

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FRANCIELE PEREIRA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO TAXÔNOMICA E FUNCIONAL DA COMUNIDADE
MICROBIANA ENVOLVIDA NA OBTENÇÃO DE BIOGÁS E OUTROS
COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE RESÍDUOS
DO PROCESSAMENTO DE CITROS/LARANJA**

São Carlos-SP

2021

FRANCIELE PEREIRA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO TAXÔNOMICA E FUNCIONAL DA COMUNIDADE
MICROBIANA ENVOLVIDA NA OBTENÇÃO DE BIOGÁS E OUTROS
COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE RESÍDUOS
DO PROCESSAMENTO DE CITROS/LARANJA**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de Doutora em Ciências:
Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

Co-orientadora: Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos-SP

2021

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

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

C172c	<p>Camargo, Franciele Pereira</p> <p>Caracterização taxônomica e funcional da comunidade microbiana envolvida na obtenção de biogás e outros compostos de interesse biotecnológico a partir de resíduos do processamento de citros/laranja / Franciele Pereira Camargo; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche; coorientadora Iolanda Cristina Silveira Duarte. São Carlos, 2021.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.</p> <p>1. Acetogênese. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Caracterização metataxonômica. 4. Limoneno. 5. Metagenômica shotgun. 6. Planejamento Fatorial. I. Título.</p>
-------	--

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **FRANCIELE PEREIRA CAMARGO**.

Título da tese: "Caracterização taxônomica e funcional da obtenção de biogás e outros compostos de interesse biotecnológico a partir de resíduos do processamento de citros/laranja".

Data da defesa: 11/03/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

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

Aprovada

Prof. Titular **Marcelo Zaia**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EEESC-USP)

Aprovada

Profa. Dra. **Tânia Forster Carneiro**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Profa. Dra. **Silvana de Queiroz Silva**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovada

Profa. Dra. **Fabiana Fantinatti Garboggini**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Menciondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedicatória

A todos os brasileiros que, mesmo em tempos difíceis, continuam acreditando e lutando pela pesquisa científica e pelo ensino público de qualidade em nosso país.

AGRADECIMENTOS

Aqueles que realizaram um doutorado sabem que nem sempre é fácil ou divertido, e que, definitivamente, não é possível ter sucesso sem muito apoio, ajuda, orientação, compreensão, companheirismo e incentivo das pessoas a seu redor. Mas estes sabem também que poucas coisas neste caminho são mais gratificantes que olhar para trás e ver que nada disso ficou em falta. Aproveito esta seção para humildemente mencionar as pessoas que me proporcionaram este enorme sentimento de gratidão.

À minha orientadora, Prof. Dr. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pela confiança depositada em mim ao longo dos anos, correção minuciosa dos trabalhos e apoio nas dificuldades enfrentadas ao longo da pesquisa. À minha co-orientadora, Prof. Dr. Iolanda Silveira Duarte, a todo o auxílio prestado e a recomendação à Prof. Bernadete. Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva (Tininho), a grande participação em minha pesquisa e colaboração ao longo do processo de escrita.

Ao imensurável apoio técnico de Maria Ângela Adorno, Carolina Sabatini, Isabel Sakamoto, Eloisa Pozzi, Juliana Custódio e Fernando Moura, por toda ajuda, colaborações e agradável convivência nestes anos. Aos professores do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), Prof. Dr. Eugênio Foresti e Marcelo Zaiat, as enriquecedoras discussões durante as pausas para o café.

A *Université Paris-Saclay, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (IRSTEA/INRAE)*, e a todo grupo de pesquisa *PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement (PROSE)*, a gentileza e carinho com que me acolheram ao longo de meu intercâmbio na França, especialmente à minha supervisora de estágio, Dr. Ariane Bize, e ao bioinformata Dr. Cédric Midoux, por toda paciência com que me ensinaram as ferramentas de bioinformática e auxiliaram na análise de dados de sequenciamento, nos artigos científicos e no idioma.

Ao *Syndicat Interdépartemental Pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP)*, a confiança e parceria no projeto *Modélisation, Contrôle et Optimisation des Procédés d'Épuration des Eaux (MOCOPEE)*, e a todos os demais pesquisadores participantes, especialmente à responsável Dr. Céline Roose-Amsaleg.

Ao *MIGALE Bioinformatics Facility* (doi: 10.15454/1.5572390655343293E12), ao apoio concedido com as ferramentas computacionais armazenamento das sequências de metagenômica *shotgun*, especialmente aos bioestatísticos Dr. Mahendra Mariadassou, Dr. Valentin Loux e Dr. Cédric Midoux.

A Usina São Martinho (Pradópolis- SP) por conceder o lodo granular termofílico de reator anaeróbico aplicado ao processamento de vinhaça de cana-de-açúcar, utilizado como inóculo nesta pesquisa, e aos colegas responsáveis por coletar este material.

À Prof. Dr. Maria do Carmo Calijuri e à técnica do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), Adriana Miwa, por gentilmente conceder acesso ao moinho de facas (Wiley TE-650/1).

Ao técnico da Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Aldimar Constante, pelo auxílio no processamento das amostras de Espectrometria de Infravermelho por Transformada Fourier (FT-IR).

Ao Prof. Dr. Arnaldo Sarti e ao técnico Alberto Camilo Alécio, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP Araraquara), a receptividade e auxílio nas análises de quantificação de limoneno.

A cuidadosa leitura e sugestões dos membros da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Sandra Imaculada Maintinguer e Prof. Tit. Marcelo Zaiat. Aos membros titulares da banca de defesa desta tese, pelo pronto aceite e pelas colaborações que ajudaram na melhoria da versão final desta pesquisa: Prof. Dr. Tânia Forster Carneiro, Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva, Prof. Tit. Marcelo Zaiat e Prof. Dr. Fabiana Fantinatti Garboggini. Agradeço ainda aos membros suplentes pela disponibilidade.

Ao Dr. Tiago Palladino Delforno, a ajuda fornecida em todo o processo de intercâmbio, por facilitar o meu primeiro contato com minha supervisora do exterior, ajuda na elaboração do projeto de pesquisa, burocracias de visto, moradia e demais dificuldades relacionadas à estadia em Paris.

A todos os colegas do LPB/SHS, tanto aos que me ajudaram direta ou indiretamente incontáveis vezes na rotina do laboratório, quanto aos que, além disso, me ofereceram companheirismo e amizade. Agradeço aos amigos Jean Oliveira, Mirabelle Cunha, Rachel Costa, Adriana Maluf, Camila Rabelo, Alana Moura, Carol Granatto, Carol Garcia, Cristiane Arruda, Guilherme Soares, Elis W. Nogueira, Jamille Sandes, Tiago Cebola, Elias Neto, Felipe Augusto e Lídia Moura. Em especial, agradeço às “Bernadete’s”, Raissa Mazareli, Alejandra Villas e Fabrício Motteran, a amizade e ajuda inestimável no início e ao longo de minha pesquisa.

Aos amigos Henrique Dornelles (e nosso anexo felino, Mabel), Marina Gomes e Schayanna Macário, cuja amizade foi meu porto seguro enquanto estive em São Carlos, e cujo apoio e carinho foi o que me manteve forte nos eventuais obstáculos.

Aos queridos amigos do intercâmbio, Tuğçe Katipoğlu, Subrata Dev, Aya Bahi, Lays Leonel, Stephane Benmaddi, Florent Bouchon e Francesc Puig-Castellví, os quais me ensinaram a conviver, respeitar e principalmente a rir muito de toda nossa bela diversidade cultural, pois agora sei que nunca estarei só em nenhum canto do mundo.

A todos os meus amigos e amigas, a compreensão com minhas ausências ao decorrer desta longa jornada acadêmica, e que continuaram ao meu lado em todos estes anos. Mais do que especialmente, agradeço à Luiza Alves, Daniela Martins Alves e Luis Salles, ao qual sou eternamente grata pois, além da valiosa amizade, sempre me socorreu em minhas dificuldades com estatística e linguagem de programação.

Aos meus pais, Alzira e Walter, minha irmã Ellen, meu cunhado André, e nossas preciosidades caninas Frida e Nina (em memória), ao apoio e compreensão que sempre tive em todas as decisões e caminhos que percorri em toda minha vida. Serei eternamente grata a confiança e amor irrestrito que sempre me ofereceram. Ser família de vocês sempre será meu título mais valioso.

As agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a bolsa de doutorado (processo n° 2017/01722-0), bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE processo n° 2018/26182-1), e suporte financeiro via Projeto Temático (processo n° 2015/06246-7) concedidos, sem os quais esta pesquisa não seria possível.

Por fim, reforço que estar em um programa multidisciplinar nos obriga o tempo todo a sair da nossa zona de conforto, portanto, agradeço a todos onde encontrei este conforto e que me ajudaram de alguma forma na realização desta pesquisa e em minha trajetória. Muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

*“Eu me seguro em minha palavra,
em minha mão, em minha lavra”*

O Rappa

RESUMO

CAMARGO, F. P. **Caracterização taxônomica e funcional da comunidade microbiana envolvida na obtenção de biogás e outros compostos de interesse biotecnológico a partir de resíduos do processamento de citros/laranja**. 312 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

A recuperação de energia a partir de biomassa lignocelulósica, como os resíduos sólidos de citros (RSC), vem sendo estudada como alternativa para seu reaproveitamento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a utilização de RSC como substrato para a obtenção de H₂ e demais bioprodutos em reatores em batelada, bem como caracterizar a comunidade microbiana envolvida neste processo. Foi possível obter um consórcio autóctone por meio da autofermentação do RSC, além de isolar uma cepa similar à *Enterococcus casseliflavus* (99%), e obter os parâmetros cinéticos de seu crescimento em glicose, como crescimento específico ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$), tempo de geração celular ($T_g = 1,98 \text{ h}^{-1}$), potencial máximo de concentração de H₂ ($P = 9,1 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ ($R_m = 1,99 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e tempo de início da obtenção de H₂ ($\lambda = 4,08 \text{ h}$). Na etapa seguinte, foram avaliados dois diferentes pré-tratamentos, sendo que a maior concentração de H₂ ocorreu nos reatores contendo RSC *in natura* ($13,31 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), quando comparado à hidrotermólise ($P = 8,19 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e deslignificação alcalina ($P = 7,27 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). Por meio do método de Plackett & Burman, foram avaliadas as variáveis pH (5,5, 7,0 e 8,5), temperatura (30, 37 e 44 °C), concentração de inóculo autóctone (1, 2 e 3 gSTV.L⁻¹) e de RSC (5, 10 e 15 g.L⁻¹), volume do *headspace* (40, 50 e 60%) e componentes do meio de cultura, como extrato de levedura (0, 0,5 e 1 g.L⁻¹), CaCO₃ (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹), NaCl (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹) e peptona (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹). O pH, concentração de inóculo e substrato (RSC) foram as variáveis significativas. A condição ótima estabelecida por meio de Delineamento do Composto Central Rotacional foi de 4 gSTV.L⁻¹ de inóculo (lodo granular aplicado ao processamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar), 29,8 g.L⁻¹ de RSC e pH 8,98, com $P = 48,47 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. A partir do sequenciamento *shotgun*, foi possível confirmar a partir da expressão gênica diferencial que as vias de degradação da celulose pela via acetogênica foram superexpressas nos reatores otimizados, sendo *Clostridium* e *Paraclostridium* os gêneros mais abundantes.

Palavras-chave: Acetogênese; Biomassa lignocelulósica; Caracterização metataxonômica; Limoneno; Metagenômica *shotgun*; Planejamento Fatorial.

ABSTRACT

CAMARGO, F. P. **Taxonomic and functional characterization of the microbial community involved in obtaining biogas and other compounds of biotechnological interest from citrus peel waste.** 312 p. Thesis (Doctor of Science) – São Carlos School of Engineering, Univesity of São Paulo, São Carlos, Brazil, 2021.

Energy recovery from lignocellulosic biomass, such as citrus peel waste (CPW), has been studied as an alternative to its reuse. This research aimed at evaluating the use of CPW as substrate to obtain H₂ and other by-products in batch reactors, as well as characterizing the microbial community involved in this process. It was possible to obtain an autochthonous consortium through the self-fermentation of CPW, in addition to isolating a strain similar to *Enterococcus casseliflavus* (99%), as well as obtaining its growth kinetic parameters in glucose, namely specific growth ($\mu = 0.35 \text{ h}^{-1}$), generation time ($T_g = 1.98 \text{ h}^{-1}$), maximum H₂ concentration potential ($P = 9.1 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$), maximum H₂ production rate ($R_m = 1.99 \text{ mmol H}_2\text{.h}^{-1}$) and starting time of H₂ production ($\lambda = 4.08 \text{ h}$). The effect of hydrothermolysis (180 °C; 15 minutes) and alkaline delignification (NaOH 5 mol.L⁻¹; 1% H₂O₂; 24 hours) pretreatments in CPW were evaluated, where it was observed that the H₂ obtainment was higher in reactors containing fresh CPW (13.31 mmol H₂.L⁻¹) when compared to hydrothermolysis ($P = 8.19 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$) and alkaline delignification ($P = 7.27 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$). By means of applying the Plackett & Burman statistical method, the variables pH (5.5, 7.0 and 8.5), temperature (30, 37 and 44 °C), inoculum (1, 2 and 3 gSTV.L⁻¹) and CPW (5, 10 and 15 g.L⁻¹) concentrations, headspace volume (40, 50 and 60%) and components of the culture medium were evaluated, namely yeast extract (0, 0.5 and 1 g.L⁻¹), CaCO₃, NaCl and peptone (0, 2.5 and 5 g.L⁻¹) concentrations, with pH, inoculum and CPW concentration the most significant variables. The optimal condition established by the Rotational Central Composite Design was 4 gSTV.L⁻¹ of inoculum (sludge of sugarcane vinasse anaerobic treatment), 29.8 g.L⁻¹ of CPW and pH 8.98, with maximum production of 48.47 mmol H₂.L⁻¹. After the shotgun sequencing, it was possible to confirm, from differential gene expression, that the cellulose degradation acetogenic pathways were overexpressed in the optimized reactor, with *Clostridium* and *Paraclostridium* the most abundant genera.

Keywords: Acetogenesis; Lignocellulosic biomass; Metataxonomic characterization; Limonene; *Shotgun* metagenomics; Factorial design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Conformação em cadeira da celulose e da hemicelulose e seus monômeros originados após hidrólise.	40
Figura 3.2. Estrutura química do limoneno.	45
Figura 3.3. Resumo dos principais métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento da biomassa lignocelulósica.	47
Figura 3.4. Esquemática simplificada do rompimento da estrutura lignocelulósica após pré-tratamento.	48
Figura 3.5. Principais gêneros de arqueias envolvidos no processo de metanogênese e suas respectivas ordens e famílias taxonômicas.	74
Figura 4.1. Fluxograma experimental com destaque para os ensaios fermentativos (em verde), metanogênicos (rosa) e as etapas de caracterização microbiana (em roxo).	85
Figura 4.2. Esquema do reator hidrotérmico.	87
Figura 4.3. Fluxograma experimental de obtenção de consórcio celulolítico	89
Figura 4.4. Esquema da metodologia empregada para análise do consórcio celulolítico-fermentativo, desde a determinação gravimétrica da degradação das fibras de celulose, isolamento de colônias em meio PCS até a avaliação da comunidade microbiana por meio de técnicas de Biologia molecular.	96
Figura 4.5. Esquema operacional do sistema de duas fases para digestão anaeróbia dos resíduos de citros, sendo (A) fase acidogênica a partir dos resíduos sólidos de citros e (B) fase metanogênica a partir da fração líquida do primeiro reator.	98
Figura 4.6. Esquema de amostragem estática do <i>headspace</i> . O conteúdo de biogás no espaço superior é coletado periodicamente (a cada 2 h) através da tampa de butila, usando seringa manual com trava.	103
Figura 4.7. Pipeline aplicado ao tratamento de sequências obtidas após o sequenciamento <i>shotgun</i> via Plataforma <i>Illumina</i> HiSeq.	110
Figura 5.1. Características micromorfológicas das cascas (A-B) e bagaço (C-F) de citros em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As setas brancas indicam a presença de estruturas semelhantes a bactérias/bacilos aderidas à superfície do material.	115
Figura 5.2. Espectrograma vibracional na região do infravermelho (FT-IR) dos resíduos de citros (cascas e bagaço <i>in natura</i>) (A) utilizados na presente pesquisa e espectro comparativo de pectina de citros (B).	116

