escala.

#### 6.4 PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO POME

O efluente da produção de  $H_2$  (EPH) a partir de POME foi submetido a uma segunda etapa de digestão anaeróbia para avaliar seu potencial metanogênico, aumentando assim a recuperação de energia e a estabilização da matéria orgânica por meio de uma estratégia de processo sequencial. De forma comparativa, também foi realizada uma DA direta do POME *in natura*, partindo de uma mesma carga orgânica inicial (18 g<sub>DQO</sub>/L). Os ensaios foram conduzidos em reatores manométricos de vidro de 300 mL, a 35 °C, com pH inicial de 7,0. Os perfis de produção cumulativa de  $CH_4$  e  $CO_2$  são apresentados na Figura 18.

**Figura 18** – Comparação entre a digestão anaeróbia (A) direta, tendo POME *in natura* como matéria-prima, e (B) sequencial, tendo o efluente da fermentação do POME como matéria-prima. Ensaios com duração de 63 dias, usando como inóculo lodo anaeróbio *in natura* (6 g<sub>SSV</sub>/L), carga orgânica inicial de 18 g<sub>DQO</sub>/L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL.



A comparação dos perfis de produção de gás ao longo da DA indica que, no processo sequencial, a formação quantificável de  $CH_4$  é observada a partir do sétimo dia de operação,

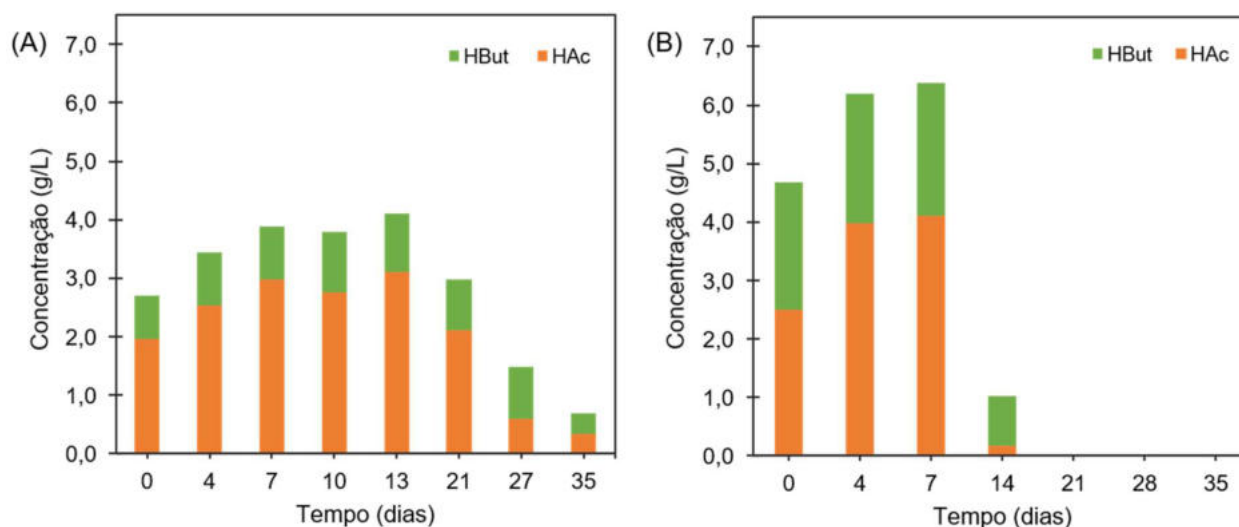
enquanto na DA direta a produção significativa desse gás ocorre apenas após o 13º dia. Esses resultados evidenciam que a configuração em duas etapas promove uma redução de aproximadamente 50% na fase adaptativa do processo.

Após 35 dias, a DA sequencial apresentou uma produção acumulada de CH<sub>4</sub> de 3873 ± 361 N-mL/L, valor estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) ao obtido no 42º dia (4302 ± 274 N-mL/L) de acordo com o teste t de Student, indicando a estabilização do sistema. Em contraste, a DA direta levou 63 dias para atingir uma produção máxima de 3059 ± 128 N-mL/L. Adicionalmente, o biogás proveniente do processo sequencial apresentou composição de 50% de CH<sub>4</sub> e 18% de CO<sub>2</sub>, enquanto no processo direto foram observadas concentrações de 38% de CH<sub>4</sub> e 21% de CO<sub>2</sub>. Um maior percentual de CH<sub>4</sub> no biogás aumenta seu poder calorífico, elevando o potencial de geração de energia por unidade de volume, e reduz a necessidade de etapas de purificação para obtenção de biometano, tornando o aproveitamento energético do gás mais eficiente.

Além disso, a aplicação da equação de Gompertz modificada (Equação 4) aos dados experimentais da DA sequencial apresentou um ajuste muito satisfatório ( $R^2 = 0,979$ ), significando que o modelo representa bem o processo de produção de CH<sub>4</sub> a partir do efluente da fermentação do POME nas condições avaliadas. O modelo previu uma fase adaptativa de 4,3 dias e uma produção máxima de CH<sub>4</sub> de 4291 N-mL/L para o processo sequencial, com uma taxa de produção máxima de 180 N-mL/L.dia. Por outro lado, o modelo não se ajustou bem aos dados experimentais da DA direta, já que o processo não chegou à estabilização da produção de CH<sub>4</sub> dentro do intervalo de tempo avaliado.

A Figura 19 apresenta os perfis de concentração dos principais AGVs ao longo dos primeiros 35 dias de ambos os processos. Observa-se que no início da digestão sequencial a concentração de ácidos é significativamente mais elevada (cerca de 4,7 g/L), uma vez que a matéria-prima utilizada é o efluente da produção de H<sub>2</sub>, etapa caracterizada pela formação desses compostos.

**Figura 19** – Perfis de concentração de ácido acético (HAc) e ácido butírico (HBut) ao longo de 35 dias de digestão (A) direta, partindo do POME *in natura*, e (B) sequencial, partindo do efluente da fermentação do POME, usando lodo anaeróbio *in natura* como inóculo, carga orgânica inicial de 18 g<sub>DQO</sub>/L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL.



Além disso, observa-se a formação de HAc durante a primeira semana em ambos os processos, enquanto a concentração de HBut permanece estável. No entanto, o consumo desses AGVs ocorre mais rapidamente na DA sequencial, sendo totalmente consumidos entre 14 e 21 dias, enquanto na DA direta eles começam a ser consumidos entre 13 e 21 dias, apresentando concentrações remanescentes ao fim dos 35 dias.

No processo de DA, a formação de HAc está associada ao predomínio da hidrólise e acidogênese, que promovem o acúmulo de AGVs antes do estabelecimento pleno da atividade metanogênica (Xi *et al.*, 2021). A estabilidade da concentração de HBut nesse período pode estar relacionada ao equilíbrio entre sua produção fermentativa e sua conversão via acetogênese sintrófica. Quanto ao consumo desses ácidos, o processo sequencial parte de uma matéria-prima pré-digerida durante a etapa de produção de H<sub>2</sub>, resultando em um efluente com substratos mais simples e mais facilmente metabolizáveis pelas comunidades microbianas presentes no lodo anaeróbio, enquanto o processo direto parte do POME *in natura*, um efluente mais complexo que demanda mais tempo para ser metabolizado.

Para avaliar a eficácia da DA como método de tratamento do POME, os teores de carga orgânica inicial e ao fim de 35 dias, mostrados na Tabela 9, também foram medidos.

