



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
IFCE *CAMPUS* FORTALEZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

VALQUÍRIA DOS SANTOS LIMA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DO BAGAÇO DE AGAVE SISALANA
VIA PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGOS E FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA

FORTALEZA

2025

VALQUÍRIA DOS SANTOS LIMA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DO BAGAÇO DE *AGAVE SISALANA* VIA
PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGOS E FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – Campus Fortaleza, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental. Área de concentração: Engenharias I.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Freire Andrade.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L732p Lima, Valquiria dos Santos.
 Produção de biohidrogênio a partir do bagaço de agave sisalana via pré-tratamento biológico com fungos e fermentação anaeróbia / Valquiria dos Santos Lima. - 2025.
 88 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, Campus Fortaleza, 2025.
 Orientação: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva.
 Coorientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Freire Andrade.
1. Bagaço de Agave sisalana. 2. Hidrólise fúngica. 3. Açúcares redutores. 4. Fermentação. 5. Biohidrogênio. I. Título.

CDD 628



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
Av. 13 de maio, 2081 - Bairro Benfica - CEP 60040-531 - Fortaleza - CE - www.ifce.edu.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Processo: 23256.017435/2025-53

Interessado: Professores do Curso de Mestrado em Gestão e Tecnologia Ambiental - Campus Fortaleza

VALQUÍRIA DOS SANTOS LIMA

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DO BAGAÇO DE *AGAVE SISALANA* VIA PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGOS E FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) *Campus* de Fortaleza, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em: **23/12/2025**.

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Glória Maria Marinho Silva (orientadora)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Profa. Dra. Alana Gandra Lima de Moura

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Renata Barros Silveira Brasil

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)



Documento assinado eletronicamente por **Alana Gandra Lima de Moura, Usuário Externo**, em 15/01/2026, às 11:18, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gloria Maria Marinho Silva, Coordenador(a) do PGTGA**, em 22/01/2026, às 18:38, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Barros Silveira Brasil, Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 23/01/2026, às 09:39, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade do documento pode ser conferida no site https://sei.ifce.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **8310026** e o código CRC **8D1BEC21**.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi construída em meio a intensas transformações, dores, mudanças inesperadas e desafios que exigiram de mim muito mais do que conhecimento acadêmico. Em vários momentos, precisei reunir forças, recomeçar, me adaptar e apenas seguir, apesar das incertezas. Passei pelo fogo e das cinzas me nutri. Cada dificuldade enfrentada se tornou combustível para continuar e cada passo dado reforçou minha capacidade de persistir. Por isso, este trabalho é, ao mesmo tempo, resultado científico e testemunho da minha própria resiliência. Entre as coisas velhas e novas, as que foram e as que ficaram, este trabalho surge como um marco de reconstrução, um registro vivo de que, mesmo quando tudo muda, ainda é possível florescer.

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e a presença de pessoas especiais que contribuíram para a realização desse sonho.

Aos meus pais, Maria Augusta e Pedro Alberto, meu amor e gratidão imensos. Minha mãe, com suas orações incessantes, sempre me fortaleceu e me incentivou a prosseguir. Meu pai, com seu jeitinho especial de ser (risos), sempre acreditou no meu potencial. À minha irmã Vanessa Lima, minha eterna companheira, obrigada por estar sempre ao meu lado e compartilhar comigo cada momento dessa jornada.

Nesse processo, agradeço aos amigos que tenho e que são presença, abrigo e afeto nos dias bons e nos dias difíceis. Álvaro Bernardo, Fernanda Santos e Vinícius Oliveira, obrigada por existirem na minha vida. Amo vocês! Vocês são aqueles amigos que me escutam sem que eu precise dizer nada: compreendem meus silêncios, acolhem minhas inquietações, torcem por mim e celebram minhas alegrias. Hoje a distância geográfica nos separa, mas a amizade continua nos mantendo perto, como sempre foi.

Aos meus colegas da Secretaria de Meio Ambiente e Controle Urbano de Itaitinga – SEMAM, meu sincero agradecimento por todo o apoio e incentivo. Em especial, ao secretário Arilo Veras, que sempre me deu o suporte necessário para que eu pudesse seguir cursar o mestrado.

Gostaria de registrar minha gratidão aos colegas do Ministério da Gestão e da Inovação em Serviços Públicos (MGI/SPU), que contribuíram para tornar minha rotina em Brasília mais leve e acolhedora, especialmente quando pousei na cidade sem conhecer ninguém. A convivência com vocês, Erick Perassoli, Marjorie Rodrigues e Marcos Vinícius, trouxe leveza, bom humor e um sentimento de pertencimento que fizeram toda diferença no meu dia a dia. Agradeço também à minha grande amiga Aline Nascimento, que teve um papel importante em tornar minha nova vida no “quadrado” que é Brasília mais agradável e divertida. A presença de cada um de vocês tornou esse caminho mais humano e prazeroso.

À Karla Oliveira e Bruna Moraes, minha profunda gratidão. A amizade de vocês me devolveu à vida nos dias em que eu mesma não sabia como voltar. Somos porto uma das outras e juntas somos mais fortes! Nesse nosso trio encontrei amparo e força, por isso desejo que a vida nos mantenha sempre assim: acolhendo, resgatando e iluminando umas às outras.

Agradeço também ao Wallason Farias pelo apoio que me ofereceu no período em que caminhamos juntos. Sua contribuição foi importante naquele momento e guardo apenas os bons sentimentos e o respeito pela história que compartilhamos.

Um agradecimento especial à minha orientadora, professora Glória Maria Marinho Silva, cuja paciência, dedicação e compreensão foram fundamentais para que eu conseguisse conciliar minha rotina de trabalho com as exigências do mestrado. Sua orientação foi essencial para que este trabalho fosse concluído com êxito. Estendo também minha gratidão ao professor Marcus Vinícius Freire Andrade, por todas as contribuições valiosas ao longo desta trajetória, sempre acrescentando novas perspectivas, sugestões e conhecimentos que com certeza enriqueceram este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental – PGTGA, minha sincera gratidão pelo conhecimento compartilhado! Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Ambiental – LATAM, em especial ao José Mateus de Moraes, Rhaina Thalia e à Victória Bermúdez, obrigada pelo companheirismo, suporte e pela troca de experiências enriquecedoras. À professora Kelly Rodrigues, que conduz o laboratório com maestria e zelo, tornando o ambiente de pesquisa ainda mais produtivo e acolhedor, minha profunda admiração e agradecimento.

Aos colegas de mestrado, por cada conversa, troca de conhecimento e incentivo mútuo, meu muito obrigado. Cada um de vocês tornou essa caminhada mais leve! Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Sou imensamente grata por todo apoio, incentivo e carinho recebidos ao longo dessa jornada.

RESUMO

A crescente crise energética global, a pressão pela redução das emissões de gases de efeito estufa e a necessidade de manejo adequado dos resíduos sólidos, tornaram urgente a busca por soluções sustentáveis que aliem geração de energia limpa e reaproveitamento de resíduos. Nesse cenário, o uso de resíduos agrícolas para produção de biocombustíveis surge como alternativa promissora, tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. O bagaço de *Agave sisalana*, resíduo abundante na região Nordeste do Brasil, apresenta grande potencial para ser transformado em bioenergia, desde que previamente tratado para melhorar sua bioconversão. Este trabalho investigou o uso do fungo *Trametes spp.* para melhoria da digestibilidade do bagaço de *A. sisalana*, com o objetivo de viabilizar sua aplicação na produção de biohidrogênio. Inicialmente foram conduzidos ensaios para o pré-tratamento do bagaço em reatores biológicos operados em batelada fungo *Trametes spp.*, com duração de até 30 dias, investigando-se os tempos de 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h (1º dia), 2º dia, 3º dia, 4º dia, 5º dia, 10º dia, 15º dia, 20º dia, 25º dia e 30º dia, avaliando-se a produção de açúcares redutores e enzimas. Os resultados indicaram produção média de $327,31 \pm 20,32$ mg/L de açúcares redutores, com pico no 3º dia ($364,05 \pm 23,69$ mg/L de AR), demonstrando boa capacidade do fungo *Trametes spp.* na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis. A atividade enzimática também foi monitorada, observando-se que a lignina peroxidase (LiP) foi a enzima que mais se destacou, apresentando atividade média de $85,81 \pm 11,21$ U/L, confirmando seu papel na quebra da lignina. O hidrolisado obtido nesta etapa inicial de pré-tratamento foi posteriormente empregado em reatores anaeróbios para a investigação da produção de biohidrogênio. Foram realizados experimentos por até 7 dias utilizando dois hidrolisados distintos: um produzido após 1 dia de pré-tratamento com *Trametes spp.*, contendo $364,05 \pm 23,69$ mg/L de açúcares redutores (Reator A), e outro obtido após 3 dias de tratamento com o mesmo fungo, contendo $338,12 \pm 20,38$ mg/L de AR (Reator B). Observou-se que a maior produção de H_2 em ambos os reatores ocorreu no 2º dia, o que nos leva a acreditar que esse momento possivelmente corresponde à fase log do crescimento microbiano. Nos experimentos do Reator tipo A foram obtidos $380,68 \mu\text{L}$ de H_2 no 2º dia de operação, enquanto os experimentos do Reator tipo B apresentaram produção de $423,77 \mu\text{L}$ de H_2 no mesmo período. De forma geral, os reatores apresentaram bom desempenho e os objetivos da pesquisa foram atendidos.

Palavras-chave: Bagaço de *Agave sisalana*. Hidrólise fúngica. Açúcares redutores. Fermentação. Biohidrogênio.

ABSTRACT

The growing global energy crisis, the pressure to reduce greenhouse gas emissions, and the need for proper management of solid waste have made the search for sustainable solutions that combine clean energy generation with waste reuse increasingly urgent. In this context, the use of agricultural residues for biofuel production emerges as a promising alternative from both environmental and economic perspectives. The bagasse of *Agave sisalana*, an abundant residue in Brazil's Northeast region, shows great potential to be converted into an bioenergy, provided it is previously treated to improve its bioconversion. This study investigated the use of the fungus *Trametes spp.* to enhance the digestibility of *A. sisalana* bagasse, aiming to enable its application in biohydrogen production. Initially, assays were conducted for the biological pretreatment of the bagasse in batch-operated bioreactors inoculated with *Trametes spp.*, with durations of up to 30 days. The following time points were evaluated: 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h (1st day), 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day, 10th day, 15th day, 20th day, 25th day, and 30th day, assessing the production of reducing sugars and enzymes. The results indicated an average production of 327.31 ± 20.32 mg/L of reducing sugars, with a peak on the 3rd day (364.05 ± 23.69 mg/L of AR), demonstrating the good capacity of *Trametes spp.* to convert lignocellulosic biomass into fermentable sugars. Enzymatic activity was also monitored, and lignin peroxidase (LiP) stood out as the most prominent enzyme, presenting an average activity of 85.81 ± 11.21 U/L, confirming its role in lignin degradation. The hydrolysate obtained in this initial pretreatment step was subsequently used in anaerobic reactors to investigate biohydrogen production. Experiments were conducted for up to 7 days using two distinct hydrolysates: one produced after 1 day of pretreatment with *Trametes spp.*, containing 364.05 ± 23.69 mg/L of reducing sugars (Reactor A), and another obtained after 3 days of treatment with the same fungus, containing 338.12 ± 20.38 mg/L of AR (Reactor B). It was observed that the highest H_2 production in both reactors occurred on the 2nd day, suggesting that this period possibly corresponds to the logarithmic phase of microbial growth. In Reactor A experiments, $380.68 \mu\text{L}$ of H_2 were obtained on the 2nd day of operation, while Reactor B experiments showed a production of $423.77 \mu\text{L}$ of H_2 in the same period. Overall, the reactors exhibited good performance, and the objectives of the research were achieved.

Keywords: *Agave sisalana* bagasse. Fungal hydrolysis. Reducing sugars. Fermentation. Biohydrogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Plantação de <i>Agave sisalana</i> no município de Caririaçu – CE	17
Figura 2 — Plantação de <i>A. sisalana</i>	18
Figura 3 — Fibra de <i>A. sisalana</i>	19
Figura 4 — Artesanato com fibra de <i>A. sisalana</i>	19
Figura 5 — Bagaço de <i>A. sisalana</i>	20
Figura 6 — Representação esquemática da lignocelulose e seus componentes principais..	22
Figura 7 — Enzimas lignolíticas	25
Figura 8 — Diagrama do processo completo de digestão anaeróbia	27
Figura 9 — Localidade Sítio São Paulo no Município de Caririaçu-CE	32
Figura 10 — Bagaço de <i>Agave sisalana</i> moído	33
Figura 11 — Experimento para determinação de extrativos	35
Figura 12 — Montagem de experimento para extração de lignina insolúvel	36
Figura 13 — Experimento para determinação do teor de holocelulose	37
Figura 14 — Corte dos discos miceliais	39
Figura 15 — Montagem de reatores	39
Figura 16 — Fermentação submersa realizada em incubadora de bancada	39
Figura 17 — Esquema geral dos procedimentos para a montagem de reatores	40
Figura 18 — Frascos de penicilina de 120 mL utilizados como reatores anaeróbios para a produção de H ₂	43
Figura 19 — Pré-tratamento térmico do inóculo (lodo anaeróbio)	45
Figura 20 — Incubação dos reatores anaeróbios em <i>shaker</i>	46
Figura 21 — Amostragem do biogás produzido nos reatores para injeção em cromatógrafo gasoso	47
Figura 22 — Concentração de açúcares redutores em reatores biológicos operados com <i>Trametes spp.</i> e bagaço de <i>A. sisalana</i> em meio basal	54
Figura 23 — Atividade enzimática de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase em reatores biológicos operados com <i>Trametes spp.</i> e bagaço de <i>A. sisalana</i>	57
Figura 24 — Quantidade de biohidrogênio produzida nos reatores A e B, em µL	62
Figura 25 — Produção acumulada de H ₂ ao longo do tempo para os Reatores A e B	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Composição do meio basal (em pH 5,5) descrito em Menezes <i>et al.</i> (2009)	38
Tabela 2 — Caracterização do bagaço de <i>Agave sisalana</i>	49
Tabela 3 — Comparação da caracterização do bagaço de <i>Agave sisalana</i> realizada por autores diversos.....	51
Tabela 4 — Produção de biohidrogênio a partir de biomassas lignocelulósicas diversas.....	51
Tabela 5 — Análise de variância - açúcares redutores.....	55
Tabela 6 — Análise de variância - enzima LiP	58
Tabela 7 — Análise de variância – LAC	60

LISTA DE SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
<i>A. sisalana</i>	<i>Agave sisalana</i>
ARs	Açúcares redutores
BLC	Biomassa lignocelulósica
CAGECE	Companhia de Água e Esgoto do Ceará
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CG	Cromatografia Gasosa
COP	Conferências das Partes
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FSA	Filtro Submerso Aerado
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
LAC	Lacase
LATAM	Laboratório de Tecnologia Ambiental
LiP	Lignina peroxidase
LTPA	Laboratório de Tecnologia em Processos Ambientais
MnP	Mangânês peroxidase
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
pH	Potencial Hidrogeniônico
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TCD	Detector de Condutividade Térmica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
VP	Peroxidases versáteis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Crise energética mundial: desafios e oportunidades	14
3.2	Produção de <i>Agave sisalana</i> no Brasil e no Ceará	15
3.3	Uso de resíduos lignocelulósicos para produção de bioenergia	21
3.4	Pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica	22
3.5	Pré-tratamento para biomassa lignocelulósica utilizando fungos	23
3.6	Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios após pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Coleta e caracterização do bagaço de <i>Agave sisalana</i>	32
4.1.1	Determinação do pH	33
4.1.2	Determinação do teor de umidade	34
4.1.3	Determinação do teor de cinzas	34
4.1.4	Determinação do teor de proteínas	34
4.1.5	Determinação do teor de extrativos	35
4.1.6	Determinação do teor de lignina insolúvel	36
4.1.7	Determinação do teor de holocelulose	36
4.1.8	Determinação do teor de alfacelulose	37
4.2	Produção de hidrolisados utilizando fungos	37
4.3	Avaliação da produção de açúcares redutores em reatores biológicos	40
4.4	Avaliação da atividade enzimática	41
4.4.1	Avaliação da atividade enzimática de lacase	41
4.4.2	Avaliação da atividade enzimática de manganês peroxidase	41
4.4.3	Avaliação da atividade enzimática de lignina peroxidase	42
4.5	Reatores anaeróbios para a produção de H ₂	43
4.5.1	Coleta, caracterização e pré-tratamento do inóculo	44

4.5.1.1	<i>Preparo do inóculo para seleção de microorganismos acidogênicos ...</i>	44
4.5.2	<i>Montagem dos reatores anaeróbios para a produção de H₂</i>	45
4.5.3	<i>Avaliação da produção de H₂ reatores anaeróbios</i>	46
4.6	<i>Análise estatística</i>	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Caracterização do bagaço de <i>Agave sisalana</i>	49
5.2	Produção de açúcares redutores em reatores biológicos operados com <i>Trametes spp.</i> e bagaço de <i>A. sisalana</i>	53
5.3	Atividade enzimática em reatores biológicos operados com <i>Trametes spp.</i> e bagaço de <i>A. sisalana</i>	57
5.4	Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios	61
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A — Comparação par a par entre os tempos experimentais para açúcares redutores pelo teste de <i>Tukey</i>	83
	APÊNDICE B — Comparação par a par entre os tempos experimentais para lignina peroxidase pelo teste de <i>Tukey</i>	84
	APÊNDICE C — Comparação par a par entre os tempos experimentais para lacase pelo teste de <i>Tukey</i>	85

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil e o mundo estão enfrentando problemas relacionados à alta demanda por energia. A progressiva escassez de recursos naturais não renováveis, como o petróleo e o gás natural, tem contribuído para uma grave crise energética, impulsionada pela diminuição contínua da disponibilidade desses insumos.

Para o enfrentamento racional dessa crise energética, alternativas devem ser pensadas e desenvolvidas, de modo a reduzir a atual dependência pelos recursos naturais não renováveis enquanto fontes de energia. Nesse contexto, tem sido essencial a adoção de estratégias que priorizem a sustentabilidade e a inovação, como aquelas baseadas nas fontes de energias renováveis. São exemplos dessas fontes as energias solar, eólica, hidrelétrica, geotérmica, oceânica, de biomassa e o hidrogênio verde.

Atualmente, na literatura é possível encontrar pesquisas nas quais resíduos de culturas têm apresentado resultados promissores quanto à produção de biohidrogênio. Isso é possível porque, quando submetidos a um processo de fermentação anaeróbia, estes materiais ricos em biomassa lignocelulósica podem ser convertidos em produtos de valor agregado, como ácidos orgânicos, metano e biohidrogênio. São exemplos de resíduos lignocelulósicos já explorados quanto ao seu potencial para produção de biohidrogênio por fermentação anaeróbia o bagaço de cana-de-açúcar (Froner Junior, 2024), a palha de trigo (Jiang *et al.*, 2023), a palha de arroz (Rani *et al.*, 2024) e o caule de mandioca (Bolonhesi *et al.*, 2023).

No Estado Ceará, um importante resíduo agrícola ainda pouco aproveitado é o bagaço de *Agave sisalana*, um resíduo lignocelulósico que sobra do processo de produção da fibra de sisal (Delfin-Ruíz *et al.*, 2021). A produção da fibra de sisal a partir de *A. sisalana* nos municípios de Caririaçu e Granjeiro é bastante expressiva e atingiu a marca de aproximadamente 55 toneladas no ano de 2023 (IBGE, 2024).

Para Muthangya *et. al* (2009), a agave representa um recurso biológico subutilizado, uma vez que os resíduos gerados após seu aproveitamento muitas vezes são descartados ao invés de serem explorados de forma eficiente e sustentável sob condições anaeróbias, podendo ser aplicada, por exemplo, para a produção de biohidrogênio.

Na literatura é possível encontrar pesquisas utilizando biomassas lignocelulósicas (BLC) para a produção de biohidrogênio, contudo, estas mesmas pesquisas são unânimes ao apontar que a recalcitrância dos compostos lignocelulósicos é um fator limitante para o uso desse substrato. Para driblar esta recalcitrância, é necessário realizar um pré-tratamento capaz

de diminuir a cristalinidade da lignina, celulose e hemicelulose presentes na BLC, tornando estes compostos mais facilmente acessíveis e assimiláveis.

O pré-tratamento da BLC pode ser realizado utilizando abordagens físicas, químicas, biológicas ou uma combinação destas e cada tipo de pré-tratamento tem suas vantagens e limitações. Embora alguns pesquisadores já tenham iniciado os estudos para a produção de biohidrogênio a partir do bagaço de agave, este projeto de pesquisa inova ao propor a realização de um pré-tratamento biológico do bagaço desta planta utilizando fungos.

Assim, neste trabalho, utilizou-se processos biológicos com fungos para realizar o pré-tratamento do bagaço de *Agave sisalana*. Essa escolha deveu-se ao fato de os pré-tratamentos biológicos com fungos serem sustentáveis e de baixo custo. Para tanto, *Trametes spp.* foi aplicado em reatores biológicos em condições controladas com o objetivo de degradar a biomassa lignocelulósica produzindo-se, a partir dela, um hidrolisado rico em açúcares redutores.

Numa etapa seguinte, empregou-se esse hidrolisado rico em açúcares redutores em reatores anaeróbios visando a produção de hidrogênio por meio de processo de fermentação anaeróbia.