Figura 5.3. Ácidos orgânicos e etanol nos ensaios de autofermentação dos resíduos de citros <i>in natura</i>	119
Figura 5.4. Características micromorfológicas do consórcio celulolítico autóctone das cascas e bagaço de laranja <i>in natura</i> em microscopia de contraste de fase. As setas apontam as estruturas similares a endósporos. Aumento total de 1.000X.....	120
Figura 5.5. Fibras de papel após o período de incubação. Ensaio controle (A) e ensaio contendo consórcio celulolítico isolado de resíduo de citros <i>in natura</i> (B).	121
Figura 5.6. Ácidos orgânicos e álcool no início e após 24h dos ensaios em reator anaeróbio em batelada a 37 °C (A) e 55 °C (B) com diferentes inóculos.	126
Figura 5.7. MEV da superfície do resíduo sólido de citros. Casca (A) e bagaço <i>in natura</i> (B), casca (C) e bagaço (D) após hidrotérmólise e casca (E) e bagaço (F) após deslignificação alcalina. As setas indicam morfologias semelhantes a bactérias.....	127
Figura 5.8. Espectrograma vibracional na região do infravermelho (FT-IR) do resíduo sólido de citros, cascas (A) e bagaço <i>in natura</i> (B), após hidrotérmólise e deslignificação alcalina.	129
Figura 5.9. Caracterização físico-química do resíduo sólido de citros (cascas e bagaço) antes e após diferentes pré-tratamentos.	130
Figura 5.10. Concentração de H ₂ a partir do resíduo de citros <i>in natura</i> (●), hidrotérmólise (■) e deslignificação alcalina (▲).	132
Figura 5.11. Ácidos orgânicos e etanol dos ensaios de diferentes pré-tratamentos. (A) ácido acético (HAc) e butírico (HBu); (B) ácido láctico (HLac) e etanol (EtOH).	134
Figura 5.12. Parâmetros físico-químicos dos ensaios de comparação entre (I) resíduo sólido de citros <i>in natura</i> , (II) após deslignificação alcalina e (III) após hidrotérmólise. (A) carboidratos totais, (B) ST, (C) fenóis totais e (D) STV.	136
Figura 5.13. Dendrograma do coeficiente de similaridade (Correlação Pearson) a partir do perfil de bandas do DGGE para o Domínio Bacteria.	137
Figura 5.14. Variação dos índices de diversidade de Shannon-Wiener e Dominância para o Domínio Bacteria.	138
Figura 5.15. Ideograma circular “Circos”. Gêneros microbianos identificados nos resíduos <i>in natura</i> e após hidrotérmólise. O círculo externo representa a abundância relativa em função do número de leituras. N.I= não identificado.	140
Figura 5.16. Rotas de conversão do resíduo sólido de citros (RSC) a carboidratos, AOV, H ₂ e CH ₄ e abundância relativa dos gêneros envolvidos nas diferentes etapas da digestão	

anaeróbia, sendo I= resíduo sólido de citros <i>in natura</i> e H= resíduo sólido de citros após hidrotérmólise. HAc= Ácido acético; HBU= Ácido butírico; HLac= Ácido láctico; EtOH= etanol. (♦) Produtores de H ₂ ; (◇) Produtores de CH ₄	146
Figura 5.17. Concentração acumulada de H ₂ dos ensaios de <i>screening design</i> para seleção de variáveis significativas por meio da matriz de Plackett & Burman.	148
Figura 5.18. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90%. (A) <i>P</i> , (B) <i>Rm</i> , (C) λ e (D) HAc.	150
Figura 5.19. Parâmetros físico-químicos de carboidratos, SSV e pH, obtidos para os ensaios <i>screening design</i> baseado na matriz de Plackett & Burman (P&B).	153
Figura 5.20. Análise de Componente Principal (PCA) dos parâmetros físico-químicos iniciais (concentração de fenol e carboidratos, SSV e pH) e respostas do modelo de Gompertz (modificado) para os ensaios de <i>screening design</i>	154
Figura 5.21. Concentração de HAc (A) e HBU (B) e potencial máximo de concentração de H ₂ dos ensaios de delineamento de Plackett & Burman.	156
Figura 5.22. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros bacterianos identificados nos reatores R5 e R12 dos ensaios de <i>screening design</i> via delineamento de Plackett & Burman.	159
Figura 5.23. Curvas de rarefação do RNAr 16S via plataforma <i>Illumina</i> HiSeq para os reatores R5 e R12.	160
Figura 5.24. Possíveis vias de conversão de resíduos sólidos de citros (RSC) em carboidratos, AOV e H ₂ e abundância relativa de gêneros relacionados aos inóculos alóctone e autóctone, hidrólise e acidogênese. Os valores entre parênteses representam abundância relativa nos ensaios R5 e R12, respectivamente. As setas vermelhas representam o efeito positivo (↑) ou negativo (↓) em cada variável (x1-x10) em diferentes respostas (<i>P</i> , <i>Rm</i> , λ , HAc).	165
Figura 5.25. Variação da concentração de hidrogênio dos ensaios de DCCR.	166
Figura 5.26. Diagrama de Pareto ilustrando a significância dos resultados obtidos para a resposta <i>P</i> para o intervalo de confiança de 90%.	169
Figura 5.27. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta <i>P</i>	170
Figura 5.28. Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B) obtida para a interação entre as variáveis substrato (g.L ⁻¹) e pH.	171
Figura 5.29. Diagrama de Pareto para <i>Rm</i> no intervalo de confiança de 90%.	172

Figura 5.30. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta R_m .	173
Figura 5.31. Diagrama de Pareto para a resposta λ e intervalo de confiança de 90%.	174
Figura 5.32. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta λ .	174
Figura 5.33. Concentração acumulada de H_2 no ensaio de validação. Otimizado (\blacklozenge); Não otimizado (\bullet). Os desvios padrão foram calculados em cada condição para os resultados obtidos por meio do modelo de Gompertz.	176
Figura 5.34. Balanço de Massa da fase Solúvel (BMS) do reator nas condições otimizadas aplicadas à obtenção de H_2 a partir de resíduos sólidos de citros.	177
Figura 5.35. Concentração de AOV e alcoóis ao longo do período operacional nos ensaios de DCCR (R01-R15), validação (Otim) e não otimizado (Não-Otim).	183
Figura 5.36. Abundância relativa dos filos (A) e gêneros (B) de bactérias mais abundantes no inóculo (Amostras 1-3) e amostras otimizadas (Amostras 4-6). NA = não identificado. As abundâncias relativas foram calculadas considerando o número total de leituras pré-processadas nas amostras.	188
Figura 5.37. Visão geral do número de genes para todos os níveis metabólicos entre as amostras analisadas e suas interseções por meio do gráfico Upset.	192
Figura 5.38. Abundância das vias metabólicas predominantes nas amostras de inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio otimizado (Amostras 4-6) para os níveis de KEGG.	193
Figura 5.39. Abundância relativa das vias metabólicas predominantes nas amostras do inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio de otimização (Amostras 4-6) para todos os níveis metabólicos (A) e filtradas para metabolismo de carboidratos (B).	194
Figura 5.40. Abundância relativa das vias metabólicas predominantes nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B) para a categoria de metabolismo de carboidratos, com as contribuições dos 10 gêneros mais abundantes.	195
Figura 5.41. Proporção dos 30 KO mais abundantes nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B) para o metabolismo de carboidratos, com os 10 gêneros mais abundantes associados a estes KO. As proporções foram calculadas considerando o número total de leituras em triplicata.	196
Figura 5.42. Ação da piruvato formiato liase na clivagem do piruvato em formiato e acetil-CoA.	197

Figura 5.43. Proporções de KO relacionadas com a obtenção de H ₂ nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B), com os 10 gêneros associados mais abundantes...	199
Figura 5.44. Proporções das Enzimas Ativas por Carboidrato (CAZymes) das classes Atividades Auxiliares (AA) ou Hidrólise Glicosídica (GH) nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B), com os 10 gêneros mais abundantes associados.	201
Figura 5.45. Possíveis vias de conversão de resíduos sólidos de citros em H ₂ e AOV em condições otimizadas. Os números EC mostrados entre colchetes representam apenas os genes significativamente superabundantes nos reatores otimizados ($p \leq 0,005$). Os valores entre parênteses representam a abundância relativa dos principais gêneros observados nos reatores otimizados.	204
Figura 5.46. Características micromorfológicas do consórcio celulolítico autóctone das cascas e bagaço de laranja <i>in natura</i> , após diluição seriada (10^{-26}) em microscopia de contraste de fase.	205
Figura 5.47. Dendrograma de distância genética do gene RNAr 16S de bactérias anaeróbias isoladas de resíduo sólido de citros <i>in natura</i> . A barra de escala representa o número de substituições por posição de nucleotídeo para cada dendrograma. Os números de acesso de cada sequência estão representados entre parênteses. Os valores dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i> (1000 réplicas). Utilizou-se a sequência do gene RNAr 16S de <i>E. coli</i> (X80725.1) como grupo externo (♦).....	207
Figura 5.48. Tempo de geração (b) e relação entre massa seca e absorvância (b) para a cepa isolada (IS_2).	209
Figura 5.49. Produção de AOV e etanol a partir de diferentes fontes de carbono e potencial máximo de concentração de H ₂ (♦) pela cepa isolada (IS_2).	210
Figura 5.50. Ácidos orgânicos e álcool ao longo do período de incubação com glicose (a) e xilose (b) para a cepa isolada (IS_2).	213
Figura 5.51. Concentração de H ₂ pela cepa isolada (IS_2) em função do tempo com diferentes concentrações de xilose.	216
Figura 5.52. Remoção de carboidratos totais (●) e potencial máximo de concentração de H ₂ do ensaio contendo glicose (■), bioaugmentação (resíduo sólido de citros + IS_2) (♦) e autofermentação + bioaugmentação (apenas resíduo sólido de citros) (▲) nos reatores em batelada inoculados com a cepa (IS_2) isolada de resíduo sólido de citros.	220
Figura 5.53. Compostos orgânicos a partir da glicose (A), autofermentação do resíduo sólido de citros + bioaugmentação (B) e bioaugmentação (C) ao longo do tempo de operação dos reatores em batelada.	222

Figura 5.54. Possíveis vias de conversão de resíduo sólido de citros (RSC), polissacarídeos e monossacarídeos aos principais metabólitos observados na fermentação de <i>E. casseliflavus</i> . HAc = ácido acético; HBu = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; HLac = ácido láctico; EtOH = etanol.	224
Figura 5.55. Concentração de H ₂ na Fase I e obtenção de H ₂ e CH ₄ na Fase II.	225
Figura 5.56. Ácidos orgânicos e etanol ao longo do período de incubação na Fase I (A) e Fase II (B) em diferentes amostrais temporais (CP1-3). Para as condições otimizadas, os pontos amostrais foram coletados no período entre 0-22 h, enquanto para as condições não otimizadas as amostras foram coletadas entre 0-700 h. Ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiônico (HPr) e etanol (EtOH).	230
Figura 5.57. Características micromorfológicas da biomassa da Fase II ao final do período de incubação. As setas vermelhas indicam os bacilos e as setas pretas indicam os endósporos. Aumento total de 1600X.	231
Figura 5.58. Curvas de rarefação das sequencias obtidas após sequenciamento massivo do gene RNAr 16S via plataforma <i>Illumina</i> HiSeq para as amostras das fases I e II.	233
Figura 5.59. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros de bactérias identificados nas fases I e II.	235
Figura 5.60. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros de arqueias nas fases I e II.	237
Figura 5.61. Principais vias metabólicas inferidas para os diferentes níveis KEGG. Os percentuais apresentados foram calculados com base no número de correspondências para cada objeto KO observados para cada amostra (Fase I e Fase II).	239
Figura 5.62. KO mais abundantes inferidos para as amostras da Fase I e Fase II, relacionadas às etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e concomitante obtenção de H ₂	240
Figura 5.63. Principais KO inferidos e relacionados à metanogênese.	241
Figura 5.64. Principais KO inferidos e relacionados à hidrólise, glicólise, acidogênese, acetogênese e obtenção de H ₂ . Os percentuais foram calculados com base no número total de KO em cada amostra.	242
Figura 5.65. Possíveis vias de conversão de resíduos sólidos de citros à CH ₄ em reatores em batelada operados em duas diferentes fases, sendo a Fase I referente às etapas de hidrólise, glicólise, acidogênese e acetogênese, e a Fase II majoritariamente referente à metanogênese. Os colchetes representam os números EC (<i>Enzyme Commission Numbers</i>)	

referentes aos KOs inferidos nas amostras. Os valores entre parenteses referem-se à abundância relativa dos principais gêneros observados nas fases I e II.	244
Figura 5.66. Curva de calibração do limoneno para 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0 e 20,0 mg.L ⁻¹ de limoneno.	246
Figura 5.67. Cromatograma típico de solução padrão de limoneno (15 mg.L ⁻¹) (A) e cromatograma obtido para ensaios com 17 mg.L ⁻¹ de limoneno (B).	247
Figura 5.68. Teor de limoneno inicial (pI) e final (pF) do processo de fermentação de reatores anaeróbios em batelada operados com diferentes concentrações de limoneno (sem adição de limoneno a 2000 mg.L ⁻¹) por cerca de 160 h. Adsorção (AD) e potencial máximo de concentração de H ₂ (P).	249
Figura 5.69. Concentração de H ₂ nos reatores anaeróbios controle e com diferentes concentrações de limoneno.	250
Figura 5.70. Ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada controle e com diferentes concentrações de limoneno. Ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiônico (HPr) e etanol (EtOH).	253

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Comparação entre os métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento de biomassa lignocelulósica.	48
Tabela 3.2. Comparação da obtenção de metano em reator em batelada a partir de diferentes substratos e condições experimentais.....	53
Tabela 3.3. Comparação da obtenção de hidrogênio em reator em batelada a partir de diferentes substratos e condições experimentais.....	56
Tabela 3.4. Principais bactérias identificadas a partir de diferentes resíduos aplicados à obtenção de produtos de interesse biotecnológico em reatores em bateladas.	72
Tabela 3.5. Principais arqueias identificadas a partir de diferentes resíduos sólidos aplicados à obtenção de metano em reatores em batelada.	76
Tabela 3.6. Comparação entre técnicas de biologia molecular utilizadas em reatores anaeróbios.	78
Tabela 3.7. Principais ferramentas para análise massiva de dados de sequenciamento (<i>shotgun</i> ou <i>metabarcoding</i>) utilizados nesta pesquisa.	82
Tabela 4.1. Meio de cultivo <i>Peptone Cellulose Solution</i> (PCS) modificado e condições utilizadas no ensaio de autofermentação dos resíduos de citros <i>in natura</i>	89
Tabela 4.2. Condições utilizadas nos ensaios de comparação entre resíduos de citros <i>in natura</i> e após diferentes pré-tratamentos (deslignificação alcalina e hidrotermólise). ..	91
Tabela 4.3. Condições mínimas (-1), máximas (+1) e do ponto central (0) para as diferentes variáveis.	92
Tabela 4.4. Matriz de Plackett & Burman codificada para o <i>screening design</i> com 16 condições experimentais e três repetições do ponto central.	93
Tabela 4.5. Matriz experimental com valores reais e valores codificados para os ensaios do DCCR de 2 ³ , com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central.....	94
Tabela 4.6. Condições experimentais dos ensaios de otimização da obtenção de H ₂ por meio do método de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).	94
Tabela 4.7. Composição do meio de Zinder modificado, utilizado nos ensaios de obtenção de CH ₄ e condições utilizadas nos ensaios em batelada.	99
Tabela 4.8. Composição da solução de metais traço.....	99
Tabela 4.9. Composição da solução de vitaminas.	100
Tabela 4.10. Análises físico-químicas utilizadas para o monitoramento dos reatores em batelada.	101

Tabela 4.11. Fatores de equivalência utilizados para determinação da DQO equivalente. Os carboidratos totais foram considerados em termos de g-glicose.	102
Tabela 5.1. Caracterização físico-química dos resíduos de citros.	113
Tabela 5.2. Parâmetros de Gompertz dos ensaios de autofermentação dos resíduos de citros <i>in natura</i> para obtenção de H ₂ a partir de casacas e bagaço de citros.	118
Tabela 5.3. Parâmetros de Gompertz modificado dos reatores anaeróbios com inóculos de diferentes origens, aplicados à obtenção de H ₂ a partir de resíduos de citros.	122
Tabela 5.4. Parâmetros físico-químicos dos reatores anaeróbios com inóculos de diferentes origens.	124
Tabela 5.5. Parâmetros de Gompertz modificado dos ensaios após diferentes pré-tratamentos do resíduo sólido de citros. Potencial máximo de concentração de H ₂ (<i>P</i>), velocidade específica máxima de obtenção de H ₂ (<i>Rm</i>), tempo de início da obtenção de H ₂ (λ) e R ² obtidos da equação de Gompertz modificada.	132
Tabela 5.6. Índices ecológicos das sequencias obtidas a partir do sequenciamento massivo do gene RNAr 16S via Plataforma <i>Illumina</i> HiSeq para amostra (1) ensaio com resíduo <i>in natura</i> e (2) ensaio após hidrotermólise.	139
Tabela 5.7. Matriz de Plackett & Burman codificada para o <i>screening design</i> com 16 condições experimentais e três repetições do ponto central (x ₁ -x ₁₀) e respostas obtidas para os ensaios cinéticos em batelada (Y ₁ -Y ₄).	148
Tabela 5.8. Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as respostas <i>P</i> , <i>Rm</i> , λ e HAc para obtenção de H ₂ a partir de resíduos sólidos de citros.	149
Tabela 5.9. Efeito dos diferentes parâmetros na obtenção de H ₂ , AOV em reatores em batelada com resíduo sólido de citros.	158
Tabela 5.10. Índices ecológicos para as sequencias do RNAr 16S via plataforma <i>Illumina</i> dos ensaios R5 e R12.	160
Tabela 5.11. Respostas relativas à obtenção de hidrogênio nos ensaios de DCCR.	167
Tabela 5.12. Valores de significância para o intervalo de confiança de 10% das respostas para as variáveis dos ensaios de DCCR.	168
Tabela 5.13. Dados estatísticos (ANOVA) obtidos para os ensaios de DCCR, para a resposta <i>P</i> e intervalo de confiança de 90%.	170
Tabela 5.14. Dados estatísticos (ANOVA) dos ensaios de DCCR para a resposta <i>Rm</i> e intervalo de confiança de 90%.	172

Tabela 5.15. Dados estatísticos (ANOVA) dos ensaios de DCCR, para a resposta λ e intervalo de confiança de 90%.....	173
Tabela 5.16. Teste ANOVA e valores ótimos para as respostas P e Rm dos ensaios de DCCR.....	175
Tabela 5.17. Comparação entre os resultados para concentração de H_2 (P) preditos pelo modelo obtido por meio de DCCR e os resultados experimentais obtidos.....	176
Tabela 5.18. Parâmetros cinéticos e físico-químicos dos ensaios de DCCR e ensaio de validação (otimizado).....	180
Tabela 5.19. Parâmetros estatísticos e de qualidade para as sequências brutas e filtradas obtidas a partir do inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio otimizado (Amostra 4-6).	186
Tabela 5.20. Índices ecológicos (Observado, Chao-1, Shannon-Wiener e Simpson) para sequências filtradas obtidas a partir do inóculo (Amostras 1-3) e ensaio otimizado (Amostras 4-6). <i>se</i> = Erro Padrão calculado a partir de triplicatas.	187
Tabela 5.21. Remoção da fibra de papel filtro e p valor obtido ^a para a cepa isolada (IS_2), consórcio autofermentativo e ensaio controle (sem inóculo).	207
Tabela 5.22. Remoção de carboidratos e pH final dos reatores em batelada, operados com diferentes fontes de carbono para a cepa isolada (IS_2).....	215
Tabela 5.23. Parâmetros de Gompertz modificado e densidade óptica da cepa isolada (IS_1) obtidos a partir de diferentes concentrações de xilose.....	216
Tabela 5.24. Modelo de regressão e ANOVA para as respostas potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ), pH, densidade óptica (OD_{600}) e consumo de carboidratos nos ensaios em diferentes concentrações de xilose (0,53 a 6,47 g.L ⁻¹) pela cepa isolada	218
Tabela 5.25. Parâmetros referentes ao modelo de Gompertz modificado ^a , para concentração de H_2 para os ensaios com diferentes substratos (glicose e resíduo sólido de citros), bioaugmentação e autofermentação.....	219
Tabela 5.26. Concentração de H_2 a partir de diferentes substratos e inóculos.	221
Tabela 5.27. Parâmetros cinéticos de obtenção de H_2 e CH_4 nas fases I e II, respectivamente.....	225
Tabela 5.28. Parâmetros físico-químicos dos reatores do ensaio de potencial metanogênico ao final do período de operação da Fase I e Fase II.....	228
Tabela 5.29. Índices ecológicos do gene RNAr 16S para as fases I e II do ensaio acidogênico e metanogênico de resíduo sólido de citros.	232
Tabela 5.30. Especificações de operação do GC-MS.	245