**Tabela 9** – Comparação entre os teores de carga orgânica solúvel inicial e no tempo de 35 dias dos processos de digestão anaeróbia direta e sequencial, usando lodo anaeróbio *in natura* como inóculo, carga orgânica inicial total de 18 g<sub>DQO</sub>/L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reatores manométricos de vidro de 300 mL.

| Estratégia          | DQO solúvel inicial   | DQO solúvel em 35 dias |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
|                     | (g <sub>DQO</sub> /L) | (g <sub>DQO</sub> /L)  |
| Digestão direta     | 9,42                  | 4,52                   |
| Digestão sequencial | 11,79                 | 2,22                   |

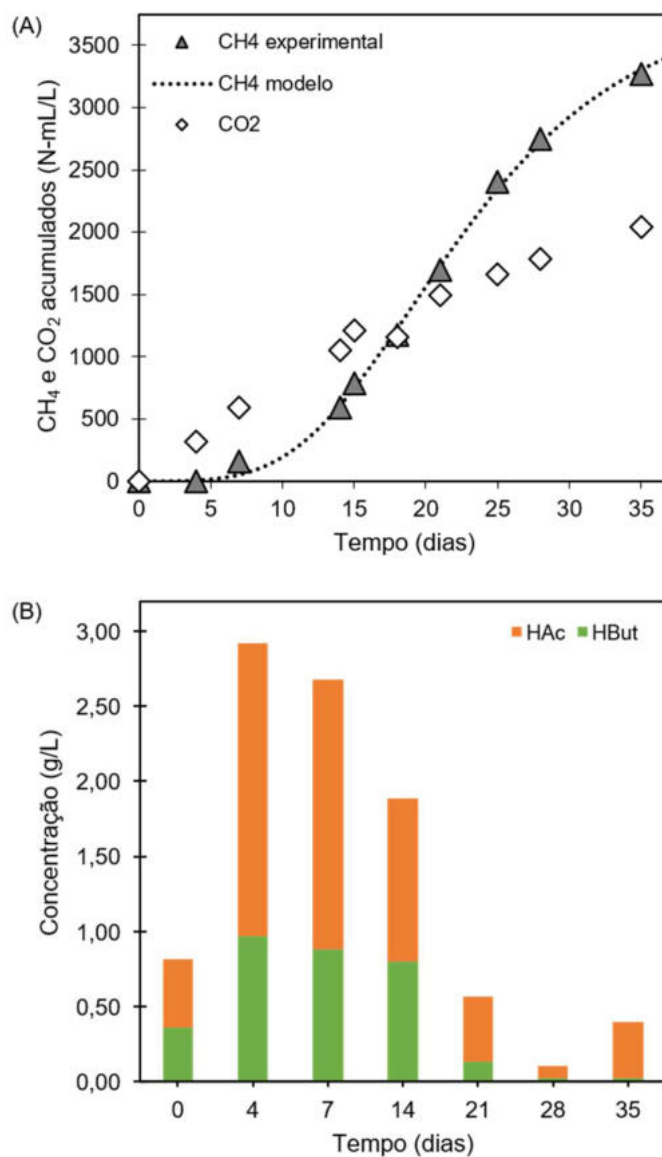
No processo direto, a redução da DQO solúvel correspondeu a uma diminuição de 52% da carga orgânica inicial. Já no processo sequencial, essa redução foi mais expressiva, atingindo 81%. A diferença entre os percentuais de remoção de DQO evidencia o melhor desempenho da DA sequencial, que se mostrou mais eficiente não apenas na geração de volumes significativos de CH<sub>4</sub>, mas também na redução da carga orgânica do efluente.

Outro aspecto relevante a ser avaliado é o potencial energético global dos processos. Pela aplicação da Equação 5 (Seção 5.6.3), a DA direta apresentou um potencial energético de 1195,2 cal/g<sub>DQO</sub>inicial ao final de 63 dias. Em contraste, a digestão em duas etapas alcançou 90,6 cal/g<sub>DQO</sub>inicial após 44 h na fase de produção de H<sub>2</sub>, e 1840,7 cal/g<sub>DQO</sub>inicial na fase metanogênica, após 35 dias. Desta forma, a DA sequencial proporciona um potencial energético 62% maior em um tempo 41% menor.

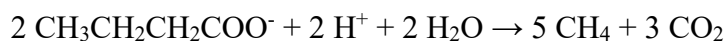
Com base nesses resultados, é possível concluir que a DA em duas etapas (sequencial) apresenta vantagens claras em relação à DA direta em estágio único. O processo sequencial antecipa significativamente o início da metanogênese, reduzindo a fase adaptativa do lodo anaeróbio, o que se reflete em uma produção mais rápida de CH<sub>4</sub>. Além disso, essa estratégia resulta em maior produção acumulada e maior produção máxima desse gás, alcançando a estabilização em menor tempo operacional. Em contraste, a DA direta demanda períodos mais longos para adaptação e apresenta menor rendimento final, indicando menor eficiência global do processo. Esses resultados evidenciam que a separação das fases acidogênica/hidrogenogênica e metanogênica favorece o controle das condições operacionais e o desempenho da produção de CH<sub>4</sub>.

Sendo assim, foi realizado um ensaio preliminar, sem replicatas, de aumento de escala da DA sequencial em reator STR de 7000 mL, sem agitação, cujo perfil de produção de gases ao longo de 35 dias é apresentado na Figura 20A. A proporção entre meio e espaço livre dentro do reator foi mantida, assim como os parâmetros do ensaio em reatores de 300 mL.

**Figura 20** – Produção de CH<sub>4</sub> utilizando o EPH durante 35 dias. (A) Produção específica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> e (B) concentração de AGVs no meio. Condições: lodo anaeróbico *in natura* como inóculo, carga orgânica inicial de 18 g<sub>DQO</sub>/L, pH 7,0, a 35 °C, sem agitação, em reator STR de 7000 mL.



A razão volumétrica CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> exibiu uma evolução temporal distinta, aumentando de 0,3 durante a semana inicial para cerca de 1,1 por volta do 21º dia, atingindo finalmente 1,4 no 35º dia. Esse perfil, particularmente a mudança para a dominância de CH<sub>4</sub>, reflete o estabelecimento progressivo da atividade metanogênica e está alinhado com a estequiometria esperada para a conversão do efluente rico em AGVs, conforme representado na Equação (7), que mostra a digestão anaeróbia do HBut (Schink e Stams, 2013).



Equação (7)

A cinética de produção de biogás apresentou uma fase adaptativa de aproximadamente 7 dias, durante a qual a produção de CH<sub>4</sub> foi mínima (154 N-mL/L), indicando o período necessário para a aclimação microbiana aos substratos e às condições do reator. Esta fase foi sucedida por uma fase exponencial (dias 7-21) que exibiu atividade metanogênica significativamente acelerada, atingindo um volume acumulado de CH<sub>4</sub> de 1696 N-mL/L. Posteriormente, a taxa de produção de CH<sub>4</sub> aparentemente começou a diminuir, correspondendo ao esgotamento dos substratos facilmente biodegradáveis, atingindo uma produção de 3274 N-mL/L após 35 dias, um valor cerca de 15% menor do que o obtido anteriormente em frascos de 300 mL no mesmo período.

Embora se trate de um resultado preliminar e seja necessária a repetição do experimento para avaliar a significância estatística das diferenças entre os dois volumes de reator, é possível discutir alguns fatores associados à redução observada. Em reatores maiores, limitações de transferência de massa e mistura não homogênea reduzem o contato entre micro-organismos e substratos, favorecendo a formação de gradientes de concentração que comprometem a atividade metanogênica e diminuem as taxas de degradação e a produção de CH<sub>4</sub> (Li *et al.*, 2023). Além disso, a dinâmica microbiana nesses sistemas pode diferir daquela observada em escalas menores, com menor diversidade e estabilidade das populações, o que afeta negativamente as vias metabólicas associadas à metanogênese (DelaVega-Quintero *et al.*, 2025).

Além disso, a aplicação da equação de Gompertz modificada (Equação 4) aos dados experimentais da DA sequencial em reator STR apresentou um ajuste muito satisfatório ( $R^2=0,999$ ), significando que o modelo representa muito bem o processo de produção de CH<sub>4</sub> a partir do EPH do POME nas condições avaliadas. O modelo previu uma fase adaptativa de 10,8 dias e uma produção máxima de CH<sub>4</sub> de 3831 N-mL/L para o processo sequencial, com uma taxa de produção máxima de 169 N-mL/L.dia.

Informações sobre a dinâmica metabólica durante produção de biogás foram obtidas a partir da análise dos principais intermediários solúveis (Figura 20B). A diferença na concentração dos componentes do meio no ponto final da fermentação (44 h – Figura 16B) e no ponto inicial da DA (0 h) deve-se à diluição causada pela adição de água e lodo anaeróbico para compor o meio da digestão. Além disso, as concentrações de ácido palmítico e oleico durante o processo ficaram abaixo do limite de quantificação, visto que a metodologia de quantificação envolve a diluição das amostras com isopropanol.

O EPH continha AGVs importantes, a saber, HAc e HBut, apresentando concentrações máximas de 1,95 a 1,80 g/L nos dias 4 a 7 para o HAc e de 0,80 g/L para o HBut no dia 14.