Desta forma, esta pesquisa objetivou demonstrar a aplicabilidade do pré-tratamento do bagaço de *A. sisalana* em reatores biológicos com fungos para degradar a lignina, a celulose e a hemicelulose presentes nele, para conversão em açúcares redutores, com potencial para produção de biohidrogênio por fermentação anaeróbia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a capacidade do fungo *Trametes spp.* de realizar o pré-tratamento biológico do bagaço de *Agave sisalana*, de modo a viabilizar a geração de açúcares redutores a serem empregados posteriormente na produção de biohidrogênio por meio de fermentação anaeróbia.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o bagaço de *A. sisalana*, especialmente acerca de suas frações de lignina, celulose e hemicelulose;
- Produzir hidrolisados utilizando o fungo de podridão branca *Trametes spp.* em reatores biológicos;
- Quantificar a atividade enzimática e a produção de açúcares redutores nos hidrolisados produzidos em reatores biológicos com *Trametes spp.* e bagaço de *A. sisalana*;
- Quantificar a produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios alimentados com hidrolisados ricos em açúcares redutores produzidos nos experimentos deste trabalho.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Crise energética mundial: desafios e oportunidades

Nas últimas décadas, o uso excessivo de combustíveis fósseis tem contribuído para o seu rápido esgotamento. Acerca deste assunto, pesquisas indicam que as reservas de gás natural podem esgotar em até 50 anos, enquanto as de carvão fóssil podem ser exauridas em cerca de 114 anos (Siddique *et al.*, 2023). Tais dados reforçam a urgência em se pensar, desenvolver e implementar o uso de fontes alternativas de energia.

É importante pontuar ainda que, além do decréscimo nas reservas de combustíveis fósseis, outro ponto deve ser observado quanto ao uso dessas fontes de energia: a consequente poluição ambiental (Siddique *et al.*, 2023). A queima de combustíveis fósseis contribui consideravelmente para o agravamento de problemas ambientais, como as mudanças climáticas, uma vez que durante a queima são liberados gases, como o dióxido de carbono e os óxidos de nitrogênio, que intensificam o efeito estufa.

De acordo com Pendse *et al.* (2023), como medida para o enfrentamento desses problemas, muitos países têm investido na pesquisa e no uso de fontes de energia alternativas e sustentáveis. Nesse sentido, Sayed *et al.* (2023) consideram ter ocorrido um rápido crescimento na produção e no uso de energias renováveis na última década. Os autores apontam como principais fontes de energia renováveis aplicadas em larga escala as fontes solar, eólica, de biomassa, oceânica e o biohidrogênio.

Pesquisas desenvolvidas por Rahman *et al.* (2024), utilizando modelos estatísticos de efeitos fixos, constataram que o uso de energias renováveis contribuiu para a ocorrência de um declínio estatisticamente significativo nas emissões de carbono, levando os autores a concluir que a qualidade ambiental de um país está diretamente relacionada ao consumo de energias renováveis nele.

Rahman *et al.* (2024) afirmam que a transição energética constitui um importante meio para alcançar qualidade de vida e a chamada sustentabilidade ambiental. Os autores defendem em sua pesquisa que a transição energética do domínio dos combustíveis fósseis para o universo das energias renováveis é um caminho necessário para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e dos objetivos das Conferências das Partes (COP).

Conforme Madurai Elavarasan *et al.* (2023), dentre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, o ODS 7 é de extrema importância para o alcance das metas climáticas, uma vez

que neste ODS busca-se universalizar o acesso de todos a uma energia acessível, confiável, sustentável e moderna.

Para Martins *et al.* (2024), o biohidrogênio está no rol das fontes renováveis e, por isso, sua aplicação e desenvolvimento possui relação direta com o ODS 7. No entanto, os autores consideram que o tema "energia" é um tema transversal e presente em todas as atividades humanas, razão pela qual Martins *et al.* (2024) acreditam que qualquer avanço no sistema energético estabelecido terá impacto em outros ODS.

No contexto do uso de energias renováveis, Siddique *et al.* (2023) elegem o uso de resíduos agrícolas como alternativa promissora para atender a crescente demanda por energia. Os autores consideram ainda que estes resíduos são fundamentais para a geração sustentável de biocombustíveis e bioprodutos, contribuindo para a transição energética e para o desenvolvimento de inovações industriais.

3.2 Produção de *Agave sisalana* no Brasil e no Ceará

A agricultura desempenha um papel essencial na sociedade. Esta atividade é a base da segurança alimentar global (Bonfim, 2024), garantindo o abastecimento de grãos, frutas, vegetais e proteínas essenciais para a alimentação humana e animal.

Para Marques (2024), o setor agrícola pode ser considerado um dos principais motores da economia, gerando empregos e movimentando indústrias associadas, como a de insumos, transporte e a agroindústria. O autor afirma ainda que nos últimos 30 anos a agricultura se tornou o principal setor da economia brasileira, apontando que seu sucesso se deveu, principalmente, à construção de uma base de pesquisa científica agrícola no Brasil.

A agricultura possui ainda uma importância ambiental, uma vez que, quando praticada de forma sustentável, pode contribuir para a mitigação das mudanças climáticas, bem como para a conservação da biodiversidade e para a conservação dos solos e das águas (Do Carmo e Shima, 2024).

Desta forma, a agricultura é uma atividade essencial para a segurança alimentar, o desenvolvimento econômico e a sustentabilidade ambiental, desempenhando também um papel fundamental na geração de empregos e na redução da pobreza (FAO, 2022). Contudo, apesar de todos os seus benefícios, sabe-se que a agricultura tem como principal impacto ambiental a geração de uma grande quantidade de resíduos orgânicos e inorgânicos, que podem impactar negativamente o meio ambiente se não forem manejados corretamente.

Apesar deste impacto ambiental importante, a produção agrícola mundial tem crescido anualmente, de forma a atender às demandas por insumos como grãos, frutas e vegetais. De acordo com as projeções feitas pelo Conselho Internacional de Grãos (IGC, 2025), estima-se que a produção global de grãos na safra 2025/26 será de 2,368 bilhões de toneladas. Esta organização intergovernamental, que supervisiona a Convenção do Comércio de Grãos, estimou ainda que produção global de milho na safra 2025/26 será de 1,269 bilhão de toneladas, enquanto a produção global de trigo nesta mesma safra será de 807 milhões de toneladas.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estima que, na safra 2025, a produção agrícola no Brasil deve atingir a marca de 322,6 milhões de toneladas, considerando a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas (IBGE, 2025). Ainda conforme IBGE (2025) as regiões com maior participação na produção agrícola do país são, na ordem: Centro-Oeste (49,4%), Sul (26,8%) Sudeste (8,8%), Nordeste (8,8%) e Norte (6,2%).

Quando realizada uma análise por unidade da federação, observa-se que os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul despontam como os maiores produtores agrícolas do Brasil. Nesta estatística, o estado do Ceará figura como 18º no ranking dos estados com maior produção agrícola, sendo responsável por apenas 0,2% de toda produção nacional de grãos (IBGE, 2025).

Apesar deste indicador aparentemente baixo, a agricultura é um dos pilares da economia do Ceará, caracterizando-se pela diversidade de culturas temporárias e permanentes, que desempenham um papel crucial no desenvolvimento econômico e social do estado.

O Ceará se destaca pelo cultivo de *Agave sisalana* e conta com 29 hectares de área destinada à colheita desta planta, nos quais se produziu 55 toneladas de fibra de sisal no ano de 2023 (IBGE, 2024).

No Brasil, a *A. sisalana* é produzida não apenas estado do Ceará, mas também é amplamente cultivada na Paraíba, no Rio Grande do Norte e na Bahia, sendo este último o maior produtor nacional da planta, contribuindo com a produção de 13.998 toneladas de fibra de sisal em 2023 (IBGE, 2024). Na Figura 1 é apresentada uma imagem aérea de uma plantação de *Agave sisalana* localizada no município de Caririáçu, no interior do estado do Ceará.

Figura 1 — Plantação de *Agave sisalana* no Município de Caririaçu – CE



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Conforme Alvarenga Jr. (2022), a estimativa é de que, no Brasil, o plantio de *A. sisalana* gere emprego e renda a aproximadamente 600 milhões de pessoas. O mesmo autor enaltece o potencial do Brasil ao apresentá-lo como o atual maior produtor e exportador de fibras e manufaturados de sisal do mundo, sendo responsável por 58% de sua produção e 70% de sua exportação.

Esta planta é originária do México, sendo muito conhecida por possuir uma fibra dura e grossa (Alvarenga Jr., 2022). No México prevalece o cultivo de *Agave tequilana*, conhecida por ser matéria prima na indústria da produção de tequila.

De acordo com Cabezas (2024), em 2022, a indústria mexicana de tequila atingiu registrou uma produção de 651 milhões de litros da bebida. No entanto, estima-se que para cada litro de tequila produzido sejam gerados cerca de 1,4 kg de bagaço de *Agave tequilana* (ALENCAR, 2023), dado que evidencia a importância e a urgência do adequado gerenciamento dos resíduos gerados pela cadeia produtiva da agave.

Tanto a *A. tequilana* quanto a *A. sisalana* possuem boa adaptabilidade nas regiões semiáridas, pois possuem grande resistência às condições de sol intenso.

Silva (2011) apresenta *A. sisalana* como uma planta xerófila, adaptada a condições de seca prolongada e altas temperaturas. O autor aponta que o desenvolvimento ideal da planta ocorre em altitudes de até 600 metros que possuam precipitação anual entre 650 mm e 1.250 mm e umidade relativa do ar variando de 66% a 79%.

As folhas de agave são rígidas, possuem formato linear lanceolado (formato de lança) e coloração cor verde escura, como apresentado na Figura 2, além de possuírem comprimento que varia entre 120 e 160 cm e largura entre 10 a 15 cm (Alvarenga Jr., 2022).

Figura 2 — Plantação de *A. sisalana*



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Considerada a maior fonte de fibras duras do mundo (Alvarenga Jr., 2022), a fibra da folha de *A. sisalana* (Figura 3) pode ser, após o beneficiamento, empregada na indústria de cordoarias artesanais para a produção de cordas, cordéis e estofamentos, entre outros. No artesanato, a *A. sisalana* tem grande importância, pois permite a confecção de bolsas, chapéus, tapetes, cestos e outros itens decorativos e utilitários (Figura 4), valorizando o trabalho manual e a cultura local.

Além de ser biodegradável e sustentável, sua produção gera renda para diversas comunidades rurais, especialmente no Nordeste brasileiro (Alvarenga Jr., 2022). Assim, o aproveitamento da fibra de sisal no artesanato promove a economia criativa e incentiva práticas ecológicas, reduzindo o uso de materiais sintéticos.

Figura 3 — Fibra de *A. sisalana*

Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Figura 4 — Artesanato com fibra de *A. sisalana*

Acervo pessoal da autora (2025)

Além das aplicações apresentadas, a fibra de *A. sisalana* também tem sido utilizada na construção civil para a produção de compósito cimentício argamassado (Espadrizano e Costa, 2025), bem como para a produção de telhas e de compósitos de gesso (Pinto *et al.*, 2022).

O processo de produção da fibra de sisal começa com o corte da folha da *A. sisalana*. Silva *et al.* (2008) afirmam que o primeiro corte das folhas pode acontecer, aproximadamente, 36 meses após a data de plantio, período em que a planta já possui porte adequado para a colheita, sendo possível cortar entre 50 e 60 folhas por planta. Conforme Silva *et al.* (2008), o corte é realizado utilizando foice ou faca bem afiada, com a qual se retira as folhas de ponto bem próximo ao tronco. Depois de cortadas, as folhas são transportadas para o local de desfibramento, etapa na qual ocorre a eliminação da polpa aderida às fibras. O desfibrilamento é realizado em equipamentos mecânicos chamados rotores raspadores, que promovem a separação do material fibroso.

O equipamento mais usado para o desfibrilamento é conhecido como motor de agave ou máquina paraibana, responsável por separar a fibra dos resíduos do processo produtivo. De acordo com Silva (2023), apenas 4% da massa total da *A. sisalana* é de fato aproveitada para a produção de fibra de sisal. O percentual restante é considerado resíduo agrícola e, na maioria das vezes, é descartado ao longo da cadeia produtiva. Dentre os resíduos do processo produtivo do sisal, é possível observar a existência de uma fração líquida e uma fração sólida.

A fração sólida, também chamada de biomassa residual verde de sisal, mucilagem de sisal ou bagaço de *A. sisalana* (Figura 5), é um material lignocelulósico com grande potencial para a conversão em produtos de valor agregado, como ácidos orgânicos, metano e biohidrogênio, dada a sua composição rica em celulose e hemicelulose (Silva, 2023). No

entanto, na prática este material é subaproveitado, prevalecendo os usos mais simples, como adubo orgânico e/ou como alimento para animais (Santos *et al.*, 2013).

Figura 5 — Bagaço de *A. sisalana*



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Pesquisadores como Mestre *et al.* (2019), Santos *et al.* (2022) e Silva (2023) dedicaram-se ao estudo do bagaço de *A. sisalana*, buscando dar a este material aplicações mais nobres que aquelas destacadas no parágrafo anterior. Nesse sentido, Mestre *et al.* (2019) demonstraram em seu trabalho que foi possível aplicar o bagaço de *A. sisalana* para a produção de carvão nanoporoso, identificando boa capacidade deste material quanto à remoção de fármacos em meio aquoso.

Além disso, Santos *et al.* (2022) patentearam método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório a partir de extrato proveniente do bagaço de *A. sisalana*, enquanto Silva (2023) dedicou seus estudos à produção de bioetanol e biocarvão a partir do aproveitamento do bagaço de agave.

Identificadas algumas poucas nobres aplicações para resíduo agrícola, percebe-se e compreende-se a necessidade de uma maior investigação deste material visando seu melhor aproveitamento, especialmente avaliando seu potencial para a produção de bioenergia.

3.3 Uso de resíduos lignocelulósicos para produção de bioenergia

Pendse *et al.* (2023) consideram que existem oportunidades inéditas no campo da bioconversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis, havendo a possibilidade de, com isto, substituir em longo prazo o uso de produtos derivados de combustíveis fósseis. Os

autores afirmam que a redução do emprego de combustíveis fósseis pode contribuir para minimizar significativamente as emissões de carbono, contribuindo diretamente para a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas.

Ao realizar busca nas principais coleções de periódicos, bibliotecas e repositórios digitais e bases de dados nacionais e internacionais foi possível localizar estudos e pesquisas que apresentam importantes avanços quanto ao uso de resíduos agrícolas para a produção de biohidrogênio. Esta produção somente é possível porque esses materiais são ricos em biomassa lignocelulósica, que pode ser convertida em compostos de valor agregado quando submetida à fermentação anaeróbia.

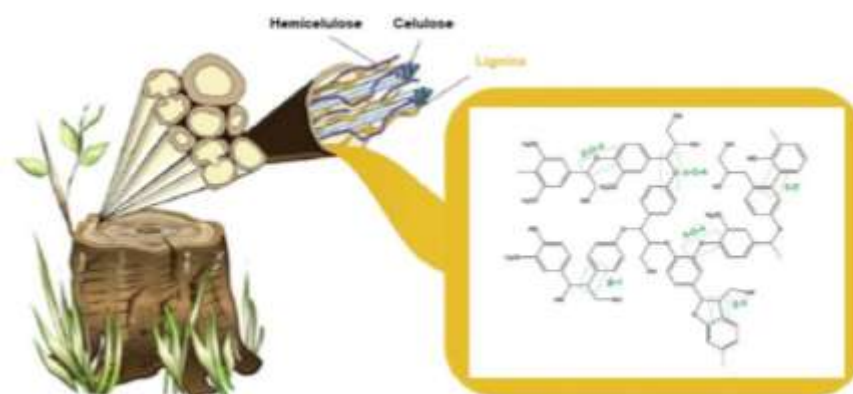
Entre os resíduos que vêm sendo investigados com esse objetivo, destacam-se o bagaço de cana-de-açúcar (Froner Junior, 2024), a palha de trigo (Jiang *et al.*, 2023), a palha de arroz (Rani *et al.*, 2024) e o caule de mandioca (Bolonhesi *et al.*, 2023). Ambos os materiais têm em comum o fato de serem essencialmente constituídos de lignina, hemicelulose e, principalmente, celulose.

Para produzir bioenergia a partir de resíduos agrícolas, como por exemplo do bagaço de agave, primeiramente é necessário realizar a conversão da celulose em açúcares fermentáveis, para que posteriormente esses açúcares sejam fermentados e transformados em bioenergia.

Contudo, apesar das oportunidades, é importante ressaltar que a biomassa lignocelulósica em seu estado natural possui elevado grau de dificuldade de hidrólise, devido à alta cristalinidade e à organização densa de celulose, hemicelulose e lignina (Sindhu *et al.*, 2016).

Dos componentes da biomassa, a lignina é o mais difícil de quebrar. Diferente da celulose e da hemicelulose, ela é um polímero com estrutura tridimensional que dá rigidez e resistência às paredes das plantas, funcionando como uma espécie de escudo natural contra a ação de produtos químicos e enzimas (Galdino, 2024). Posicionada na camada mais externa, a lignina envolve e emaranha as estruturas de celulose, dificultando o acesso a essas moléculas de interesse (Shimizu, 2018). Na Figura 6 está apresentada uma representação esquemática da lignocelulose e seus componentes principais.

Figura 6 — Representação esquemática da lignocelulose e seus componentes principais.



Fonte: Galdino (2024)

Portanto, é essencial aplicar um procedimento preliminar, de modo a viabilizar a remoção da lignina, otimizando assim a eficácia na conversão da celulose.

3.4 Pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica

De acordo com Baksi *et al.* (2023) o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa indispensável quando se deseja aproveitar este material para a produção de bioenergia. Para os autores, esta etapa torna possível e ainda mais eficaz o processo de hidrólise subsequente, contribuindo para uma melhor produção de açúcares redutores totais.

É possível realizar o pré-tratamento da BLC utilizando métodos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos ou pela combinação destes, no entanto, é importante pontuar que cada tipo de pré-tratamento tem suas vantagens e desafios associados (Zhao *et al.*, 2022).

Entre os principais pré-tratamentos físicos e químicos aplicados à biomassa lignocelulósica, cita-se a extrusão, a explosão a vapor, a irradiação, a criomoagem e a aplicação de ácidos, álcalis, solventes orgânicos e agentes oxidantes (Mujtaba *et al.*, 2023). De forma geral, esses métodos ajudam a romper a estrutura rígida da lignina e facilitam o acesso às frações de celulose, aumentando a eficiência nos processos posteriores de hidrólise e fermentação (Zhao *et al.*, 2022). Por outro lado, as desvantagens desses métodos incluem o alto custo energético, o uso de substâncias tóxicas ou corrosivas e a geração de subprodutos (por exemplo, o furfural) que podem inibir o metabolismo de microrganismos em etapas seguintes (Mujtaba *et al.*, 2023).

Conforme Zheng *et al.* (2014), o pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica é bastante eficiente, uma vez que produz efeitos consideráveis na composição e estrutura

desse tipo de biomassa, tais como aumento da área superficial acessível, solubilização da lignina e da hemicelulose e alteração da estrutura da lignina.

Kumari e Singh (2018) apontam que este pré-tratamento possui como desvantagem a exigência de longos períodos de processo, assim como a necessidade de monitoramento contínuo do crescimento dos microrganismos.

3.5 Pré-tratamento para biomassa lignocelulósica utilizando fungos

Dentre os diversos métodos para realizar o pré-tratamento biológico da BLC, a aplicação de fungos merece especial ênfase para este fim. Os fungos são seres vivos eucariontes e heterotróficos, com reserva de glicogênio, que formam um dos grupos mais numerosos da natureza (Ribeiro, 2024), uma vez que se estima que existam entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies pertencentes a esse reino.

Estes microrganismos se destacam, principalmente, pela sua versatilidade e capacidade de crescer e se adaptar até mesmo em ambientes extremos (Cavalcante *et al.*, 2021), possuindo um papel essencial no equilíbrio ecológico ao atuar principalmente como decompositores, o que os torna fundamentais na ciclagem da matéria orgânica (Ribeiro, 2024). Sua importância se estende também para áreas como a medicina, a indústria de alimentos e a agricultura.

Kumari e Singh (2018) e Atelge *et al.* (2020) apontam que os fungos podem ser utilizados para o pré-tratamento biológico da BLC e indicam como principais vantagens desta aplicação o baixo consumo de energia e a ausência de necessidade de produtos químicos. Zabed *et al.* (2019) elegem os baixos custos de pré-tratamento, a ausência ou redução na geração de resíduos e a redução na formação de inibidores como principais vantagens deste tipo de pré-tratamento.

Zabed *et al.* (2019) e Abraham *et al.* (2020) indicam como desvantagem a ocorrência de perdas de carboidratos, visto que os fungos utilizam alguma fração deste recurso como matéria-prima para seu metabolismo e crescimento (Shah *et al.*, 2015). Essa desvantagem pode ser driblada se, ao invés de realizarmos uma hidrólise fúngica, optarmos por realizar uma hidrólise enzimática. Na primeira são aplicados fungos para biodegradação da BLC, enquanto na segunda são aplicadas apenas enzimas produzidas pelos fungos (adquiridas comercialmente ou produzidas em laboratório).

De acordo com Andlar *et al.* (2018), os fungos apresentam um sistema enzimático extremamente eficiente, o que os torna capazes de decompor materiais ricos em lignocelulose.

Para os autores, essa eficiência deve-se principalmente à capacidade que os fungos têm de produzir enzimas hidrolíticas, que atuam na quebra dos polissacarídeos, mas também se deve à presença de um sistema oxidativo distinto, de natureza não enzimática. Assim, durante o pré-tratamento biológico de BLC com fungos, estes dois mecanismos atuam em conjunto promovendo alterações estruturais e a degradação da lignina presente nesses substratos.

Algumas espécies de fungos são mais indicadas para serem utilizadas no pré-tratamento biológico da BLC do que outras. Sankaran *et al.* (2020) conferiram em seu trabalho especial destaque aos fungos de podridão branca pela sua maior eficácia neste tipo de pré-tratamento.