Tabela 5.31. Parâmetros cinéticos de obtenção de H ₂ dos reatores anaeróbios controle e com diferentes concentrações de limoneno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para o intervalo de confiança de 95% no teste de Kruskal-Wallis.....	250
Tabela 5.32. Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada controle e com diferentes concentrações de limoneno no início (pI) e final (pF).	252
Tabela 6.1. Conclusões sobre as hipóteses iniciais da pesquisa e resumo sobre as principais condições operacionais e resultados de cada etapa.....	259

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de Variância
AOV	Ácidos Orgânicos Voláteis
ATP	Trifosfato de Adenosina
BLAST	Ferramenta Básica de Procura por Alinhamento Local
BMS	Balço de Massa da fase Solúvel
CAZymes	Enzimas Ativas de Carboidratos
CoA	Coenzima A
CoM	Coenzima M
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
<i>e.g.</i>	por exemplo (do latim, <i>exempli gratia</i>)
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido
Eq.	Equação
<i>et. al.</i>	e outros (do latim, <i>et alia</i>)
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GC	Citosina-Guanina
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
H4SPT	Tetra-hidrossarcinapterina
HAc	Ácido acético
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
HBu	Ácido butírico
HCap	Ácido caproico
HLac	Ácido láctico
HLac	Ácido láctico
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HPr	Ácido propiônico

HVal	Ácido valérico
KEGG	Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas
KO	Banco de dados de ortologia KEGG
LAS	Alquilbenzeno Linear Sulfonado
LD	Límite de Detecção
ln	Logarítimo natural
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSC	Massa Seca Celular
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
<i>P</i>	Potencial máximo de concentração de H ₂
P&B	Plackett & Burman
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCS	Solução de Celulose e Peptona
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PID	Painel de controle derivativo integral proporcional
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
<i>R_m</i>	Velocidade máxima de obtenção de H ₂
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _r	Ácido Ribonucleico Ribossômico
RSC	Resíduo Sólido de Citros
T _g	Tempo de geração celular
THMPT	Tetra-hidrometanopterina
UASB	Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ΔG	Energia livre de Gibbs
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
atm	atmosfera
bar	unidade de pressão
cm	Centímetros
d	Dia
$\text{DQO}_{\text{filtrada}}$	Demanda Química de Oxigênio de amostra filtrada
g	Gramas
$\text{g}\cdot\text{dm}^3$	Gramas por decímetro cúbico
$\text{g}\cdot\text{DQO}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de demanda química de oxigênio por litro
$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Gramas por quilo
$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas por litro
$\text{g}\cdot\text{SSV}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de sólidos suspensos voláteis por litro
$\text{g}_{\text{glicose}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de glicose por litro
$\text{g}_{\text{limoneno}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de limoneno por litro
$\text{g}_{\text{msc}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de massa seca celular por litro
$\text{g}_{\text{SS}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de sólidos suspensos por litro
$\text{g}_{\text{ST}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de sólidos totais por litro
$\text{g}_{\text{STV}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de sólidos totais voláteis por litro
$\text{g}_{\text{xilose}}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas de xilose por litro
h	Hora
kg	Quilograma
kJ	Quilojoule
kWh	Quilowatt-hora
L	Litro
$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	Litro por quilo
M	Molar
mg	Miligramas
$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Miligramas por quilo
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Miligramas por litro

mg EtOH.L ⁻¹	Miligramas de etanol por litro
mg HAc.L ⁻¹	Miligramas de ácido acético por litro
mg HBU.L ⁻¹	Miligramas de ácido butírico por litro
mg HLac.L ⁻¹	Miligramas de ácido láctico por litro
mg HPr.L ⁻¹	Miligramas de ácido propiônico por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milomol
mmol.h ⁻¹	Milimol por hora
mmol.L ⁻¹	Milimol por litro
mmol CH ₄ .h ⁻¹	Milimol de metano por hora
mmol CH ₄ .L ⁻¹	Milimol de metano por litro
mmol H ₂ .h ⁻¹	Milimol de hidrogênio por hora
mmol H ₂ .L ⁻¹	Milimol de hidrogênio por litro
Mpa	Megapascal
Mt	Megatonelada
nm	Nanômetros
OD ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nanômetros
p	Probabilidade de significância
R ²	Coefficiente de determinação
rpm	Revoluções Por Minuto
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
λ	Tempo de início da obtenção de H ₂
μ	Crescimento específico
μL	Microlitro
μmax	Velocidade máxima

LISTA DE EQUAÇÕES

$H_2O_2 \leftrightarrow H^+ + HOO^-$	(Eq. 3.1).....59
$H_2O_2 + HOO^- \rightarrow HO\cdot + O_2 + H_2O$	(Eq. 3.2)59
$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 2CO_2 + 2CH_3COOH + 4H_2$	(Eq. 3.3)65
$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 2CO_2 + CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2$	(Eq. 3.4)65
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	(Eq. 3.5)66
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2OH + 2CO_2$	(Eq. 3.6)67
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	(Eq. 3.7)73
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	(Eq. 3.8)73
$Severidade = \int_0^t \exp\left[\frac{T(t)-100}{14,75}\right] d \times t$	(Eq. 4.1).....87
$Degradação (\%) = \frac{M_t - M_r}{M_t} \times 100$	(Eq. 4.2).....90
$Tg = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$	(Eq. 4.3).....97
$BMS = \left(\frac{DQO_{metabólitos} + DQO_{carboidratos} + DQO_{fenóis}}{DQO_{experimental}} \right) \times 100$	(Eq. 4.4)101
$LD = 3 \times DesvPad/m$	(Eq. 4.5)105
$LQ = 10 \times DesvPad/m$	(Eq. 4.6)105
$Recuperação (\%) = (concentração\ estimada/teórica) \times 100$	(Eq. 4.7)106
$Y(t) = P \cdot \exp\{-\exp(\frac{Rm.e}{A}[\lambda - t] + 1)\}$	(Eq. 4.8)112
$C_5H_{10}O_5 + 1,67H_2O \rightarrow 1,67C_2H_3O_2^- + 1,67H^+ + 1,67CO_2 + 3,33H_2$	(Eq. 5.1).....157
$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0,83C_4H_7O_2^- + 0,83H^+ + 1,67CO_2 + 1,67H_2$	(Eq. 5.2)157
$Y_1 = 15,29 + 7,35x_2 - 1,97x_2^2 + 1,38x_3 + 4,70x_2x_3$	(Eq. 5.3)168
$Y_2 = 0,98 + 0,33x_2$	(Eq. 5.4)171
$Y_3 = 12,55 + 3,21x_2x_3$	(Eq. 5.5)174
$CH_3CH_2COOH + 3H_2O \rightarrow CH_3COOH + 7HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	(Eq. 5.6)182
$6\text{ fosfo}\beta\text{Dglicosil}(1,4)\text{ Dglicose} + H_2 \leftrightarrow \text{Dglicose} + \text{Dglicose6fosfato}$	(Eq. 5.7)....197
$\text{Acetaldeído} + NAD^+ + CoA \leftrightarrow \text{AcetilCoA} + NADH + H^+$	(Eq. 5.8).....198
$\text{Glicose} + 2ADP + 2Pi \rightarrow 2\text{ EtOH} + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$	(Eq. 5.9).....198
$(S) - \text{lactato} + NAD^+ \rightarrow \text{piruvato} + NADH + H^+$	(Eq. 5.10).....198
$CH_3COOH + 2H_2 \rightarrow CH_3CH_2OH + 4H_2O$	(Eq. 5.11).....212
$C_6H_6O + 5H_2O \rightarrow 3CH_3COOH + 2H_2$	(Eq. 5.12).....229
$ATP + \text{acetato} + CoA \rightarrow AMP + \text{difosfato} + \text{AcetilCoA}$	(Eq. 5.13).....229
$\text{AcetilCoA} + \text{fosfato} \leftrightarrow CoA + \text{acetilfosfato}$	(Eq. 5.14).....243

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	33
2.1 HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL.....	33
2.1.1 Hipótese geral.....	33
2.1.2 Objetivo geral.....	33
2.2 HIPÓTESES E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
2.2.1 Hipótese e objetivo específico 1.....	33
2.2.2 Hipótese e objetivo específico 2.....	33
2.2.3 Hipótese e objetivo específico 3.....	34
2.2.4 Hipótese e objetivo específico 4.....	34
2.2.5 Hipótese e objetivo específico 5.....	34
2.2.6 Hipótese e objetivo específico 6.....	34
2.2.7 Hipótese e objetivo específico 7.....	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
3.1 BIORREFINARIAS E BIOPRODUTOS	37
3.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	39
3.3 RESÍDUOS SÓLIDOS AGROINDUSTRIAIS.....	41
3.4 RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CITROS	43
3.5 PRÉ-TRATAMENTOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	46
3.5.1 Pré-tratamentos químicos	57
3.5.2 Pré-tratamentos físicos	59
3.5.3 Pré-tratamentos biológicos.....	62
3.6 MICRORGANISMOS FERMENTATIVOS E METANOGENÉTICOS.....	63
3.6.1 Bactérias fermentativas e celulolíticas	63
3.6.2 Arqueias metanogênicas	72
3.7 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS AO ESTUDO DE MICRORGANISMOS EM REATORES ANAERÓBIOS	76
3.7.1 Ferramentas de bioinformática aplicadas à metagenômica.....	79
4. MATERIAL E MÉTODOS	83
4.1 ESQUEMA OPERACIONAL	83
4.2 SUBSTRATO	86
4.2.1 Resíduos de citros.....	86
4.2.2 Pré-tratamentos.....	86
4.2.2.1 Hidrotermólise	86
4.2.2.2 Deslignificação alcalina	87
4.3 ENSAIOS CINÉTICOS EM BATELADA	88
4.3.1 Inóculo.....	88
4.3.1.1 Inóculo autóctone.....	88
4.3.1.1.1 Atividade celulolítica	89
4.3.1.2 Inóculo alóctone.....	90
4.3.2 Faixa de temperatura	90

4.3.3	Ensaio de pré-tratamento	91
4.3.4	Ensaio fermentativo	91
4.3.4.1	Delineamento de Plackett & Burman	91
4.3.4.2	Delineamento Composto Central Rotacional	93
4.3.4.3	Obtenção de bactérias anaeróbias celulolíticas	95
4.3.4.3.1	<i>Caracterização da cepa isolada</i>	96
4.3.5	Ensaio metanogênicos	97
4.4	MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS	100
4.4.1	Análises físico-químicas e cromatográficas	100
4.4.1.1	Caracterização de macro e microelementos	100
4.4.1.2	Análises físico-químicas	100
4.4.1.3	Balanço de massa	101
4.4.1.4	Análise da composição do biogás	102
4.4.1.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier	103
4.4.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura	103
4.4.1.7	Microscopia óptica	104
4.4.2	Determinação do teor de limoneno via GC-MS	104
4.4.2.1	Reagentes	104
4.4.2.2	Preparação das amostras	104
4.4.2.3	Curva de calibração	105
4.4.2.4	Validação do método	105
4.4.2.5	Ensaio de adsorção	105
4.4.2.6	Aplicabilidade	106
4.5	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	106
4.5.1	Extração do DNA e amplificação da região-alvo	107
4.5.2	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante	108
4.5.3	Sequenciamento e bioinformática	108
4.10.3.1	Bactérias anaeróbias celulolíticas	108
4.10.3.2	<i>Metabarcoding</i>	109
4.10.3.3	Metagenômica <i>shotgun</i>	110
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	111
4.6.1	Ajuste dos dados experimentais	112
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	113
5.1.1	Caracterização físico química	113
5.1.2	Exame Microscópico	114
5.1.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	115
5.2	OBTENÇÃO DE INÓCULO	117
5.2.1	Inóculo autóctone	117
5.2.2	Inóculo alóctone	121
5.3	PRÉ-TRATAMENTOS APLICADOS AO RESÍDUO SÓLIDO DE CITROS	126
5.3.1	Efeitos dos pré-tratamentos nas características físico-químicas e morfológicas do substrato	126

5.3.2 Efeitos dos pré-tratamentos na obtenção de H ₂ e AOV.....	131
5.3.3 Análise da comunidade microbiana	136
5.4 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS VIA PLACKETT & BURMAN	146
5.4.1 Análise da comunidade microbiana	158
5.5 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE H ₂ VIA DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	166
5.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	166
5.5.1.1 Validação experimental	175
5.5.1.2 Parâmetros físico-químicos e AOV	177
5.5.2 Caracterização microbiana	184
5.5.2.1 Anotação funcional e mapeamento de vias metabólicas.....	192
5.6 OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS CELULOLÍTICAS	205
5.6.1 Atividade celulolítica, isolamento e identificação	205
5.6.2 Parâmetros cinéticos	208
5.6.3 Vias fermentativas e metabolitos da cepa isolada.....	209
5.6.4 Efeito da concentração de xilose.....	215
5.6.5 Aplicação em resíduo sólido de citros e bioaumentação.....	219
5.7 POTENCIAL METANOGÊNICO	224
5.7.1 Obtenção de biogás e AOV	224
5.7.2 Caracterização da comunidade microbiana	230
5.7.3 Caracterização funcional.....	237
5.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIMONENO VIA GC-MS	245
5.8.1 Equipamentos e condições.....	245
5.8.2 Curva de calibração e validação de parâmetros	245
5.8.3 Ensaio de adsorção.....	247
5.8.4 Aplicabilidade.....	248
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	255
7. CONCLUSÕES	261
8. RECOMENDAÇÕES	263
9. REFERÊNCIAS	265
GLOSSÁRIO	291
LISTA DE PUBLICAÇÕES	295
ÍNDICE REMISSIVO	297

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional e o desenvolvimento da atividade econômica têm como consequência o acúmulo de resíduos de origem antrópica provenientes da atividade doméstica e industrial, como os resíduos agroindustriais. Além disso, surge com este desenvolvimento a necessidade de se buscar novas fontes de energia alternativas àquelas oriundas de combustíveis fósseis. A obtenção de produtos de interesse biotecnológico conciliada ao uso de biomassa residual é uma das propostas que vem ganhando destaque, minimizando os impactos ambientais de sua disposição direta no ambiente.

O uso de biocombustíveis, como o biogás (hidrogênio e metano), seria indicado para substituição dos combustíveis derivados do petróleo. Sua obtenção vem sendo estudada a partir de diversos inóculos e substratos, como resíduos alimentícios de restaurantes (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2008), bagaço de cana-de-açúcar (LEITÃO et al., 2013), resíduos do processamento de citros (FORGÁCS et al., 2012; CALABRÒ et al., 2016; SU; TAN; XU, 2016), entre outros. Um dos obstáculos para a reutilização de resíduos sólidos orgânicos é a presença dos componentes de difícil degradação, como a celulose e a lignina, que podem restringir este processo devido a sua difícil assimilação pelos microrganismos (FRUNZO; PIROZZI, 2015). Desta forma, são necessárias novas possibilidades e também a otimização dos métodos físicos, químicos e biológicos de pré-tratamentos e hidrólise dos componentes lignocelulósicos dos resíduos orgânicos.

Os resíduos industriais do processamento de citros são potenciais substratos para a obtenção de bioprodutos, sendo o Brasil o principal produtor (CALABRÒ et al., 2016). O resíduo sólido de citros é composto por cascas e bagaço da fruta, sendo produzidas 500 toneladas (t) a cada 1.000 t de fruta processadas (RUIZ; FLOTATS, 2016). Considerando-se safra de aproximadamente 92,5 mil t de resíduos de frutas processadas, 44,8% são direcionados à compostagem, reciclagem e coprocessamento/refinamento, enquanto o restante, aproximadamente 54,9% do resíduo é considerado como excedente, sendo destinados à incineração, armazenamento local ou aterros sanitários (KOPPAR; PULLAMMANAPPALLIL, 2013; CITROSUCO, 2016). Uma vez que não há padronização para o reuso e disposição final do resíduo excedente (CALABRÒ et al., 2016), a abordagem de biorrefinaria vem ganhando destaque como possibilidade de destinação final, conciliando seu tratamento à obtenção de biogás (LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010).

Calabrò et al. (2016) utilizaram diversos inóculos para a obtenção de metano a partir de resíduos de citros, tais como resíduos industriais e resíduos agroindustriais, sendo obtidos os melhores resultados em experimentos em condição mesófila e reatores em batelada; ou seja, de 33 mmol CH₄.L⁻¹. Além disso, destaca-se também a obtenção de 0,01 mmol CH₄.L⁻¹ utilizando resíduo pré-tratado de citros com inóculo de estrume de suíno e lodo de esgoto (SU; TAN; XU, 2016). Forgàcs et al. (2012) obtiveram concentração máxima de 247,7 mmol CH₄.L⁻¹ utilizando resíduo de citros tratado por explosão a vapor com inóculo de reator de produção de biogás.

Outra possibilidade é o uso de resíduos sólidos de citros como substrato fermentativo para obtenção de compostos de interesse biotecnológico (FORGÁCS et al., 2012; RUIZ; FLOTATS, 2014; CALABRÒ et al., 2016). Todavia, destaca-se nestes resíduos a presença de inibidores, como compostos fenólicos e limoneno, os quais podem inibir o crescimento de algumas bactérias e arqueias metanogênicas (CALABRÒ et al., 2016). Sendo assim, a obtenção de microrganismos autóctones adaptados aos inibidores pode ser fundamental para o sucesso do processo fermentativo.