Esse acúmulo inicial é atribuído principalmente à alta carga de AGVs, potencialmente aumentada pela rápida acidogênese/acetogênese de substratos residuais não quantificados (por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, glicerol e triglicerídeos) durante a fase adaptativa da produção de  $\text{CH}_4$ /consumo de AGVs. À medida que o consórcio metanogênico se tornou totalmente ativo (coincidindo com a fase exponencial de produção de gás na Figura 19A), o consumo de AGVs aumentou significativamente.

Entretanto, enquanto esses ácidos já haviam sido totalmente consumidos em 21 dias no ensaio em reator de 300 mL (Figura 19B), a taxa de consumo foi um pouco mais lenta no processo em reator de 7000 mL, o que poderia ser atribuído às limitações de transferência de massa e mistura não homogênea citadas anteriormente. No 35º dia, o HAc havia sido quase totalmente consumido e o HBut apresentava apenas concentração residual de 0,02 g/L (Figura 19B). O consumo eficiente desses AGVs está de acordo com sua função estabelecida como substratos primários para a geração de  $\text{CH}_4$  por meio de vias acetoclásticas em consórcios microbianos anaeróbios.

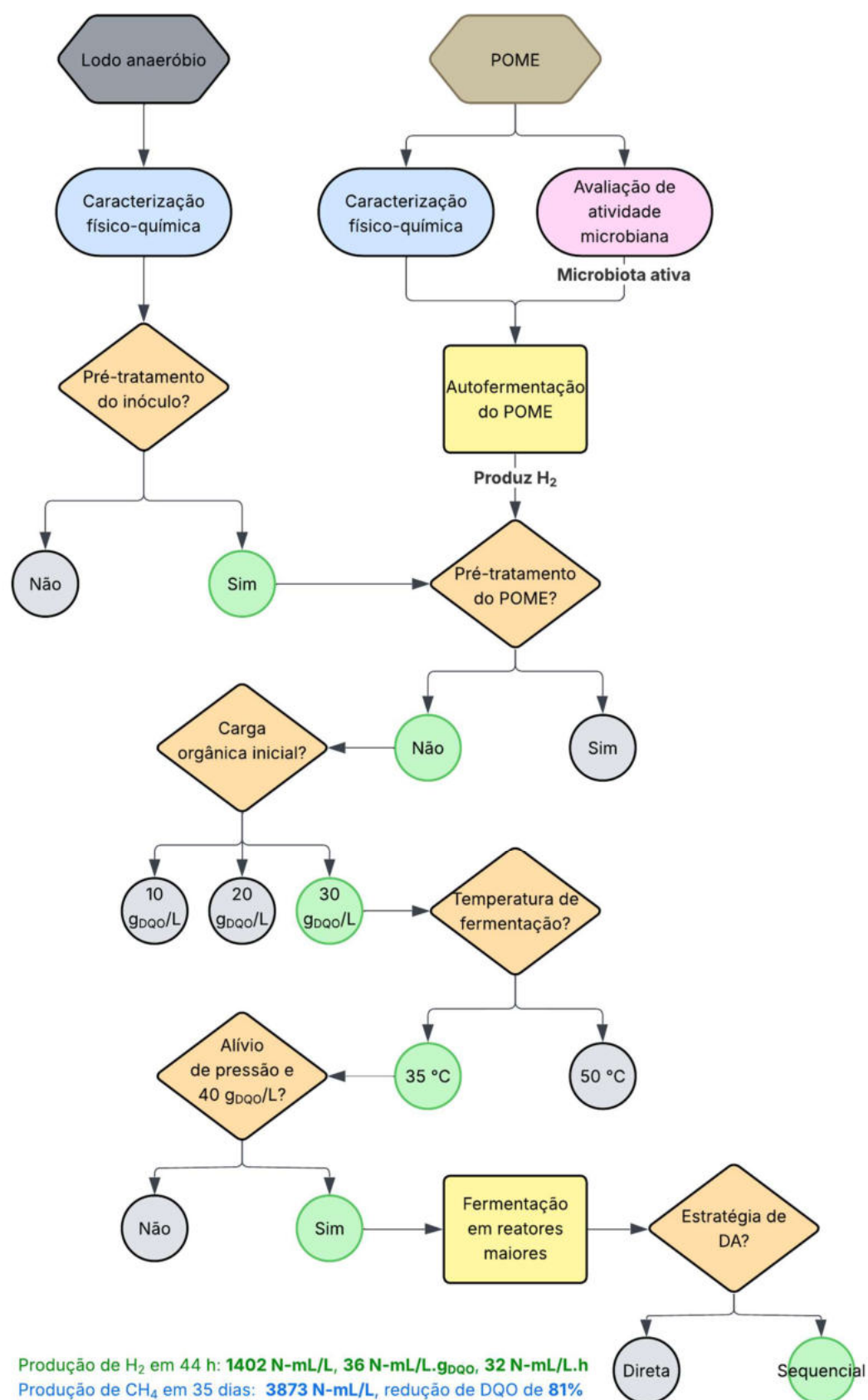
O acúmulo de ácido propiônico durante a digestão anaeróbia também foi verificado qualitativamente por HPLC, porém a quantificação não foi realizada. O ácido propiônico é um AGV que se acumula em digestores anaeróbios sob condições de estresse, como alta carga orgânica, inibição por amônia ou desequilíbrio do processo (Capson-Tojo *et al.*, 2017; Khafipour *et al.*, 2020). Este é um parâmetro importante a ser monitorado em estudos futuros, pois pode levar à instabilidade e à redução da produção de  $\text{CH}_4$ . O manejo eficaz requer tanto o controle operacional quanto intervenções microbianas ou químicas direcionadas para manter o propionato em níveis não inibitórios e garantir o desempenho estável do digestor (Kim *et al.*, 2022; Li e Wang, 2021).

Sendo assim, apesar de algumas diferenças no perfil metabólico e de ser necessário realizar mais repetições do experimento em reator de 7000 mL, a redução de apenas 15% na produção específica de  $\text{CH}_4$  sugere uma boa escalabilidade do processo de DA sequencial do POME.

## 6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Figura 21 sintetiza o percurso experimental realizado nesta dissertação, explicitando as condições operacionais selecionadas em cada etapa, a fim de maximizar a produção biológica de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$  a partir de POME, bem como os principais resultados obtidos.

**Figura 21** – Esquema representativo das atividades experimentais realizadas nesta dissertação e suas respectivas conclusões.



Fonte: Elaboração própria.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio é uma etapa crucial para aumentar a produção de  $H_2$  a partir de POME. Os experimentos também demonstraram que a microbiota nativa do POME é capaz de produzir  $H_2$  por si só, mas sua presença não impactou significativamente a produção de  $H_2$  utilizando o lodo anaeróbio pré-tratado. Isso significa que a esterilização do efluente é desnecessária, o que pode representar economia de custos e um processo mais sustentável. Os melhores valores de produção específica de  $H_2$  (1402 N-mL/L), rendimento (36 N-mL/L.g<sub>DQO</sub>) e produtividade (32 N-mL/L.h) foram alcançados utilizando carga orgânica inicial de 40 g<sub>DQO</sub>/L, a 35 °C e aplicando a estratégia de alívio de pressão durante o processo. Além disso, foi possível alcançar produção específica de  $H_2$ , produtividade e rendimento comparáveis ao aumentar o volume do reator de 300 mL para 7000 mL, com uma relação linear entre o volume do reator e o volume total de  $H_2$ , sugerindo a viabilidade e robustez do sistema para aumento de escala. Para a produção de  $CH_4$ , foram avaliadas a DA direta e sequencial do POME. A digestão em duas etapas apresentou produção específica acumulada de 3873 N-mL/L em 35 dias, valor 27% superior ao obtido na digestão direta após 63 dias, bem como uma redução de DQO de 81%. Além disso, o potencial energético global do processo sequencial foi 62% maior, corroborando as vantagens dessa estratégia. Estudos em escalas mais próximas aos níveis industriais ainda precisam ser conduzidos, porém esses resultados reforçam a viabilidade técnica da produção de  $H_2$  e sua aplicabilidade em escalas maiores, representando uma alternativa promissora para a utilização eficiente e sustentável de resíduos orgânicos.