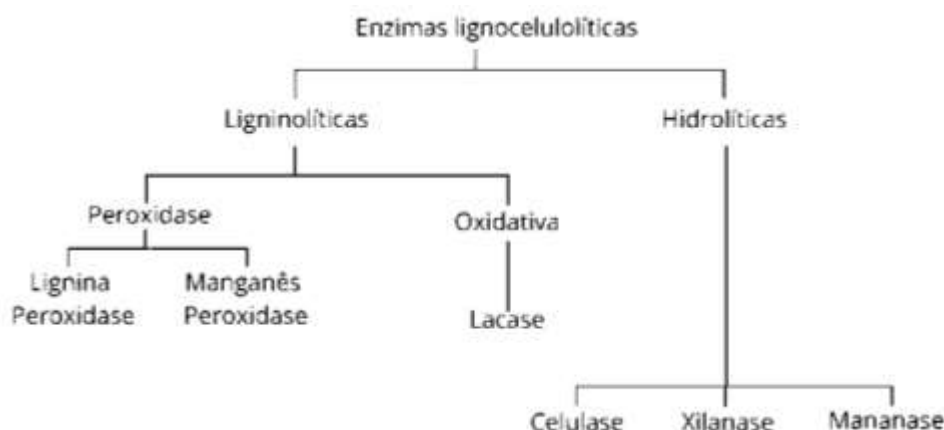
Kumari e Singh (2018) destacam que os fungos de podridão branca possuem a capacidade de degradar completamente a lignina ao oxidar suas moléculas, enquanto os fungos de podridão mole realizam uma decomposição lenta e incompleta da lignina, degradando mais rapidamente as frações de polissacarídeos da biomassa. *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma reesei* são exemplos de fungos de podridão mole utilizados nos últimos anos em pré-tratamento biológico de BLC (Kumari e Singh, 2018).

Na natureza, os fungos do tipo podridão branca, pertencentes ao grupo dos basidiomicetos, são os principais responsáveis por degradar a lignina, pois realizam este trabalho de forma mais eficiente e completa do que outros microrganismos (Andlar *et al.*, 2018).

Os fungos que degradam materiais lignocelulósicos produzem dois tipos principais de enzimas: as hidrolíticas e as lignolíticas. As enzimas hidrolíticas são aquelas que atuam na hidrólise de moléculas como a celulose (ex: celulasas, hemicelulasas, pectinases, quitanases, amilases, proteases e esterases). Já as enzimas lignolíticas, como as peroxidases e oxidases, atuam principalmente na degradação da lignina. A Figura 7 mostra algumas dessas enzimas importantes para o pré-tratamento da BLC (Fernandes, 2021).

Espécies como *Pleurotus* spp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Phlebia* spp., figuram como importantes exemplos de fungos com alta atividade lignolítica. Estas espécies são apontadas como grandes produtoras de enzimas capazes de oxidar compostos aromáticos, produzindo assim radicais que alteram estruturalmente os substratos lignocelulósicos (Andlar *et al.*, 2018). Entre as principais enzimas lignolíticas cita-se a lacase (LAC), a manganês peroxidase (MnP) e a lignina peroxidase (LiP).

Figura 7 — Enzimas lignolíticas



Fonte: Fernandes (2021)

A lacase (LAC) é uma enzima com forte capacidade oxidativa, capaz de atuar sobre compostos aromáticos, não aromáticos, orgânicos e inorgânicos (Scarlassara, 2022). Ela também aparece conceituada como uma glicoproteína cuja arquitetura molecular é semelhante a da família de enzimas multicobre oxidases, pois possui um sítio catalítico formado por quatro átomos de cobre (Silva, 2024).

A lacase produzida pelos fungos é fundamental na degradação da lignina, pois promove a oxidação de grupos fenólicos e gera radicais livres necessários para esse processo (Scarlassara, 2022). Embora seja produzida no citoplasma, sua atividade ocorre apenas após ser secretada para o meio extracelular.

Silva (2024) afirma que as lacases utilizam o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons e, por isso, são consideradas enzimas oxidorredutases capazes de hidrolisar vários substratos. Seu mecanismo de ação envolve três etapas: a primeira é a retirada de elétrons do substrato no sítio de cobre, que dá à enzima uma coloração azul; as demais etapas envolvem a ativação do oxigênio molecular e a liberação de água como subproduto (Scarlassara, 2022).

A enzima manganês peroxidase (MnP) é uma proteína extracelular que oxida Mn^{+2} em Mn^{+3} , quando ativada por peróxido de hidrogênio (Ferrari, 2024). Muito encontradas em fungos de podridão branca, essas enzimas pertencem ao grupo das oxidorredutases, assim como a lacase e a lignina peroxidase (Chang *et al.*, 2021).

Durante a atividade enzimática, o íon Mn^{2+} contido na enzima MnP é oxidado a Mn^{3+} , que por sua vez oxida fenóis, gerando radicais fenólicos (Gruenberg *et al.*, 2025). No entanto, de acordo com Zhang *et al.* (2022), como o potencial redox da MnP é baixo, ela só é capaz de degradar oxidativamente lignina fenólica.

Por possuir ampla especificidade de substrato, a MnP tem potencial para catalisar muitos poluentes com estruturas diversas, como pesticidas, corantes e hidrocarbonetos (Ferrari, 2024). É devido a este potencial para catalisar muitos poluentes que a atividade enzimática de manganês peroxidase é amplamente investigada em pesquisas para diversos fins, incluindo a degradação de lignina em BLC.

A lignina peroxidase (LiP) trata-se de uma enzima com potencial para oxidação tanto de compostos fenólicos, quanto de compostos não fenólicos (Singh *et al.*, 2021b). Por esta razão, desde a década de 80, várias espécies de fungos têm sido estudadas de modo investigar a produção de LiP e seu mecanismo de ação na lignina em diversas condições ambientais.

A atividade de LiP é dependente de H_2O_2 e esta enzima age liberando cátion-radicaís que ajudam a "quebrar" partes da estrutura das moléculas, como cadeias laterais, podendo remover grupos metila, fazer ligações dentro da mesma molécula e promover rearranjos na molécula (Singh *et al.*, 2021a).

Singh *et al.* (2024) consideram que o alto potencial redox e, principalmente, a capacidade que a LiP possui de oxidar materiais recalcitrantes são os principais fatores motivadores para o desenvolvimento de estudos que explorem o uso e a aplicação desta enzima. É possível encontrar diversos estudos que avaliam a atividade enzimática de LiP para a remoção de contaminantes como produtos farmacêuticos, fenólicos, fenóis clorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Singh *et al.*, 2024).

Até o momento, não foram identificadas pesquisas que explorassem o uso de qualquer espécie de fungo no pré-tratamento biológico do bagaço de *A. sisalana* com o objetivo específico de viabilizar a produção de biohidrogênio. Essa ausência de estudos no campo da hidrólise fúngica aponta para uma lacuna na literatura e abre espaço para investigações inovadoras nessa área.

3.6 Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios após pré-tratamento de biomassa lignocelulósica

Após matérias-primas com alto teor de celulose e hemicelulose passarem por um pré-tratamento físico, químico ou biológico, no qual ocorre hidrólise, forma-se um composto chamado hidrolisado, que contém altas concentrações de açúcares redutores com cadeias de cinco ou seis carbonos (Felipe, 2025).

De acordo com Sousa (2022), quando este hidrolisado é submetido a um processo de digestão anaeróbia (demonstrado na Figura 8 e caracterizado pelas etapas de hidrólise,

De acordo com De Sá *et al.* (2014), a produção de hidrogênio por processos biológicos é um campo de pesquisa em expansão, uma vez que possui duas principais vantagens: trata-se de uma fonte de energia renovável e seu desenvolvimento muitas vezes ocorre com o reaproveitamento de resíduos. Além disso, a produção de hidrogênio por meio de processos biológicos apresenta custos energéticos mais baixos em comparação com as rotas termoquímicas, pois os processos biológicos ocorrem em condições mais brandas de temperatura e pressão (Bachofen, 2024).

Em sua pesquisa, Martins (2023) constatou um crescimento no número de publicações sobre produção de H₂ em biorreatores, identificando que, entre 2012 e 2022, foram publicados 476 artigos com esta temática. O autor identificou ainda que, entre os anos de 2014 e 2023, foram depositadas 251 patentes internacionais, registradas para proteger invenções e processos relacionados à produção de hidrogênio em biorreatores.

Conforme Martins (2023), o aumento da demanda por fontes de energia sustentáveis tem favorecido o desenvolvimento de novas pesquisas para a produção de hidrogênio em biorreatores e, para o autor, esta produção biológica é principalmente influenciada pela seleção adequada dos microorganismos, pelo projeto do biorreator e pelo controle das condições operacionais.

Acerca deste último item, Martins (2023) afirma ainda que a adoção de condições ideais de temperatura, pH e concentração de nutrientes pode favorecer uma maior produção de H₂ em reatores biológicos.

De Sá *et al.* (2014) afirmam que a produção de biohidrogênio pode ocorrer por meio de diferentes tipos de processos, a saber, biofotólise direta da água empregando algas verdes, biofotólise indireta da água por cianofíceas, fotofermentação de compostos orgânicos utilizando bactérias fotossintéticas, fermentação anaeróbia de compostos orgânicos com o uso de bactérias fermentativas e métodos mistos empregando bactérias fotossintéticas e fermentativas.

Sobre a fermentação anaeróbia de compostos orgânicos com o uso de bactérias fermentativas, sabe-se que este é um processo bioquímico amplamente utilizado para conversão de matéria orgânica em produtos de valor energético, como biogás. Nesse processo, bactérias hidrolíticas secretam enzimas extracelulares que atuam como biocatalisadores, promovendo a decomposição de materiais complexos em moléculas dissolvidas mais simples (Balbino, 2020).

Conforme Devens (2024), através da fermentação é possível produzir H_2 e outros subprodutos de valor agregado, como ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico e etanol.

É possível encontrar na literatura sistemas para fermentação anaeróbia montados com os mais variados arranjos e níveis de complexidade. Os trabalhos de Tomasini (2020), Balbino (2020) e Adarme (2016) foram desenvolvidos utilizando sistemas mais simples, nos quais o hidrolisado, um inóculo e um meio de cultura foram incubados em frasco de vidro lacrado (sistema estanque) em condições variadas de temperatura, tempo e agitação.

Utilizando estes sistemas, os autores obtiveram êxito na produção de H_2 após os açúcares contidos no hidrolisado serem fermentados pelo conjunto de microorganismos presentes no inóculo em um meio líquido, que pode ser simplesmente água ou um meio de cultura para enriquecimento nutricional do sistema, sempre em condições anaeróbias.

Santana (2019) considera o frasco penicilina como um excelente exemplo de recipiente a ser utilizado como biorreator batelada, dada a sua simplicidade, seu custo acessível e sua boa aplicabilidade para fins de produção biológica de hidrogênio demonstrada em trabalhos recentes.

Utilizando esse tipo de frasco, Tomasini (2020) operou sistemas anaeróbios montados utilizando um inóculo, um meio de cultura para enriquecimento nutricional e um hidrolisado produzido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 1,6%. Neste experimento a autora obteve uma produção de $3,09 \pm 0,02$ mmol após conduzir 48 h de fermentação, em condições mesofílicas e pH 5,5.

Outro caso de êxito na produção de H_2 é o de Balbino (2020), que conduziu experimentos utilizando hidrolisado da palha da soja, água e um inóculo (lodo anaeróbio) em frascos de penicilina hermeticamente fechados. A partir deste sistema, operado por 7 dias com temperatura mesofílica ($35 \pm 1^\circ C$), pH 7,70 e agitação a 120 rpm, a pesquisadora conseguiu produzir 159 mL de H_2 .

Sobre os inóculos empregados em biorreatores, De Paula *et al.* (2025) afirmam que estes possuem um papel importante na produção de H_2 , pois é nesse material que estarão presentes os microorganismos responsáveis pela fermentação dos açúcares contidos no hidrolisado. Para os autores, o inóculo utilizado pode ser de cultura mista ou de cultura pura, cada um possuindo suas vantagens e desvantagens.

Os inóculos de cultura pura apresentam como principal vantagem a seletividade do substrato, o que pode conduzir à maximização da produção de H_2 , no entanto, seu manuseio

exige condições estéreis, o que pode aumentar o seu custo (De Paula *et al.*, 2025). Já os inóculos de culturas mistas podem ser facilmente obtidos, o que lhe confere baixo custo.

De Paula *et al.* (2025) consideram que o lodo anaeróbio tem grande potencial para ser usado como inóculo em sistemas de digestão anaeróbia voltados à produção de hidrogênio. No entanto, os autores ressaltam que, muitas vezes, é necessária a aplicação de um pré-tratamento ao inóculo para favorecer a geração de H₂, uma vez que tal procedimento contribui para a inibição da atividade metanogênica e para a esporulação dos microrganismos produtores de hidrogênio (Adarme, 2016).

Para Dornelles (2024), *Methanospirillum* e *Methanobacterium* são importantes exemplos de arqueias metanogênicas com metabolismo hidrogenotrófico, uma vez que consomem H₂ como doador de elétrons para reduzir dióxido de carbono (CO₂) e produzir metano CH₄, conforme a Equação 1.



A realização de um pré-tratamento no inóculo pode contribuir para a redução da população de microrganismos consumidores de H₂ e, conseqüentemente, diminuir sua proporção em relação aos microrganismos produtores de hidrogênio (Santana, 2019).

Pesquisas recentes dedicadas à produção de H₂ têm buscado maximizar a produção deste gás em relação aos outros produtos componentes do biogás. Nesse sentido pode-se encontrar na literatura algumas estratégias úteis para favorecer a produção de biohidrogênio em sistemas anaeróbios.

Santana (2019), Lima (2020) e Adarme (2016) optaram por realizar em suas pesquisas pré-tratamento físico de natureza térmica no inóculo (lodo anaeróbio), aquecendo-o em chapa térmica a fim de inativar as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e evitar o consumo de H₂ por esses microorganismos.

Na contramão dos pré-tratamentos térmicos do inóculo, Adames *et al.* (2021) e Rossi *et al.* (2021) realizaram pré-tratamento ácido no inóculo com o mesmo objetivo: eliminar as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Ambos os pré-tratamentos, físico (térmico) e químico, são eficazes para este fim, sendo que a escolha pelo primeiro demanda o emprego de energia térmica e a escolha pelo segundo demanda aquisição de reagentes.

Santana (2019) considera que realizar o pré-tratamento do inóculo favorece os microorganismos produtores de hidrogênio e destaca os do gênero *Clostridium* como potenciais produtores desse gás.

Silva (2015) cita *Clostridium sp.*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium beijerinckii* como importantes bactérias fermentativas e produtoras de H₂, e aponta ainda as bactérias *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* como principais microrganismos para produção de H₂ por fermentação anaeróbia.

Assim, pode ser útil empregar nos biorreatores uma seleção de microrganismos de interesse por meio do pré-tratamento do inóculo, evitando o indesejável consumo de H₂ pela família das arqueias metanogênicas.

O uso de biorreatores apresenta grande potencial para a produção de H₂ e, até o momento, não foram identificados estudos que investiguem a geração de H₂ por fermentação anaeróbia empregando hidrolisado obtido por meio do pré-tratamento biológico do bagaço de *Agave sisalana* com cepas de *Trametes spp.*, configurando a principal inovação desta pesquisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e caracterização do bagaço de *Agave sisalana*

O bagaço de *A. sisalana* utilizado nesta pesquisa foi adquirido de um produtor rural (que atende pelo apelido de Tizil) por meio de doação e foi coletado no Município de Caririáçu-CE, em localidade denominada Sítio São Paulo. O local onde foram coletadas as amostras de bagaço de agave utilizadas nesta pesquisa segue demonstrado na Figura 9.

Figura 9 — Localidade Sítio São Paulo no Município de Caririáçu-CE.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Após a coleta, a amostra foi acondicionada em embalagens de polipropileno e armazenadas, em temperatura ambiente, em caixas de papelão para transporte. No Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa, o bagaço de agave foi levado à estufa a 105 ± 2 °C por três horas e moído em Moinho com rotor PULVERISETTE 16 Fritsch utilizando peneira de 20 *mesh*. Após a moagem o material foi novamente acondicionado em sacos de polipropileno e armazenado à temperatura ambiente (sem refrigeração). Na Figura 10 está apresentado o bagaço de *Agave sisalana* moído.

Figura 10 - Bagaço de *Agave sisalana* moído



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

A caracterização do bagaço de *Agave sisalana* foi realizada no Laboratório de Tecnologia da Biomassa e no Laboratório de Análises de Alimentos, ambos ligados à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Agroindústria Tropical. A amostra foi submetida a ensaios para determinação pH e dos teores de umidade, cinzas, proteínas, extrativos, lignina, holocelulose e alfacelulose.

4.1.1 Determinação do pH

A determinação de pH foi realizada em quintupla (cinco repetições) a partir de leitura em pHmetro digital (*Mettler Toledo*, modelo F20, Ohio, EUA) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 2016).

4.1.2 Determinação do teor de umidade

Na sequência, foram realizados os procedimentos para a determinação da umidade, que corresponde ao teor de água presente em uma amostra. De acordo com Moraes *et al.* (2010), esse parâmetro pode ser determinado pela diferença de massa da amostra antes e após o processo de secagem em estufa a 105 °C. Assim, a perda de massa durante a secagem reflete o conteúdo de água presente, sendo possível calcular o teor percentual de umidade na amostra.

O teor de umidade foi avaliado em quintupla, utilizando a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), descrita em Moraes *et al.* (2010).

4.1.3 Determinação do teor de cinzas

Conforme Moraes *et al.* (2010), a determinação do teor de cinzas em amostras vegetais corresponde, essencialmente, ao teor de minerais presentes. Para avaliação do teor de cinzas o material orgânico deve ser ignizado, o que resulta na liberação de gases e, consequentemente, na eliminação de elementos como carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre. Após esse procedimento, permanecem apenas os minerais, como sódio, potássio, cálcio e ferro, entre outros (Moraes *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa, o teor de cinzas foi determinado por calcinação em Forno Mufla Digital 7Lab Modelo Bio FM 16L, seguindo a metodologia descrita em Moraes *et al.* (2010), realizando todo o procedimento em quintupla.

4.1.4 Determinação do teor de proteínas

Conforme Esteves (2006), o reconhecimento do teor de proteínas em uma amostra é uma atividade importante, pois, ao quantificá-lo, é possível identificar propriedades tecnológicas e nutricionais dos materiais. No geral, a determinação do teor de proteínas é feita através da análise de nitrogênio presente na amostra, uma vez que este é o elemento que se encontra mais presente nas proteínas.

A determinação do teor de proteína foi realizada por combustão, segundo o método de DUMAS em equipamento Analisador de Nitrogênio/Proteína NDA 701 Dumas, utilizando EDTA como padrão, com base no método da AOAC 992.23 (AOAC, 2016). Para assegurar a precisão e a exatidão da análise, o procedimento foi realizado em quintupla.

4.1.5 Determinação do teor de extrativos

Conforme Moraes *et al.* (2010), os extrativos podem ser conceituados como componentes que podem ser extraídos de biomassas lignocelulósicas seja por solventes polares, seja por solventes apolares, podendo englobar uma variedade de moléculas como sais, açúcares, ácidos, ésteres graxos, ceras e resinas, entre outros. Entre suas funções, cita-se a proteção da matéria contra os ataques de fungos e bactérias (Moraes *et al.*, 2010).

A determinação de extrativos ocorreu conforme a metodologia descrita em Moraes *et al.* (2010). A Figura 11 apresenta parte do experimento conduzido para determinação desta variável.

Figura 11 — Experimento para determinação de extrativos



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Para garantir a confiabilidade da análise, o ensaio foi realizado em triplicata.

4.1.6 Determinação do teor de lignina insolúvel

Devido às limitações técnicas, esta pesquisa deteve-se apenas à determinação do teor de lignina insolúvel ou lignina de *Klason*, não sendo realizada a determinação do teor de lignina solúvel, razão pela qual não foi possível avaliar o teor de lignina total,

A determinação do teor de lignina insolúvel foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita em Moraes *et al.* (2010), que consiste em adaptação da norma TAPPI T 222. A Figura 12 ilustra uma etapa do experimento realizado para a determinação do teor de lignina insolúvel.

Figura 12 — Montagem de experimento para extração de lignina insolúvel



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

4.1.7 Determinação do teor de holocelulose

Neste trabalho optou-se por determinar o teor de holocelulose, pois esta é uma variável que em si engloba os teores de celulose e dos demais carboidratos, sendo frequentemente utilizado para quantificar os carboidratos totais presentes em uma célula vegetal (MORAIS *et al.*, 2010). Além disso, esta variável também foi investigada para, posteriormente, determinar o teor de hemicelulose.

A determinação do teor de holocelulose ocorreu conforme procedimento descrito em Moraes *et al.* (2010). A Figura 13 retrata parte do procedimento experimental adotado para a quantificação do teor de holocelulose.

Figura 13 — Experimento para determinação do teor de holocelulose



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Com o objetivo de garantir maior precisão e confiabilidade dos resultados, o procedimento experimental foi conduzido em triplicata.

4.1.8 Determinação do teor de alfacelulose

Nesta pesquisa optou-se por determinar a variável alfacelulose, porque a partir deste parâmetro é possível determinar o teor de hemicelulose. Isso porque, conforme Moraes *et al.* (2010), conhecendo-se os valores de holocelulose e de alfacelulose de um material, pode-se, por meio do cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose.

A determinação do teor de alfacelulose foi realizada em triplicata, adotando-se todos os procedimentos metodológicos disponíveis em Moraes *et al.* (2010).

4.2 Produção de hidrolisados utilizando fungos

Após a caracterização do bagaço de *A. sisalana*, iniciaram-se os procedimentos para a produção do hidrolisado utilizando fungos. Para esta produção foram utilizadas cepas isoladas de *Trametes spp.* obtidas na micoteca do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *campus* Fortaleza.

A cepa isolada foi cultivada individualmente por 7 dias em placa de Petri contendo meio sólido ágar batata dextrose (PDA) a 30 °C. O micélio fúngico produzido nesta etapa foi utilizado na forma de discos miceliais (*plag*). Para produzir os discos miceliais, utilizou-se um

tubo de ensaio com abertura de 6 mm, que foi previamente flambado em chama para esterilização. Após rápido resfriamento, o tubo foi utilizado para demarcar os discos miceliais de *Trametes spp.* presentes na placa de Petri.