A determinação da prevalência de microrganismos presentes em citros torna-se informativa no estudo de grupos resistentes aos inibidores deste substrato, como a matriz lignocelulósica e, ainda, o limoneno, que vem sendo relatado como um dos obstáculos ao seu reuso. A possibilidade de uso de consórcios ao invés de culturas puras pode ser vantajosa, uma vez que há redução de custos em manutenção de cepas e meios específicos. Entretanto, o entendimento da composição do inóculo é fundamental, uma vez que as cepas isoladas podem ser aplicadas em processos de bioaugmentação, como alternativa à melhoria de processos biotecnológicos e industriais e, recentemente, na produção biológica de H₂ (MAINTINGUER et al., 2017).

A avaliação da comunidade microbiana, bem como a predição das enzimas envolvidas no processo fermentativo, é fundamental para o entendimento dos mecanismos de conversão da biomassa residual em produtos de valor agregado, como biogás e compostos orgânicos solúveis (COLOMBO et al., 2016). Uma vez que apenas uma pequena porcentagem de procariotos é cultivável, o uso de técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento de nova geração (NGS) aplicados à amostras ambientais são úteis na caracterização destas comunidades, possibilitando o estudo de seu papel funcional e taxonômico na degradação de resíduos orgânicos (COLOMBO et al., 2016; KESKIN et al., 2018).

As técnicas NGS podem ser aplicadas para o sequenciamento massivo do gene RNAr 16S (*metabarcoding*), ou ainda via metagenômica *shotgun*, por sequenciamento em plataforma *Illumina* (GUO et al., 2015), sendo as ferramentas meta-ômicas consideradas mais informativas para o entendimento da comunidade microbiana. Por meio da metagenômica *shotgun*, é possível acessar informações funcionais da comunidade, enquanto o sequenciamento massivo do gene RNAr 16S fornece informações diretas apenas sobre a identidade dos microrganismos. Além disso, por meio das ferramentas meta-ômicas tem-se a possibilidade de entendimento sobre como o consórcio microbiano se relaciona com as variáveis operacionais, e ainda sobre as rotas metabólicas envolvidas em sistemas complexos de aproveitamento de biomassa lignocelulósica (BRUCE et al., 2010; DELFORNO et al., 2017).

Além da composição do inóculo, outras variáveis são relevantes ao processo de obtenção de H₂ em reatores anaeróbios, como temperatura, pH inicial, concentração de nutrientes e o tipo de substrato utilizado. Desta forma, o uso de ferramentas estatísticas torna-se útil no estabelecimento das condições operacionais ótimas para cada processo fermentativo. A obtenção de produtos de interesse biotecnológico pode ser otimizada a partir da manipulação das variáveis operacionais, bem como das condições nutricionais do meio de cultivo, a fim de obter condições economicamente viáveis e com maior produção do metabólito de interesse. Entretanto, uma vez que não há consenso sobre as condições ótimas para obtenção de biogás a partir de resíduos de citros, como pH, temperatura (faixa mesofílica ou termofílica), condições nutricionais, concentração ideal de inóculo ou de substrato, se fazem necessários novos estudos acerca destas variáveis.

O método mais comum para seleção de variáveis operacionais é o unidimensional, ou também conhecido como “*one factor at a time*”, em que se varia uma categoria por vez e as demais são mantidas como constantes (MATHUR et al., 2013; KORAYEM et al., 2015; WU et al., 2018). Entretanto, este método pode ser inviável quando há muitas variáveis a serem estudadas, além de não garantir que as melhores condições serão alcançadas (NAVEENA et al., 2005). O delineamento experimental de Plackett & Burman (PLACKETT; BURMAN J.P., 1946) é ferramenta de *screening* de variáveis significativas e seus efeitos em diferentes processos (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Sitthikitpanya et al. (SITTHIKITPANYA; REUNGSANG; PRASERTSAN, 2018) analisaram o efeito de diferentes variáveis (concentração de substrato, enzima, inóculo, pH e temperatura) na obtenção de hidrogênio e metano a partir de biomassa lignocelulósica (tronco de óleo de palma) por *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Os autores

observaram que o pH inicial e concentração de substrato foram as variáveis mais influentes no processo, enquanto as demais não foram significativas ($p \leq 0,05$) e fixadas em níveis menores, reduzindo os custos relacionados aos reagentes.

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) possibilita a obtenção de um modelo polinomial, que pode ser utilizado para descrever tanto o efeito de cada fator estudado, quanto a interação entre diferentes fatores em uma resposta de interesse (RODRIGUES; IEMMA, 2014), *e.g.*, obtenção de H_2 . A partir do modelo de regressão, é possível estabelecer as condições ótimas de operação, a fim de maximizar a obtenção do subproduto de interesse. Villa-Montoya et al. (2020) obtiveram $29,46 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$ após otimização usando DCCR em reatores em batelada, avaliando a concentração do substrato (resíduos de café), pH (4,82-8,18) e volume do *headspace* (33,18-66,82%). As condições ótimas identificadas foram pH 7,0, com 7 g.L^{-1} de substrato e 30% de *headspace*, sendo que o ácido butírico foi o principal metabólito obtido (3.838 mg.L^{-1}).

Neste contexto, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a utilização de resíduos sólidos de citros como substrato para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico e biogás em reatores em batelada, além de isolar, identificar e caracterizar bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas a partir dos resíduos de citros *in natura*. Para tanto, utilizou-se os métodos estatísticos de Plackett & Burman seguido de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), além de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) em plataforma *Illumina HiSeq*, via metagenômica *metabarcoding* e *shotgun*.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL

2.1.1 Hipótese geral

Os experimentos conduzidos foram baseados na hipótese geral de que os resíduos do beneficiamento de citros, tanto as cascas, quanto os bagaços, devido à sua composição rica em material lignocelulósico, podem ser usados como substratos na digestão anaeróbia em reatores em batelada, possibilitando a obtenção de produtos de interesse biotecnológico (ácidos orgânicos, álcoois e biogás), e como fonte de microrganismos fermentativos autóctones potencialmente celulolíticos.

2.1.2 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a utilização de resíduos sólidos de citros como substrato para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico e biogás em reatores em batelada, além de isolar, identificar e caracterizar bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas a partir dos resíduos de citros *in natura*.

2.2 HIPÓTESES E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Hipótese e objetivo específico 1

Hipótese 1- Os resíduos de citros *in natura* são fonte de microrganismos celulolíticos e fermentativos.

Objetivo 1.1- Avaliar consórcio fermentativo de bactérias anaeróbias celulolíticas e fermentativas a partir do enriquecimento de microbiota autóctone de resíduos de citros (cascas e bagaço *in natura*) em relação à obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

Objetivo 1.2- Caracterizar bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas a partir do consórcio autofermentativo do resíduo de citros.

2.2.2 Hipótese e objetivo específico 2

Hipótese 2- Os grânulos de reatores UASB aplicados ao processamento de águas residuárias provenientes de avícolas ou vinhaça de cana-de-açúcar podem ser considerados fonte de microrganismos fermentativos e metanogênicos para obtenção de biogás e demais produtos de interesse biotecnológico, a partir da fermentação de resíduo de citros.

Objetivo 2.1- Comparar o efeito da adição de lodo granulado termófilico e mesofílico de reator UASB como fonte de biomassa anaeróbia na obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros, bem como avaliar a faixa de temperatura mais adequada para o processo.

2.2.3 Hipótese e objetivo específico 3

Hipótese 3- O aumento da obtenção de biogás é possível por meio da aplicação de pré-tratamentos de hidrotermólise e deslignificação alcalina, com a finalidade de romper a estrutura lignocelulósica dos resíduos de citros e facilitar o acesso microbiano. A aplicação dos pré-tratamentos de hidrotermólise e deslignificação alcalina causa modificações na estrutura lignocelulósica das cascas e bagaço de citros, como a deslignificação, rompimento das fibras de hemicelulose e também de celulose cristalina.

Objetivo 3.1- Comparar e caracterizar morfológicamente a estrutura lignocelulósica após diferentes estratégias de rompimento da casca e bagaço dos resíduos sólidos de citros.

2.2.4 Hipótese e objetivo específico 4

Hipótese 4- É possível definir as condições operacionais ótimas à obtenção de biogás e outros produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros por meio do método estatístico de Planejamento Experimental.

Objetivo 4.1- Avaliar as melhores condições para obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros por meio da ferramenta de *screening design* Plackett & Burman para avaliação da significância de diferentes variáveis operacionais, e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para obtenção de superfície de resposta indicando as regiões ótimas para o processo.

2.2.5 Hipótese e objetivo específico 5

Hipótese 5- A obtenção de H₂ a partir de resíduos sólidos de citros em reatores em batelada tem como consequência uma fração líquida rica em metabólitos, que podem ser utilizados como substrato por microrganismos sintróficos e/ou metanogênicos, como ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico) e oligo/monossacarídeos oriundos da degradação dos resíduos lignocelulósicos.

Objetivo 5.1- Avaliar o potencial metanogênico da fração líquida acidificada obtida após a fermentação dos resíduos sólidos de citros em reatores em batelada, simulando um reator em batelada de dois estágios (fase acidogênica e fase metanogênica).

2.2.6 Hipótese e objetivo específico 6

Hipótese 6- É possível determinar via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) o teor de limoneno, um dos principais inibidores da fermentação e metanogênese envolvidos na reutilização de resíduos sólidos de citros em reatores anaeróbios para recuperação de produtos de interesse biotecnológico.

Objetivo 6.1- Desenvolver e validar um método de determinação do teor de limoneno em amostras líquidas via GC-MS, além de aplicar o método desenvolvido no monitoramento de reatores em batelada operados em temperatura mesofílica (30 °C) para obtenção de hidrogênio.

2.2.7 Hipótese e objetivo específico 7

Hipótese 7- As diferentes condições operacionais aplicadas em diferentes etapas da presente pesquisa influenciam diretamente a comunidade microbiana envolvida no processo, bem como as vias metabólicas predominantes.

Objetivo 7.1- Avaliar as comunidades microbianas envolvidas em diferentes etapas da fermentação de resíduos de citros, por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração, bem como estimar sua contribuição nas diferentes etapas e vias metabólicas envolvidas na degradação de resíduos lignocelulósicos e digestão anaeróbia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIORREFINARIAS E BIOPRODUTOS

Um dos grandes desafios da sociedade moderna é tornar-se mais sustentável, não apenas no que diz respeito à emissão e disposição de resíduos, mas também à exploração de recursos naturais. A biorrefinaria, cuja instalação visa a integração entre processos e equipamentos de conversão da biomassa para a obtenção de combustíveis, energia e produtos químicos a partir de biomassa residual, é considerada tecnologia emergente, implantada com a finalidade principal de impulsionar o desenvolvimento rural a partir do uso desta biomassa residual e integração entre os processos de obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos. O objetivo deste processo é aproveitar ao máximo a matéria prima inicial bruta, bem como seus diferentes componentes e intermediários, maximizando seu valor agregado e diminuindo a emissão de resíduos (BORGES; COSTA, 2006; LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010).

Por meio da Agencia Internacional de Energia tem-se estimativa que até 2035 a demanda por combustíveis poderá aumentar em até 30% (MARQUES et al., 2013). Desta forma, a obtenção de biocombustíveis e bioprodutos é uma das propostas que vem ganhando destaque, uma vez que permite conciliar a obtenção de energia à reutilização de resíduos, minimizando os impactos ambientais de sua disposição direta no ambiente. Os bioprodutos são produzidos a partir de matéria-prima biológica, por meio de reações termoquímicas ou bioquímicas que podem gerar etanol, metanol, butanol, óleos vegetais, biodiesel, biogás, entre outros, podendo ser aproveitados por meio da energia liberada em sua combustão direta ou para obtenção de energia elétrica (BALAT, 2011).

A alternativa mais indicada para a obtenção dos bioprodutos é a utilização de resíduos sólidos orgânicos, como os resíduos agroindustriais ou resíduos resultantes do processamento de alimentos, sendo que os resíduos alimentícios mais comuns provêm de vegetais, carnes, frutas, grãos e laticínios (KIRAN et al., 2014). A utilização de matéria-prima orgânica não residual, a princípio, não é recomendada, pois pode acarretar na redução da quantidade de suprimentos e no aumento de seu preço, levando a instabilidade sociopolítica (SU; TAN; XU, 2016).

O uso de biocombustíveis, como o biogás, seria indicado para substituição dos combustíveis oriundos do petróleo (MARQUES et al., 2013). Sua obtenção vem sendo estudada a partir de diversos inóculos e substratos, como resíduos alimentícios de restaurantes (MASIH-DAS; TAO, 2018; JIANG et al., 2019), bagaço de cana-de-açúcar (LEITÃO et al., 2013; AHMAD et al., 2018; RABELO et al., 2018a; SOARES et al., 2018),

banana (MAZARELI et al., 2020), resíduos do processamento de café (VILLA MONTOYA et al., 2020) e também os resíduos do processamento de citros (FORGÁCS et al., 2012; CALABRÒ et al., 2016; SU; TAN; XU, 2016).

A utilização do biogás resultante da fermentação de matéria orgânica como biocombustível pode ser considerada como uma via de duplo propósito, uma vez que além de promover a destinação adequada para diversos resíduos orgânicos, como as cascas e bagaço de citros, a captação desse gás impede sua liberação para a atmosfera (RUIZ; FLOTATS, 2016). Considera-se que este processo fomenta destinação mais adequada para os resíduos orgânicos, pois após a produção de biogás, o resíduo sólido resultante é rico em nutrientes, podendo ser utilizado como fertilizantes ou condicionantes do solo (LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010; KIRAN et al., 2014).

O metano, o hidrocarboneto mais simples e principal componente do biogás, vem sendo amplamente estudado como carreador energético, uma vez que produz mais energia por unidade de massa ($55,7 \text{ kJ.g}^{-1}$) quando comparado a outros hidrocarbonetos, além de produzir menos dióxido de carbono como subproduto. Desta forma, o metano pode ser utilizado para produção de energia elétrica por meio de sua queima em turbinas de gás ou caldeiras de vapor, além de que, desde meados de 1930, seu uso sob a forma de gás natural comprimido como combustível em veículos vem ganhando destaque (AZMAN et al., 2015; SHEN et al., 2016; WEI; GENG, 2016).

O hidrogênio é o elemento mais abundante do universo, compreendendo aproximadamente três quartos de toda a matéria, sendo que a superfície terrestre contém cerca de 0,14% deste elemento na forma gasosa (H_2). Uma vez que o principal produto da combustão deste gás é a água e possui alto rendimento energético (122 kJ.g^{-1}), pode ser considerado como um combustível não poluente e como alternativa ao uso de combustíveis fósseis (DAS; VEZIROGLU, 2001; ILGI KAPDAN; KARGI, 2006; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

O H_2 pode ser útil para o armazenamento e transmissão da energia gerada em sistemas nucleares ou de energia solar. Além disso, a hidrogenação tem outras aplicações além do uso como combustível, como eliminador de O_2 a fim de prevenir a oxidação e corrosão de materiais ou também como refrigerante em geradores elétricos. O H_2 pode ser obtido a partir de combustíveis fósseis ou, alternativamente, a partir de biomassa, por meio de processos de eletrólise, fotólise, processos termoquímicos ou processos biológicos, foco deste estudo, que tem como principais vantagens a possibilidade de realização a

temperaturas e pressões ambiente e, principalmente, o uso de biomassa residual como substrato de fermentação (DAS; VEZIROGLU, 2001; NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

3.2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os monossacarídeos podem ser estocados nas células animais e vegetais na forma de polímeros de alta massa molecular (glicogênio e amido, respectivamente) e que mantém a osmolaridade citosólica consideravelmente baixa, sendo liberadas e utilizadas para a síntese de ATP em situações de alta demanda energética, por meio do metabolismo aeróbio, em que o monossacarídeo será completamente oxidado a CO₂ e água, ou também anaeróbio, por meio da fermentação destes açúcares a diversos produtos finais, como ácidos orgânicos e/ou álcoois, dependendo da rota metabólica favorecida (NELSON; COX, 2011). Entretanto, existem outros polissacarídeos abundantes nas células, que possuem função estrutural e não de armazenamento energético, mas que também podem conter elevada energia potencial.

A biomassa lignocelulósica, oriunda de atividades municipais, florestais e também agroindustriais, pode ser considerada como fonte abundante de recursos orgânicos, uma vez que grandes quantidades deste resíduo são acumulados anualmente (ZHENG et al., 2014). Um dos fatores limitantes da destinação destes resíduos como substrato é a sua difícil assimilação, o que impede a bioconversão direta desta biomassa à glicose (DE LA RUBIA et al., 2011). Sua composição é complexa, uma vez que é formada majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, variando de acordo com fatores ambientais ou com as características vegetais, sendo que normalmente a proporção destes é em média 70-78% de celulose e hemicelulose e 18-28% de lignina (DEMÍRBAS, 2005; SUNDBERG, 2010; FRUNZO; PIROZZI, 2015), mas que podem variar de acordo com a origem do resíduo, sendo que resíduos agroflorestais geralmente possuem maior teor de lignina em relação aos resíduos agrícolas (SUNDBERG, 2010).

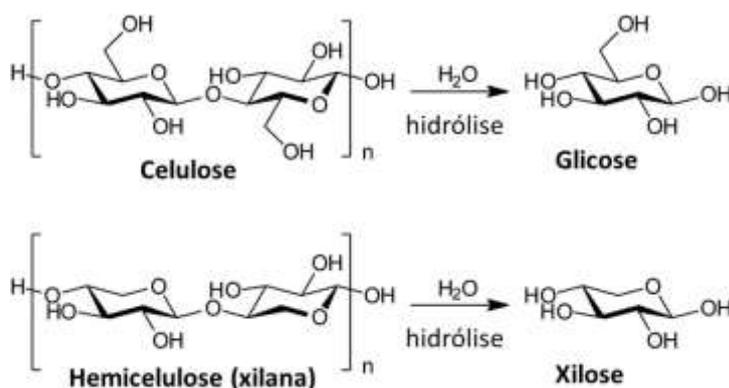
A celulose, principal componente dos materiais lignocelulósicos, é um biopolímero linear de celobiose (dissacarídeo de glicose), fortemente ligado e coberto por lignina nas estruturas lignocelulósicas, que por sua vez é um grande complexo aromático de heteropolímeros hidrofóbicos, o que confere a resistência do material à biodegradação (ZHENG et al., 2014). A resistência da lignina a torna a principal responsável pela dificuldade de se converter os polissacarídeos a monossacarídeos, entretanto, apesar de sua

insolubilidade em água, a lignina pode se dissolver em temperaturas elevadas (180 °C), condições ácidas ou alcalinas (GRABBER, 2005).