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o processo de produção de  $H_2$  a partir do POME em regime contínuo;
- Estudar os parâmetros de digestão anaeróbia, como agitação e temperatura;
- Avaliar o processo de digestão anaeróbia sequencial em regime contínuo;
- Identificar as espécies microbianas presentes no meio em diferentes etapas do processo;
- Avaliar os processos de produção de  $H_2$  e  $CH_4$  a partir do POME em escala piloto.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, A.; CHEN, X.; LIU, J.; XIE, X.; ZHANG, J.; ZHANG, K.; WANG, H.; LIU, N. Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. **BioMed Research International**, 2014.
- ABDULLAH, M. F.; MD JAHIM, J.; ABDUL, P. M.; MAHMOD, S. S. Effect of carbon/nitrogen ratio and ferric ion on the production of biohydrogen from palm oil mill effluent (POME). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 1 jan. 2020.
- AKA, B. E. Z.; DJENI, T. N.; AMOIKON, S. L. T.; KANNENGIESSER, J.; OUAZZANI, N.; DJE, M. K. High-throughput 16S rRNA gene sequencing of the microbial community associated with palm oil mill effluents of two oil processing systems. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- AKHBARI, A.; CHUEN, O. C.; IBRAHIM, S. Start-up study of biohydrogen production from palm oil mill effluent in a lab-scale up-flow anaerobic sludge blanket fixed-film reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 17, p. 10191–10204, 2021.
- AKHBARI, A.; IBRAHIM, S.; AHMAD, M. S. Optimization of up-flow velocity and feed flow rate in up-flow anaerobic sludge blanket fixed-film reactor on bio-hydrogen production from palm oil mill effluent. **Energy**, v. 266, 1 mar. 2023.
- AKHBARI, A.; ZINATIZADEH, A. A.; VAFAEIFARD, M.; MOHAMMADI, P.; ZAINAL, B. S.; IBRAHIM, S. Effect of operational variables on biological hydrogen production from palm oil mill effluent by dark fermentation using response surface methodology. **Desalination and Water Treatment**, v. 137, p. 101–113, 1 jan. 2019.
- ALBUQUERQUE, M. M.; SARTOR, G. DE B.; MARTINEZ-BURGOS, W. J.; SCAPINI, T.; EDWIGES, T.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Biohydrogen Produced via Dark Fermentation: A Review. **Methane**, v. 3, n. 3, p. 500–532, 14 set. 2024.
- ALHAJI, A. M.; ALMEIDA, E. S.; CARNEIRO, C. R.; SILVA, C. A. S. DA; MONTEIRO, S.; COIMBRA, J. S. DOS R. Palm Oil (*Elaeis guineensis*): A Journey through Sustainability, Processing, and Utilization. **Foods Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, , 1 set. 2024.

ALMUTAIRI, M. Method development for evaluating the effectiveness of hydrocarbons on BOD, UBOD and COD removal in oily wastewater. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 12, p. 2650–2663, 15 jun. 2020.

AN, X.; XU, Y.; DAI, X. Biohythane production from two-stage anaerobic digestion of food waste: A review. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Chinese Academy of Sciences, 1 maio 2024.

ANTUKH, T.; LEE, I.; JOO, S.; KIM, H. Hydrogenotrophs-Based Biological Biogas Upgrading Technologies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media S.A., 25 abr. 2022.

ANUKAM, A.; MOHAMMADI, A.; NAQVI, M.; GRANSTRÖM, K. A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency. **Processes** MDPI AG, 1 ago. 2019.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l: s.n.].

ARAÚJO-GOMES, R.; DOS, G.; MOREIRA, S.; ISHIHARA, J. H. Uso de biorreatores para tratamento do efluente industrial do dendê: produção de biofertilizante e biogás. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, n. 28, p. 735–746, 2024.

ARISHT, S. N.; MAHMOD, S. S.; ABDUL, P. M.; INDERA LUTFI, A. A.; TAKRIFF, M. S.; LAY, C. H.; SILVAMANY, H.; SITTIJUNDA, S.; JAHIM, J. M. Enhancing biohydrogen gas production in anaerobic system via comparative chemical pre-treatment on palm oil mill effluent (POME). **Journal of Environmental Management**, v. 321, 1 nov. 2022.

ARNAIZ, C.; GUTIERREZ, J. C.; LEBRATO, J. Biomass stabilization in the anaerobic digestion of wastewater sludges. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1179–1184, jul. 2006.

AYDIN, M. I.; KARACA, A. E.; QURESHY, A. M. M. I.; DINCER, I. A comparative review on clean hydrogen production from wastewaters. **Journal of Environmental Management**, Academic Press, 15 jan. 2021.

AYOMPE, L. M.; NKONGHO, R. N.; ACOBTA, A. N.; TAMBASI, E. E.; MASSO, C.; EGOH, B. N. Review of conceptual frameworks for smallholder farmers to achieve

sustainable palm oil production. **Journal of Cleaner Production**. Elsevier Ltd, , 15 maio 2025.

BAKKALOGLU, S.; HAWKES, A. A comparative study of biogas and biomethane with natural gas and hydrogen alternatives. **Energy and Environmental Science**, v. 17, n. 4, p. 1482–1496, 22 jan. 2024.

BALDI, F.; PECORINI, I.; IANNELLI, R. Comparison of single-stage and two-stage anaerobic co-digestion of food waste and activated sludge for hydrogen and methane production. **Renewable Energy**, v. 143, p. 1755–1765, 1 dez. 2019.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES). BNDES aprova cerca de R\$ 450 mi para planta de biometano em Paulínia (SP), parceria entre Edge e Orizon. **Agência BNDES de Notícias**, Rio de Janeiro, 18 dez. 2025. Disponível em: <https://agenciadenoticias.bndes.gov.br/socioambiental/BNDES-aprova-cerca-de-R%24-450-mi-para-planta-de-biometano-em-Paulinia-SP-parceria-entre-Edge-e-Orizon>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BARBOSA, H. R.; RODRIGUES, M. F. A.; CAMPOS, C. C.; CHAVES, M. E.; NUNES, I.; JULIANO, Y.; NOVO, N. F. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **Journal of Microbiological Methods**. [s.l: s.n.].

BARRERA-QUINTERO, V.; DAVILA-GOMEZ, J. A.; RIZO ACOSTA, P.; HERNANDEZ-ROJAS, M. E.; BAEZ-PIMIENTO, S. Gompertz Equation's First and Second Derivatives for Kinetics Analysis of Batch Dark Fermentation on Bio-Hydrogen Production. **European Journal of Engineering Research and Science**, v. 2, n. 11, p. 18, 25 nov. 2017.

BASHIR, M. A.; JI, T.; WEIDMAN, J.; SOONG, Y.; GRAY, M.; SHI, F.; WANG, P. Plastic waste gasification for low-carbon hydrogen production: a comprehensive review. **Energy Advances**. Royal Society of Chemistry, 15 jan. 2025.

BHATIA, S. K.; PATEL, A. K.; RAVINDRAN, B.; YANG, Y. H. Renewable bioenergy from palm oil mill effluent (POME): A sustainable solution for net-zero emissions in palm oil production. **Journal of Water Process Engineering**. Elsevier Ltd, 1 fev. 2025.

BRASIL. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).** Hydrogen. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/en/hydrogen>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).** Biometano. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biometano>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).** Painel dinâmico de produtores de biometano. Brasília, DF, 2022. Atualizado em 2 fev. 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/paineis-dinamicos-da-anp/paineis-e-mapa-dinamicos-de-produtores-de-combustiveis-e-derivados/painel-dinamico-de-produtores-de-biometano>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Decreto nº 11.003, de 21 de março de 2022.** Institui a Estratégia Federal de Incentivo ao Uso Sustentável de Biogás e Biometano. Brasília, DF: Presidência da República, 2022. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2022/decreto/d11003.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2022/decreto/d11003.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. Governo Federal incentiva a produção e uso sustentável do biometano. **Gov.br**, Brasília, DF, 21 mar. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/meio-ambiente-e-clima/2022/03/governo-federal-incentiva-a-producao-e-uso-sustentavel-do-biometano>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Lei nº 14.948, de 2 de agosto de 2024.** Institui o marco legal do hidrogênio de baixa emissão de carbono; dispõe sobre a Política Nacional do Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono; institui incentivos para a indústria do hidrogênio de baixa emissão de carbono; institui o Regime Especial de Incentivos para a Produção de Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono (Rehidro); cria o Programa de Desenvolvimento do Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono (PHBC); e altera as Leis nº 9.427, de 26 de dezembro de 1996, e nº 9.478, de 6 de agosto de 1997. **Brasília, DF: Presidência da República**, 2024. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2023-2026/2024/lei/14948.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/14948.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Lei nº 14.990, de 27 de setembro de 2024.** Institui o Programa de Desenvolvimento do Hidrogênio de Baixa Emissão de Carbono (PHBC) e altera a Lei nº

14.948, de 2 de agosto de 2024. **Brasília, DF: Presidência da República**, 2024.

Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2023-2026/2024/lei/114990.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/114990.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Lei nº 14.993, de 8 de outubro de 2024**. Dispõe sobre a promoção da mobilidade sustentável de baixo carbono e a captura e estocagem geológica de dióxido de carbono; institui o Programa Nacional de Combustível Sustentável de Aviação (ProBioQAV), o Programa Nacional de Diesel Verde (PNDV) e o Programa Nacional de Descarbonização do Produtor e Importador de Gás Natural e de Incentivo ao Biometano. Brasília, DF: Presidência da República, 2024. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2023-2026/2024/lei/L14993.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/L14993.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Ministério da Fazenda**. Hidrogênio de baixo carbono. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/fazenda/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/transformacao-ecologica/programas-em-destaque/hidrogenio-de-baixo-carbono>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Ministério das Cidades**. Projeto de Fomento ao Aproveitamento Energético de Biogás no Brasil – PROBIOGÁS. Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/cidades/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/saneamento/probiogas>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Ministério de Minas e Energia (MME)**. Programa Nacional do Hidrogênio (PNH2). Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/programa-nacional-do-hidrogenio-1>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Secretaria de Comunicação Social da Presidência da República**. Governo Federal aprova instalação de projeto de hidrogênio verde de R\$ 17,5 bilhões na ZPE de Pecém (CE). **Gov.br**, Brasília, DF, 10 out. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/secom/pt-br/acompanhe-a-secom/noticias/2024/10/governo-federal-aprova-instalacao-de-projeto-de-hidrogenio-verde-de-r-17-5-bilhoes-na-zpe-de-pecem-ce>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BRASIL. **Senado Federal**. Avança inclusão de biogás em incentivo a energia renovável a pequenos produtores. **Agência Senado**, Brasília, DF, 7 out. 2025. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2025/10/07/avanca-inclusao-de-biogas-em>



incentivo-a-energia-renovavel-a-pequenos-produtores. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

BUDIMAN, P. M.; WU, T. Y. Ultrasonication pre-treatment of combined effluents from palm oil, pulp and paper mills for improving photofermentative biohydrogen production. **Energy Conversion and Management**, v. 119, p. 142–150, 1 jul. 2016.

BUENO, C. DA S.; SILVEIRA, J. M. F. J. DA; MORAES, B. DE S.; FRANCO, T. T. Biogas upgrading to biomethane in Brazil: Networks, technologies, and industrial pathways. **Sustainable Futures**, v. 10, 1 dez. 2025.

CABEZA, C.; LIER, J. B. VAN; STEEN, P. VAN DER. Effects of thermal and enzymatic pre-treatments on the solubilisation of extracellular polymeric substances (EPS) and subsequent anaerobic digestion of microalgae-bacterial biomass. **Algal Research**, v. 72, 1 maio 2023.

CAPSON-TOJO, G.; RUIZ, D.; ROUEZ, M.; CREST, M.; STEYER, J. P.; BERNET, N.; DELGENÈS, J. P.; ESCUDIÉ, R. Accumulation of propionic acid during consecutive batch anaerobic digestion of commercial food waste. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 724–733, 2017.

CARDOSO, A. R. B.; ALVES, R. G. C. DE M.; SERAFIM, E. C. DA S. Produção de biogás e energia elétrica a partir do tratamento de efluente da palma de óleo por lagoas anaeróbias. **Revista de Departamento de Águas e Esgotos**, v. 72, n. 245, p. 1–15, 2024.

CAZIER, E. A.; TRABLY, E.; STEYER, J. P.; ESCUDIE, R. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 106–113, 1 ago. 2015.

CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L. An integrated anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): Start-up and steady state performance. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 485–495, mar. 2012.

CHEN, X.; NIU, Q.; LI, J.; ZHOU, Z.; WU, Y.; SONG, G.; LIU, R. Anaerobic Digestion of High-Solid Chicken Manure (CM) at Different Temperature: Intestinal Microbiome Efficiency, Inhibition, and Microbial Community Evolution. **Microorganisms**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2025.

CHEZEAU, B.; VIAL, C. Modeling and Simulation of the Biohydrogen Production Processes. *Em: Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biohydrogen, Second Edition*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 445–483.

CIBIOGÁS. **Panorama Biogás 2024**. [s.l: s.n.].

CONRAD, R. Complexity of temperature dependence in methanogenic microbial environments. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media SA, 2023.

CYPROWSKI, M.; STOBNICKA-KUPIEC, A.; ŁAWNICZEK-WAŁCZYK, A.; BAKAL-KIJEK, A.; GOŁOFIT-SZYMCZAK, M.; GÓRNY, R. L. Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 91, n. 5, p. 571–579, 1 jul. 2018.

DELAVEGA-QUINTERO, J. C.; NUÑEZ-PÉREZ, J.; LARA-FIALLOS, M.; BARBA, P.; BURBANO-GARCÍA, J. L.; ESPÍN-VALLADARES, R. Advances and Challenges in Anaerobic Digestion for Biogas Production: Policy, Technological, and Microbial Perspectives. **Processes**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 nov. 2025.

DEVENS, K. U.; RIBEIRO, A. R.; CAMARGO, F. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Two-stage versus single-stage anaerobic co-digestion on methane synthesis: Energy prospects and microbial community. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 196, 1 abr. 2025.

DINCER, I.; ACAR, C. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 34, p. 11094–11111, 18 ago. 2014.

DOMRONGPOKKAPHAN, V.; PHALAKORNKULE, C.; KHEMKHAO, M. In-situ methane enrichment of biogas from anaerobic digestion of palm oil mill effluent by addition of zero valent iron (ZVI). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 60, p. 30976–30987, 1 set. 2021.

ELSAMADONY, M.; MOSTAFA, A.; FUJII, M.; TAWFIK, A.; PANT, D. Advances towards understanding long chain fatty acids-induced inhibition and overcoming strategies for efficient anaerobic digestion process. **Water Research**, v. 190, p. 116732, 2021.

EPE. Bases para a Consolidação da Estratégia Brasileira do Hidrogênio. 2021.

FABER, M. DE O.; MEIRELES, P. L. S. DE; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Process Parameters and Energy Evaluation of Biological Hydrogen and Methane Sequentially Produced Using Residual Glycerin from Biodiesel. **Bioenergy Research**, v. 16, n. 3, p. 1758–1768, 1 set. 2023.

FAO. **Food and agriculture organization of the united nations**. Disponível em: <[www.fao.org/statistics](http://www.fao.org/statistics)>. Acesso em: 14 dez. 2025.

FASHEUN, D. O.; SILVA, A. S. A. DA; TEIXEIRA, R. S. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Dark fermentative hydrogen production from cassava starch: A comprehensive evaluation of the effects of starch extrusion and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 322–334, 2 jan. 2024.

FERDEŞ, M.; PARASCHIV, G.; IONESCU, M.; DINCĂ, M. N.; MOICEANU, G.; ZĂBAVĂ, B. ŞTEFANIA. Anaerobic Co-Digestion: A Way to Potentiate the Synergistic Effect of Multiple Substrates and Microbial Diversity. **Energies**. MDPI, , 1 mar. 2023.

FERNÁNDEZ, D. I. T.; RODRIGUEZ, C. J. C.; MACHÍN, E. B.; PEDROSO, D. T.; CARVALHO JÚNIOR, J. A. DE. Brazil's Biogas–Biomethane Production Potential: A Techno-Economic Inventory and Strategic Decarbonization Outlook. **Biomass**, v. 6, n. 1, p. 4, 7 jan. 2026.

GALIH PANGESTU, M. R.; RAZZAK, S. A.; UDDIN, S. Microbial biomass conversion for hydrogen production: A review. **Green Energy and Resources**. Elsevier B.V., , 1 set. 2025.

GAMARALALAGE, D.; SAWAI, O.; NUNOURA, T. Degradation behavior of palm oil mill effluent in Fenton oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, p. 791–799, 15 fev. 2019.

GARRITANO, A. DO N.; SÁ, L. R. V. DE; *et al.* Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolized palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 49, p. 29166–29174, 2017.

GARRITANO, A. DO N.; SÁ, L. R. V.; AGUIEIRAS, E. C. G.; FREIRE, D. M. G.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolized palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 49, p. 29166–29174, 2017.