A montagem de reatores para a produção de hidrolisado por fermentação submersa foi conduzida por procedimento adaptado de Araújo *et al.* (2021) e Menezes *et al.* (2009), no qual o fungo foi cultivado em meio de cultura contendo pequena quantidade de bagaço. As reações foram conduzidas em modo descontínuo, de forma que os reatores foram operados em regime de batelada durante todo o experimento.

Os reatores foram conduzidos em regime de fermentação submersa, utilizando apenas o substrato principal, sem suplementação com co-substratos. Para isto, frascos *Erlenmeyers* de 250 mL foram utilizados como reatores, sendo preenchidos com 60 mL de meio basal (em pH 5,5) e 3 g de bagaço de *A. sisalana*. Os frascos *Erlenmeyers* foram fechados com papel alumínio e elástico de borracha e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. A composição do meio basal (em pH 5,5) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 — Composição do meio basal (em pH 5,5) descrito em Menezes *et al.* (2009).

Reagente	Concentração
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g/L
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L
Ureia	0,1 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L
CaCl ₂	0,3 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,56 mg/L
CoCl ₂	2,0 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/L

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Após atingir temperatura ambiente, cada reator (Figura 14) foi inoculado com três discos miceliais (*plags*) de 6 mm de diâmetro (Figura 15) e incubado a 28 ± 1 °C, na ausência de luz. Uma adaptação à metodologia proposta por Araújo *et al.* (2021) foi adotada ao se empregar uma agitação de 150 rpm, utilizando incubadora de bancada Cientec Modelo CT-712 (Figura 16).

Figura 14 — Corte dos discos miceliais Figura 15 — Montagem de reatores



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)



Acervo pessoal da autora (2025)

Figura 16 — Fermentação submersa realizada em incubadora de bancada



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Para este trabalho, foi produzida quantidade de reatores tal, de forma que fosse possível realizar o desmonte de uma triplicata de reatores a cada tempo pré-definido para avaliação de açúcares redutores, bem para o monitoramento da atividade enzimática de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Estas variáveis foram monitoradas ao longo de trinta dias nos tempos: 3h, 6h, 9h, 12h, 24h (1º dia), 2º dia, 3º dia, 4º dia, 5º dia, 10º dia, 15º dia, 20º dia, 25º dia e 30º dia, totalizando 14 tempos distintos. Por esta razão, foram então montados 42 reatores, de modo que a tempo especificado, até o trigésimo dia, uma triplicata de reatores fosse submetida à avaliação das variáveis acima informadas nos intervalos de tempo pré-estabelecidos.

A Figura 17 apresenta um esquema geral dos procedimentos metodológicos adotados para a montagem de reatores para a produção de hidrolisado por fermentação submersa.

Figura 17 — Esquema geral dos procedimentos adotados para a montagem de reatores



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Ao término do período reacional, o substrato foi coletado e separado por filtração utilizando papel para filtração rápida e, na sequência, uma filtração a vácuo utilizando filtro de fibra de vidro. O resíduo retido no filtro foi descartado de forma ambientalmente adequada e o filtrado, considerado hidrolisado, foi reservado, parte para a determinação dos parâmetros desejados e parte para a próxima etapa da pesquisa (produção de H_2 por fermentação anaeróbia). A fração a ser usada para a produção de H_2 por fermentação anaeróbia foi acondicionado em tubo plástico do tipo *Falcon* de 50 mL e armazenada em freezer a 4°C para preservação de suas características originais.

4.3 Avaliação da produção de açúcares redutores (AR) em reatores biológicos

A avaliação da produção de açúcares redutores foi realizada através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que consiste em um método colorimétrico amplamente utilizado para quantificar açúcares redutores (como glicose, maltose e lactose) em soluções.

Nesse método, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante presente no reativo DNS) reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores (Teixeira, 2022). Durante a reação, o ácido DNS, que apresenta uma coloração amarela, é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que apresenta uma coloração avermelhada, cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade de açúcares redutores presente na amostra. A intensidade da cor é mensurada em um espectrofotômetro, em 540 nm, permitindo a quantificação do açúcar redutor na amostra por meio de uma curva padrão (Teixeira, 2022).

A metodologia detalhada da análise está disponível em Vasconcelos *et al.* (2013).

4.4 Avaliação da atividade enzimática

4.4.1 Avaliação da atividade enzimática de lacase (LAC)

A determinação da atividade de lacase foi realizada utilizando metodologia proposta por Buswell *et al.* (1995), que se inicia com a adição em um tubo de ensaio de 10 cm x 100 mm de 3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 6 mL do hidrolisado e 1 mL de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) 0,03% (p/v). O conteúdo do tubo de ensaio foi agitado e uma primeira leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis GENESYS 150 Thermo Scientific ajustado para o comprimento de onda de 420 nm.

Em seguida, o tubo de ensaio foi incubado a 37°C por 10 minutos em equipamento Banho Maria Digital GlobalTrade 16L. Cessado o período de incubação, as amostras foram mais uma vez lidas em espectrofotômetro a 420 nm.

As análises foram realizadas em duplicata e a variação da absorbância (Δ Absorbância) foi registrada para aplicação na Equação 2, que considera este dado e o coeficiente de extinção molar (ϵ) do produto formado ($36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), dentre outros dados (Buswell *et al.*, 1995).

A Equação 2, obtida em Cavalcante (2024), permite a determinação da atividade enzimática em U/L, na qual 1 U corresponde à quantidade de enzima capaz de catalisar a conversão de 1 μmol do substrato por minuto, sob as condições do ensaio.

$$\text{Atividade enzimática (U/L)} = \frac{\Delta \text{ Absorbância} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (2)$$

Sendo,

Δ Absorbância = Absorbância final – Absorbância inicial

ϵ = coeficiente de absorção molar = $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

R = volume de hidrolisado utilizado (L) = 0,006 L

t = tempo de reação (min) = 10min

4.4.2 Avaliação da atividade enzimática de manganês peroxidase (MnP)

Para avaliação da atividade enzimática de manganês peroxidase (MnP) utilizou-se o método descrito em Ameen *et al.* (2016) e Cavalcante (2024).

Para isso, em um tubo de ensaio de 10 cm x 100 mm foi adicionado 400 μL de MnSO_4 (1 mM), 300 μL de solução de tartarato de sódio (100 mM, pH 4,5), 600 μL de fenol 0,01% e 600 μL de H_2O_2 0,1 mM e 3 mL de alíquotas filtradas dos reatores (hidrolisado).

O conteúdo do tubo de ensaio foi agitado e uma primeira leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis GENESYS 150 *Thermo Scientific* ajustado para o comprimento de onda de 460 nm. Uma segunda leitura foi realizada no mesmo equipamento após incubação em temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos.

As análises foram realizadas em duplicata e a variação da absorbância ($\Delta\text{Absorbância}$) foi registrada para aplicação na Equação 2, anteriormente apresentada. Para a determinação desta atividade enzimática adotou-se ϵ (coeficiente de absorção molar) = 6500 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, R = volume de hidrolisado utilizado (L) = 0,003 L e t = tempo de reação (min) = 10min.

4.4.3 Avaliação da atividade enzimática de lignina peroxidase (LiP)

Para a determinação da enzima lignina peroxidase (LiP), seguiu-se protocolo descrito no trabalho de Sanchez (2021). Neste método, a atividade enzimática da LiP é determinada a partir da medição do aumento da absorbância a 310 nm na presença de álcool veratrílico (3,4-dimethoxybenzyl alcohol).

Para tanto, em um tubo de ensaio de 10 cm x 100 mm foi adicionado 2000 μL de solução tampão tartarato de sódio (125 mM, pH 4,5), 1000 μL de hidrolisado, 1000 μL de álcool veratrílico (10 mM) e 1000 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM). Uma primeira leitura foi realizada a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis GENESYS 150 *Thermo Scientific* e uma segunda leitura foi realizada no mesmo equipamento após incubação em temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos.

As análises foram realizadas em duplicata e a variação da absorbância ($\Delta\text{Absorbância}$) foi registrada para aplicação na Equação 2, anteriormente apresentada. Para a determinação desta atividade enzimática adotou-se ϵ (coeficiente de absorção molar) = 9300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, R = volume de hidrolisado utilizado (L) = 0,001 L e t = tempo de reação (min) = 10min.

4.5 Reatores anaeróbios para a produção de H₂

Os reatores anaeróbios para a produção de H₂ foram montados e operados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) utilizando metodologia adaptada de Balbino (2020).

Nesta pesquisa optou-se por operar dois tipos reatores:

- um contendo água, inóculo e um hidrolisado obtido após um dia de pré-tratamento do bagaço de *A. sisalana* por hidrólise fúngica com *Trametes spp.*, chamado de Reator tipo A; e
- outro contendo água, inóculo e um hidrolisado obtido após três dias de pré-tratamento do bagaço de *A. sisalana* por hidrólise fúngica com *Trametes spp.*, chamado de Reator tipo B.

Foram utilizados como reatores frascos de penicilina de 120 mL fabricados em borossilicato de material transparente (Figura 18) e estes frascos foram preenchidos com água destilada, hidrolisado e inóculo pré-tratado, nesta ordem, adotando-se ainda medidas para tornar o sistema mais anaeróbio o possível.

Figura 18 – Frascos de penicilina de 120 mL utilizados como reatores anaeróbios para a produção de H₂



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Um processo de desoxigenação térmica foi adotado para reduzir a concentração de oxigênio no sistema. Para tanto, a água destilada usada nos sistemas foi aquecida em bquer a 100°C em chapa aquecedora Quimis Q313F21. Após a fervura, a água foi resfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente e, após isso, o volume desejado foi medido e transferido para o reator, cuidadosamente, a fim de evitar a incorporação de oxigênio atmosférico.

O hidrolisado, que estava acondicionado em tubo plástico do tipo *Falcon* de 50 mL e armazenado em freezer a 4°C para preservação de suas características originais, foi descongelado em temperatura ambiente até que alcançasse a temperatura de 25°C.

Como o hidrolisado já estava caracterizado anteriormente em termos de concentração de açúcares redutores, nesta etapa foi necessário caracterizar apenas o inóculo utilizado.

4.5.1 Coleta, caracterização e pré-tratamento do inóculo

O inóculo utilizado nesta pesquisa trata-se de lodo anaeróbio proveniente de Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) operada pela Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE) no município de Horizonte/CE. A referida ETE utiliza a tecnologia UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), seguida por um sistema de filtro submerso aerado (FSA).

Na etapa de coleta, o lodo anaeróbio foi armazenado em frasco plástico de 5 L e conduzido ao LATAM para caracterização quanto a concentração de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).

Para a determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foi empregado o método gravimétrico “Determinação de sólidos suspensos fixos e voláteis por ignição a 550°C” descrito em APHA (2017).

Por se tratar de lodo anaeróbio, foi necessário realizar sua diluição a 1% para viabilizar a realização da análise.

4.5.1.1 Preparo do inóculo para seleção de microorganismos acidogênicos

Imediatamente antes da montagem dos reatores foi realizado o pré-tratamento térmico do inóculo, procedimento adotado para reduzir a população de microrganismos consumidores de H₂ e, conseqüentemente, diminuir sua proporção em relação aos microrganismos produtores de hidrogênio (Santana, 2019).

Para isso, o material foi acondicionado em béquer e colocado em chapa aquecedora *Quimis* Q313F21 até atingir a temperatura de 90°C, mantendo-o em temperatura constante por 10 min (Figura 19). Em seguida, o inóculo foi resfriado até alcançar a temperatura de 25°C, conforme metodologia indicada em Balbino (2020 *apud* MAINTINGUER *et al.*, 2011).

Figura 19 – Pré-tratamento térmico do inóculo (lodo anaeróbio)



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

4.5.2 Montagem dos reatores anaeróbios para a produção de H_2

As reações para a produção de H_2 foram conduzidas em modo descontínuo, de forma que os reatores foram operados em regime de batelada durante todo o experimento.

Os reatores anaeróbios foram operados utilizando água destilada (12,5 mL), hidrolisado (25 mL) e inóculo pré-tratado (12,5 mL), sem realizar o ajuste do pH inicial dos reatores. Conforme já relatado, foram montados reatores utilizando dois diferentes hidrolisados:

- Um primeiro conjunto de reatores, que chamaremos de reatores A, foram montados utilizando água, inóculo e um hidrolisado produzido após um dia de pré-tratamento biológico com *Trametes spp* de bagaço de *A. sisalana*.
- Um segundo conjunto de reatores, que chamaremos de reatores B, foram montados utilizando água, inóculo e um hidrolisado produzido após três dias de pré-tratamento biológico com *Trametes spp* de bagaço de *A. sisalana*.

Após a montagem, os reatores foram hermeticamente fechados com rolha de borracha de butila e lacre de metal utilizando alicate crimpador. Os reatores foram dispostos em uma incubadora com agitação orbital (*shaker*) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e 120 rpm, conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 20 – Incubação dos reatores anaeróbios em *shaker*



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

Foi produzida quantidade de reatores, de forma que fosse possível realizar o desmonte de 01 (um) reator A e 01 (um) B após 1, 2, 4 e 7 dias de operação para avaliação do volume de H_2 produzido. Por esta razão, para cada tipo de reator foram então montados 4 reatores.

Além dos reatores A e B, foram incluídos reatores “branco”, montados sem adição de hidrolisado, contendo apenas água destilada e inóculo pré-tratado. Esse branco teve como objetivo servir de controle, permitindo avaliar a produção de H_2 associada apenas ao consumo de ARs do hidrolisado.

Após o encerramento de cada tempo reacional, os reatores eram retirados da incubadora e o biogás produzido era analisado o mais brevemente possível.

4.5.3 Avaliação da produção de H_2 reatores anaeróbios

Findado o tempo reacional, os reatores foram conduzidos ao Laboratório de Tecnologia em Processos Ambientais (LTPA), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *campus* Maracanaú, para a avaliação da produção de H_2 por cromatografia gasosa.

No LTPA, os reatores foram cuidadosamente manuseados de forma retirar de cada um deles uma alíquota de 200 μL para determinação do volume de H_2 produzido. A amostragem foi realizada do *headspace* do reator utilizando seringa para cromatografia gasosa (CG) *Hamilton GASTIGHT 1 mL Modelo 1001 TLL*, conforme demonstrado na Figura 21.

Figura 21 – Amostragem do biogás produzido nos reatores para injeção em cromatógrafo gasoso



Fonte: Acervo pessoal da autora (2025)

A alíquota retirada de biogás foi introduzida em coluna cromatográfica de Cromatógrafo Gasoso (CG) *Trace 1310 (Thermo Scientific)* equipado com coluna *Carboxen 1010 PLOT* e detector de condutividade térmica (TCD). O tempo de corrida foi mantido em 10 min com fluxo constante de gás de arraste de N_2 a $3,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, fluxo do gás de referência de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e polaridade negativa. A temperatura do injetor foi mantida em 200°C e a temperatura do forno em 50°C e o detector foi mantido a 230°C .

A produção de hidrogênio é dada neste trabalho em μL .

4.6 Análise estatística

Os resultados referentes à produção de açúcares redutores, atividade de LiP, MnP e LAC foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste de comparação de médias de *Tukey*, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste de *Tukey* foi utilizado para avaliar diferenças significativas na produção de açúcares redutores, atividade enzimática e produção de biohidrogênio. Todas as análises estatísticas

foram realizadas utilizando o software Stata, versão 18 (*StataCorp LLC, College Station, TX, EUA*).

No caso da produção de biohidrogênio, não foram realizados testes estatísticos, uma vez que essa etapa experimental não contou com repetições em duplicata ou triplicata, o que impossibilita a aplicação de análises estatísticas inferenciais. Dessa forma, os resultados de produção de H_2 foram avaliados de maneira descritiva, sendo utilizados para observar o comportamento dos reatores ao longo do período experimental.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do bagaço de *Agave sisalana*

A caracterização do bagaço de *A. sisalana* foi realizada e obteve-se os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 — Caracterização do bagaço de *Agave sisalana*

Variáveis	Bagaço de <i>A. sisalana</i>
pH	10,8000 ± 0,0320
Proteínas (%)	7,0205 ± 0,0065
Umidade (%)	11,4777 ± 0,4566
Cinzas (%)	23,9037 ± 0,3985
Extrativos (%)	6,3285 ± 0,4163
Lignina insolúvel (%)	20,1685 ± 0,8875
Holocelulose (%)	60,4837 ± 2, 4007
Alfacelulose (%)	47,5226 ± 0,7345
Hemicelulose (%)	12,9611 ± 1,1846

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para efeitos de comparação, o portal dos periódicos da CAPES foi consultado e foram selecionados os 04 (quatro) artigos científicos mais recentes que em seu escopo continham uma caracterização completa deste substrato. Os artigos selecionados foram publicados entre os anos de 2023 e 2024, o que ressalta o atual interesse quanto à pesquisa e exploração do potencial biotecnológico deste substrato. Ressalta-se ainda, que apesar de se tratar de uma planta originária da América Central, todos os artigos selecionados tratavam de substratos coletados no nordeste do Brasil.

Alternativamente, outros artigos recentes contemplavam a caracterização do bagaço de outras espécies de agave diferentes do objeto deste estudo, como por exemplo a *A. tequilana*. Por se tratar de espécies diferentes, estes últimos dados não foram utilizados nas discussões deste trabalho.

Os resultados das variáveis analisadas no presente trabalho para caracterização do bagaço de *A. sisalana* concordam com aqueles obtidos por Da Silva *et al.* (2023), que em sua

pesquisa caracterizaram o bagaço agave com a finalidade de melhor compreendê-lo, a fim de aplicá-lo em ensaios de bioissorção em solos contaminados com metais pesados.

Em Da Silva *et al.* (2023), além de lignina insolúvel, foi avaliado o teor de lignina solúvel, o que permitiu a determinação do teor de lignina total, uma variável não investigada no presente trabalho. O bagaço avaliado por Da Silva *et. al* (2023) também foi coletado no município de Caririaçu-CE, assim como o analisado neste trabalho, no entanto, não é possível afirmar que este é oriundo da mesma localidade que o utilizado nesta pesquisa.

Silva *et al.* (2024) também estudaram o bagaço de agave e nos estudos desenvolvidos por estes pesquisadores encontraram-se teores de extrativos e hemicelulose (6,0 e 16,7%, respectivamente) semelhantes aos obtidos neste trabalho. No entanto, outras variáveis como os teores de cinzas (14,0%) e celulose (37,2%) são notadamente inferiores aos observados na presente pesquisa. O estudo desenvolvido por Silva *et al.* (2024) foi conduzido para avaliar a aplicabilidade deste substrato quanto à remoção de bisfenol-A, um contaminante emergente.

Os resultados encontrados no presente trabalho divergem daqueles dispostos em Thomas *et al.* (2024), especialmente quanto às variáveis extrativos e holocelulose. Esta última trata-se de uma variável importante, uma vez que, conforme Segato *et al.* (2014), refere-se à fração da biomassa lignocelulósica formada por polissacarídeos que formam um grande reservatório de energia, ligados por ligações C—H em polímeros difíceis de quebrar. Destaca-se que, dentre os trabalhos selecionados, o de Thomas *et al.* (2024) foi o que avaliou uma menor quantidade de variáveis para a caracterização do bagaço da *A. sisalana*.

Cunha *et al.* (2024) avaliaram em seu trabalho a viabilidade da aplicação de técnicas de compostagem para o melhoramento da produção de bio-óleo a partir dos resíduos de sisal, mas, antes disso, investigaram a composição lignocelulósica do bagaço de *A. sisalana*. Os resultados por eles apresentados contrastam com os aqui obtidos, uma vez que Cunha *et al.* (2024) encontraram baixos teores holocelulose (20,1%), celulose (14,1%) e hemicelulose (6,0%) no substrato por eles avaliado.

Apesar das semelhanças e divergências, em todos os trabalhos concluiu-se que o bagaço de agave possuía boa aplicabilidade para a finalidade pretendida, dados os teores de lignina, celulose e hemicelulose encontrados nos substratos avaliados. Estas reflexões seguem sintetizadas na Tabela 3, que compara os resultados obtidos nesta pesquisa quanto à caracterização do bagaço de *A. sisalana*, com os resultados obtidos por Da Silva *et. al* (2023), Silva *et. al* (2024), Thomas *et al.* (2024) e Cunha *et al.* (2024).

Tabela 3 – Comparação da caracterização do bagaço de *Agave sisalana* realizada por autores diversos

	Autora (2025)	Da Silva <i>et. al</i> (2023)	Silva <i>et.</i> <i>al</i> (2024)	Thomas <i>et. al</i> (2024)	Cunha <i>et</i> <i>al.</i> (2024)	Desvio Padrão
pH	10,8	-	-	-	-	-
Proteína (%)	7,0	-	-	-	-	-
Umidade (%)	11,5	12,7	8,4	4,6	-	3,629
Cinzas (%)	23,9	17,3	14,0	12,1	11,1	5,170
Extrativos (%)	6,3	7,6	6,0	23,2	52,7	20,084
Lignina ins. (%)	20,2	2,0	-	-	-	12,848
Lignina total (%)	-	5,9	15,5	13,0	9,5	4,198
Holocelulose (%)	60,5	56,5	53,9	42,4	20,1	9,502
Alfacelulose (%)	47,5	45,1	37,2	-	14,1	16,334
Hemicelulose (%)	13,0	11,4	16,7	-	6,0	4,440

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da Tabela 3 observou-se que o presente trabalho foi o que realizou uma caracterização mais completa do bagaço de *A. sisalana*, deixando apenas de avaliar a variável “lignina total”. Observou-se ainda que os teores de lignina, holocelulose e alfacelulose obtidos neste trabalho são superiores aos encontrados nos artigos analisados.

Os teores de lignina, celulose e hemicelulose obtidos nesta etapa, deste trabalho, são relevantes e assemelham-se a teores obtidos em pesquisas que buscavam caracterizar outros tipos de biomassa lignocelulósica para fins de produção de biohidrogênio.

Ao comparar trabalhos, descritos na literatura, que tinham como objetivo a produção de biohidrogênio a partir de diferentes biomassas, foi organizada a Tabela 4, que apresenta uma síntese dos artigos selecionados e dos resultados extraídos deles. A comparação deu-se em função dos teores de lignina, celulose e hemicelulose.