Sintetizada pelas plantas na magnitude de aproximadamente 10^{11} toneladas por ano, a celulose (Figura 3.1) é considerada um dos compostos mais abundantes da biosfera, e é um polissacarídeo polimérico linear e fibroso de celobiose, cuja principal função biológica é a função estrutural na parede celular vegetal (NELSON; COX, 2011). É formada por dissacarídeos de glicose, fortemente ligados via ligações glicosídicas β -1,4. As cadeias celulósicas possuem grande quantidade de grupos hidroxila, o que leva à formação de ligações de hidrogênio nestas mesmas cadeias ou em cadeias adjacentes, interligadas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, resultando em microfibras de alta resistência (ZHENG et al., 2014).

Outra característica que confere resistência à celulose são as diferentes possibilidades de orientação das moléculas ao longo das fibras, resultando em diferentes níveis de cristalinidade, podendo, ser subdividida em duas regiões principais: amorfa (baixa cristalinidade) e cristalina (alta cristalinidade), sendo que quanto mais cristalina a estrutura, mais resistente (ATALLA; VANDERHART, 1984; ZHENG et al., 2014).

Figura 3.1. Conformação em cadeira da celulose e da hemicelulose e seus monômeros originados após hidrólise.



Fonte: Modificado de Kobayashi et al. (2016).

Outros homopolissacarídeos, como o amido, diferem da celulose devido a sua configuração molecular em α -1,4 ao invés de β -1,4. Esta diferença é importante, uma vez que as enzimas produzidas pelos animais e pela maior parte dos microrganismos possuem afinidade por moléculas na configuração α (amilases e glicosídeos) e apenas alguns microrganismos restritos a ambientes específicos (como o trato digestivo ou rúmem de herbívoros) ou decompositores de biomassa vegetal possuem enzimas celulases ou demais enzimas do complexo celulolítico (NELSON; COX, 2011).

A hemicelulose, segundo componente mais abundante da estrutura lignocelulósica, difere em relação à celulose no que diz respeito a sua conformação e composição, pois são amorfas e também heterogêneas, compostas de várias pentoses, (como a xilose e a arabinose), hexoses (glicose, galactose, manose, ramnose) e também de ácidos (glucurônico, metil glucurônico e galacturônico). As cadeias de hemicelulose são as responsáveis pela interligação entre a celulose e a lignina, além de que são mais suscetíveis à hidrólise devido a sua estrutura amorfa (ZHENG et al., 2014).

Por fim, a lignina é um complexo aromático amorfo, hidrofóbico e heterogêneo, composto de unidades de fenilpropano (álcool coniferílico e sinapílico) com grupos hidroxila, metoxila e carbonila. A lignina é a responsável pela rigidez da estrutura tridimensional da lignocelulose (DE LA RUBIA et al., 2011; ZHENG et al., 2014). (GRABBER, 2005; LEITÃO et al., 2013). De acordo com Grabber (2005) e Leitão et al. (2013), a estrutura da lignina pode ser desestabilizada em altas temperaturas (180 °C) e em condições ácidas ou alcalinas.

A obtenção de bioprodutos depende da hidrólise dos resíduos lignocelulósicos a carboidratos mais assimiláveis, ou seja, a quebra das ligações glicosídicas dos polissacarídeos a monossacarídeos e oligossacarídeos (KIRAN et al., 2014), e também a diminuição da cristalinidade da estrutura celulósica (ZHENG et al., 2014) sendo para tanto, utilizados métodos físicos, químicos ou biológicos no pré-tratamento destes resíduos.

3.3 RESÍDUOS SÓLIDOS AGROINDUSTRIAIS

A agroindústria constitui uma das principais parcelas da economia, tanto para o abastecimento interno, quanto para exportação (SPADOTTO; RIBEIRO, 2007). As atividades da agroindústria podem provocar impactos ambientais consequentes do desmatamento, queimadas em pastagens e florestas, poluição relacionada ao uso de agrotóxicos, entre outros. No Brasil, dado seu potencial agrícola, a gestão dos resíduos da agroindústria é de vital importância. Em 2013, estima-se que o agronegócio foi responsável por 22,54% do PIB nacional (CEPEA, 2013), ou seja, a atividade agrícola se traduz em benefícios ao país, com geração de empregos e maior contribuição ao desenvolvimento econômico e social (SCHNEIDER et al., 2012). Diversos motivos vêm incentivando as empresas a buscar alternativas para a disposição dos resíduos gerados durante o processamento de diferentes matérias primas, sendo que além dos riscos de danos ambientais, também podem ser citados os prejuízos financeiros advindos do não cumprimento da legislação ambiental vigente.

Os resíduos agroindustriais podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos, sendo os primeiros aqueles relacionados a embalagens de agrotóxicos e fertilizantes, além de insumos veterinários, enquanto os resíduos orgânicos, foco desta pesquisa, compreendem os resíduos agrícolas/agroindustriais (culturas permanentes ou temporárias), dejetos de animais e resíduos florestais/silviculturais (ABNT, 2004).

Quando analisadas as principais fontes de resíduos sólidos agroindustriais e orgânicos de culturas permanentes nacionais, Schneider et al. (2012) apontam que os resíduos de citros são os mais críticos (aproximadamente 8.825.276 t por ano), seguido pelo café (1.220.029 t por ano), coco-da-baía (405.009 t por ano), banana (99.640 t por ano) e castanha-de-caju (80.484 t por ano). Todos estes resíduos têm potencial para uso em reaproveitamento energético (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2008; FORGÁCS et al., 2012; LEITÃO et al., 2013; CALABRÒ et al., 2016; SU; TAN; XU, 2016), embora ainda não haja legislações específicas para este fim. Estes dados compreendem apenas os resíduos do processamento industrial de citros, excluindo os resíduos de feiras e residências, pois estes são considerados junto aos resíduos urbanos, os quais não fazem parte do escopo deste estudo; além dos resíduos orgânicos gerados diretamente na atividade de agricultura, uma vez que estes são utilizados como complemento nutritivo aos solos no próprio local de produção, não sendo, portanto, indicado seu uso em outras finalidades (SCHNEIDER et al., 2012).

Uma das vantagens do uso dos resíduos sólidos orgânicos em sistemas de reaproveitamento energético é a consequente redução anual de material aterrado ou disposto de forma inadequada, diminuindo assim a necessidade de implantação de aterros sanitários em novas áreas. Além disso, a disposição de resíduos orgânicos de forma inadequada pode agravar a emissão de gases do efeito estufa, como o metano e dióxido de carbono (DEPPENMEIER, 2002). Desta forma, planos de gestão de resíduos cada vez mais adequados ambientalmente e vantajosos economicamente devem ser estudados, uma vez que as atividades agroindustriais não trazem apenas prejuízos para os estados e municípios que os abrigam, mas também benefícios proporcionais ao crescimento deste setor, portanto, não devem ser desestimuladas.

Com o desenvolvimento da atividade econômica e o crescente aumento populacional, problemas como o acúmulo de resíduos de origem antrópica provenientes da atividade doméstica e agroindustrial, e também a necessidade de novas fontes de energia renováveis e menos poluentes, ainda permanecem sem solução adequada. A obtenção de

biocombustíveis e bioprodutos é uma das propostas que vem ganhando destaque, pois permite conciliar a produção de energia à utilização de resíduos, minimizando os impactos ambientais de sua disposição direta no ambiente.

3.4 RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE CITROS

O Brasil é o principal produtor de citros do mundo, sendo responsável por aproximadamente 35% da produção mundial de laranja e 81,6% da exportação de suco concentrado (BORGES; COSTA, 2006; CALABRÒ et al., 2016), seguido pelos Estados Unidos da América, Índia e China. No Brasil, a atividade de exportação citrícola teve início na década de 80 no Estado do Rio de Janeiro. A partir de 1957, o Estado de São Paulo tornou-se o principal produtor devido as suas condições edafoclimáticas favoráveis (BORGES; COSTA, 2006).

A laranja (*Citrus sinensis* L.) pode ser considerada como uma das frutas mais cultivadas, sendo associada à obtenção de diversos produtos, como geleias, óleo essencial, mel de flor de laranjeira e conservas (LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010), entretanto, a sua principal destinação é a produção de suco, compreendendo 70% do total (FAOSTAT, 2014; CALABRÒ et al., 2016), de 88 milhões de toneladas por ano.

Após o seu beneficiamento, entre 50-60% do volume de frutas produzidas tornam-se resíduos, incluindo suas cascas, bagaço, sementes e membranas, sendo que sua via de destinação mais comum é a sua utilização como matéria prima para a fabricação de ração para gado, compostagem ou incineração do resíduo excedente (LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010). Esses resíduos possuem em sua composição elevada quantidade de carboidratos, portanto, são considerados como potencial substrato para a obtenção de biogás e bioetanol, em biorrefinarias. Entretanto, a presença de limoneno e lignina tornam a degradação mais difícil, limitando a obtenção de produtos de interesse biotecnológico (POURBAFRANI et al., 2010).

Apenas no Brasil, estima-se que são produzidas aproximadamente 68 Mt por ano, dos quais 25-30 Mt são convertidos em resíduos. Devido a sua composição, sendo 75-85% de água, 17% de monossacarídeos solúveis, 0,8% de lignina ($C_{10}H_{11}O_{3,5}$), 9,2% de celulose ($CH_{1,67}O_{0,83}$), 10,5% de hemicelulose ($CH_{1,64}O_{0,78}$), 42,5% de pectina ($C_6H_{10}O_5$)_n e 0,3-0,5% de óleos essenciais, como o limoneno ($C_{10}H_{16}$) (BICAS et al., 2008; LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010; CALABRÒ et al., 2016), os resíduos dos cultivares e do processamento de citros vem sendo estudados como matéria prima alternativa e de baixo custo para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

Forgàcs et al. (2012) obtiveram concentração máxima de 247,7 mmol CH₄.L⁻¹ utilizando resíduo de citros tratado por explosão a vapor com inóculo de reator de planta de produção de biogás. Calabrò et al. (2016) utilizaram diversos inóculos para a obtenção de metano a partir de resíduos de citros, tais como resíduos industriais e resíduos agroindustriais, sendo obtidos os melhores resultados em experimentos em condição mesófila em reatores em batelada, com concentração de 33 mmol CH₄.L⁻¹. Além disso, destaca-se também a obtenção de 0,01 mmol CH₄.L⁻¹ utilizando resíduo pré-tratado de citros com inóculo de estrume suíno e lodo de esgoto (SU; TAN; XU, 2016).

Destaca-se que a obtenção de metano pode ser conciliada à obtenção de gás hidrogênio (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2008; KIRAN et al., 2014) e que não apenas os resíduos sólidos do processamento de citros podem ser utilizados como substrato para a obtenção de biogás, mas também a água residuária oriunda de sua prensagem, processo realizado quando há o objetivo de redução do volume dos resíduos ou sua posterior destinação como matéria prima para ração animal (LÓPEZ; LI; THOMPSON, 2010).

Anjum et al. (2017) avaliaram o efeito da co-digestão de resíduos do processamento de citros e resíduos de restaurantes em reatores em batelada incubados por 80 dias a 30 °C. Os autores verificaram que a proporção ideal seria de 1:1 de cada resíduo, a fim de reduzir a concentração de potenciais inibidores dos resíduos cítricos (*e.g.*, limoneno) e aumentar a eficiência da obtenção de biogás. Saidi et al. (2018) obtiveram concentração máxima de 446 mmol H₂.L⁻¹, em condições hipertermófilas (80 °C) em pH 7,0 e reator de tanque de agitação contínua, utilizando como inóculo cultura pura da bactéria *Thermotoga maritima* e resíduos de vegetais e frutas, incluindo citros/laranja, como fonte alternativa de carbono.

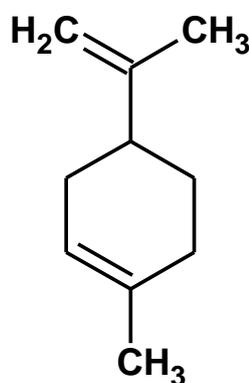
Além da difícil degradação dos componentes dos resíduos do processamento de citros, sua acidez e quantidades consideráveis de óleos essenciais (OEs), como o limoneno, podem inibir o desenvolvimento microbiano, uma vez que induz a lise celular (BAKKALI et al., 2008). Estima-se que a inibição microbiana pelo limoneno ocorra em concentrações acima de 25-75 mg.L⁻¹.d⁻¹, mas ainda sobre isso não há valores definidos (RUIZ; FLOTATS, 2016). Todavia, são poucas as pesquisas envolvendo a obtenção de hidrogênio a partir de resíduos de citros, bem como pesquisas sobre o efeito destes OE, como o limoneno, em processos fermentativos.

Os óleos essenciais (OEs) são compostos aromáticos naturais e voláteis, formados como metabólitos secundários por algumas espécies de plantas, compreendendo entre 0,3-

0,5% dos resíduos sólidos de citros *in natura* (CALABRÒ et al., 2016). Sua síntese ocorre em todos os órgãos das plantas (caule, flores, folhas, sementes, frutos, raízes, lenho) e é armazenada em células secretoras especializadas ou tricomas. Devido às suas propriedades medicinais, anti-sépticas e microbicidas, além de sua fragrância, os óleos essenciais são utilizados como aditivos em produtos farmacêuticos e da indústria de alimentos, como anestésicos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, entre outros (NEGRO et al., 2017; LOTITO et al., 2018).

Tendo em vista que os óleos essenciais são metabolizados principalmente como mecanismo de defesa das plantas, esses compostos podem ser tóxicos para outros organismos devido à sua afinidade lipofílica (JUSTINO DE ARAÚJO et al., 2020). Esta natureza lipofílica possibilita a passagem do óleo essencial pela parede celular e pela membrana citoplasmática, desestabilizando polissacarídeos e ácidos graxos, além de ocasionar a perda de íons nas células bacterianas, levando-os à lise (BAKKALI et al., 2008). O limoneno, um monoterpene monocíclico conhecido como D-limoneno ou (R)-(+)-4-isoproprenil-1-metilciclohexano (Figura 3.2), é o principal constituinte dos óleos essenciais na maioria das espécies cítricas, como limão, laranja, tangerina, limão e toranja (LOPRESTO, 2015; RUIZ; FLOTATS, 2016).

Figura 3.2. Estrutura química do limoneno.



Fonte: Elaborada em ChemSketch (ACD, 2019).

O teor de limoneno nos resíduos de processamento de citros é considerado um dos principais obstáculos a sua reutilização na obtenção de biogás. Sua concentração mínima para inibição é estimada em aproximadamente 200 mg.kg⁻¹ (POURBAFRANI et al., 2010; CALABRÒ et al., 2016; RUIZ; FLOTATS, 2016), e como as concentrações em resíduos sólidos de citros geralmente excedem esse limite, o efeito inibitório dessa substância é sempre esperado (RUIZ; FLOTATS, 2014).

Em aerobiose, a degradação do limoneno ocorre em aproximadamente 14 dias, no entanto, não há dados sobre esse processo em condições anaeróbias. Sabe-se que em anaerobiose, o limoneno apresenta maior toxicidade; no entanto, os mecanismos ainda não são claros. A toxicidade do limoneno pode ser atribuída tanto à maior sensibilidade dos organismos anaeróbios quanto à baixa pressão parcial de oxigênio no sistema, resultando em menor oxidação deste composto (RUIZ; FLOTATS, 2014).

Calabrò et al. (2016) descreveram a formação de *p*-cimeno após a biodegradação do limoneno em condições anaeróbias, nos quais o limoneno é mais tóxico que o *p*-cimeno (DORMAN; DEANS, 2000), justificando o maior tempo de adaptação da biomassa, proporcional às maiores concentrações de limoneno e à adaptação microbiana após esse período. Os autores observaram maior tempo de início da obtenção de H₂ (λ) em ensaios com maior concentração de limoneno; no entanto, a obtenção de metano atingiu valores finais de concentração (33 mmol CH₄.L⁻¹) similares aos do controle.

Diversos métodos descritos na literatura podem ser utilizados para determinação do conteúdo de limoneno, como Espectroscopia de Absorção Molecular (UV-Vis) (AHRO et al., 2001), Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID), Espectrometria de Massa de Monitoramento de Íons Seleccionados (SIM) (BLANCH; NICHOLSON, 1998), Cromatografia a Gás com Colunas Capilares de Vidro (SONG et al., 2000), Espectrometria de Mobilidade por Íons Ultravioleta (IMS) (VAUTZ; SIELEMANN; BAUMBACH, 2004), Cromatografia Líquida de Alta Performance (RP-HPLC) (VILLA et al., 2007) e diferentes condições em Cromatografia em Fase Gasosa Acopladas à Espectrometria de Massa (GC-MS) (SONG et al., 2000; MARINE; CLEMONS, 2003; MILLER et al., 2008). De acordo com Adorno et al. (2014), métodos que envolvem análise direta do *headspace* são mais vantajosos quando comparados àqueles com injeção de amostra líquida na coluna cromatográfica, preservando seu tempo de vida.

Em pesquisas anteriores, o método via GC-MS foi utilizado para determinação de limoneno em amostras de citros (DAVIDOWSKI; DIMARCO, 2009), entretanto, ainda são escassos os dados referentes à sua aplicação em amostras de reatores anaeróbios, comumente alimentados com águas residuárias.

3.5 PRÉ-TRATAMENTOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Diversos resíduos orgânicos podem ser utilizados para a obtenção de bioprodutos a partir da digestão anaeróbia da matéria orgânica, entretanto, um dos obstáculos é a presença dos componentes de difícil degradação, como a celulose e a lignina, que podem restringir

este processo devido a sua difícil assimilação pelos microrganismos responsáveis pela decomposição (FRUNZO; PIROZZI, 2015). Desta forma, é necessária a aplicação de métodos físicos, químicos e biológicos de hidrólise dos componentes lignocelulósicos dos resíduos orgânicos. A Figura 3.3 sumariza os diferentes tipos de pré-tratamentos aplicáveis à biomassa lignocelulósica.