HANS, M.; KUMAR, S. Biohythane production in two-stage anaerobic digestion system. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 17363–17380, 28 jun. 2019.

HARIRCHI, S.; WAINAINA, S.; SAR, T.; NOJOUMI, S. A.; PARCHAMI, MILAD; PARCHAMI, MOHSEN; 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**. Taylor and Francis Ltd., , 2022.

HEO, H.; NGUYEN-DINH, T.; JUNG, M. Y.; GREENING, C.; YOON, S. Hydrogen-dependent dissimilatory nitrate reduction to ammonium enables growth of *Campylobacterota* isolates. **ISME Journal**, v. 19, n. 1, 1 jan. 2025.

HO, Q. N.; LAU, W. J.; JAAFAR, J.; OTHMAN, M. H. D.; YOSHIDA, N. Membrane Technology for Valuable Resource Recovery from Palm Oil Mill Effluent (POME): A Review. **Membranes**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 maio 2025.

HOSSEINZADEH, A.; ZHOU, J. L.; ALTAEE, A.; LI, D. Machine learning modeling and analysis of biohydrogen production from wastewater by dark fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 343, 1 jan. 2022.

HU, J.; ZUO, Y.; GUO, B.; SHI, H. Enhanced hydrogen production from sludge anaerobic fermentation by combined freezing and calcium hypochlorite pretreatment. **Science of the Total Environment**, v. 858, 1 fev. 2023.

HU, Y.; ZHOU, Z.; SHEN, C. Microbial community acclimation during anaerobic digestion of high-oil food waste. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

IMAM, S. S.; SANI, S.; MUJAHID, M.; ADNAN, R. Valuable resources recovery from palm oil mill effluent (POME): A short review on sustainable wealth reclamation. **Waste Management Bulletin**. Elsevier B.V., 1 abr. 2025.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, I. **Global Hydrogen Review 2023**. [s.l.: s.n.].

Disponível em: <www.iea.org>. Acesso em: 28 de janeiro de 2026.

ISLAM, M. A.; YOUSUF, A.; KARIM, A.; PIROZZI, D.; KHAN, M. R.; WAHID, Z. A. Bioremediation of palm oil mill effluent and lipid production by *Lipomyces starkeyi*: A combined approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1779–1787, 20 jan. 2018.

JALIL, A.; KHAN, S.; NDAYISENGA, F.; WANG, X.; AHMADI, H.; YU, Z. Impact of chloramphenicol and preheat treatment of activated sludge on biohydrogen production from food waste. **Bioresource Technology**, v. 437, 1 dez. 2025.

JAME, R.; ALAYSUY, O.; OMER, N.; MOFADI ALATAWI, N.; HASSAN ELSAIM, M. Production of Bio-methane Gas as Renewable Energy Source - A Review. **Journal of Energy, Environmental & Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 124, 2021.

JANESCH, E.; PEREIRA, J.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Phase Separation in Anaerobic Digestion: A Potential for Easier Process Combination? **Frontiers in Chemical Engineering**. Frontiers Media SA, 2021.

KADIER, A. *et al.* Performance optimization of microbial electrolysis cell (MEC) for palm oil mill effluent (POME) wastewater treatment and sustainable Bio-H<sub>2</sub> production using response surface methodology (RSM). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 34, p. 15464–15479, 22 abr. 2022.

KAN, K. W.; CHAN, Y. J.; TIONG, T. J.; LIM, J. W. Maximizing biogas yield from palm oil mill effluent (POME) through advances simulation and optimisation techniques on an industrial scale. **Chemical Engineering Science**, n. 285, 2024.

KARADAG, D.; PUHAKKA, J. A. Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 16, p. 8554–8560, ago. 2010.

KEUCKEN, A.; HABAGIL, M.; BATSTONE, D.; JEPPSSON, U.; ARNELL, M. Anaerobic co-digestion of sludge and organic food waste-performance, inhibition, and impact on the microbial community. **Energies**, v. 11, n. 9, 1 set. 2018.

KHAFIPOUR, A.; JORDAAN, E. M.; FLORES-OROZCO, D.; KHAFIPOUR, E.; LEVIN, D. B.; SPARLING, R.; CICEK, N. Response of Microbial Community to Induced

Failure of Anaerobic Digesters Through Overloading With Propionic Acid Followed by Process Recovery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 11 dez. 2020.

KIM, M.; RHEE, C.; WELLS, M.; SHIN, J.; LEE, J.; SHIN, S. G. Key players in syntrophic propionate oxidation revealed by metagenome-assembled genomes from anaerobic digesters bioaugmented with propionic acid enriched microbial consortia. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 17 nov. 2022.

KING, W. G.; DJUN, L. M.; AFFAM, A. C.; CHUNG, W. C.; SWEE, I. W. C.; ADEBAYO, J. O. Application of hybrid ultrasonic cavitation/adsorption and coagulation for treatment of palm oil mill effluent. AIP Conference Proceedings. **Anais...American Institute of Physics Inc.**, 23 jul. 2019

LI, H.; WANG, Y. The effect of propionic acid accumulation on methane production in dry mesophilic anaerobic fermentation. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...IOP Publishing Ltd**, 4 mar. 2021

LI, W. *et al.* A review of high-solid anaerobic digestion (HSAD): From transport phenomena to process design. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 jul. 2023.

LING, C. M. **BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM PALM OIL MILL EFFLUENT BY LOCALLY ISOLATED CLOSTRIDIUM BUTYRICUM EB6**. [s.l.] UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA, 2009.

LITTI, Y. V.; KOVALEV, D. A.; KOVALEV, A. A.; MERKEL, A. Y.; VISHNYAKOVA, A. V.; RUSSKOVA, Y. I.; NOZHEVNIKOVA, A. N. Auto-selection of microorganisms of sewage sludge used as an inoculum for fermentative hydrogen production from different substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 58, p. 29834–29845, 23 ago. 2021.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 959–964, fev. 2010.

MAAROFF, R. M.; MD JAHIM, J.; AZAHAR, A. M.; ABDUL, P. M.; MASDAR, M. S.; NORDIN, D.; ABD NASIR, M. A. Biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) by two stage anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) system for better

utilization of carbon sources in POME. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 3395–3406, 4 fev. 2019.

MAHMOD, S. S.; ARISHT, S. N.; JAHIM, J. M.; TAKRIFF, M. S.; TAN, J. P.; LUTHFI, A. A. I.; ABDUL, P. M. Enhancement of biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME): A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 96, p. 40637–40655, 12 dez. 2022.

MAHMOD, S. S.; AZAHAR, A. M.; LUTHFI, A. A. I.; ABDUL, P. M.; MASTAR, M. S.; ANUAR, N.; TAKRIFF, M. S.; JAHIM, J. M. D. Potential Utilisation of Dark-Fermented Palm Oil Mill Effluent in Continuous Production of Biomethane by Self-Granulated Mixed Culture. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

MARZOUK, O. A. 2030 Ambitions for Hydrogen, Clean Hydrogen, and Green Hydrogen. **Engineering Proceedings**, v. 56, n. 1, 2023.

MBA, O. I.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry - A review. **Food Bioscience**, v. 10, p. 26–41, 2015.

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**, MDPI AG, 11 out. 2018.

MEHI GASPARI AUGUSTO, I.; ZAMPOL LAZARO, C.; ALBANEZ, R.; MARIA RATUSZNEI, S.; LOVATO, G.; DOMINGUES RODRIGUES, J. A. H<sub>2</sub> production via dark fermentation of soybean molasses: Elucidating the role of homoacetogenesis and endogenous substrate microorganisms by kinetic and microbial analysis. **Energy**, v. 298, 1 jul. 2024.

MENEZES, C. A. DE; DUARTE, M. S.; TEIXEIRA, I. N.; CAVALCANTE, W. DE A.; ALMEIDA, P. DE S.; VIANA, M. B.; ZAIAT, M.; LEITÃO, R. C. Using fruit and vegetable waste to generate hydrogen through dark fermentation. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 29, 2024.

MENZEL, T.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. **Energies**, MDPI AG, 23 out. 2020.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **BRAZIL, WORLD LEADER IN ENERGY TRANSITION**. Brasília: [s.n.].

MISHRA, P. **BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM PALM OIL MILL EFFLUENT VIA SEQUENTIAL DARK-PHOTO FERMENTATION**. [s.l.] UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA, 2018.