Tabela 4 – Produção de biohidrogênio a partir de biomassas lignocelulósicas diversas

Substrato analisado	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
Bagaço de <i>Agave sisalana</i> (Autora, 2025)	20,17	47,52	12,96
Folha de cana-de-açúcar (Miftah <i>et al.</i>, 2022)	27,68	36,18	25,23
Caule de mandioca (Bolonhesi <i>et al.</i>, 2023)	28	35	21
Grama Napier (Balakrishnan <i>et al.</i>, 2023)	28,47	35,44	20,05
Palha de trigo (Jiang <i>et al.</i>, 2023)	17,1	44,4	24,7
Palha de arroz (Rani <i>et al.</i>, 2024)	13,81	35,50	35,50

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quando comparado aos demais substratos, o bagaço de *A. sisalana* apresentou baixa concentração de lignina (20,17%) e a menor concentração de hemicelulose (12,96%) entre os substratos avaliados, o que pode indicar que o bagaço de *A. sisalana* pode ser mais facilmente aproveitado num processo de hidrólise fúngica.

Isso porque, conforme Shimizu (2018), a lignina funciona como uma barreira, protegendo a celulose, culminando na baixa acessibilidade desta, à ação de enzimas, o que vem a dificultar o processo de hidrólise da celulose. Adicionalmente, o mesmo autor acrescenta que a lignina é um tipo de polímero aromático e sua presença afeta a digestão e a transformação da biomassa em outros produtos. Assim, quando existem baixos teores de lignina, a celulose fica mais exposta, facilitando o acesso de enzimas extracelulares secretadas por fungos.

Condição diversa foi encontrada no caule de mandioca e na grama napier, que apresentaram teores mais altos de lignina (28% e 28,47%, respectivamente), o que poderia dificultar o acesso e a degradação da celulose por enzimas e, como consequência, limitar a produção de açúcares redutores e biogás. Além disso, estes substratos apresentaram os teores mais baixos de celulose (35 e 35,44%, respectivamente). Apesar do exposto, Bolonhesi *et al.* (2023) e Balakrishnan *et al.* (2023) obtiveram êxito na produção de hidrogênio a partir destes resíduos após realizarem pré-tratamento para remoção de hemicelulose e lignina.

Bolonhesi *et al.* (2023) avaliaram o potencial do caule de mandioca para a produção de hidrogênio ao utilizá-lo como material de suporte em um reator de biofilme de sequenciamento anaeróbio (AnSBBR) num processo de fermentação escura. Em seus experimentos, os autores obtiveram uma taxa de produção volumétrica de hidrogênio entre 670 e 1.480 mL H₂/L.d ao variarem as condições operacionais no reator. Além disso, a produção de hidrogênio foi favorecida pela adoção de dois tipos de pré-tratamento: a hidrólise ácida e a hidrólise a vapor.

Na tentativa de favorecer a acessibilidade à celulose, Balakrishnan *et al.* (2023) realizaram o pré-tratamento alcalino com NaOH da grama Napier. Após este pré-tratamento, os autores realizaram ensaios para a produção de biohidrogênio por fermentação escura e concluíram que a adoção de condições mesofílicas favoreceu a produção máxima de hidrogênio (763,34 mL), observando que o pH 5,5 foi mais indicado para a produção de hidrogênio.

A palha de trigo apresentou uma composição balanceada, com teores consideráveis de hemicelulose (24,7%). Jiang *et al.* (2023) utilizaram este substrato submetendo-o a um pré-tratamento com ácido oxálico diidratado, seguido de um pré-tratamento (hidrólise enzimática)

com celulase (*Cellic@ CTec3*, 160 FPU/ml). O material pré-tratado seguiu para fermentação anaeróbia em um reator tubular de vidro (417 mL) com suspensão de *Enterobacter aerogenes* a 37 °C, no qual obteve-se um rendimento máximo de biohidrogênio de 114,04 mL H₂/g ST.

Rani *et al.* (2024) produziram 90,52 mL de hidrogênio ao realizar experimentos com palha de arroz. Os autores operaram reatores em batelada de 125 mL selados com tampa hermética, mantidos a 37°C e agitados a 120 rpm, nos quais zelou-se pela inibição de arqueias metanogênicas ou outras bactérias consumidoras de hidrogênio, bem como pelo enriquecimento das culturas de produtoras de hidrogênio. A baixa produção de hidrogênio pode ser justificada por possíveis falhas na etapa de pré-tratamento, realizado com hidróxido de sódio 2%.

Miftah *et al.* (2022), investigando a aplicação da folha de cana-de-açúcar como substrato para produção de H₂ por digestão anaeróbia, realizaram dois pré-tratamentos na biomassa: um químico, com solventes eutéticos profundos, e um biológico, com uso de microrganismos celulolíticos. Após esta etapa os autores obtiveram uma expressiva produção volumétrica de hidrogênio, entre 2.135 e 3.187 mL H₂/L.

A folha de cana-de-açúcar apresentou 25,23% de hemicelulose (Miftah *et al.*, 2022), que é fonte importante de açúcares fermentáveis, o que pode ter favorecido a conversão para biohidrogênio. É importante ainda pontuar que encontra-se maior quantidade de celulose no bagaço de agave (47,52%), quando comparado a folha de cana-de-açúcar (36,18%), pode torná-lo mais atrativo para processos de produção de biohidrogênio, desde que as dificuldades de conversão devido ao alto teor de lignina possam ser superadas.

5.2 Produção de açúcares redutores em reatores biológicos operados com *Trametes spp* e bagaço de *A. sisalana*

A degradação biológica da biomassa lignocelulósica é geralmente lenta, em razão da estrutura cristalina do substrato e da presença de compostos recalcitrantes, como a lignina (Aguiar Filho, 2008). A lignina dificulta o acesso das enzimas à celulose e à hemicelulose, o que pode limitar a produção de açúcares redutores (Shimizu, 2018).

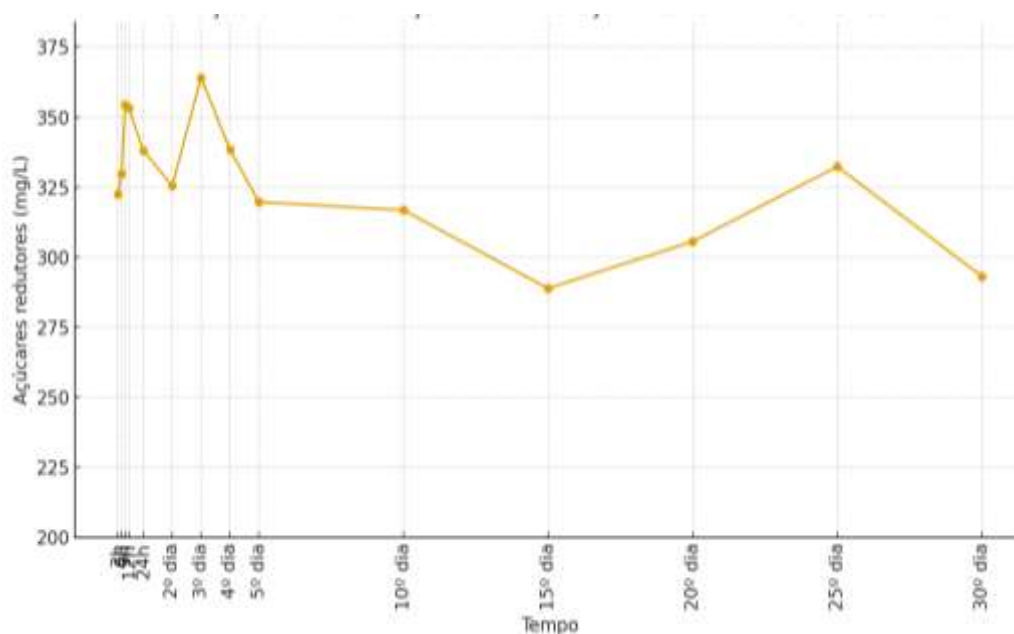
Esta etapa do trabalho teve como objetivo compreender de forma completa a dinâmica de produção dos açúcares redutores (ARs) nos reatores biológicos operados nesta pesquisa. A compreensão desse processo é fundamental, uma vez que os açúcares fermentescíveis produzidos nos reatores foram posteriormente convertidos, também por via biológica, em biohidrogênio.

Após a condução de experimento utilizando reatores biológicos operados em regime de batelada com *Trametes spp* e bagaço de *A. sisalana*, obteve-se os dados apresentados na Figura 22.

Neste trabalho optou-se por monitorar a produção de açúcares redutores nos tempos 3h, 6h, 9h, 12h, 24h (1 dia), 48h (2 dias), 72h (3 dias) e 96h (4 dias), como em Ribeiro (2010), mas também optou-se por monitorar a produção de ARs no 5º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias, como em Menezes *et al.* (2009), de forma a garantir o monitoramento mais completo.

A coleta de dados nas primeiras horas possibilitou uma compreensão mais detalhada da cinética inicial da produção de açúcares redutores, uma vez que o acompanhamento das primeiras horas é fundamental, pois muitos processos metabólicos e adaptações microbianas ocorrem logo após a partida do sistema.

Figura 22 – Concentração de açúcares redutores em reatores biológicos operados com *Trametes spp* e bagaço de *A. sisalana* em meio basal.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A concentração média de ARs no período total de operação dos reatores foi de 327,31 $\pm$ 20,32 mg/L, estando as maiores concentrações de ARs no lado esquerdo do gráfico, nos menores tempos.

Considerando os dados obtidos, é possível observar que a diferença entre a maior concentração de ARs (364,05 mg/L no 3º dia) e a menor (288,85 mg/L no 15º dia) foi de quase 80 mg/L, sendo que as menores concentrações de ARs ao foram observadas após o 5º dia.

Conforme a Tabela 5, foi encontrado um efeito principal do tempo estatisticamente significativo ($F(13,26)=2,7$, $p=0,014$). Isso demonstra que a concentração média de açúcares redutores varia significativamente ao longo dos 14 períodos de medição.

Quanto ao efeito das repetições dos reatores (triplicata), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as triplicatas de reatores ($F(2,26)=0,4$, $p=0,647$). Isso significa que, em todos os tempos, nenhum reator de cada triplicata produziu mais ou menos açúcares que os outros. Ou seja, a principal fonte de variação na concentração de açúcares redutores é o tempo de reação, não as réplicas do reator. A comparação par a par entre os 14 tempos testados utilizando o teste de *Tukey* está presente no Apêndice A.

Houve diferenças significantes ao comparar o 3º dia ao 15º e 30º dia, os quais apresentaram médias 75,2 e 70,9 menores em comparação ao 3º dia. Os demais tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

Tabela 5 – Análise de variância - açúcares redutores.

	SQ parcial	GL	QM	F	Valor p
Modelo	19488,9	15	1299,3	2,4	0,022
Reator	472,6	2	236,3	0,4	0,647
Tempo	19016,3	13	1462,8	2,7	0,014
Resíduos	13863,6	26	533,2		

SQ parcial = Soma dos quadrados parcial; GL = Graus de liberdade associados a cada fonte de variação; QM = Quadrado médio ($QM = SQ/GL$); F = Estatística F do teste ANOVA; Valor p = Probab. associada ao teste F.
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Estudo apresentado por Matei (2018) demonstra que a aplicação do fungo *Trametes spp* no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e da casca de arroz resultou na produção de 0,22 g/L (220mg/L) e 0,30 g/L (300 mg/L) de açúcares redutores, respectivamente.

Os resultados são relativamente próximos aos obtidos nesta pesquisa e Matei (2018) considerou os resultados satisfatórios ao refletir que a produção de açúcares redutores ocorreu sem a necessidade de um alto gasto energético e sem a formação de compostos tóxicos durante o pré-tratamento da biomassa. Realidade diferente ocorre em outros trabalhos científicos e na indústria de bioetanol de segunda geração (2G), que utilizam métodos físico-químicos para o tratamento da biomassa.

Sabe-se que, ao mesmo tempo em que os fungos são capazes de produzir açúcares redutores a partir da degradação da lignocelulose, durante a hidrólise fúngica ocorre também o consumo de açúcares para suas necessidades de crescimento e metabolismo (Hartmann, 2017). Deste modo, observa-se então que a Figura 22 reflete não apenas a produção de ARs,

mas sim a variação na dinâmica de produção e consumo de açúcares redutores, refletida na sua concentração ao longo do tempo avaliado.

Assim, a queda na concentração de ARs pode representar, então, não apenas uma fase com menor produção, mas sim uma fase com um maior consumo de açúcares pelo fungo *Trametes spp.* para suas necessidades de crescimento, reprodução e metabolismo, o que justifica o aumento na concentração (produção) de ARs, por exemplo, no 25º dia.

Figuerola-Rosales *et al.* (2020) estudaram o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de açúcares redutores para a posterior produção de bioetanol. No entanto, após realizar o pré-tratamento biológico com o fungo, Figuerola-Rosales *et al.* (2020) realizaram um pré-tratamento alcalino com NaOH 20%. Possivelmente esta segunda etapa muito contribuiu para a produção dos 7,3 mg/mL (7.300 mg/L) de ARs obtidos, contudo, com a introdução de uma etapa alcalina, contrai-se a obrigação do gerenciamento dos resíduos químicos gerados, bem como aumenta-se os custos de produção dos ARs.

A produção de açúcares redutores apresentada neste trabalho é resultado da atuação sinérgica de um conjunto de enzimas lignolíticas e hidrolíticas produzidas pelo fungo *Trametes spp.* Outros mecanismos não enzimáticos também podem ter colaborado para esta produção, no entanto, o escopo deste trabalho se deteve à investigação apenas dos mecanismos enzimáticos lignolíticos.

Além disso, considera-se que o processo de autoclavagem utilizado na esterilização do meio possa ter favorecido adicionalmente a liberação de ARs, uma vez que essa técnica envolve a aplicação de altas temperaturas e pressões, condições capazes de promover a ruptura de estruturas e a solubilização de componentes presentes no substrato.

Por fim, como restou comprovado que no 3º dia houve uma produção superior de ARs em relação aos demais dias, o hidrolisado produzido por este reator foi reservado para ser utilizado na etapa seguinte, visando a sua aplicação na produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia. Também foi reservado para ser utilizado na etapa seguinte hidrolisado produzido no reator $t = 1$ dia.

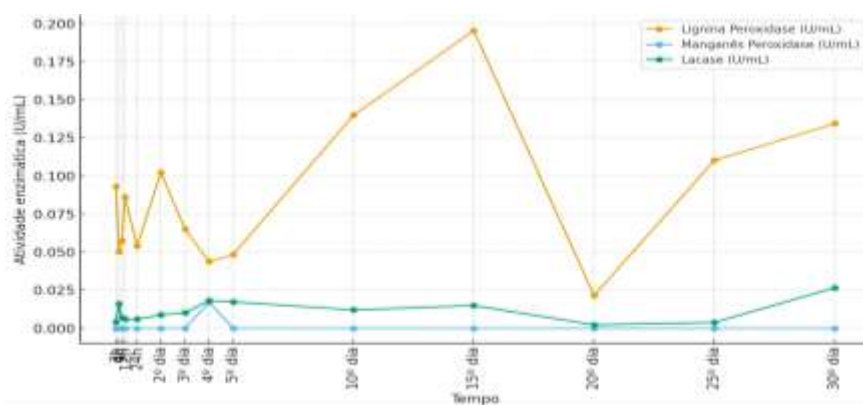
5.3 Atividade enzimática em reatores biológicos operados com *Trametes spp.* e bagaço de *A. sisalana*

Como dito anteriormente, acredita-se que a produção de açúcares redutores nesta pesquisa, apresentada no tópico anterior, ocorreu devido à hidrólise fúngica da biomassa lignocelulósica e também ao tratamento físico associado ao processo de autoclavagem. Embora a autoclavagem não tenha sido realizada com o propósito de redução de sua cristalinidade do substrato, é possível que esse processo tenha colaborado para melhoria de sua digestibilidade.

Considerando que os fungos utilizam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos na degradação da BLC (Andlar *et al.*, 2018) e que estes microrganismos apresentam um sistema enzimático altamente eficiente, optou-se por avaliar a atividade enzimática nos reatores em questão, com o objetivo de investigar o papel desempenhado pelas enzimas lignolíticas secretadas pelo fungo *Trametes spp.* na degradação da lignina presente no bagaço de agave.

Neste estudo, em função do escopo experimental adotado e das condições disponíveis para a condução das análises, foram investigadas apenas as enzimas lignolíticas. Apesar da ausência de investigação direta das enzimas celulolíticas, a avaliação das enzimas lignolíticas já permite compreender aspectos relevantes da degradação da lignina, pois estas enzimas contribuem para a maior acessibilidade da fração celulósica da biomassa. A Figura 23 apresenta atividade enzimática de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase em reatores biológicos operados com *Trametes spp* e bagaço de agave em meio basal.

Figura 23 – Atividade enzimática de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase em reatores biológicos operados com *Trametes spp* e bagaço de agave



Fonte: Elaborado pela autora

Embora o experimento tenha sido realizado em fermentação submersa com um meio basal suplementado com nutrientes, esse meio não continha açúcares simples. Assim, o fungo *Trametes spp.* tinha disponível basicamente o carbono estrutural do bagaço de *A. sisalana*, que é um substrato recalcitrante. Acredita-se que devido a essa limitação de carbono facilmente assimilável, *Trametes spp.* passou a ajustar seu metabolismo, estimulando a produção de enzimas associadas ao metabolismo secundário

A atuação dessas enzimas promove a degradação da lignina, facilitando o acesso à celulose e à hemicelulose, o que se reflete na liberação de açúcares redutores. Dessa forma, a produção de parte dos açúcares observada neste trabalho pode uma consequência direta da ativação do metabolismo secundário do fungo.

Assim como neste trabalho, Antunes (2015) constatou uma produção mais expressiva de LiP, uma produção discreta de LAC e uma baixa, quase nula, produção de MnP. O pesquisador realizou estudo semelhante a este, operando reatores com uma BLC (bagaço de cana-de-açúcar) e uma espécie de fungo (*Pycnoporus sanguineus*).

No presente trabalho a enzima lignina peroxidase (LiP) foi a que apresentou os maiores níveis de atividade entre as enzimas avaliadas, com valor médio de $0,08581 \pm 0,01121$ U/mL (ou $85,81 \pm 11,21$ U/L), evidenciando sua importância na degradação da lignina.

A atividade da Lignina Peroxidase variou de forma significativa ao longo dos 30 dias. O efeito do tempo foi estatisticamente significativo ($F(13,18)=3,1$, $p=0,014$), conforme demonstrado na Tabela 6. A comparação par a par entre os 14 tempos testados utilizando o teste de *Tukey* está presente no Apêndice B.

Quanto ao efeito do tempo, houve diferenças significantes ao comparar cinco pares de tempos: 6h, 9h, 24h, 3º dia e 4º dia, todos em comparação ao 15º dia.

Tabela 6 – Análise de variância - enzima LiP

	SQ parcial	GL	QM	F	Valor p
Modelo	0,069	15	0,0046	2,7	0,021
Reator	0,002	2	0,0010	0,6	0,564
Tempo	0,067	13	0,0052	3,1	0,014
Resíduos	0,030	18	0,0017		

SQ parcial = Soma dos quadrados parcial; GL = Graus de liberdade associados a cada fonte de variação; QM = Quadrado médio ($QM = SQ/GL$); F = Estatística F do teste ANOVA; Valor p = Probab. associada ao teste F.
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quanto ao efeito das repetições dos reatores (triplicata), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as triplicatas de reatores para LiP ($F(2,18)=0,6$; $p=0,564$).

Apesar de *Trametes spp.* figurar na literatura como um grande produtor de LiP, poucos trabalhos foram localizados após realizar uma busca por estudos que aplicaram este fungo com o objetivo de tratar resíduos agrícolas.

Na pesquisa desenvolvida por Matei (2018), não foi detectada atividade enzimática de LiP após a condução de experimentos de fermentação submersa para pré-tratamento de cana-de-açúcar com *Trametes spp.* Contudo, no trabalho de De Souza (2024), verificou-se a presença de LiP máxima na ordem de 65 U/L ao utilizar este mesmo fungo em serrapilheira como substrato.

Ao explorar estudos que investigaram a produção de LiP por outras espécies de fungos utilizando uma BLC como substrato, encontramos um volume maior de trabalhos, que também apresentavam uma produção mais robusta da enzima.

A exemplo, Antunes (2015) buscou pré-tratar bagaço de cana-de-açúcar aplicando o fungo *Pycnoporus sanguineus* e obteve um pico de produção de LiP (420 U/L) no décimo quarto dia de operação de seus reatores. Como, diferentemente do observado no presente trabalho, após o pico observou-se o progressivo decaimento da produção de LiP até a estabilização da produção em 1 U/L, Antunes (2015) associou o declínio à provável escassez de nutrientes, bem como ao possível acúmulo de metabólitos secundários, que geram a inibição da enzima.

No presente trabalho, a enzima lacase apresentou atividade mais discreta, com um pico (também discreto) ao final do experimento (0,02664 U/mL ou 26,64 U/L no 30º dia). Uma primeira via de interpretação pode ser a de que, neste experimento, a enzima exibe apenas uma participação complementar, especialmente na oxidação de compostos fenólicos resultantes da quebra da lignina.

O efeito do tempo foi altamente significativo ($F(13,20)=10,8$; $p<0,001$) na atividade da enzima lacase, que muda de forma muito expressiva ao longo do experimento, conforme demonstrado na Tabela 7. A comparação par a par entre os 14 tempos testados utilizando o teste de Tukey está presente no Apêndice C. Houve diferenças significantes ao comparar 26 pares de tempos (equivalente a 21.1% das comparações).

Tabela 7 – Análise de variância - enzima LAC.