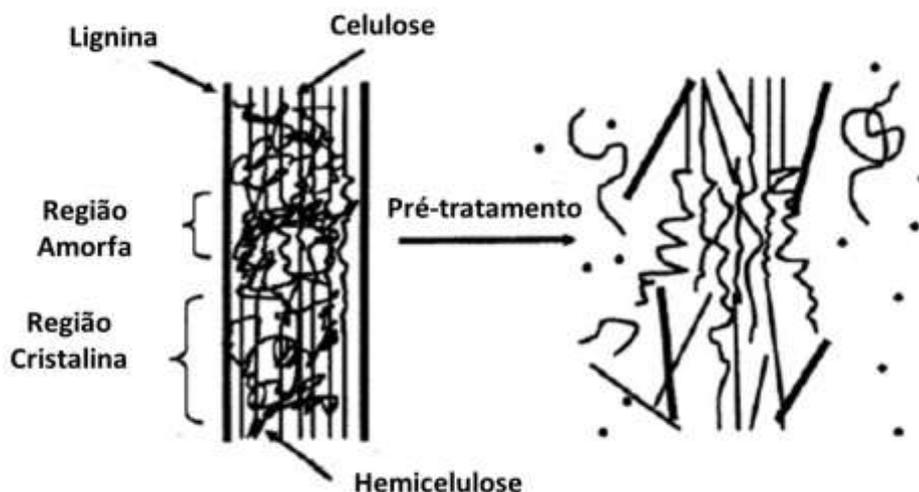
Figura 3.3. Resumo dos principais métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Elaboração própria.

A obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de diversos resíduos, entre eles os resíduos lignocelulósicos, vem sendo estudada como forma de solucionar, tanto a problemática de seu descarte inadequado, quanto à necessidade de se buscar novas fontes de carbono para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

A etapa de pré-tratamento é importante para reduzir a rigidez da lignina (Figura 3.4), possibilitando a hidrólise da celulose e hemicelulose e, conseqüentemente, a conversão dos carboidratos poliméricos a monômeros fermentáveis (SUNDBERG, 2010). A eficiência da etapa de pré-tratamento depende de um orçamento positivo (HJORTH et al., 2011), uma vez que esta etapa é considerada a mais onerosa do processo de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico (CABRERA et al., 2014), logo, faz-se necessário que o método mais eficiente seja escolhido. As principais vantagens e limitações de cada método estão descritas na Tabela 3.1.

Figura 3.4. Esquemática simplificada do rompimento da estrutura lignocelulósica após pré-tratamento.

Fonte: Modificado de Mosier et al. (2005).

Tabela 3.1. Comparação entre os métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento de biomassa lignocelulósica.

Método	Pré-tratamento	Limitações
Físico	Trituração mecânica	- Consumo de energia
	Explosão a vapor	- Degradação da xilose - Geração de inibidores microbianos
	Pirólise	- Consumo de energia - Formação de cinzas
	Hidrotermólise	- Consumo de energia
Químico	Explosão por fibra de amônia	- Baixa eficiência em biomassa com alto teor de lignina
	Explosão de CO ₂	- Não afeta a lignina e a hemicelulose
	Ozonólise	- Oneroso, requer grandes quantidades de O ₃ - Alto custo de reagentes
	Hidrólise ácida	- Risco de corrosão dos reatores - Risco de poluição secundária
	Hidrólise por alcalinização	- Longo tempo de exposição requerido - Formação de sais irrecuperáveis
Biológico	Biodegradação	- Processo muito lento

Fonte: Modificado de Balat (2011).

Ainda não há um consenso sobre o método mais adequado para o tratamento de resíduos orgânicos com composição lignocelulósica, uma vez que todos os métodos físicos, químicos e biológicos possuem vantagens e limitações (BALAT, 2011). Desta forma, maiores estudos sobre o potencial de diferentes métodos no pré-tratamento deste tipo de resíduo, entre eles os de citros, visando a posterior obtenção de produtos de interesse biotecnológico torna-se desejável. A importância de se reduzir o conteúdo lignocelulósico

do substrato começa a ser evidenciada em meados da década de 80 com os trabalhos de Song e Lee (1984) e Sharma, Madan e Vasudevan (1989). Tais autores indicam que a obtenção de metano é maior quando são utilizados como substrato tecidos vegetais jovens, provavelmente devido à menor lignificação em relação aos tecidos adultos. Além disso, também fica evidente o aumento na concentração de glicose nos reatores após aplicação do método de hidrólise ácida do substrato lignocelulósico, tornando-o mais biodisponível.

A obtenção de biogás a partir de resíduos celulósicos/lignocelulósicos vem sendo avaliada pelo Grupo de Pesquisa em Processos Anaeróbios do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo *campus* São Carlos (EESC-USP). Botta et al. (2016), utilizaram consórcio microbiano obtido a partir de fluido de rumem pré-tratado com ácido, mantendo-se este fluido durante 24 h a 37 °C e em pH 3,0, ajustado com HCl 3M e reajustado após este período para pH 7,0 com NaOH 1 mol.L⁻¹. O inóculo pré-tratado foi utilizado em bateladas com o objetivo de avaliar a obtenção de H₂ a partir de resíduo de escritório (papel) como substrato. Além disso, os autores adicionaram celulase, a fim de aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis a partir da celulose do papel, obtendo-se degradação de aproximadamente 65,5% do substrato com 5,51 mmol.g⁻¹ DQO.

O bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado como substrato após diferentes pré-tratamentos e diferentes inóculos (SOARES et al., 2017; AHMAD et al., 2020) para a obtenção de H₂ e CH₄. Soares et al. (2017a), avaliaram a obtenção de H₂ a partir de bagaço de cana-de-açúcar após hidrotérmólise (200 °C, 10 minutos, 16 bar), em reatores em batelada em condições termofílicas (60 °C). Os autores obtiveram concentração máxima de 17,7 mmol H₂.L⁻¹, além de ácido acético (50,44 mg.L⁻¹), ácido butírico (209,71 mg.L⁻¹), etanol (38,4 mg.L⁻¹) e metano (6,27 mmol CH₄.L⁻¹).

Rabelo et al. (2018b) avaliaram diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar (0,8 a 9,2 g.L⁻¹) como substrato e pH inicial do meio reacional (4,6 a 7,4 g.L⁻¹) a fim de otimizar a obtenção de H₂. A partir do método estatístico de Delineamento Composto Central, os autores obtiveram 19,84 mmol H₂.L⁻¹ nas condições otimizadas, de pH inicial 7,2 e 7 g.L⁻¹ de substrato (bagaço de cana-de-açúcar). Além disso, os autores identificaram os microrganismos endógenos do bagaço de cana-de-açúcar, os quais foram semelhantes a *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Paenibacillus* sp.

Ahmad et al. (2020) também utilizaram o método de Delineamento Composto Central para otimização da obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Neste estudo, o principal objetivo foi a avaliação dos efeitos da

aplicação de pré-tratamento de deslignificação alcalina conciliado à hidrotermólise, a fim de promover a deslignificação do substrato. As variáveis operacionais estudadas foram temperatura do pré-tratamento (160, 180 e 200 °C), tempo de exposição do substrato à hidrotermólise (5, 12 e 19 minutos) e concentração de peróxido de hidrogênio (2, 4 e 6%). Os autores observaram que após o pré-tratamento otimizado (180 °C, 12 min, 7,36% H₂O₂), houve 73,09% de deslignificação, 75,83% de remoção de xilose e 139,21% de aumento do conteúdo de glicanas. Além disso, obtiveram 13,1 mmol CH₄.L⁻¹ para os resíduos pré-tratados.

Além dos trabalhos citados, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar resíduos lignocelulósicos, tais como, cascas de frutas (banana), cascas de café e resíduos de cervejaria, como substratos para a obtenção de biogás e demais compostos de interesse biotecnológico (VILLA MONTOYA et al., 2019, 2020; MAZARELI et al., 2020), incluindo os resíduos de citros, foco desta pesquisa.

Uma das limitações associadas à aplicação de pré-tratamentos é a possível formação de inibidores. Os principais inibidores da fermentação são os ácidos fracos, furanos e compostos fenólicos. A geração destes compostos varia de acordo com o pH, tempo de exposição da biomassa ao pré-tratamento no processo de hidrólise e temperatura. Após a hidrólise, a hemicelulose é convertida em xilose, manose, galactose, glicose e ácido acético. Entretanto, Sundberg (2010) aponta que em pré-tratamentos sob temperaturas muito elevadas, acima de 200 °C há aumento da formação de compostos inibidores, como furfural e 5-hydroxymetil furfural (HMF), a partir da degradação da xilose e hexoses, respectivamente.

Com base nos dados apresentados na Tabela 3.2, pode-se observar para os resíduos de citros de forma geral, maior obtenção de metano, quando comparado aos demais resíduos, como o bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, também é possível observar que entre os diversos tipos de pré-tratamento, a aplicação dos químicos (deslignificação ácida e alcalina) e físicos (moagem e trituração, hidrotermólise e explosão a vapor) oferecem melhores resultados em relação aos pré-tratamentos biológicos, como a biodegradação.

Observa-se ainda que os resíduos de citros já foram utilizados como substrato para a obtenção de metano a partir de diferentes pré-tratamentos. Calabrò et al. (2016) utilizaram apenas a moagem e trituração em resíduos de citros e, ainda assim, obtiveram valores maiores em relação aqueles obtidos por Su, Tan e Xu (SU; TAN; XU, 2016), que utilizaram, também em resíduos de citros, a biodegradação por fungos das espécies

Phanerochaete chrysosporium e *Aspergillus niger*. Forgàcs et al. (2012) utilizaram o método de hidrotermólise (150 °C durante 20 minutos) aplicado aos resíduos de citros que, de acordo com Zheng et al. (2014), é um dos métodos mais recomendados quando se tem como objetivo a obtenção de metano (247,7 mmol CH₄.L⁻¹).

Além dos resíduos de citros, a obtenção de metano pode ser obtida a partir de outros resíduos lignocelulósicos, como resíduos do processamento de semente de girassol (DE LA RUBIA et al., 2011), bagaço de cana-de-açúcar (LEITÃO et al., 2013), palha e grama (HJORTH et al., 2011) e resíduos do processamento de farinha de milho, linho, palha de trigo, cânhamo (SCHROYEN et al., 2015).

De La Rubia et al. (2011) avaliaram a obtenção de CH₄ em ensaios em batelada na faixa mesofílica (35 °C) e com lodo de esgoto anaeróbico como inóculo, a partir de resíduos do processamento de semente de girassol sem pré-tratamento, além da moagem e trituração do resíduo. Os autores compararam diferentes tamanhos de partículas dos resíduos, cujos melhores resultados foram aqueles dos ensaios contendo partículas maiores (0,7, 1,0, 1,4 e 2 mm), em relação aqueles com partículas menores (0,3 e 0,5 mm). Os autores atribuíram maior obtenção de CH₄ nos ensaios com partículas de 2 mm, e concentração máxima de 71,31 mmol CH₄.L⁻¹ à menor produção de ácido propiônico, ao contrário dos ensaios com partículas menores (0,3 mm), onde elevada produção do mesmo ácido e menor concentração de CH₄ (60,93 mmol CH₄.L⁻¹) foram reportadas.

Diferentes resíduos sólidos foram estudados por Hjorth et al. (2011) em reatores em batelada em temperatura mesofílica (35 °C), com estrume (suíno e bovino) como inóculo. Os autores obtiveram concentração máxima de aproximadamente 31,5 mmol CH₄.L⁻¹ nos ensaios contendo resíduo de palha pré-tratado por extrusão após 28 dias de incubação, enquanto nos demais ensaios para as mesmas condições foi verificado 28,1 mmol CH₄.L⁻¹ para serrapilheira, 29,2 mmol CH₄.L⁻¹ para fração sólida de esterco (de bovinos e suínos), 22,5 mmol CH₄.L⁻¹ para fração sólida de esterco (de bovinos e suínos) prensado e 5,6 mmol CH₄.L⁻¹ para grama.

Leitão et al. (2013) compararam pré-tratamentos químicos, como a deslignificação ácida e alcalina, além da hidrotermólise, aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar, em reatores em batelada na faixa mesofílica (35 °C) contendo rúmen de caprinos, lodo UASB e efluente de cervejaria como inóculo. Os autores verificaram que a melhor concentração de metano (66,12 mmol CH₄.L⁻¹) foi obtida nos ensaios contendo o resíduo pré-tratado em hidrotermólise, enquanto àqueles após deslignificação ácida e alcalina foram inferiores, de 40,91 e 46,47 mmol CH₄.L⁻¹, respectivamente.

Schroyen et al. (2015) avaliaram a influência da adição de enzimas (lacase e peroxidase) em resíduos de farinha de milho, linho, palha de trigo, cânhamo, obtendo concentrações entre 21,5-25,71 mmol CH₄.L⁻¹, em bateladas incubadas em condições mesofílica (27 °C) com estrume bovino como inóculo. Além disso, os autores obtiveram concentração de 40 mmol CH₄.L⁻¹ em reatores nas mesmas condições, com ensilagem de milho como substrato, atribuindo essa maior obtenção a partir deste resíduo, quando comparado aos resíduos de farinha de milho, linho, palha de trigo, cânhamo.

Tabela 3.2. Comparação da obtenção de metano em reator em batelada a partir de diferentes substratos e condições experimentais.

Pré-tratamento	mmol CH ₄ .L ⁻¹	Substrato	Pré-tratamento	Inóculo	Volume líquido (mL)	Incubação (dias)	Temperatura (°C)	Referência
Físicos	33	Resíduos de citros	Moagem e trituração	Estrume	500	30	35	Calabrò et al. (2016)
	66,1	Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrotermólise	Rumem de caprinos, lodo UASB, efluente de cervejaria	200	30	35	Leitão et al. (2013)
	247,7	Resíduos de citros	Explosão a vapor	Resíduo de unidade de biogás	600	50	55	Forgács et al. (2012)
	71,3	Resíduos do processamento de semente de girassol	Moagem e trituração	Lodo de esgoto anaeróbio	250	08	35	De La Rubia et al. (2011)
	39,3	Palha de trigo	Micro-ondas	Estrume suíno e lodo de esgoto	500	26	35	Jackowiak et al. (2011)
	31,5	Palha	Extrusão	Estrume suíno e bovino	450	28	35	Hjorth et al. (2011)
Químicos	40,9	Bagaço de cana-de-açúcar	Deslignificação ácida	Rumem de caprinos, lodo UASB, efluente de cervejaria	200	30	35	Leitão et al. (2013)
	46,5	Bagaço de cana-de-açúcar	Deslignificação alcalina	Rumem de caprinos, lodo UASB, efluente de cervejaria	200	30	35	Leitão et al. (2013)
Biológicos	0,01	Citros	Biodegradação	Estrume suíno e lodo de esgoto	4000	30	25	Su, Tan e Xu (2016)
	25,7	Farinha de milho, palha de trigo, cânhamo	Enzimática (lacase e peroxidase)	Estrume bovino	250	30	27	Schroyen et al. (2015)

Fonte: Elaboração própria.

Por fim, entre os pré-tratamentos mencionados, nota-se que os resultados obtidos por Calabrò et al. (2016), utilizando resíduos de citros sem outros pré-tratamentos além da moagem do resíduo, foram superiores em relação à obtenção de metano em comparação aos demais autores estudados. Entretanto, é importante salientar a influência do substrato utilizado, bem como de outras variáveis operacionais, como a origem do inóculo e faixa de temperatura.

Apesar do número reduzido de estudos com foco na obtenção de hidrogênio em comparação aos estudos voltados à obtenção de metano, é possível encontrar pesquisas nas quais sua obtenção é feita a partir do uso de resíduos do processamento de alimentos e biomassa lignocelulósica como substrato (Tabela 3.3).

Por exemplo, Rabelo et al. (2018) obtiveram $39,2 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ a partir de celulose ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fonte de carbono em reatores em batelada sob condições mesofílicas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) ao longo de 16 dias de incubação. Os autores utilizaram lodo de lagoa facultativa de tratamento de efluente da indústria de papel como fonte de microrganismos celulolíticos e produtores de H_2 , sendo que após a caracterização filogenética deste inóculo por meio de ferramentas de biologia molecular (clonagem e sequenciamento) foram identificados gêneros relacionados à atividade celulolítica e fermentativa, como *Clostridium*, *Klebsiella* e *Raoultella*.

Apesar das vantagens relacionadas à aplicação de pré-tratamentos a fim de promover a deslignificação da biomassa e aumentar sua biodegradabilidade, uma de suas principais desvantagens é a formação de subprodutos potencialmente tóxicos e inibitórios ao processo fermentativo, como compostos fenólicos, furanos e 5-hydroxymetilfurfural (5-HMF). Quéméneur et al. (2012) investigaram os efeitos de furfural, 5-HMF, fenol e lignina-Kraft na obtenção de H_2 a partir de xilose e lignina em reatores em batelada em condições mesofílicas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), utilizando lodo granulado anaeróbio pré-tratado por choque térmico ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min) como inóculo. Os autores concluíram que apesar de que todos os compostos estudados foram considerados significativos em relação ao efeito inibitório na obtenção de H_2 , os furanos ($0,40\text{-}0,51 \text{ mol H}_2$ por mol de xilose) foram relacionados a maiores impactos do que os compostos fenólicos ($1,28\text{-}1,39 \text{ mol H}_2$ por mol de xilose), quando comparados ao controle contendo apenas xilose ($1,67 \text{ mol H}_2$ por mol de xilose).

Soares et al. (2017a) aplicaram o método de superfície de respostas, a fim de obter as faixas operacionais ótimas em relação à temperatura de incubação e suplementação do meio reacional com extrato de levedura em reatores em batelada, utilizando bagaço de

cana-de-açúcar pré-tratado por hidrotermólise e lodo granulado diluído (10^{-4}) como inóculo. Os autores obtiveram $17,7 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ nas condições otimizadas previstas pelo modelo de segunda ordem, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura.

Gonzales et al. (2017) avaliaram três diferentes substratos lignocelulósicos (casca de fruto de palmeira, cascas de arroz e pellet de madeira de pinheiro) pré-tratados por moagem ($\leq 2 \text{ mm}$) e hidrólise ácida com H_2SO_4 (5%) em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados em batelada em faixa termofílica e lodo anaeróbio pré-tratado por choque térmico ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min) como inóculo. A maior concentração de H_2 observada foi de 44,9, 54,3 e 48,4 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ para os resíduos de frutos de palmeira, casca de arroz e madeira de pinheiro, respectivamente.