MOHAMMAD, S.; BAIDURAH, S.; KOBAYASHI, T.; ISMAIL, N.; LEH, C. P. Palm oil mill effluent treatment processes—A review. *Processes* MDPI AG, 2021.

MOHAMMADI, P.; IBRAHIM, S.; MOHAMAD ANNUAR, M. S.; LAW, S. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 14, p. 1654–1658, 2011.

MOHD YUSOF, M. A. BIN; CHAN, Y. J.; CHONG, C. H. Comparative analysis in the performances of four in-ground lagoon anaerobic digesters treating palm oil mill effluent (POME). **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 6, 1 nov. 2023.

MOKHTARANI, B.; ZANGANEH, J.; MOGHTADERI, B. A Review on Biohydrogen Production Through Dark Fermentation, Process Parameters and Simulation. **Energies** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 mar. 2025.

NÁTHIA-NEVES, G.; BERNI, M.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; FORSTER-CARNEIRO, T. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Center for Environmental and Energy Research and Studies, 1 set. 2018.

NESTERENKO, N.; MEDEIROS-COSTA, I. C.; CLATWORTHY, E. B.; CRUCHADE, H.; KONNOV, S. V.; DATH, J. P.; GILSON, J. P.; MINTOVA, S. Methane-to-chemicals: A pathway to decarbonization. **National Science Review**, Oxford University Press, 1 set. 2023.

ONG, E. S.; RABBANI, A. H.; HABASHY, M. M.; ABDELDAYEM, O. M.; AL-SAKKARI, E. G.; RENE, E. R. Palm oil industrial wastes as a promising feedstock for biohydrogen production: A comprehensive review. **Environmental Pollution**, v. 291, n. December 2020, p. 118160, 2021.



PACHAPUR, V. L.; KUTTY, P.; PACHAPUR, P.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. LE; GALVEZ-CLOUTIER, R.; BUELNA, G. Seed pretreatment for increased hydrogen production using mixed-culture systems with advantages over pure-culture systems. **Energies**MDPI AG, 7 fev. 2019.

PAN, X.; ZHAO, L.; LI, C.; ANGELIDAKI, I.; LV, N.; NING, J.; CAI, G.; ZHU, G. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. **Water Research**, v. 190, 15 fev. 2021.

PAULO, L. M.; STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**. Springer Netherlands, 1 dez. 2015.

PECES, M.; ASTALS, S.; JENSEN, P. D.; CLARKE, W. P. Deterministic mechanisms define the long-term anaerobic digestion microbiome and its functionality regardless of the initial microbial community. **Water Research**, v. 141, p. 366–376, 15 set. 2018.

PENG, X.; ZHANG, S. Y.; LI, L.; ZHAO, X.; MA, Y.; SHI, D. Long-term high-solids anaerobic digestion of food waste: Effects of ammonia on process performance and microbial community. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 148–158, 1 ago. 2018.

PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**. Anais...10 maio 2013

POH, P. E.; YONG, W. J.; CHONG, M. F. Palm oil mill effluent (POME) characteristic in high crop season and the applicability of high-rate anaerobic bioreactors for the treatment of pome. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 22, p. 11732–11740, 17 nov. 2010.

POPOVIĆ, M. E.; PEI, D.; MIHAILOVIĆ, M. Le Chatelier's principle and metabolism: biothermodynamic analysis of the metabolic pathway for synthesis of glucagon. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 91, n. 0, p. 1–18, 2026.

PORTAL ENERGIA E BIOGÁS. **Biometano**. Disponível em: <https://biogaseenergia.com.br/biometano>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2026.

PRASERTSAN, P.; KHANGKHACHIT, W.; DUANGSUWAN, W.; MAMIMIN, C.; O-THONG, S. Direct hydrolysis of palm oil mill effluent by xylanase enzyme to enhance biogas production using two-steps thermophilic fermentation under non-sterile condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27759–27766, 2017.

QIAN, S.; CHEN, L.; XU, S.; ZENG, C.; LIAN, X.; XIA, Z.; ZOU, J. Research on Methane-Rich Biogas Production Technology by Anaerobic Digestion Under Carbon Neutrality: A Review. **Sustainability (Switzerland)** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 fev. 2025.

RAHMAN, M. S.; HOQUE, M. N.; PUSPO, J. A.; ISLAM, M. R.; DAS, N.; SIDDIQUE, M. A.; HOSSAIN, M. A.; SULTANA, M. Microbiome signature and diversity regulates the level of energy production under anaerobic condition. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

RAMÓN VANEGAS, A. A.; VÁSQUEZ, J.; MOLINA, F.; PEÑUELA VÁSQUEZ, M. Evaluation of anaerobic digestion of palm oil mill effluent (POME) using different sludges as inoculum. **Water Resources and Industry**, v. 31, 1 jun. 2024.

RICHARD, E. N.; HILONGA, A.; MACHUNDA, R. L.; NJAU, K. N. A review on strategies to optimize metabolic stages of anaerobic digestion of municipal solid wastes towards enhanced resources recovery. **Sustainable Environment Research** BioMed Central Ltd, , 2019.

ROSA, D.; MEDEIROS, A. B. P.; MARTINEZ-BURGOS, W. J.; NASCIMENTO, J. R. DO; CARVALHO, J. C. DE; SYDNEY, E. B.; SOCCOL, C. R. Biological hydrogen production from palm oil mill effluent (POME) by anaerobic consortia and *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Biotechnology**, v. 323, p. 17–23, 10 nov. 2020.

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

SANI, K.; KONGJAN, P.; PAKHATHIRATHIEN, C.; CHEIRSILP, B.; O-THONG, S.; RAKETH, M.; KANA, R.; JARIYABOON, R. Effectiveness of using two-stage anaerobic digestion to recover bio-energy from high strength palm oil mill effluents with simultaneous treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 39, 1 fev. 2021.

SANTOS, I. DE O.; COSTA, G. H. G.; FERREIRA, O. E. BIOGÁS: UMA REVISÃO SOBRE AS VANTAGENS DE SEU APROVEITAMENTO ENERGÉTICO. n. 1, p. 27–35, 2023.

SANTOS, L. DE O. L.; PIRES, M. S. G.; OKADA, D. Y. REVISTA AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica. GERAÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS DA DIETA DE CULTIVO DE INSETOS BIOGAS GENERATION FROM ANAEROBIC DIGESTION OF RESIDUES FROM THE INSECT CULTIVATION DIET. v. 17, n. 2, p. 473–484, 2024.

SARWANI, M. K. I.; FAWZI, M.; OSMAN, S. A.; NASRIN, A. B. Bio-Methane from Palm Oil Mill Effluent (POME): Transportation Fuel Potential in Malaysia. **Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences Journal homepage**, v. 63, p. 1–11, 2019.

SCHINK, B. Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-27009>>.

SCHINK, B.; STAMS, A. J. M. **The Prokaryotes**. Heidelberg: Springer, 2013.

SEENGENYOUNG, J. Biohydrogen Production from Palm Oil Mill Effluent Pretreated by Chemical Methods Using Thermoanaerobacterium-Rich Sludge. **Iranica Journal of Energy and Environment**, v. 4, n. 4, dez. 2013.

SHI, X.; YASUDA, S.; WANG, Z.; HU, Y.; WU, G.; LENS, P.; ZHAN, X. Microbial transitions and degradation pathways driven by butyrate concentration in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion under low hydrogen partial pressure. **Bioresource Technology**, v. 419, 1 mar. 2025.

SILVA-MARTÍNEZ, R. D.; AGUILAR-JUÁREZ, O.; DÍAZ-JIMÉNEZ, L.; VALDEZ-GUZMÁN, B. E.; ARANDA-JARAMILLO, B.; CARLOS-HERNÁNDEZ, S. Biological Hydrogen Production Through Dark Fermentation with High-Solids Content: An Alternative to Enhance Organic Residues Degradation in Co-Digestion with Sewage Sludge. **Fermentation**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2025.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; NREL, D. C. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. August, 2012.

SOARES, V. L.; FABER, M. DE O.; MONTEIRO, A. F.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Potential use of sisal juice as raw material for sequential biological production of hydrogen and methane. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 41, n. 1, p. 97–108, 1 mar. 2024.

SOO, P. L.; WONG, L. P.; BASHIR, M. J. K. Anaerobic digestion of palm oil mill effluent (POME) and impact of incorporation with palm oil fuel ash (POFA). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...Institute of Physics**, 2023

SOUSA, A. L.; RIZZATTO, M. L. Produção de biogás a partir de resíduos orgânicos: uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 2, 31 jan. 2022.