	SQ parcial	GL	QM	F	Valor p
Modelo	0,001	15	0,0001	9,6	< 0,001
Reator	0,000	2	0,0000	1,4	0,270
Tempo	0,001	13	0,0001	10,8	< 0,001
Resíduos	0,000	20	0,0000		

SQ parcial = Soma dos quadrados parcial; GL = Graus de liberdade associados a cada fonte de variação; QM = Quadrado médio (QM = SQ/GL); F = Estatística F do teste ANOVA; Valor p = Probab. associada ao teste F.
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quanto ao efeito das repetições dos reatores (triplicata), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as triplicatas de reatores para LAC ($F(2,20)=1,4$; $p=0,270$).

Corrêa (2023) também detectou uma baixa concentração de lacase ao investigar a aplicação da linhagem *T. asperellum* para degradação de bagaço de uva e de farelo de trigo. O autor reconheceu a baixa produção da enzima (1,5 U/g), associando-a uma possível baixa relação C/N durante todo processo fermentativo, e considerou que a suplementação do meio fermentativo pode ser uma alternativa para melhorar essa relação. Isso é possível, uma vez que o carbono ajuda no crescimento das células, fornecendo energia (Corrêa, 2023). Já o nitrogênio, que costuma ser o segundo componente mais presente no meio fermentativo, é usado na produção de partes da célula que contêm nitrogênio, como os aminoácidos e as purinas (Suryadi *et al.*, 2022).

Para contornar o problema de baixa de baixa produção de enzimas como lacase e manganês peroxidase por *Trametes trogii* para degradação de BLC (serragem e maravalha), Levin *et al.* (2008) adicionaram extrato de malte e peptona aos seus reatores. Após a adição destas fontes facilmente assimiláveis de carbono e nitrogênio no meio de cultura, os autores observaram um aumento significativo na produção de enzimas.

Apesar de a investigação da relação C/N não ter sido realizada no presente estudo, esta pode ser uma segunda via de interpretação para justificar a baixa produção de LAC aqui observada.

Por fim, no presente trabalho, a enzima manganês peroxidase (MnP) foi detectada apenas no 4º dia (0,01701 U/mL ou 17,01 U/L), que pode indicar que, para os reatores em questão, a atuação desta enzima foi bastante limitada no processo, possivelmente associada à degradação de frações mais simples da lignina.

No trabalho desenvolvido por Aguiar Filho (2008), também não foi constatada atividade de MnP após experimentos utilizando um fungo para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça. O autor utilizou o *Pleurotus ostreatoroseus*, que, assim como o fungo utilizado neste estudo (*Trametes spp.*), é um fungo de podridão branca. No entanto,

outros pesquisadores detectaram a presença da enzima MnP ao desenvolverem trabalhos utilizando fungos para o pré-tratamento de BLC. Na pesquisa de Soares (2023), por exemplo, foi possível identificar a presença de MnP em concentrações entre 8,42 e 27,64 U/L após condução de experimentos com *Trametes villosa* para degradar um meio enriquecido com borra de café.

Soares (2023) observou em sua pesquisa que a composição do meio de cultivo influencia significativamente na produção de enzimas. Esta pesquisadora investigou o uso de 11 (onze) meios de cultivo diferentes, aplicados em reatores contendo biomassa lignocelulósica e os fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus sp.* Soares (2023) observou, por exemplo, que a produção de lacase em reatores contendo *Trametes villosa* variou de 0 a 743.22 U/L a depender do meio de cultivo utilizado. Assim, entende-se que é possível obter maior ou menor produção de enzimas a depender do meio empregado nos reatores.

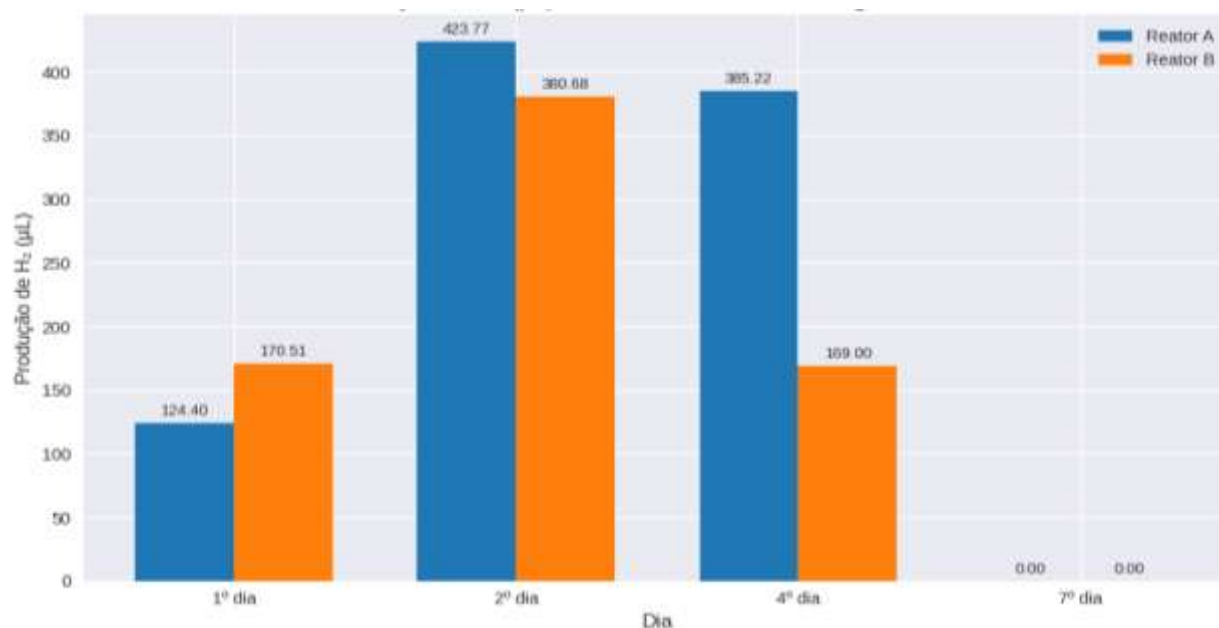
Para o desfecho desta seção, vale destacar que, neste trabalho, identificou-se ser possível produzir enzimas lacase (LAC) e lignina peroxidase (LiP) através do tratamento biológico do bagaço de *A. sisalana* com fungos. Estudos futuros podem ser realizados visando otimizar as condições de produção dessas enzimas, bem como realizar processos de purificação enzimática, o que poderá abrir caminhos para uma produção futura de enzimas comerciais utilizando a metodologia descrita neste trabalho.

5.4 Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios

Na etapa de caracterização do inóculo, verificou-se que o lodo anaeróbio apresentou concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) de $29,266 \pm 1,53$ g/L, indicando que o inóculo possui alta concentração de biomassa, favorável aos processos biológicos necessários na produção de H₂.

A condução de experimentos de fermentação utilizando sistemas simples contendo este inóculo, água destilada e hidrolisado em dois diferentes tipos de reatores, A e B permitiu uma produção de biohidrogênio nas quantidades demonstradas na Figura 24.

Figura 24 – Quantidade de biohidrogênio produzida nos reatores A e B, em μL



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

De acordo com a Figura 24, nos experimentos realizados nesta pesquisa observou-se variação na produção de biohidrogênio, com resultados que oscilaram desde produção nula, no sétimo dia, até uma produção máxima de 423,77 μL de H_2 (ou 0,0189 mmol de H_2), no segundo dia.

De forma geral, ambos os reatores, A e B, apresentaram um perfil de comportamento típico de sistemas fermentativos, sendo possível observar neles as fases de crescimento microbiano: fase lag, fase exponencial (logarítmica ou simplesmente log), fase estacionária e fase de declínio.

Passos (2018) afirma que a fermentação se inicia com a conversão do substrato em piruvato, via glicólise, relatando que a partir do piruvato vários produtos são formados, dentre eles o hidrogênio, por meio da ação de enzimas específicas, como as hidrogenases.

Apesar de o hidrolisado utilizado nesta pesquisa constituir um substrato de fácil assimilação microbiana, a produção de hidrogênio não ocorreu de forma rápida e imediata, uma vez que, nas horas iniciais do processo, a atividade metabólica está prioritariamente direcionada ao crescimento celular, adaptação dos microrganismos e síntese de enzimas, que precedem o aumento efetivo na geração de biohidrogênio, típico da fase seguinte.

Embora neste estudo não tenha sido realizada a modelagem cinética pelo modelo de *Gompertz* modificado para estimar a duração da fase lag, considera-se que a produção de biohidrogênio no primeiro dia ocorreu em níveis mais baixos, característicos dessa fase, na

qual os microrganismos passam por um processo de adaptação metabólica tanto ao ambiente quanto ao substrato.

Telles (2023) define a fase lag como o “tempo necessário para comunidade microbiana se adaptar e iniciar a produção de hidrogênio”, definição que concorda com a de Passos (2018), que considera a fase lag como o tempo necessário para que se inicie o crescimento exponencial dos microrganismos.

Nos experimentos com reatores (frascos de penicilina) com e sem agitação conduzidos Telles (2023), constatou-se que os frascos agitados apresentaram uma fase lag mais curta, entre $6,95 \pm 5,73$ e $47,05 \pm 5,16$ horas. Os reatores operados sem agitação por Telles (2023) apresentaram uma fase lag bastante tardia, de até $68,60 \pm 0,35$ horas, o que levou a autora a afirmar que a agitação favorece o crescimento microbiano no meio reacional.

O primeiro tempo avaliado nesta pesquisa (1º dia = 24 horas) se aproxima da faixa de tempo encontrada para fase lag nos reatores agitados de Telles (2023), indicando que promover a agitação nos sistemas dessa pesquisa foi uma decisão acertada.

Após a corrida cromatográfica foi possível verificar que no 1º dia, além do biohidrogênio, foram detectados outros compostos gasosos (coprodutos do processo fermentativo), os quais saíram em tempos de retenção superiores ao do biohidrogênio (t_R do $H_2 = 0,995$ min). No primeiro dia de operação, foi identificado um pico adicional com tempo de retenção de 5,685 min referente ao Reator A. Observou-se ainda, no primeiro dia, a presença de dois picos adicionais no cromatograma referentes ao Reator B, com tempos de retenção de 2,543 min e 4,703 min.

É preciso pontuar que esses picos de coprodutos possuíam áreas abaixo do limite de detecção do método ($LD = 0,276$), impossibilitando sua identificação e quantificação. Assim, apesar da leitura desses compostos, não foi possível realizar sua identificação devido às limitações analíticas.

Para encerrar as discussões referentes ao 1º dia, observa-se que os reatores A e B produziram 124,40 e 170,51 μL de H_2 , respectivamente. Assim, o Reator B apresentou produção de H_2 aparentemente superior (37%) à do Reator A, contudo, devido à ausência de replicações experimentais (duplicata, triplicata ou mais), não foi possível aplicar testes estatísticos que confirmassem se essa diferença é realmente significativa. Dessa forma, pouco se pode afirmar então, em termos estatísticos, sobre a superioridade da produção de um reator em relação ao outro.

A maior produção de hidrogênio no presente trabalho foi observada no segundo dia e acredita-se ser possível afirmar que em “t = 2 dias” o sistema estava na fase logarítmica, na qual os microrganismos estão em processo de maior produção de H₂.

De acordo com Machado (2016) é na fase log da curva de crescimento que ocorre um aumento acelerado da quantidade de microorganismos e uma maior atividade fermentativa, sendo esta a fase que apresenta um maior rendimento na produção do gás de interesse. Concordando com Machado (2016), Passos (2018) afirma que a fase log é aquela que coincide com a fase acidogênica do processo anaeróbico e é nesta etapa que as bactérias produtoras de hidrogênio apresentam maior eficiência metabólica, convertendo o substrato orgânico em ácidos fermentativos (ex.: ácido acético, ácido butírico), CO₂ e H₂.

Durante a fase log, pode ocorrer uma redução do pH do sistema devido ao acúmulo de ácidos fermentativos no meio, tornando-o mais ácido. Sabe-se que o pH é um dos parâmetros mais importantes para o desempenho de bioprocessos, pois impacta diretamente no crescimento microbiano e, por consequência, na eficiência da produção de hidrogênio.

Gioannis *et al.* (2014), verificaram em suas pesquisas que a faixa ideal para a geração de biohidrogênio é aquela entre pH 6,5 e 7,5. Os autores constataram em seus biorreatores que quando o pH estava abaixo de pH 5,5, havia uma queda drástica na produção de hidrogênio.

De acordo com Zagrodnik e Laniecki (2015), alterações no pH podem ainda comprometer a estrutura de proteínas essenciais ao metabolismo da microbiota, reduzindo a atuação de enzimas envolvidas nas rotas bioquímicas responsáveis pela formação do hidrogênio. Nesse contexto, a adição de um agente tamponante na montagem dos reatores poderia contribuir para manter o pH próximo ao valor ótimo para o crescimento microbiano, evitando a inibição enzimática causada pela acidificação excessiva, medida que não foi adotada nesta pesquisa.

Passos (2018) identificou que a fase log de seus experimentos ocorreu entre 13 e 40h. No entanto, é importante observar que o autor utilizou uma cultura pura de *Clostridium beijerinckii* que, segundo Silva *et al.* (2017), é um importante microorganismo produtor de biohidrogênio por processos fermentativos anaeróbios. Assim, a fase log na presente pesquisa pode ter sido um pouco mais tardia devido à cultura utilizada (cultura mista), associada à baixa disponibilidade de açúcares redutores.

É preciso ressaltar que, embora no Reator B fosse encontrada maior concentração inicial de açúcares redutores, foi no Reator A que se observou uma maior produção de hidrogênio no período, o que pode ser atribuído à ocorrência de uma maior atividade enzimática das hidrogenases ou mesmo a menor competição microbiana nesse reator. No

entanto, pouco se pode afirmar em termos estatísticos sobre a existência de diferença significativa entre os resultados de cada reator, uma vez que, conforme já discutido anteriormente, não foi possível estimar a variabilidade experimental nesta etapa do trabalho.

Para finalizar as discussões inerentes ao 2º dia de operação dos reatores, observou-se que, embora na fase log seja esperado que também ocorra a produção de CO₂, por exemplo, nos cromatogramas não foram detectados outros compostos gasosos considerados como coprodutos do processo fermentativo em nenhum dos reatores, o que pode significar a ocorrência de falhas na operação.

Ao quarto dia, verificou-se em ambos os reatores uma redução na produção de hidrogênio, sendo este declínio menos acentuado no Reator A, que apresentou uma queda de 9,10% na quantidade de hidrogênio produzido em relação ao período anterior (2º dia).

Essa produção, quase que constante (sem queda abrupta que indique colapso metabólico), pode ser característica da fase estacionária, momento que sucede a fase exponencial (log) e é marcada pelo estabelecimento de um equilíbrio entre a taxa de crescimento celular e a taxa de morte dos microrganismos. Nesta fase, ocorre uma diminuição da atividade metabólica, uma vez que as condições do meio passam a se tornar desfavoráveis, exigindo mecanismos de adaptação por parte da microbiota.

Ainda no quarto dia, verificou-se que a redução na produção de biohidrogênio no Reator B ocorreu de forma mais acentuada que no Reator A, com decréscimo de 55,61% em relação ao período anterior (2º dia), que pode ser entendido como um comportamento típico da fase de declínio.

Nessa etapa, a diminuição na disponibilidade de nutrientes, associada ao acúmulo de metabólitos tóxicos, passa a ser um limitante para a atividade metabólica dos microrganismos, tornando as condições ainda mais desfavoráveis. Como consequência, a taxa de mortalidade celular torna-se superior à taxa de multiplicação, resultando em uma diminuição da população microbiana, acompanhada por processos de lise celular e liberação de compostos intracelulares no meio.

Ainda sobre o quarto dia, o Reator A apresentou um pico associado a geração de coprodutos em $t_r = 1,788$ min. O pico possuía área de 0,422, superior ao limite de detecção do método, confirmando a produção mensurável de um coproduto gasoso neste período. Apesar da detecção desse composto no quarto dia, sua identificação não foi possível devido à ausência de padrões cromatográficos de referência e às limitações analíticas do método.

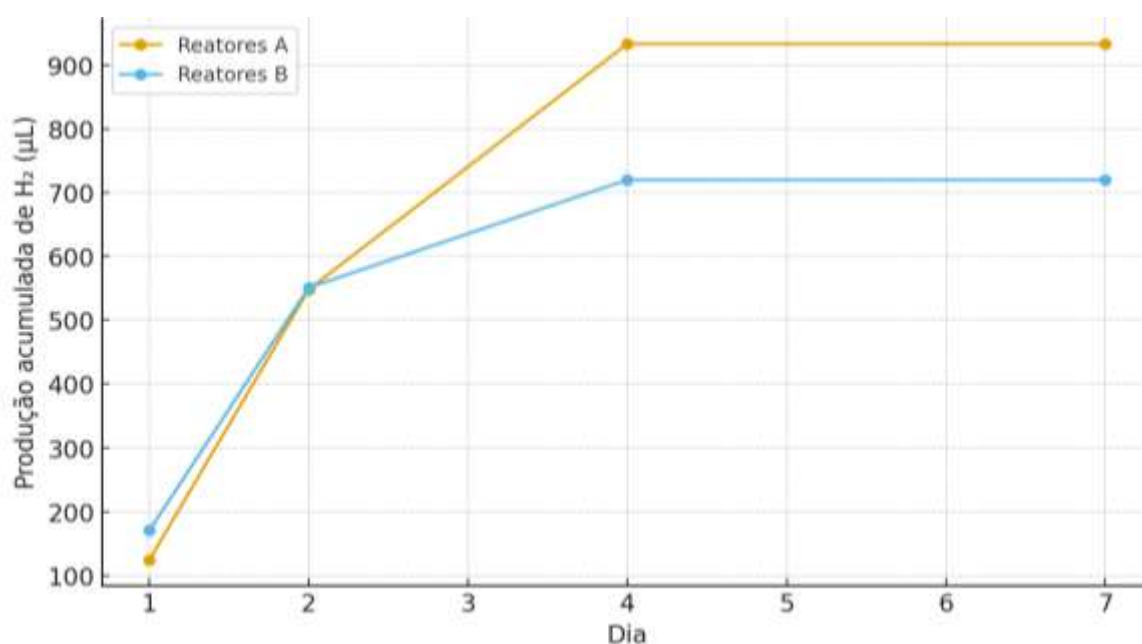
No sétimo dia, os cromatogramas não registraram picos que indicassem a presença de biohidrogênio, o que indica que a produção do gás havia cessado por completo. Nessa etapa

do processo, a concentração de nutrientes e carboidratos fermentescíveis (ARs) possivelmente já estava extremamente reduzida, limitando a atividade celular e impedindo a continuidade das reações metabólicas responsáveis pela geração de H_2 .

Além disso, um possível acúmulo de substâncias tóxicas produzidas pelas próprias bactérias pode ter deixado o ambiente ainda mais desfavorável, causando estresse nas células e diminuindo sua capacidade metabólica. Somado a isso, é possível que o pH tenha baixado muito aquém das faixas ideais, contribuindo para a interrupção completa da produção de biohidrogênio. Dessa forma, o quadro observado no sétimo dia representa uma fase de colapso metabólico, típica do final (declínio ou morte) do ciclo fermentativo, quando as bactérias já não conseguem manter atividade suficiente para gerar H_2 em quantidades detectáveis.

Para o desfecho destas discussões, destacamos que o conjunto de reatores A, de modo geral, aparentemente apresentou desempenho superior ao conjunto de reatores B. No total, considerando-se a soma das produções nos dias 1 (24h), 2 (48h), 4 (96h) e 7 (168h), os reatores A produziram 933,38 μL (ou 0,0417 mmol) de H_2 , enquanto os reatores B totalizaram 720,19 μL (ou 0,0322 mmol) de H_2 . A Figura 25 mostra a produção acumulada de H_2 ao longo do tempo para os Reatores A e B.

Figura 25 – Produção acumulada de H_2 ao longo do tempo para os Reatores A e B



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Importa novamente destacar que a produção máxima de hidrogênio observada no Reator A ocorreu no segundo dia, alcançando 423,77 μL de H_2 . Embora esse valor pareça modesto quando analisado isoladamente, a produção se torna mais expressiva quando relacionada à quantidade de substrato disponível. O hidrolisado adicionado ao reator apresentava apenas 338,12 mg/L de açúcares redutores. Como foi empregado somente 25 mL de hidrolisado no reator, a oferta efetiva foi de 8,453 mg (0,008453 g) de ARs. Assim, o rendimento nesse dia foi de aproximadamente 50,13 mL de H_2 por grama de açúcar.

Outra perspectiva importante para avaliar o desempenho do sistema é relacionar a produção de biohidrogênio à quantidade de biomassa utilizada para gerar o hidrolisado. No presente experimento, os 423,77 μL de H_2 registrados no segundo dia foram obtidos a partir de um hidrolisado produzido com 3 g de bagaço de *Agave sisalana*. Com o volume de hidrolisado produzido acreditamos ser possível montar pelo menos dez reatores nas configurações adotadas neste trabalho para a produção de H_2 . Assim, quando essa relação é ajustada para uma base de um grama de biomassa, o rendimento estimado alcança pelo menos 1,41 mL de H_2 por grama de bagaço.

Esses valores demonstram que, mesmo com uma quantidade reduzida de material lignocelulósico e com os baixos teores de açúcares obtidos pelo pré-tratamento biológico com fungos, o processo apresentou uma boa capacidade de conversão. Assim, pode-se afirmar que o bagaço de *Agave sisalana* tem potencial para aplicações em sistemas fermentativos destinados à geração de biohidrogênio.

Acredita-se que neste trabalho a produção inferior àquela observada em Balbino (2020) deve-se principalmente ao fato de não terem sido utilizados agentes químicos para o tratamento do substrato (bagaço de *A. sisalana*) e nem do inóculo (lodo anaeróbio), o que levou também a uma produção de biohidrogênio completamente limpa e sem geração de resíduos que requeiram destinações especiais.

No entanto, apesar dessa vantagem do presente trabalho, é preciso pontuar que o tratamento biológico com fungos e sem o emprego de agentes químicos se demonstrou bastante lento, produzindo um hidrolisado com baixo teor de açúcares, quando comparado a outros trabalhos que realizaram, por exemplo, um pré-tratamento químico na BLC.