Além da utilização de consórcios microbianos, a obtenção de H_2 também é possível a partir da utilização de culturas puras como inóculo. Braga et al. (2017) utilizaram cepa de *Clostridium cellulolyticum* (atual *Ruminiclostridium cellulolyticum*) em reatores em batelada na faixa mesofílica ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato e pré-tratado por hidrotermólise. Sob tais condições foi obtido $7,6 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Zhao et al. (2012) utilizaram cultura pura de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* como inóculo para obtenção de $71,6 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ em reatores em batelada com sabugo de milho como substrato, pré-tratado por meio da biodegradação durante 21 dias com os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma viride*, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 130 rpm de agitação.

Com base no que foi mencionado, fica nítida a importância de se estudar cada processo com base em suas singularidades, como temperatura de incubação, composição do inóculo e especialmente no que diz respeito a origem do substrato e possíveis pré-tratamentos a serem aplicados na biomassa lignocelulósica, bem como a formação de compostos potencialmente tóxicos como consequência do processo de deslignificação.

Tabela 3.3. Comparação da obtenção de hidrogênio em reator em batelada a partir de diferentes substratos e condições experimentais.

Pré-tratamento	mmol H ₂ .L ⁻¹	Substrato	Pré-tratamento	Inóculo	Incubação (dias)	Temperatura (°C)	Referência
Ausente	39,2	Celulose	Nenhum	Lodo de lagoa facultativa de tratamento de efluente da indústria de papel	16	37	Rabelo et al. (2018)
	29,2	Compostos derivados da lignocelulose (xilose/lignina)	Nenhum	Lodo granulado anaeróbico pré-tratado por choque térmico (90 °C/10 min)	50	37	Quéméneur et al. (2012)
Físicos	17,7	Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrotermólise	Lodo granulado termofílico diluído (10 ⁻⁴)	16,6	60	Soares et al. (2017a)
	7,6	Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrotermólise	<i>Clostridium cellulolyticum</i> (atual <i>R. cellulolyticum</i>)	16,6	37	Braga et al. (2017)
	92,8	Palha de milho	Explosão a vapor	Lodo anaeróbico pré-tratado por choque térmico (220 °C/3 min)	2,5	35	Datar et al. (2007)
Químicos	54,3	Casca de arroz	Hidrólise ácida	Lodo anaeróbico pré-tratado por choque térmico (90 °C/30 min)	03	35	Gonzales et al. (2017)
Biológico	71,6	Sabugo de milho	Biodegradação (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) + Enzimática (<i>Trichoderma viride</i>)	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	1,4	60	Zhao et al. (2012)

Fonte: Elaboração própria.

3.5.1 Pré-tratamentos químicos

Os pré-tratamentos químicos geralmente envolvem a adição de reagentes, como a explosão por fibra de amônia, explosão por CO₂, deslignificação ácida (SONG; LEE, 1984; LEITÃO et al., 2013) e alcalina (CHANDRA et al., 2012; KIM; HAN, 2012; LEITÃO et al., 2013), tratamento oxidativo (CABRERA et al., 2014), adição de líquidos iônicos e a adição de solventes orgânicos, a fim de alterar, tanto as características químicas, quanto físicas da biomassa. Os métodos de pré-tratamento químicos foram amplamente estudados para a produção de bioetanol, entretanto, sua aplicação para a obtenção de biogás ainda é reduzida (ZHENG et al., 2014).

Na explosão por fibra de amônia, a biomassa é exposta à amônia em estado líquido, quente e sob alta pressão, havendo a despressurização súbita e ocasionando a desestabilização da estrutura lignocelulósica, além da descristalização da celulose. Este método é indicado especialmente para o tratamento de biomassa de resíduos agrícolas, uma vez que tem pouco efeito sob a lignina e a hemicelulose, embora seu alto custo possa restringir sua aplicação. Uma alternativa ao método químico de explosão por fibra de amônia é a explosão por CO₂, cuja metodologia é similar, porém o reagente utilizado é economicamente mais viável (SUNDBERG, 2010). Estes processos, apesar de extensivamente estudados para a produção de bioetanol, ainda não são aplicados no pré-tratamento para posterior obtenção de biogás (ZHENG et al., 2014).

O pré-tratamento ácido é considerado como um dos mais efetivos e, como o próprio nome sugere, envolve a adição de reagentes ácidos orgânicos ou inorgânicos, comumente o ácido sulfúrico (H₂SO₄). Pode ser feito, tanto com ácidos em altas concentrações (30-70%) e baixas temperaturas (*e.g.*, 40 °C), quanto com baixas concentrações (0,1%) e altas temperaturas (*e.g.*, 230 °C) (ZHENG et al., 2014).

O ácido pode ser adicionado à biomassa e ser aquecido indiretamente ou também via injeção direta de vapor, de forma similar ao método físico conhecido como explosão à vapor. Um dos maiores problemas relacionados a este método é a formação de resíduos ácidos que carecem de neutralização após o tratamento da biomassa (SUNDBERG, 2010), além da baixa fermentabilidade dos açúcares liberados após a hidrólise (SONG; LEE, 1984) e de sua toxicidade e corrosividade, requerendo, conseqüentemente, materiais caros para sua manipulação, armazenamento e utilização (ZHENG et al., 2014).

Leitão et al. (2013) utilizaram o método de deslignificação ácida aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar. O tempo de reação entre o ácido utilizado (HCl 0,63 M) foi de 6,4 minutos a 136 °C, sendo que foram obtidos 40,9 mmol CH₄.L⁻¹ após 30 dias de incubação em condições mesofílicas (35 °C), utilizando rúmem de caprinos, lodo de UASB e efluente de cervejaria como inóculos.

A deslignificação alcalina envolve a adição de bases, como o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) ou também hidróxido de amônio (NH₄OH) a fim de promover a solubilização da lignina e também da hemicelulose (SUNDBERG, 2010), aumentando a porosidade do material e reduzindo o grau de polimerização da lignina com outros polímeros e de cristalinidade (KIM; HAN, 2012; ZHENG et al., 2014), além do aumento do grau de hidratação da celulose (CABRERA et al., 2014).

Entre as diversas possibilidades de bases que podem ser adicionadas ao substrato na deslignificação alcalina, a mais utilizada em estudos para obtenção de biogás é o hidróxido de sódio (NaOH). Kim e Han (2012) obtiveram rendimento de glicose de 254,6 g.kg⁻¹ de biomassa de palha de arroz após aplicação deslignificação alcalina com NaOH (1,33 mol.L⁻¹) a 80 °C durante 60 minutos, sendo que houve remoção de aproximadamente 43% da lignina. Chandra et al. (2012) apontam que a eficiência da obtenção de metano a partir de palha de trigo aumentou até 112% após deslignificação alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) (4% dos ST) a 37 °C durante cinco dias, aumentando de 3,5 para 7,4 mmol CH₄.L⁻¹.

O pré-tratamento oxidativo ocorre por meio da adição de um composto oxidante, como oxigênio (O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido peracético (CH₃CO₃H) ou ozônio (O₃) na biomassa suspensa em água, sendo que seu principal efeito é a degradação da lignina. Um dos problemas relacionados a este pré-tratamento é a perda dos monossacarídeos, uma vez que a oxidação não é seletiva (SUNDBERG, 2010). Os peróxidos são transformados *in situ* em radicais hidroxil (OH[•]) que por sua vez são mais potentes do que o peróxido em si. É mais comum no tratamento da biomassa com uso posterior de obtenção de bioetanol, havendo poucos estudos sobre sua aplicação para processos de obtenção de biogás (ZHENG et al., 2014).

A união dos métodos de deslignificação alcalina com o pré-tratamento oxidativo utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um dos tratamentos químicos mais efetivos para resíduos agroindustriais, pois além de favorecer a quebra da lignina, é considerado um

processo ambientalmente mais vantajoso, uma vez que o reagente utilizado não representa grandes riscos ambientais e é utilizado em baixas concentrações. As espécies superóxidas altamente reativas e radical hidroxila são formados de acordo com a Equação 3.1 e Equação 3.2 (CABRERA et al., 2014).



O pré-tratamento via adição de solventes orgânicos, também conhecido como Organosolv, utiliza preferencialmente álcoois de baixo custo, como metanol e etanol. A adição de líquidos iônicos, como sais com cátions orgânicos ou ânions inorgânicos em baixas temperaturas, é um tipo de pré-tratamento químico promissor devido a sua grande eficiência na quebra da celulose e a possibilidade de recuperação de 100% do reagente utilizado ao término do tratamento. Entretanto, apesar de promissores, o Organosolv e os líquidos iônicos são considerados altamente dispendiosos e, portanto, pouco utilizados (SUNDBERG, 2010).

3.5.2 Pré-tratamentos físicos

Os tratamentos físicos são aqueles que não carecem de reagentes químicos e nem de microrganismos para promover a hidrólise da estrutura lignocelulósica (LEITÃO et al., 2013). Os tratamentos físicos mais recorrentes na literatura são a fragmentação (como a moagem e a trituração) (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2008; DE LA RUBIA et al., 2011), a explosão de vapor (auto hidrólise) (JACQUET et al., 2011; FORGÁCS et al., 2012), aplicação de água em estado líquido em elevadas temperaturas (hidrotermólise) (LEITÃO et al., 2013), pirólise, extrusão e, por fim, a irradiação (ultrassom e micro-ondas) (JACKOWIAK et al., 2011). Os tratamentos físicos são favoráveis de aplicação para posterior obtenção de metano a partir de resíduos agroindustriais (ZHENG et al., 2014).

A fragmentação é um método utilizado como etapa anterior aos demais tipos de pré-tratamento, não havendo consenso na literatura se pode ser considerado por si só um tipo de pré-tratamento ou não, sendo empregada principalmente com a finalidade de reduzir o tamanho das partículas e facilitar o manuseio e armazenamento do resíduo, podendo aumentar sua superfície de contato. Os métodos de fragmentação mais comuns são os

realizados por meio de máquinas de moagem ou trituração, como moinhos, martelo, facas, rolos e extrusores, dependendo do teor de umidade do substrato (ZHENG et al., 2014; CALABRÒ et al., 2016).

Kivaisi e Eliapenda (1994) afirmam que a redução das partículas de bagaço de coco de 5 mm para 0,85 mm aumentou a obtenção de metano a partir deste resíduo em até 30%. Entretanto, outros autores como De La Rubia (2011) apontam redução na obtenção de metano proporcional à redução no tamanho das partículas da biomassa (resíduos do processamento de semente de girassol), sendo que nos ensaios com partículas entre 1,4-2,0 mm observaram-se maiores concentrações de metano ($71,3 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$), quando comparado aos ensaios com partículas entre 0,36-0,55 mm e 0,71-1,0 mm ($62,2 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$), sendo uma possível explicação o aumento na produção de ácidos orgânicos voláteis. A partir destes resultados verifica-se a necessidade de considerar as diferenças entre o tipo de matéria-prima a ser tratada antes da escolha do pré-tratamento ideal, além de conciliar diferentes tipos de pré-tratamentos.

O método de explosão a vapor, um dos mais difundidos, consiste na submissão do substrato a elevadas temperaturas ($160\text{-}260 \text{ }^\circ\text{C}$) e ($0,69\text{-}4,83 \text{ Mpa}$) durante curto intervalo de tempo, para que a pressão seja rapidamente reduzida, finalizando as reações e possibilitando a descompressão explosiva da biomassa, ocasionando a hidrólise da biomassa em açúcares (SUNDBERG, 2010; ZHENG et al., 2014).

A explosão a vapor vem sendo aplicada em diversos substratos como pré-tratamento para a obtenção de metano, entre eles o bagaço de citros. Forgàcs et al. (2012) obtiveram concentração máxima de $247,7 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando resíduo de citros tratado por explosão a vapor como substrato e lodo termófilo ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) de unidade de biogás como inóculo. Além disso, estimou-se que houve redução de 94,3% da concentração de óleo essencial (limoneno) no resíduo após o pré-tratamento, e a concentração de metano aumentou cerca de 426% em comparação com o resíduo sem pré-tratamento.

Na hidrotermólise, reatores pressurizados são utilizados para manter a água no estado líquido em elevadas temperaturas, geralmente em torno de $200 \text{ }^\circ\text{C}$, condição favorável à penetração da água na estrutura da biomassa, hidratando a celulose, solubilizando a hemicelulose e removendo a lignina, facilitando sua degradabilidade, além de prover produto final com menor concentração de inibidores. Nestas condições experimentais a água tem uma constante dielétrica elevada, agindo como um ácido e possibilitando a dissociação da hemicelulose e dissolução parcial da lignina (ZHENG et

al., 2014). Apesar de sua demanda por energia elétrica, este método vem sendo apontado como uma possibilidade de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, uma vez que não carece de adição de reagentes químicos (SUNDBERG, 2010).

A hidrotermólise pode aumentar a produção de metano a partir de diversos substratos. Chandra et al. (2012) verificaram que a obtenção de metano a partir de palha de trigo aumentou 20% após o pré-tratamento via hidrotermólise (200 °C e 1,55 Mpa durante 10 minutos). Em outro trabalho, Chandra, Takeuchi e Hasegawa (2012) também comparam a obtenção de metano nas mesmas condições, usando palha de arroz como substrato ao invés de palha de trigo. Sob tais condições, os autores obtiveram resultados melhores quando comparados aos do estudo anterior, uma vez que nos ensaios com substrato pré-tratado, concentrações de CH₄ aproximadamente 222% superiores em relação ao substrato sem pré-tratamento. Essa variação ocorre devido às diferenças químicas e estruturais particulares de cada tipo de resíduo.

A hidrotermólise é promissora para aplicações futuras até mesmo em larga escala (ZHENG et al., 2014) e bons resultados tem sido observados para resíduos lignocelulósicos (LEITÃO et al., 2013). Este método foi escolhido para aplicação no pré-tratamento de resíduo de citros neste estudo.

O processo de extrusão, outro método físico de pré-tratamento, possibilita resultados similares aos da hidrotermólise, uma vez que a parede celular do material é quebrada após o alívio da pressão, causando a despolimerização da celulose, hemicelulose, lignina e também de proteínas. Hjorth et al. (2011) indicam que a eficiência na obtenção de metano a partir de biomassa agrícola (palha e grama) aumentou até 70% quando submetidas a este pré-tratamento.

Os métodos de irradiação incluem as micro-ondas, ultrassom, raios-gama e feixe de elétrons, sendo a primeira a mais estudada, na qual a energia é gerada por campo eletromagnético, fornecendo aquecimento rápido e uniforme com gradientes térmicos reduzidos. Possuem como vantagem a capacidade de aquecer rapidamente grandes volumes, levando a economia de energia, entretanto, são excessivamente onerosos (ZHENG et al., 2014). Jackowiak et al. (2011) obtiveram otimização de 28% na obtenção de metano a partir de palha de trigo após pré-tratamento com radiação micro-ondas utilizando lodo de esgoto e estrume como inóculo.

3.5.3 Pré-tratamentos biológicos

Os pré-tratamentos biológicos geralmente envolvem o uso de culturas puras, consórcios microbianos ou também enzimas hidrolíticas (celulases, hemicelulases e lacases) produzidas por microorganismos, sendo esta última possibilidade mais raramente aplicada por ser economicamente onerosa (ZHENG et al., 2014).

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais estudados para aplicação no tratamento biológico, especialmente aqueles que são capazes de hidrolisar a biomassa lignocelulósica, mas utilizam principalmente lignina e hemicelulose, em vez da celulose, o que diminui a possibilidade de competição por substrato com as bactérias fermentativas (ZHENG et al., 2014; SU; TAN; XU, 2016). Além de microrganismos isolados, outra possibilidade é a utilização de consórcios, ou seja, microrganismos obtidos após a partir dos próprios materiais lignocelulósicos em decomposição.

Schroyen et al. (2015) utilizaram as enzimas lacase e peroxidase com o objetivo de degradar a lignina de resíduos de farinha de milho, linho, palha de trigo e cânhamo, em reatores batelada com estrume bovino e silagem de milho como inóculo. Os autores observaram concentrações de metano de até $40 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ para a silagem de milho após 30 dias de experimento. Para os demais substratos avaliados, a concentração de metano foi inferior, de aproximadamente $17,8 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$. A biodegradação foi utilizada por Su, Tan e Xu (2016) por meio da coinoculação de fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus niger* com resíduos de citros como substrato e uma mistura de estrume suíno e lodo de esgoto como inóculo, resultando na concentração de $0,01 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$.

Apesar das vantagens dos métodos de pré-tratamentos biológicos quando comparadas aos físicos e químicos, como a baixa demanda por energia e reagentes e a menor probabilidade de impacto ambiental, este tipo de pré-tratamento requer longo período de exposição entre microrganismo (ou enzima) e substrato, geralmente semanas ou meses, o que pode limitar seu uso em larga escala (ZHENG et al., 2014).

Neste cenário, optou-se pela aplicação do método de pré-tratamento físico por hidrotermólise e pré-tratamento químico de deslignificação alcalina, comparando seus efeitos na obtenção de biogás (hidrogênio e metano) a partir de resíduos de citros como substrato.

3.6 MICRORGANISMOS FERMENTATIVOS E METANOGÊNICOS

3.6.1 Bactérias fermentativas e celulolíticas

Na digestão anaeróbia, é possível obter outros produtos de interesse biotecnológico como por exemplo, os ácidos orgânicos e álcoois produzidos na etapa fermentativa acidogênica e acetogênica, além do biogás. Os ácidos orgânicos comumente formados nestas etapas são os seguintes: acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, láctico, crotônico e caproico, além dos principais álcoois, tais como metanol, etanol e isobutanol. A formação destes produtos depende de diversos fatores, dentre eles a temperatura, tipo de substrato, pH do meio reacional e principalmente a origem do inóculo, uma vez que as populações microbianas presentes podem determinar as rotas metabólicas predominantes.

Miceli et al. (2018) relacionaram a diferentes doadores de elétrons (glicose, sacarose, lactato e melão) com os principais metabólitos produzidos (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, hidrogênio e metano) e as populações microbianas predominantes no processo. Os autores concluíram que o doador de elétrons é um dos principais fatores no estabelecimento dessas populações nos reatores anaeróbios.