SUKSONG, W.; TUKANGHAN, W.; PROMNUAN, K.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A.; INSAM, H.; O-THONG, S. Biogas production from palm oil mill effluent and empty fruit bunches by coupled liquid and solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 296, 1 jan. 2020.

TERLOUW, T.; ROSA, L.; BAUER, C.; MCKENNA, R. Future hydrogen economies imply environmental trade-offs and a supply-demand mismatch. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 1 dez. 2024.

TONELLI, D.; ROSA, L.; GABRIELLI, P.; CALDEIRA, K.; PARENTE, A.; CONTINO, F. Global land and water limits to electrolytic hydrogen production using wind and solar resources. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.

TRIPATHI, G.; DHAR, A. Performance, emissions, and combustion characteristics of methane-diesel dual-fuel engines: A review. **Frontiers in Thermal Engineering**, v. 2, 12 set. 2022.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. dez. 2013.

VERGARA, D.; FERNÁNDEZ-ARIAS, P.; LAMPROPOULOS, G.; ANTÓN-SANCHO, Á. Hydrogen Revolution in Europe: Bibliometric Review of Industrial Hydrogen Applications for a Sustainable Future. **Energies**, v. 17, n. 15, 1 ago. 2024.

WADCHASIT, P.; SUKSONG, W.; O-THONG, S.; NUTHITIKUL, K. Development of a novel reactor for simultaneous production of biogas from oil-palm empty fruit bunches (EFB) and palm oil mill effluents (POME). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 3, 1 jun. 2021.

WALLINGTON, T. J.; WOODY, M.; LEWIS, G. M.; KEOLEIAN, G. A.; ADLER, E. J.; MARTINS, J. R. R. A.; COLLETTE, M. D. Hydrogen as a sustainable transportation fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Elsevier Ltd, 1 jul. 2025.

WANG, C.; KUZYAKOV, Y. Mechanisms and implications of bacterial-fungal competition for soil resources. **ISME Journal**. Oxford University Press, 1 jan. 2024.

WANG, J.; YIN, Y. Clostridium species for fermentative hydrogen production: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**. Elsevier Ltd, 11 out. 2021.

WANG, S.; MA, F.; MA, W.; WANG, P.; ZHAO, G.; LU, X. Influence of temperature on biogas production efficiency and microbial community in a two-phase anaerobic digestion system. **Water (Switzerland)**, v. 11, n. 1, 12 jan. 2019.

WANG, T. *et al.* Comparison of Thermophilic–Mesophilic and Mesophilic–Thermophilic Two-Phase High-Solid Sludge Anaerobic Digestion at Different Inoculation Proportions: Digestion Performance and Microbial Diversity. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, 1 out. 2023.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Elsevier Ltd, 2014.

WOON, J. M. *et al.* Epitomizing biohydrogen production from microbes: Critical challenges vs opportunities. **Environmental Research**. Academic Press Inc., 15 jun. 2023.

WORARUTHAI, T.; SUPAWATKORN, C.; UTHAIPAI SANWONG, P.; KUSONMANO, K.; WONGSURAWAT, T.; JENJAROENPUN, P.; CHAIYEN, P.; WONGNATE, T. Isolation and characterization of *Enterococcus faecalis* isolate VT-H1: A

highly efficient hydrogen-producing bacterium from palm oil mill effluent (POME).

**International Journal of Hydrogen Energy**, v. 49, p. 295–309, 2 jan. 2024.

WU, H.; LI, A.; ZHANG, H.; LI, S.; YANG, C.; LV, H.; YAO, Y. Microbial mechanisms for higher hydrogen production in anaerobic digestion at constant temperature versus gradient heating. **Microbiome**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2024.

WU, M.; LIU, X.; PAMELA ENGELBERTS, J.; TYSON, G. W.; MCILROY, S. J.; GUO, J. Anaerobic oxidation of ammonium and short-chain gaseous alkanes coupled to nitrate reduction by a bacterial consortium. **ISME Journal**, v. 18, n. 1, 1 jan. 2024.

WU, T. Y.; MOHAMMAD, A. W.; JAHIM, J. M.; ANUAR, N. **Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end-of-pipe processes** *Journal of Environmental Management* Academic Press, 2010.

XI, Y.; LIU, Y.; YE, X.; DU, J.; KONG, X.; GUO, D.; XIAO, Q. Enhanced Anaerobic Biogas Production From Wheat Straw by Herbal-Extraction Process Residues Supplementation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 6 maio 2021.

XU, Y.; MENG, X.; SONG, Y.; LV, X.; SUN, Y. Effects of different concentrations of butyrate on microbial community construction and metabolic pathways in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 377, 1 jun. 2023.

YU, M.; WANG, S.; ZHONG, Y.; YUAN, L.; AN, L.; FENG, D.; LIU, Z.; MA, S. A new selective culture medium for isolation of Burkholderia cepacia complex in pharmaceutical industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025.

YU, Z.; MANDI, L. Study on the interchangeability between low calorific value coalbed methane blended with hydrogen, dimethyl ether and natural gas. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...** IOP Publishing Ltd, 15 jun. 2021

YUSAF, T.; LAIMON, M.; ALREFAE, W.; KADIRGAMA, K.; DHAHAD, H. A.; RAMASAMY, D.; KAMARULZAMAN, M. K.; YOUSIF, B. Hydrogen Energy Demand Growth Prediction and Assessment (2021–2050) Using a System Thinking and System Dynamics Approach. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 2, 1 jan. 2022.

YUSNITATI *et al.* Biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) in Indonesia: Potential, challenges, and prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2024.

ZAINAL, B. S.; AHMAD, M. A.; DANAEE, M.; JAMADON, N.; MOHD, N. S.; IBRAHIM, S. Integrated system technology of pome treatment for biohydrogen and biomethane production in Malaysia. **Applied Sciences (Switzerland)**MDPI AG, , 1 fev. 2020.

ZAINAL, B. S.; GUNASEGARAN, K.; TAN, G. Y. A.; DANAEE, M.; MOHD, N. S.; IBRAHIM, S.; CHYUAN, O. H.; NGHIEM, L. D.; MAHLIA, T. M. I. Effect of temperature and hydraulic retention time on hydrogen production from palm oil mill effluent (POME) in an integrated up-flow anaerobic sludge fixed-film (UASFF) bioreactor. **Environmental Technology and Innovation**, v. 28, 1 nov. 2022.

ZAINAL, B. S.; ZINATIZADEH, A. A.; CHYUAN, O. H.; MOHD, N. S.; IBRAHIM, S. Effects of process, operational and environmental variables on biohydrogen production using palm oil mill effluent (POME). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 23, p. 10637–10644, 2018a.

\_\_\_\_. Effects of process, operational and environmental variables on biohydrogen production using palm oil mill effluent (POME). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 23, p. 10637–10644, 7 jun. 2018b.

ZAMRI, M. F. M. A.; HASMADY, S.; AKHIAR, A.; IDERIS, F.; SHAMSUDDIN, A. H.; MOFIJUR, M.; FATTAH, I. M. R.; MAHLIA, T. M. I. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Elsevier Ltd, 1 mar. 2021.

ZHANG, H.; YUAN, W.; DONG, Q.; WU, D.; YANG, P.; PENG, Y.; LI, L.; PENG, X. Integrated multi-omics analyses reveal the key microbial phylotypes affecting anaerobic digestion performance under ammonia stress. **Water Research**, v. 213, 15 abr. 2022.

ZHANG, Y.; LI, C.; YUAN, Z.; WANG, R.; ANGELIDAKI, I.; ZHU, G. **Syntrophy mechanism, microbial population, and process optimization for volatile fatty acids metabolism in anaerobic digestion**. **Chemical Engineering Journal**. Elsevier B.V., 15 jan. 2023.

ZHAO, Z. T.; DING, J.; WANG, B. Y.; BAO, M. Y.; LIU, B. F.; PANG, J. W.; REN, N. Q.; YANG, S. S. Advances in the biomass valorization in dark fermentation systems: A sustainable approach for biohydrogen production. **Chemical Engineering Journal**. Elsevier B.V., 1 fev. 2024.

ZHENG, X.; LI, R. Critical Review on Two-Stage Anaerobic Digestion with H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> Production from Various Wastes. **Water (Switzerland)**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 jun. 2024.