Uma alternativa para este problema pode ser a aplicação de outras espécies de fungos, mais especializadas na degradação de biomassa lignocelulósica como *Pleurotus* spp., *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia* spp. (Andlar *et al.*, 2018). Outra possibilidade é a aplicação de consórcios de fungos, empregando-se duas ou mais espécies para o pré-

tratamento biológico do substrato, com objetivo de produzir um hidrolisado com maior concentração de açúcares redutores para o emprego nos reatores anaeróbios.

Outra alternativa para melhorar a produção de hidrogênio seria a adoção de medidas mais eficazes para garantir uma condição de baixa disponibilidade de oxigênio ou total anaerobiose nos sistemas operados. No presente trabalho adotou-se a fervura da água para a realizar desoxigenação térmica, no entanto, essa medida pode ter sido pouco eficaz para este fim.

Pesquisadores como Ribeiro (2022), Telles (2023), Borges (2024) e Nascimento (2024) e Ribeiro (2024), ao operarem reatores para a produção de H_2 , realizaram a purga dos reatores com gás nitrogênio (N_2) com a finalidade substituir todo o ar atmosférico (rico em oxigênio), garantindo a existência de condições anaeróbias dentro dos sistemas. Outros pesquisadores, como Balbino (2020), adotaram procedimento semelhante, optando por realizar a substituição do ar atmosférico presente no *headspace* dos reatores por meio da purga de Argônio.

Outra adaptação para aumentar a quantidade de hidrogênio produzido seria a realização de um pré-tratamento químico no inóculo, buscando favorecer a redução da população de arqueias metanogênicas com metabolismo hidrogenotrófico. Embora De Sá *et al.* (2011) tenham constatado em suas pesquisas que o tratamento térmico favorece uma maior produção de H_2 quando comparado com os tratamentos ácidos e alcalino, pode ser útil investigar, por exemplo, a combinação de dois ou mais tipos de tratamentos.

Outra alternativa para melhorar a produção de H_2 , seria realizar a adição de um agente químico tamponante para controlar as possíveis variações de pH nos sistemas. A redução indesejada do pH conduz à acidificação do reator, e há inúmeros relatos na literatura descrevendo a inibição do processo anaeróbio devido à queda de pH provocada pelo acúmulo de ácidos graxos voláteis, como observado por Pereira *et al.* (2009).

Kus e Wismann (1995) também consideram que baixos valores de pH em reatores anaeróbios estão relacionados a altas concentrações de ácidos graxos voláteis, levando, muitas vezes, à falência do processo. Considerando isto, Ismail *et al.* (2009), Lima (2020) e Ribeiro (2024) realizaram a adição de $NaHCO_3$ no lodo anaeróbio para tamponamento do processo, o que evitou o acúmulo de ácidos e o decréscimo do pH dos reatores operados por estes pesquisadores e garantiu a estabilidade dos sistemas.

No presente não foi realizada a modelagem cinética dos dados experimentais. Essa etapa não foi conduzida em decorrência de limitações relacionadas ao tempo disponível para a execução da pesquisa, bem como às condições operacionais e analíticas do estudo.

Assim, recomenda-se que trabalhos futuros empreguem modelos cinéticos, como o modelo de *Gompertz* modificado, como nos trabalhos de Balbino (2020) e Telles (2023), visando descrever quantitativamente a dinâmica da produção de hidrogênio, estimar parâmetros como tempo de fase lag, taxa máxima de produção e potencial máximo de geração de H₂, além de permitir uma melhor comparação entre diferentes sistemas.

A aplicação desse tipo de modelagem contribuirá para uma compreensão dos fenômenos bioquímicos envolvidos na fermentação anaeróbia, além de fornecer subsídios importantes para a otimização de processos.

Por fim, e não menos importante, é necessário pontuar que neste trabalho não foi possível realizar estudos adicionais como a identificação e quantificação das bactérias presentes no reator, a realização de ensaios utilizando reatores anaeróbios contendo culturas puras, a identificação dos demais gases produzidos, a investigação da influência de presença ou não de luz, a investigação da produção de inibidores e o monitoramento da produção de biogás em intervalos menores, por exemplo, hora a hora, de forma a desenvolver um entendimento completo sobre o assunto.

Apesar das lacunas deixadas, esta pesquisa fornece uma visão inicial sobre a produção de hidrogênio a partir do pré-tratamento biológico de *Agave sisalana* por uma espécie de fungos, atendendo o objetivo inicialmente proposto. Ficam abertos, através deste trabalho, os caminhos para o desenvolvimento de novos estudos que aprimorem as bases aqui construídas.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o fungo *Trametes spp.* foi eficaz na produção de açúcares redutores a partir do bagaço de *Agave sisalana*, demonstrando o potencial do pré-tratamento biológico com fungos para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. Os açúcares redutores gerados durante a hidrólise fúngica foram utilizados para a produção de hidrogênio em biorreatores operados em regime de batelada e, embora a quantidade de H₂ produzida possa inicialmente parecer pequena, os resultados obtidos mostram que o bioprocessado adotado é viável e pode ser otimizado em estudos futuros.

Algumas limitações dessa pesquisa comprometeram o aprofundamento de algumas discussões, mas não comprometem a relevância científica do presente trabalho, que apresenta uma contribuição para o avanço do conhecimento na área de biotecnologia aplicada à energia renovável ao demonstrar a viabilidade de realizar o pré-tratamento biológico do bagaço de *A. sisalana* seguido de uma fermentação anaeróbia para a produção de biohidrogênio.

Pesquisas futuras, seguindo as sugestões aqui apresentadas e explorando variáveis adicionais, poderão melhorar a eficiência do processo. Por ora, este trabalho representa uma contribuição significativa à comunidade científica, no contexto da geração de energia limpa e sustentável, alinhada com a crescente demanda por alternativas renováveis.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; PARK, J. H.; SANG, B. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122725, abr. 2020. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>. Acesso em: 05 jan. 2025.
- ADAMES, L. V. PIRES; L. O.; ADORNO, M. A. T.; MAINTINGUER, S. I. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, ISSN 1517-7076 artigos e12968, 2021. Acesso em: 07 nov. 2025.
- ADARME, O. F. H. **Produção de metano e hidrogênio com hidrolisados gerados no tratamento oxidativo do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise Enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP, Piracicaba, 2008. Acesso em: 17 nov. 2024.
- ALENCAR, M. S. **Pré-tratamento contínuo da biomassa de Agave tequilana em extrusora dupla-rosca**. Rio de Janeiro, 2023. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.
- ALVARENGA JR., E. R. Cultivo e aproveitamento do sisal: Agave sisalana. **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC**. (Dossiê técnico), 2022.
- AMEEN, F., MOSLEM, M., HADI, S., & AL-SABRI, A. E. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 2, p. 211–218, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>. Acesso em: 17 nov. 2024.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23th Edition. American Public Health Association, Washington, DC, 2017.
- ANDLAR M, REZIĆ T, MARĐETKO N, KRACHER D, LUDWIG R, ŠANTEK B. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Eng Life Sci**. J18(11):768-778. doi: 10.1002/elsc.201800039. 2018. Acesso em: 06 fev. 2025.
- ANTUNES, J. R. D. Q. **Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de enzimas lignolíticas fúngicas**. Tese (Doutorado em Tecnologias Ambientais). Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis.off AOAC International**. 20 ed. Editor: Dr. George W. Latimer, Jr. Rockville, MD, USA, 2016.

ARAÚJO, N. L.; AVELINO, K. V.; HALABURA, M. I. W.; MARIM, R. A.; KASSEM, A. S. S.; SANTANA, T. T.; COLAUTO, G. A. L.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Production of mycelial biomass and lignocellulolytic enzymes of *Pleurotus* spp. in liquid culture medium. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e6810111406, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11406>. Acesso em: 30 jan. 2025.

ATELGE, M.R.; ATABANI, A.E.; BANU, J. Rajesh; KRISA, David; KAYA, M.; ESKICIOGLU, Cigdem; KUMAR, Gopalakrishnan; LEE, Changsoo; YILDIZ, Y.ş.; UNALAN, S. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, [S.L.], v. 270, p. 117494, jun. 2020. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>. Acesso em: 15 jan. 2025.

BACHOFEN, R. M. **Análise da viabilidade dos processos de produção de hidrogênio verde a partir de biomassa**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

BAKSI, S., SAHA, D., SAHA, S., SARKAR, U., BASU, D., & KUNIYAL, J. C. Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization. **International journal of environmental science and technology: IJEST**, v. 20, n. 12, p. 13895–13922, 2023. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04838-4> . Acesso em: 27 dez. 2024.

BALAKRISHNAN, D., MANMAI, N., PONNAMBALAM, S., UNPAPROM, Y., CHAICHOMPOO, C., & RAMARAJ, R. Optimized model of fermentable sugar production from Napier grass for biohydrogen generation via dark fermentation. **International journal of hydrogen energy**, v. 48, n. 55, p. 21152–21160, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>. Acesso em: 30 dez. 2024.

BALBINO, E. S. **Produção de Hidrogênio a partir do Hidrolisado da Palha da Soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

BOLONHESI, I. B. DE T. M., ANDREANI, C. L., DE MELO, M. R., GOMES, S. D., & LOPES, D. D. Biomass immobilization in hydrolyzed lignocellulosic material can enhance biohydrogen production from cassava residues? **Biochemical Engineering Journal**, 190 (108725), 108725. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108725>. Acesso em: 03 jan. 2025.

BONFIM, G. A segurança está à mesa: segurança e soberania alimentar no Brasil. **Caderno de saúde pública**, 40(9), 2024. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPT126424>. Acesso em: 13 dez. 2024.

BORGES, F. S. S. **Estudo da potencialidade do glicerol bruto na prospecção de bioprodutos utilizando resíduo de suinocultura como inóculo**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento). Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2024. Acesso em: 19 nov. 2025.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.-T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) edodes. **FEMS microbiology letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00087-L](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00087-L). Acesso em: 1 set. 2024.

CABEZAS, L. F. C. **The growth of Tequila as a global beverage**. Dissertação (Mestrado em Gestão Internacional com Especialização em Marketing). Universidade Católica Portuguesa, Lisboa, 2024.

CAVALCANTE, A. V. **Biorremediação de pesticida por consórcio fúngico**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza, Fortaleza, 2024.

CAVALCANTE, F. S.; CAMPOS, M. C. C.; DE LIMA, J. P. S. **A percepção ambiental sobre fungos: uma revisão integrativa**. *Novos Cadernos NAEA*, v. 24, n. 3, p. 81-98, 2021, ISSN 1516-6481 / 2179-7536. Disponível em: <https://revista.facsur.net.br/index.php/rf/article/view/5>. Acesso em: 1 abr. 2025.

CHANG, Y., YANG, D., LI, R., WANG, T., ZHU, Y. Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 26, n. 15, p. 4403, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26154403>. Acesso em: 17 nov. 2024.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG). v. 5, 2ª ed. 2007.

CORREA, A. G. **Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes versicolor* e *Trichoderma asperellum* utilizando bagaço de uva e farelo de trigo como substratos**. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis). Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Biocombustíveis. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023

CUNHA, F. S., LIMA, S. B., & PIRES, C. A. DE M. (2024). Upgrade of bio-oil produced from the sisal residue composting. *Global change biology. Bioenergy*, v. 16, n. 3, 2024. <https://doi.org/10.1111/gcbb.13129>. Acesso em: 17 nov. 2024.

DA SILVA, M. G., GARCIA, K. G. V., MATTOS, A. L. A., PEREZ, E. H., DA SILVA MARTINS, T., DE AQUINO SOUSA, L. F. R., DA COSTA PINTO, A. M., ESCOBAR, M. E. O. Reduction of Cd²⁺ and Pb²⁺ bioavailability in contaminated soil treated with sisal residues (agave sisalana). *Water, air, and soil pollution*, v. 234, n. 2, 2023 <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06140-y>. Acesso em: 1 set. 2024.

DELFIN-RUIZ, M.E., CALDERÓN-SANTOYO, M. RAGAZZO-SÁNCHEZ, J.A., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J., AGUILAR-USCANGA, M.G. Ethanol Production from Enzymatic Hydrolysates Optimized of Agave tequilana Weber var. azul and Agave karwinskii bagasses. *Bioenergy research*, v. 14, n. 3, p. 785–798, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10196-7> Acesso em: 1 set. 2023.

DE PAULA, G. DA P., LIMA, R. F. C. DE, SALES, A. L. Â., ALVES, E. D., FELÍCIO, P. F., ROCHA, T. M., & NUNES, L. E. (2025). Anaerobic bacterial fermentation: A strategy for hydrogen production. *Research, Society and Development*, 14(1), e7814148081. doi: 10.33448/rsd-v14i1.48081. Acesso em: 05 dez. 2025.

DE SÁ, L. R. V., OLIVEIRA, T. C., SANTOS, A. M., OLIVEIRA, E. M. M., CAMMAROTA, V. S, FERREIRA-LEITÃO, V. S. Avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H₂ por bactérias anaeróbias. *LATIN AMERICAN*

WORKSHOP AND SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION, 5., 2011, Ouro Preto. Anais [...]. Ouro Preto: UFMG: UFOP, 2011. Acesso em: 16 nov. 2025.

DE SÁ, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Produção de Hidrogênio via Fermentação Anaeróbia—Aspectos Gerais e Possibilidade de Utilização de Resíduos Agroindustriais Brasileiros. **Quim. Nova** 37, 857–867. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>. 2014. Acesso em: 07 dez. 2025.

DE SOUSA, I. A. L., BOARI, A. J., & SANTOS, A. S. Ligninolytic enzyme potential of *Trametes* spp. associated with leaf litter in riparian forest of the Amazônia region. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e282099, 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.282099>. Acesso em: 30 jan. 2025.

DEVENS, K. U. **Produção de hidrogênio e metano por meio da co-digestão de água residuária do processamento de mandioca e glicerol e em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). São Carlos : Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024. Acesso em: 30 set. 2025.

DO CARMO, E. R., SHIMA, E. M. R. Práticas de conservação de solo e água na agricultura como ferramentas de mitigação da degradação ambiental no Brasil. **Cadernos Macambira**, v. 9, n. 2., 2024. p.15. - ISSN 2525-6580. Anais do III Seminário do Curso de Pós Graduação em Ciências Ambientais. <https://revista.lapprudess.net/CM/article/view/918> . Acesso em: 30 jan. 2025.

DORNELLES, H.S. **Desvendando o metabolismo e sintrofismo microbiano em Reatores. Anaeróbios de Leito Fluidificado aplicados a biodegradação de surfactantes: da engenharia às meta-ômicas**. Tese Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). São Carlos : Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

ESPADRIZANO, B.; COSTA, M. R.. Avaliação das propriedades físicas e mecânicas das fibras de sisal em compósito cimentício argamassado. **Ambiente Construído**, v. 25, p. e139353, 2025. <https://doi.org/10.1590/s1678-86212025000100863>. Acesso em: 30 mar. 2025.

ESTEVES. E. G. **Componentes nitrogenados: metodologias analíticas e associações com outros indicadores de qualidade do leite cru refrigerado**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) . Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FELIPE, F. M. C. **Biorrefinarias lignocelulósicas: desafios, inovações e perspectivas no desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento da biomassa**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

FERNANDES, A. L. **Enzimas Lignocelulolíticas e seu Potencial para Tratamento de Biomassa: Uma Revisão**. Monografia (Graduação em Biotecnologia). Instituto Latino-Americano de Ciências da vida e da natureza. Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

FERRARI, V. B.. **Potencial biotecnológico de actinomicetos isolados de biomas brasileiros para biotransformação e biodegradação de compostos**. 2024. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). São Paulo, 2024.

FIGUEROA-ROSALES, E. X.; AGUILAR-HUERTA, E.; GRANADOS-BAEZA, M. J.; QUINTO-HERNÁNDEZ, A. Bioethanol production from agro-industrial *Saccharum* spp. residues: using *Trametes versicolor* in simple fermentation and saccharification processes. **Agroproductividad**: v. 13,n. 9, pp: 103-109, 2020. <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1738> . Acesso em: 30 jan. 2025.

Food and Agriculture Organization. **The state of food and agriculture 2021: Making agrifood systems more resilient to shocks and stresses** (Food & Agriculture Organization, Org.). Roma, Italy: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2022.

FRONER JUNIOR, A.; TEVISAN, P. H. **Produção de hidrogênio verde musgo a partir de resíduo agroindustrial-vinhaça**. 2024. Monografia (Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Santa Maria-RS, 2025.

GALDINO, D. S. **Desempenho de painéis osb produzidos com madeira de pinus e adesivo à base de lignina e boro**.114f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica). Faculdade de Engenharia e Ciências, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2024.

GIOANNIS, G. de; FRIARGIU, M.; MASSI, E.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; SPIGA, D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930-20941, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046> Acesso em: 30 nov. 2025.

GRUENBERG, M. G., HALVORSON, J. J., & SCHMIDT, M. A. Kinetics of manganese peroxidase using simple phenolic compounds as substrates. **Metabolites**, v. 15(4), p. 254. <https://doi.org/10.3390/metabo15040254> Acesso em: 19 abr. 2025.

HARTMANN, C. **Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por macrofungos regionais para posterior produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal - Culturas temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro (RJ): Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão; 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=destaques>. Acesso em: 01 abr. 2025.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola – Lavoura Permanente | Sisal ou agave**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ce/pesquisa/15/12040>. Acesso em: 23 out. 2024.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE prevê safra de 322,6 milhões de toneladas para 2025, com crescimento de 10,2% frente a 2024**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de->

noticias/releases/42436-ibge-preve-safra-de-322-6-milhoes-de-toneladas-para-2025-com-crescimento-de-10-2-frente-a-2024 . Acesso em: 01 abr. 2025.

IGC - International Grains Council. **Projeção da safra global de grãos** . Disponível em: <https://www.igc.int/en/default.aspx> . Acesso em: 01 abr. 2025.

ISMAIL, F.; RAHMAN, N. A. A.; ABD-AZIZ, S.; LING, C. M.; HASSAN, M. A. Statistical optimization of biohydrogen production using food waste under thermophilic conditions. **The Open Renewable Energy Journal**, v. 2, n. 1, p. 124-131, DOI: 10.2174/1876387100902010124. 2009. Acesso em: 01 dez. 2025

JIANG, J., FU, J., AN, N., ZHANG, Y., CHEN, X., WANG, L. Rapid and effective molten oxalic acid dihydrate pretreatment to enhance enzymatic saccharification for biohydrogen production by efficient coextraction of lignin and hemicellulose in wheat straw. **Chemical engineering journal**, v. 475, n. 146422, p. 146422, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146422>. Acesso em: 25 jan. 2025.

KARTHIKEYAN, P. K., BANDULASENA, H. C. H., RADU, T. A comparative analysis of pre-treatment technologies for enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic waste. **Industrial crops and products**, v. 215, n. 118591, p. 118591, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118591>. Acesso em: 15 fev. 2025.

KUMAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, pp. 242-247, 1984. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80327-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80327-0). Acesso em: 10 nov. 2024.

KUMARI, D; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877–891, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>. Acesso em: 23 out. 2024.

KUS, F.; WIESMANN, U. Degradation kinetics of acetate and propionate by immobilized anaerobic mixed cultures. **Water Research**, New York, v. 29, n. 29, n. 6, p. 1437-43, 1995. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00285-F](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00285-F) . Acesso em: 26 out. 2025.

LEVIN, L., HERRMANN, C., & PAPINUTTI, V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes troglia* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 207-214, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.004>. Acesso em: 22 nov. 2025.

LIMA, G. P. **Produção de bio-hidrogênio a partir de frutas e vegetais residuais em reatores anaeróbios em batelada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia.. Maceió, 2020.

LYU, Q.; DAR, R. A.; BAGANZ, F.; SMOLÍŃSKI, A.; RASMEY, A.-H. M.; LIU, R.; ZHANG, L. Effects of lignocellulosic biomass-derived hydrolysate inhibitors on cell growth and lipid production during microbial fermentation of oleaginous microorganisms—A review. **Fermentation**, v. 11, n. 3, p. 121, 2025. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030121> . Acesso em: 25 nov. 2025

MACHADO, R. G. **Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação empregando cultura pura e co-cultura**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MADURAI ELAVARASAN, R., NADARAJAH, M., PUGAZHENDHI, R., SINHA, A., GANGATHARAN, S., CHIARAMONTI, D., ABOU HOURAN, M. The untold subtlety of energy consumption and its influence on policy drive towards Sustainable Development Goal 7. **Applied energy**, v. 334, n. 120698, p. 120698, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.120698>. Acesso em: 25 jan. 2025.

MARQUES, T. D. **Uma análise das trajetórias dos elementos constitutivos da agricultura brasileira contemporânea**. 176 p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Econômicas do Instituto de Economia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2024.

MARTINS, W. A. **Uma revisão abrangente das tendências de pesquisa global sobre produção de biohidrogênio em bioreatores: Um campo em desenvolvimento**. Monografia (Graduação em Engenharia de Energias) - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2023.

MARTINS, F. P., DE-LEÓN ALMARAZ, S., BOTELHO JUNIOR, A. B., AZZARO-PANTEL, C., Parikh, P. Hydrogen and the sustainable development goals: Synergies and trade-offs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 204, n. 114796, p. 114796, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114796>. Acesso em: 28 jan. 2025.

MATEI, J. C.. **Pré-tratamento de resíduos agroindustriais com enzimas ligninolíticas para produção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, pp. 68–78, 2009. Acesso em: 05 jan. 2025.

MESTRE, A. S., HESSE, F., FREIRE, C., ANIA, C. O., CARVALHO, A. P. Chemically activated high grade nanoporous carbons from low density renewable biomass (Agave sisalana) for the removal of pharmaceuticals. **Journal of colloid and interface science**, v. 536, p. 681–693, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.081>. Acesso em: 16 jan. 2025.

MIFTAH, A. K., SITTIJUNDA, S., IMAI, T., SALAKKAM, A., & REUNGSANG, A. (2022). Biohydrogen and methane production from sugarcane leaves pretreated by deep eutectic solvents and enzymatic hydrolysis by cellulolytic consortia. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 396, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080396>. Acesso em: 15 jan. 2025.

MORAIS, J. P. S., ROSA, F. M., & MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Embrapa [54 p.], 2010. Acesso em: 05 mar. 2025.

MUJTABA, M.; FRACETO, L. F.; FAZELI, M.; MUKHERJEE, S.; SAVASSA, S.M.; DE MEDEIROS, G. A.; DO ESPÍRITO SANTO PEREIRA, A.; DONNINI MANCINI, S.;

LIPPONEN, J.; VILAPLANA, F. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: A review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **J. Clean. Prod.** 2023, 402, 136815. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815> . Acesso em: 16 jan. 2025.

MUTHANGYA, M.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. K. Two-stage fungal pre-treatment for improved biogas production from sisal leaf decortication residues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10(11), 4805–4815, 2009. <https://doi.org/10.3390/ijms10114805>. Acesso em: 20 nov. 2024.

NASCIMENTO, L. X. **Produção de bio- hidrogênio por co-cultura de Enterobacter cloacae e Rhodopseudomonas palustris utilizando lactose do soro de leite como fonte de carbono**. 2024. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Centro de tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024. Acesso em: 18 nov. 2025.

PACHECO, T.F.; MENDES, T. D. Guia Prático Para Caracterização de Enzimas. Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, 58p, 2021. Acesso em: 09 mar. 2025.

PASSOS, V. F. **Utilização dos subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio para a geração de energia em uma célula microbiana a combustível**. Dissertação (Mestrado Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

PENDSE, D. S.; DESHMUKH, M.; PANDE, A. Different pre-treatments and kinetic models for bioethanol production from lignocellulosic biomass: A review. **Heliyon**, v. 9, n. 6, p. e16604, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16604> . Acesso em: 12 ago. 2024.

PEREIRA, E., CAMPOS, C., & MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, 4(3), 157–168, 2009. doi:10.4136/ambi-agua.109. Acesso em: 17 nov. 2025.

PINTO, C.P. C.; CÉSAR, S.; FERNANDES, R. Influência das fibras de sisal no comportamento térmico dos compósitos com matriz de gesso. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 8, n. 4, p. 14149-01e, 2022. <https://doi.org/10.18540/jcecvl8iss4pp14149-01e> Acesso em: 27 jan. 2025.

PIRONTI, L. A. **Produção de etanol de segunda geração por *Pichia membranifaciens* na presença de inibidores isolados ou em associação**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2024.

RAHMAN, A., MURAD, S. M. W., MOHSIN, A. K. M., & WANG, X. Does renewable energy proactively contribute to mitigating carbon emissions in major fossil fuels consuming countries? **Journal of Cleaner Production**, v. 452, 142113. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.142113>. Acesso em: 16 jan. 2025.

RANI, P., RAM, C., YADAV, A., YADAV, D. K., BISHNOI, K., BISHNOI, N. R. Comparative analysis of various seed sludges for biohydrogen production from alkaline

pretreated rice straw. **Nature, environment and pollution technology**, 23(2), 1065–1073, 2024. <https://doi.org/10.46488/nept.2024.v23i02.040>. Acesso em: 16 jan. 2025.

RIBEIRO, C. L. **Diversificando as estratégias no ensino de micologia**. Dissertação (Mestrado profissional em Ensino de Biologia). Programa de Pós-Graduação em Ensino de Biologia: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis, 2024.

RIBEIRO, G. S. **Avaliação de pré-tratamentos em resíduos agroindustriais visando à geração de biogás em reatores anaeróbios em batelada**. Monografia (Engenharia Ambiental). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Rio Claro, 2022.

RIBEIRO, J. A. B. **Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando Extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), 2010.

ROSSI, D.M., COSTA, J.B., SOUZA, E.A. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, pp. 4814-4819, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005>. Acesso em: 10 nov. 2025.

SANCHES, J. L. Isolamento de fungos ligninolíticos de amostras da Antártica e suas atividades enzimáticas. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Rio Claro, Rio Claro, 2021

SANKARAN, R.; PARRA CRUZ, R.A.; PAKALAPATI, H.; SHOW, P.L.; LING, T.C.; CHEN, W.H.; TAO, Y. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: a comprehensive review. **Bioresour. Technol.**, 298, Article 122476, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122476>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SANTANA, R. **Montagem de Biorreator para Produção de Hidrogênio Biológico em Batelada**. Monografia (Graduação em Engenharia Química). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SANTOS, L.; KUAE, L. Y.; IBE, M. B.; TAKAHASHI, M. E. **Método de obtenção de composto gel anti-inflamatório contendo extrato de agave sisalana perrine (sisal) encapsulado em quitosana e gel anti-inflamatório resultante**. Patente BR 10 2020 025761-7 INPI: 2022.

SANTOS, R. D.; NEVES, A. L. A.; PEREIRA, L. G. R.; ARAUJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V.; COSTA, C. T. F.; OLIVEIRA, G. F. de. Coprodutos do desfibramento do sisal como alternativa na alimentação de ruminantes. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 5 p. il. (**Embrapa Semiárido**. Circular técnica, 102). Acesso em: 20 set. 2024.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P.S.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; VO, D.V.N. Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic

biomass. **Bioresour. Technol.**, 344, Article 126203, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SAYED, E., OLABI, A., ALAMI, A., RADWAN, A., MDALLAL, A., REZK, A., ABDELKAREEM, M. Renewable energy and energy storage systems. **Energies**, 16(3), 1415, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16031415>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SCARLASSARA, L. R. **Investigação biológica da bioconversão de lignina em processo de produção da enzima lacase**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

SEGATO, F., DAMÁSIO, A. R. L., DE LUCAS, R. C., SQUINA, F. M., & PRADÉ, R. A. Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 78(4), p. 588–613, 2014. <https://doi.org/10.1128/membr.00019-14>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SHAH, F.A.; MAHMOOD, Q.; RASHID, N.; PERVEZ, A.; RAJA, I.A.; SHAH, M.M. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renew Sustain Energy Rev**, 42, pp. 627-642, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.053> Acesso em: 25 jan. 2025.

SHIMIZU F. L. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Programa de pós-graduação em microbiologia aplicada do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2018.

SIDDIQUE, M., NAWAZ MENGAL, A., KHAN, S., ALI KHAN, L., & KHAN KAKAR, E. Pretreatment of lignocellulosic biomass conversion into biofuel and biochemical: a comprehensive review. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 8(1), p. 39–43, 2023. <https://doi.org/10.4152/pea.2025430301>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview **Renew. Energy**, 98 pp. 203-215, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.057>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SINGH, A. K., BILAL, M., IQBAL, H. M. N., & RAJ, A. Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants - A critical review on recent progress and perspectives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 58–82, 2021a. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.032>. Acesso em: 25 jan. 2025.

SINGH, A.K., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., SCHMIDT, J.E. Biocatalytic Functionalities of Lignin Peroxidase-Based Systems in Lignin Depolymerization and Pollutants Removal from Environmental Matrices. **Curr Pollution Rep**, v. 10, 345–361, 2024. <https://doi.org/10.1007/s40726-024-00310-0>. Acesso em: 25 jan. 2025.

SINGH, A. K., KATARI, S. K., UMAMAHESWARI, A., RAJ, A. In silico exploration of lignin peroxidase for unraveling the degradation mechanism employing lignin model compounds. **RSC Advances**, 11(24), 14632–14653, 2021b. <https://doi.org/10.1039/D0RA10840E>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SILVA, A., XAVIER, F., DA FONSECA, M., & DA CONCEIÇÃO, M. Preparation of TiO₂/lignin composites with agave sisalana residue for bisphenol-A removal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35(9), pp. 1-13, 2024. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240066>. Acesso em: 20 dez. 2024.

SILVA, F. M. S., OLIVEIRA, L. B., MAHLER, C. F., & BASSIN, J. P. Avaliação da produção de hidrogênio a partir da codigestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos e glicerol residual da produção de biodiesel. **Química nova**, v. 40, n. 5, p. 523-527, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170041>. Acesso em: 16 nov. 2025.

SILVA, M.O. I. **Produção e aplicação de lacases do fungo *Trametes villosa* para o tratamento de efluentes**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2024.

SILVA, O. R. R. F.; CARTAXO, W. V.; SILVA, J. C. A. da; ALVES, I. **Sisal com tecnologia Embrapa para a geração de emprego e renda na agricultura familiar do Nordeste**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2011. Acesso em: 22 nov. 2024.

SILVA, T. C. **Aproveitamento energético da biomassa residual verde de sisal: etanol e biocarvão**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares). Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

SOARES, T. S. **Biotransformação de resíduos agroindustriais por basidiomicetos para produção de enzimas e compostos de interesse industrial**. 2023. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

SONG, G., MADADI, M., MENG, X., SUN, C., AGHBASHLO, M., SUN, F., RAGAUSKAS, A. J., TABATABAEI, M., & ASHORI, A. Double in-situ lignin modification in surfactant-assisted glycerol organosolv pretreatment of sugarcane bagasse towards efficient enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Journal** (Lausanne, Switzerland: 1996), v. 481, p. 148713, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.148713> . Acesso em: 15 fev. 2025.

SOUSA, S. R. **Digestão anaeróbia da vinhaça em reatores horizontais de alta taxa : desempenho do processo e composição da microbiota**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2022.

SURYADI, H., JUDONO, J. J., PUTRI, M. R., ECLESSIA, A. D., ULHAQ, J. M., AGUSTINA, D. N., & SUMIATI, T. Bidelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, p. e08865, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>. Acesso em: 15 fev. 2025.

TAPPI. T 421 om-02. **Moisture in pulp, paper and paperboard**. 2002, 3 p.

TEIXEIRA, G. G. **Determinação de açúcar em amostras alimentícias a partir de imagens digitais**. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Curitiba, 2022.

TELLES, N. L. S. **Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir de resíduo de cervejaria artesanal**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

THOMAS, H. Y., CAVALCANTE, J. D. N., DE ARAÚJO PADILHA, C. E., DOS SANTOS, E. S., GASPARIN, F. P., DA SILVA RIES, L. A., SALES, A. T., MENEZES, R. S. C., DUTRA, E. D. Valorization of lignocellulosic agave residues via pyrolysis and its use as adsorbent for methylene blue removal. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Volume 15, pages 6743–6756, 2025. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05687-y>. Acesso em: 25 jan. 2025.

TOMASINI, M. C. **Produção sequencial de hidrogênio e metano via digestão anaeróbia a partir da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em em Ciência (Bioquímica)). Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. 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. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88** – Embrapa. Fortaleza, dez. 2013. Acesso em: 20 mar. 2025.

ZABED, H.M.; AKTER, S.; YUN, J.; ZHANG, G.; AWAD, F.N.; QI, X.; SAHU, J.N. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 105, p. 105-128, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>. Acesso em: 17 dez. 2023.

ZAGRODNIK, R.; ŁANIECKI, M. Hydrogen production from starch by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Rhodobacter sphaeroides* in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 224, p. 298-306. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.060> . Acesso em: 05 dez. 2025.

ZHANG, S., DONG, Z., SHI, J., YANG, C., FANG, Y., CHEN, G.; TIAN, C. Enzymatic hydrolysis of corn stover lignin by laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase. **Bioresource Technology**, v. 36, pp.127699, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127699>. Acesso em: 15 fev. 2025.

ZHAO, L.; SUN, Z.F.; ZHANG, C.C.; NAN, J.; REN, N.Q.; LEE, D.J.; CHEN, C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: challenges and perspectives. **Bioresour Technol**, v. 343, p. 126123, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126123>. Acesso em: 17 out. 2023.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F. ; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Prog. Energy Combust. Sci.**, v. 42, pp. 35-53, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>. Acesso em: 25 set. 2023.

**APÊNDICE B — COMPARAÇÃO PAR A PAR ENTRE OS TEMPOS
EXPERIMENTAIS PARA LIGNINA PEROXIDASE PELO TESTE DE *TUKEY***

Tempo	2h			8h			8h			12h			24h			2º dia			3º dia		
	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p
2h	-0,013	-0,17, 0,09	0,985																		
8h	-0,026	-0,16, 0,06	0,997	0,007	-0,12, 0,14	1,000	0,029	-0,10, 0,11	1,000	0,018	-0,13, 0,16	1,000	0,050	-0,09, 0,20	0,560						
12h	-0,007	-0,14, 0,12	1,000	0,036	-0,09, 0,16	0,997	0,006	-0,12, 0,14	1,000	-0,021	-0,15, 0,11	1,000	0,011	-0,12, 0,14	1,000	-0,039	-0,18, 0,11	0,998			
24h	-0,039	-0,17, 0,08	0,993	0,004	-0,12, 0,11	1,000	-0,003	-0,13, 0,11	1,000	-0,042	-0,17, 0,09	0,987	-0,010	-0,14, 0,12	1,000	-0,050	-0,21, 0,08	0,925	-0,021	-0,15, 0,11	1,000
2º dia	0,011	-0,13, 0,16	1,000	0,054	-0,09, 0,26	0,965	0,047	-0,10, 0,11	0,968	0,018	-0,13, 0,16	1,000	0,050	-0,09, 0,20	0,560						
3º dia	-0,028	-0,16, 0,10	1,000	0,015	-0,11, 0,14	1,000	0,008	-0,12, 0,14	1,000	-0,021	-0,15, 0,11	1,000	0,011	-0,12, 0,14	1,000	-0,039	-0,18, 0,11	0,998			
8º dia	-0,049	-0,18, 0,08	0,957	-0,005	-0,13, 0,12	1,000	-0,014	-0,14, 0,12	1,000	-0,042	-0,17, 0,09	0,987	-0,010	-0,14, 0,12	1,000	-0,050	-0,21, 0,08	0,925	-0,021	-0,15, 0,11	1,000
10º dia	-0,041	-0,19, 0,10	0,995	0,002	-0,14, 0,15	1,000	-0,003	-0,15, 0,14	1,000	-0,034	-0,18, 0,11	0,999	-0,002	-0,12, 0,14	1,000	-0,032	-0,17, 0,22	1,000	0,068	-0,12, 0,23	0,971
20º dia	0,040	-0,15, 0,23	1,000	0,003	-0,10, 0,24	0,992	0,075	-0,11, 0,26	0,939	0,047	-0,14, 0,23	0,999	0,079	-0,11, 0,27	0,919	0,028	-0,09, 0,24	0,510	0,130	0,00, 0,26	0,445
19º dia	0,102	-0,03, 0,21	0,206	0,143	0,02, 0,27	0,619	0,138	0,01, 0,27	0,629	0,109	-0,02, 0,24	0,144	0,141	0,01, 0,27	0,024	0,091	-0,05, 0,24	0,510	0,130	0,00, 0,26	0,445
20º dia	-0,079	-0,27, 0,11	0,918	-0,036	-0,22, 0,15	1,000	-0,043	-0,23, 0,14	1,000	-0,072	-0,26, 0,12	0,957	-0,040	-0,23, 0,15	1,000	-0,090	-0,29, 0,11	0,868	-0,051	-0,24, 0,14	0,968
25º dia	0,021	-0,12, 0,14	1,000	0,064	-0,08, 0,21	0,699	0,056	-0,09, 0,24	0,953	0,028	-0,12, 0,17	1,000	0,060	-0,09, 0,21	0,931	0,009	-0,15, 0,17	1,000	0,049	-0,10, 0,19	0,984
30º dia	0,036	-0,11, 0,18	0,999	0,079	-0,07, 0,22	0,707	0,071	-0,07, 0,22	0,809	0,043	-0,10, 0,19	0,925	0,075	-0,07, 0,22	0,764	0,024	-0,14, 0,19	1,000	0,064	-0,06, 0,21	0,897
	4º dia			5º dia			10º dia			15º dia			20º dia			25º dia					
	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p	Diferença entre médias	IC95%	Valor p
5º dia	0,008	-0,14, 0,14	1,000																		
10º dia	0,089	-0,10, 0,26	0,838	0,081	-0,12, 0,26	0,944															
15º dia	0,152	-0,02, 0,28	0,012	0,143	0,00, 0,29	0,665	0,063	-0,12, 0,24	0,984												
20º dia	-0,029	-0,22, 0,16	1,000	-0,038	-0,24, 0,11	1,000	-0,118	-0,34, 0,11	0,779	-0,181	-0,37, 0,01	0,063									
25º dia	0,070	-0,06, 0,22	0,829	0,062	-0,10, 0,22	0,949	-0,019	-0,22, 0,19	1,000	-0,082	-0,23, 0,06	0,661	0,099	-0,10, 0,30	0,813						
30º dia	0,085	-0,06, 0,22	0,607	0,077	-0,08, 0,24	0,839	-0,004	-0,20, 0,19	1,000	-0,067	-0,21, 0,08	0,667	0,114	-0,08, 0,31	0,612	0,015	-0,15, 0,16	1,000			

**APÊNDICE C — COMPARAÇÃO PAR A PAR ENTRE OS TEMPOS
EXPERIMENTAIS PARA LACASE PELO TESTE DE TUKEY**

Tempo	3h			6h			9h			12h			24h			2º dia			3º dia		
	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p
3h	0,0	0,002; 0,022	0,010																		
9h	0,0	-0,007; 0,013	0,998	-0,009	-0,019; 0,001	0,122	-0,001	-0,012; 0,010	1,000	0,000	-0,012; 0,012	1,000									
12h	0,0	-0,005; 0,013	1,000	-0,010	-0,021; 0,001	0,114	-0,001	-0,012; 0,010	1,000	0,000	-0,012; 0,012	1,000									
24h	0,0	-0,005; 0,013	1,000	-0,010	-0,021; 0,001	0,114	-0,001	-0,012; 0,010	1,000	0,000	-0,012; 0,012	1,000									
2º dia	0,0	-0,006; 0,016	0,920	-0,007	-0,018; 0,004	0,503	0,002	-0,009; 0,013	1,000	0,003	-0,009; 0,015	1,000	-0,009; 0,015	1,000							
3º dia	0,0	-0,004; 0,016	0,544	-0,005	-0,016; 0,004	0,627	0,003	-0,006; 0,013	0,984	0,004	-0,007; 0,015	0,976	0,004	-0,007; 0,015	0,970	0,001	-0,010; 0,012	1,000	-0,002; 0,016	0,264	
4º dia	0,0	0,004; 0,024	0,002	0,002	-0,008; 0,012	1,000	0,011	0,001; 0,021	0,016	0,012	0,001; 0,023	0,029	0,012	0,001; 0,023	0,027	0,009	-0,002; 0,020	0,169	-0,003; 0,017	0,325	
05º dia	0,0	0,003; 0,023	0,003	0,001	-0,000; 0,011	1,000	0,010	0,001; 0,020	0,030	0,011	0,000; 0,022	0,049	0,011	0,000; 0,022	0,046	0,000	-0,003; 0,020	0,261	-0,003; 0,017	0,325	
10º dia	0,0	-0,004; 0,016	0,477	-0,005	-0,016; 0,006	0,932	0,004	-0,007; 0,016	0,945	0,005	-0,007; 0,017	0,935	0,005	-0,007; 0,018	0,926	0,002	-0,010; 0,015	1,000	-0,010; 0,012	1,000	
15º dia	0,0	0,001; 0,021	0,023	-0,001	-0,011; 0,009	1,000	0,008	-0,002; 0,018	0,177	0,009	-0,002; 0,020	0,224	0,009	-0,002; 0,020	0,211	0,006	-0,005; 0,017	0,714	-0,005; 0,015	0,844	
20º dia	0,0	-0,012; 0,008	1,000	-0,014	-0,024; -0,004	0,002	-0,005	-0,014; 0,005	0,860	-0,004	-0,015; 0,007	0,976	-0,004	-0,015; 0,007	0,983	-0,003	-0,016; 0,004	0,586	-0,008; -0,018; 0,002	0,187	
25º dia	0,0	-0,011; 0,011	1,000	-0,012	-0,023; -0,001	0,033	-0,003	-0,014; 0,009	1,000	-0,002	-0,014; 0,010	1,000	-0,002	-0,014; 0,010	1,000	-0,006	-0,017; 0,008	0,968	-0,006; -0,017; 0,005	0,733	
30º dia	0,0	0,011; 0,033	< 0,001	0,010	-0,001; 0,021	0,107	0,019	0,008; 0,030	< 0,001	0,020	0,007; 0,032	< 0,001	0,020	0,007; 0,032	< 0,001	0,017	0,005; 0,029	0,002	0,016	0,005; 0,027	0,002
	4º dia			5º dia			10º dia			15º dia			20º dia			25º dia					
	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p	Diferença entre médias	IC 95%	Valor p
5º dia	-0,001	-0,011; 0,009	1,000																		
10º dia	-0,007	-0,018; 0,004	0,566	-0,006	-0,017; 0,005	0,723	0,004	-0,007; 0,015	0,909	-0,013	-0,023; -0,003	0,005	-0,009	-0,020; 0,002	0,179	-0,011	-0,022; 0,000	0,066	0,002	-0,009; 0,013	1,000
15º dia	-0,003	-0,013; 0,007	0,591	-0,002	-0,012; 0,007	0,999	0,004	-0,007; 0,015	0,909	-0,013	-0,023; -0,003	0,005	-0,009	-0,020; 0,002	0,179	-0,011	-0,022; 0,000	0,066	0,002	-0,009; 0,013	1,000
20º dia	-0,016	-0,026; -0,006	< 0,001	-0,015	-0,025; -0,005	0,001	-0,009	-0,019; 0,005	0,648	-0,011	-0,022; 0,000	0,066	0,002	-0,009; 0,013	1,000						
25º dia	-0,014	-0,025; -0,003	0,007	-0,013	-0,024; -0,002	0,012	-0,007	-0,019; 0,005	0,648	-0,011	-0,022; 0,000	0,066	0,002	-0,009; 0,013	1,000						
30º dia	-0,000	-0,003; 0,019	0,362	0,009	-0,003; 0,020	0,244	0,015	0,003; 0,027	0,010	0,011	0,000; 0,022	0,065	0,024	0,011; 0,035	< 0,001	0,022	-0,009; 0,034	< 0,001			