O processo de obtenção biológica do gás hidrogênio envolve diferentes microrganismos, uma vez que pode ocorrer por meio da biofotólise da água usando algas e cianobactérias, pela fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas ou também pela fermentação de compostos orgânicos. A obtenção de hidrogênio na via fermentativa é baseada na geração de elétrons em organismos heterotróficos a partir do crescimento oxidativo anaeróbio, no qual há a eliminação dos elétrons excedentes na forma de hidrogênio molecular devido à presença da enzima *ferredoxina* e também pela enzima *hidrogenase*, transferindo elétrons para o H^+ (DAS; VEZIROGLU, 2001; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

Os principais microrganismos anaeróbios envolvidos no processo de obtenção de hidrogênio são as bactérias acidogênicas do gênero *Clostridium*, que inclui bactérias anaeróbias obrigatórias e fermentativas como *C. cellobioparum* (atual *Ruminiclostridium cellobioparum*), *C. thermocellum*, *C. butyricum*, entre outros (DAS; VEZIROGLU, 2001; YUTIN; GALPERIN, 2013), que podem atingir o balanço redox por meio da excreção de produtos da fermentação, como ácidos orgânicos e álcoois, ou pela produção de hidrogênio molecular.

Uma vez que, tanto a obtenção de hidrogênio, quanto de ácidos orgânicos consiste de uma etapa intermediária da digestão anaeróbia, quando o objetivo do processo é a obtenção de um destes produtos finais, a reação deve ser interrompida nesta fase, caso contrário haverá consumo destes produtos como substrato para a metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica, respectivamente. Para tanto, é importante que as condições operacionais sejam bem estabelecidas e controladas, o que justifica a importância do estudo das faixas ideais de temperatura, pH, condições nutricionais do meio, entre outros.

Em relação às principais populações envolvidas na fermentação, os clostrídios são acidogênicos e produtores de hidrogênio, sendo muito estudado, devido ao seu caráter ubíquo e diversidade metabólica. Entretanto, gêneros como *Bacillus*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são associados ao processo de obtenção de produtos de interesse biotecnológico por meio de processos anaeróbios (MAINTINGUER et al., 2017; RABELO et al., 2018a; MAZARELI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

Converti e Perego (2002) avaliaram o uso de glicose como fonte de carbono em condições de anaerobiose por espécie anaeróbia facultativa *Enterobacter aerogenes*, demonstrando que seu principal produto fermentativo, além do H₂ foi o butanodiol. Kotay e Das (2007) obtiveram rendimento máximo de H₂ (2,28 mol H₂ por mol de glicose) utilizando cepa isolada de lodo de esgoto anaeróbio, identificada como *Bacillus coagulans*, também anaeróbia facultativa, capaz de utilizar fontes alternativas de carbono, bem como resíduos lignocelulósicos, sendo relacionada à produção de ácido acético, ácido butírico e etanol, dependendo das condições do meio de cultivo.

López et al. (2010) relacionam o uso de resíduo sólido de citros como matéria prima principalmente para a produção de etanol de segunda geração, comumente em processos aeróbios, e ácido succínico em processos anaeróbios. Li et al. (2010) estudaram a produção de ácido succínico em batelada a partir de resíduos de citros pré-tratados com destilação a vapor como substrato, utilizando cepa celulolítica-fermentativa *Fibrobacter succinogenes*, obtendo 1,9 g.L⁻¹ deste ácido.

Lin et al. (2007) avaliaram variadas espécies de clostrídios, como *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* e *C. beijerinckii*. Os autores verificaram para as condições experimentais com a última espécie melhor rendimento de H₂ em relação as demais (2,1 mmol H₂ por mmol de glicose). Os autores demonstraram ainda que os principais produtos da fermentação da glicose por espécies deste gênero são ácido butírico

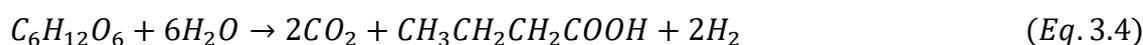
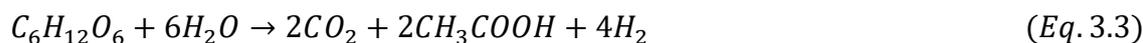
(0,37–0,67 mmol por mmol glicose) e acético (0,34–0,42 mmol por mmol glicose) em pH acima de 5, uma vez que abaixo deste valor, houve mudança da via metabólica de acético/butírico para láctico/etanol em algumas cepas, como *C. butyricum*.

Clostridium acetobutyricum é uma espécie conhecida por seu potencial de formação de solventes, como acetona, butanol e etanol, em pH igual ou abaixo de 5 e limitação de ferro e fosfato. Desta forma, para favorecer a via metabólica na qual há obtenção de hidrogênio, deve se manter o pH acima de 5 (HAWKES et al., 2002).

Ainda que *Clostridium acetobutyricum* seja conhecidamente anaeróbico, sabe-se que esta espécie é capaz de tolerar baixas concentrações de O₂ no meio durante curtos períodos de exposição (entre 4 e 6 h), apesar de reduzir o consumo de açúcares e conseqüentemente a síntese de biomoléculas como DNA, RNA e proteínas, podendo causar danos celulares irreversíveis quando há exposição em longos períodos.

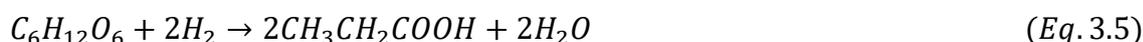
Espécies de *Clostridium* caracterizam-se pela produção de ácidos orgânicos voláteis em maior quantidade na fase exponencial do crescimento e álcoois na fase estacionária, provavelmente devido à diminuição do pH do meio, após a fase exponencial e conseqüente favorecimento de vias metabólicas redutoras. A espécie comumente conhecida como produtora de ácido propiônico é *C. propionicum* (atual *Tyzzarella propionica*) (DÜRRE, 1998; HAWKES et al., 2002; YUTIN; GALPERIN, 2013), além de bactérias do gênero *Propionibacterium*, que também produzem ácido propiônico como um dos principais produtos finais da fermentação, a partir de glicose ou lactato como substrato (SOLLI et al., 2014).

Quando o processo tem como principal objetivo a obtenção de hidrogênio como produto final, as rotas metabólicas desejáveis são as que produzem ácido acético e ácido butírico como principais produtos finais da fermentação, além da baixa produção de propiônico e de produtos finais reduzidos, como álcoois e ácido láctico (HAWKES et al., 2002). Pela via do ácido acético tem-se rendimento de 4 moléculas de H₂ para cada molécula de glicose (Equação 3.3), enquanto pela via do ácido butírico tem-se 2 moléculas de H₂ para cada molécula de glicose (Equação 3.4).



Na reação de oxidação da glicose a ácido acético, os átomos de hidrogênio são primeiramente transferidos para o dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (NAD⁺), que atua como carreador de elétrons em sua forma reduzida (NADH), sendo liberados como hidrogênio dissolvido (MOSEY, 1983). Em condições com excesso de energia disponível, há desvio das rotas metabólicas para a formação de compostos orgânicos mais reduzidos, conseqüentemente diminuindo a obtenção de hidrogênio (MOSEY, 1983; AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

A produção de ácido propiônico está associada à baixa obtenção de hidrogênio, uma vez que há consumo de duas moléculas de hidrogênio para sua formação, como ilustrado na Equação 3.5 a partir da glicose como substrato.



Todavia, a formação de ácido propiônico pode ser desejável quando o objetivo do processo é a obtenção de metano como produto final, uma vez que o consumo de hidrogênio é necessário para manter a pressão parcial do reator dentro dos limites necessários para a atividade metanogênica (HAWKES et al., 2002).

Uma vez que a reação de produção de ácido acético gera dois mols deste ácido por mol de glicose, enquanto a produção de ácido butírico gera um mol de ácido por mol de glicose, fica claro que a predominância da rota metabólica acetogênica causa maior acidificação do meio. Além disso, a reação de formação de ácido acético é favorecida em menores concentrações de hidrogênio e desfavorecida quando a pressão parcial deste gás no meio torna-se elevada (acima de 0,0006 atm), momento em que as rotas de produção de ácido butírico e propiônico são mais favoráveis (MOSEY, 1983; MICELI; TORRES; KRAJMALNIK-BROWN, 2016). Isto ocorre como consequência da falta de NAD⁺ no meio intracelular, e sua regeneração por meio de outras vias mais favoráveis nestas condições, nas quais a fermentação do ácido pirúvico acarreta na formação de ácido propiônico, láctico e etanol, ou ainda pela fermentação do Acetil-CoA a ácido butírico.

É importante salientar que, como mencionado por Guo et al. (2014), nem sempre a produção de ácido acético está diretamente relacionada à obtenção de hidrogênio, uma vez que sua formação também pode ocorrer durante a homoacetogênese, via comum em reatores em batelada, na qual há consumo de H₂ e CO₂ ou também de monossacarídeos de hexose por bactérias do gênero *Clostridium*.

A reação de formação do etanol (Equação 3.6), conhecida como via solvetogênica, é desvantajosa para o processo de obtenção de hidrogênio, apesar de não haver consumo direto de átomos de hidrogênio, a prevalência da via solvetogênica acarreta em competição pelo mesmo substrato necessário para a formação de hidrogênio nas vias acidogênica e acetogênica, sendo que sua produção ocorre a partir do composto intermediário comum às reações, Acetil-CoA.



A indústria de fabricação de ácido acético já é consolidada, movimentando entre 1200 a 1600 dólares no ano de 2015, o que corresponde a demanda de aproximadamente 13 milhões de toneladas deste produto puro. Sua principal aplicação é na produção oxidativa de monômero de acetato de vinil, usado como matéria prima para a fabricação de tintas e adesivos, além da produção de anidrido acético por meio de sua condensação, sendo utilizado para a produção do acetato de celulose, matéria prima da indústria têxtil e filmes fotográficos. O ácido acético glacial (livre de água) é um excelente solvente com diversas aplicações (PAL; NAYAK, 2017).

Os processos de obtenção biológica do ácido acético são comumente realizados utilizando bactérias aeróbias, especialmente as dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Acidomonas* oxidantes de açúcares, álcoois e etanol (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997), que produzem ácido acético como produto final deste processo. O substrato preferencial de *Acetobacter* é etanol, que é um produto final valioso e utilizado como matéria prima em diversos processos industriais, gerando apenas 1 mol de ácido acético para cada mol de etanol oxidado (RASPOR; GORANOVIČ, 2008).

Apesar de a obtenção de ácido acético ser maior em processos oxidativo aeróbios em relação aos processos de fermentação, no primeiro caso, envolve mais gasto de operação, uma vez que as bactérias envolvidas são aeróbias obrigatórias e, portanto, carecem de oxigênio livre no sistema, acarretando em gastos com aeração constante (RASPOR; GORANOVIČ, 2008). Além disso, a possibilidade de uso de consórcio bacteriano na obtenção de ácido acético em processos anaeróbios ao invés de culturas puras também pode ser considerada como vantajosa, uma vez que reduz os gastos em meio de cultivos específicos e possibilita a obtenção de demais produtos de interesse biotecnológico conciliados ao processo, como o hidrogênio gasoso.

Neste cenário, estudos sobre novas formas de obtenção de ácidos orgânicos e solventes a partir de processos biológicos anaeróbios vêm sendo estimulados, especialmente quando conciliadas à digestão anaeróbia, uma vez que há a possibilidade de obtenção de hidrogênio e/ou metano ao longo do processo, além do tratamento de resíduos orgânicos de difícil degradação, como os lignocelulósicos.

Em relação a conversão de biomassa lignocelulósica em produtos de interesse biotecnológico tem-se duas formas: (1) via hidrólise dos polissacarídeos a monossacarídeos fermentáveis ou (2) via fermentação dos açúcares em solventes, ácidos orgânicos e biogás (ZVERLOV; SCHWARZ, 2008). O papel dos microrganismos celulolíticos, bem como sua participação fundamental no ciclo do carbono, está intimamente relacionado com a primeira situação (WILSON, 2011).

Os microrganismos celulolíticos são capazes de hidrolisar a biomassa lignocelulósica em celulose e hemicelulose, que por sua vez, em ambientes anaeróbios, é catabolizada a celobiose e xilobiose e, posteriormente, hidrolisada por organismos fermentativos em ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) além de álcoois (etanol, butanol) e gases (H_2 , CO_2). Hidrogênio e ácido acético podem ser consumidos diretamente na metanogênese, enquanto os demais compostos requerem a atividade dos organismos sintróficos, que irá convertê-los em H_2 , CO_2 e demais produtos, como ácido acético, etanol e ácido láctico (RATTANAPAN et al., 2019).

Estima-se que 90% da celulose presente na biomassa residual, em teoria, poderia ser convertida a metano (AZMAN et al., 2015). Desta forma, levando-se em consideração que a hidrólise da celulose é uma das etapas limitantes para o aproveitamento da maior parte da biomassa residual, a procura por fontes de obtenção de enzimas celulolíticas vem aumentando cada vez mais (SADHU; MAITI, 2013).

As celulasas são enzimas responsáveis pela atividade celulolítica e compostas por exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases, variando de acordo com sua ação catalítica (SADHU; MAITI, 2013). A atividade celulolítica é comumente associada a microrganismos aeróbios, entretanto, bactérias semelhantes a *Clostridium* e *Ruminiclostridium* são conhecidas por sua eficiência em hidrolisar, em anaerobiose, os polissacarídeos que compõe os vegetais, por meio do celossoma, um complexo enzimático extracelular responsável pela despolimerização da celulose, constituído por uma proteína integradora (cipA), que contém diversos compostos catalíticos e coenzimas (CHAPLEUR et al., 2016).

Apesar de haver diferentes mecanismos de degradação biológica da celulose, sabe-se que as celulasas são enzimas chave, presentes em todos estes mecanismos. Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose presentes nos polímeros de celulose. A maior diferença entre as celulasas e demais enzimas, é que ao contrário das enzimas que catalisam reações com substratos que se ligam aos seus sítios ativos, as celulasas catalisam reações com matrizes insolúveis, dependendo, portanto, da adesão do microrganismo celulolítico ao substrato, devido ao domínio conhecido como módulo de ligação de carboidratos (WILSON, 2011).

Estima-se que existem pelo menos onze famílias de celulasas, sendo que a similaridade entre elas se baseia em sua sequência de aminoácidos, que determinam as dobras destas proteínas e sua especificidade, de acordo com diferentes tipos de substrato e diferentes níveis de cristalinidade da celulose. Em microrganismos anaeróbios, é comum a presença do complexo enzimático celulosoma, que apesar de não conter módulos de ligação de carboidratos, são anexados a proteínas “andaimes” que contém este sítio ativo (WILSON, 2011).

Diversos fatores podem afetar a atividade destas enzimas, como pH do meio reacional, temperatura de incubação e também a concentração de substrato e/ou produtos finais formados (celobiose e glicose) (SARATALE et al., 2008).

Os macronutrientes e micronutrientes, por exemplo, são elementos essenciais no metabolismo microbiano, necessários para o crescimento celular, tanto para sua composição (parede celular, membranas, DNA), e como também na forma de cofatores enzimáticos. Alguns destes micronutrientes, como Ca, Na e Fe, são imprescindíveis para o estabelecimento de populações de bactérias produtoras de hidrogênio (WU; CHU; SHEN, 2012). Da mesma forma, em concentrações elevadas, os micronutrientes podem ser tóxicos aos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, especialmente pelos metais Cu e Zn (LIN; SHEI, 2008), que apesar de essenciais aos processos fermentativos, podem apresentar efeitos inibitórios em concentrações acima de 250 e 400 mg.L⁻¹, respectivamente (ZHENG; YU, 2004).

Uma das principais limitações para a compreensão dos aspectos fisiológicos dos microrganismos celulolíticos ocorre devido ao fato de que a maior parte destes microrganismos não são cultiváveis. Diversas espécies da ordem Clostridiales são associadas à atividade celulolítica de biomassa lignocelulósica residual, como polpa de

papel, resíduos agroindustriais e bagaço de cana-de-açúcar (SADHU; MAITI, 2013). As espécies de clostrídios conhecidamente celulolíticas são: *Clostridium thermocellum* (atual *Ruminiclostridium thermocellum*), *C. aldrichii* (atual *R. aldrichii*), *C. alkalicellulosi* (atual *R. alkalicellulosi*), *C. caenicola* (atual *R. caenicola*), *C. cellobioparum* (atual *R. cellobioparum*), *C. cellulolyticum* (atual *R. cellulolyticum*), *C. cellulosi* (atual *R. cellulosi*), *C. clariflavum* (atual *R. clariflavum*), *C. hungatei* (atual *R. hungatei*), *C. josui* (atual *R. josui*), *C. leptum* (atual *R. leptum*), *C. methylpentosum* (atual *R. methylpentosum*), *C. papyrosolvens* (atual *R. papyrosolvens*), *C. sporosphaeroides* (atual *R. sporosphaeroides*), *C. stercorarium* (atual *R. stercorarium*), *C. straminisolvens* (atual *R. straminisolvens*), *C. sufflavum* (atual *R. sufflavum*), *C. termitidis* (atual *R. termitidis*), *C. thermosuccinogenes* (atual *R. thermosuccinogenes*) e *C. viride* (atual *R. viride*) (AZMAN et al., 2015). É possível notar, a maior parte das espécies celulolíticas anteriormente consideradas junto ao gênero *Clostridium* foram reclassificadas no gênero *Ruminiclostridium* (YUTIN; GALPERIN, 2013).

Guedon et al. (2002) estudaram a influência de subprodutos do metabolismo anaeróbico na atividade celulolítica, e verificaram que o acúmulo de ácido láctico inibiu o crescimento de *C. cellulolyticum* (atual *Ruminiclostridium cellulolyticum*) em ensaios contendo celulose como fonte de carbono, enquanto o acúmulo de ácido acético e etanol não representaram o mesmo efeito.

Rabelo et al. (2018) identificaram por sequenciamento massivo do gene 16S RNAr bactérias similares a *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Paenibacillus* sp., *Lactobacillus paracasei*, *Escherichia hermannii* e *Enterobacter aerogenes* em ensaios contendo bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a obtenção de H₂, sendo *C. cellobioparum* (atual *Ruminiclostridium cellobioparum*), *C. sartagoforme* e *C. cellulolyticum* (atual *Ruminiclostridium cellulolyticum*), bactérias tanto celulolíticas quanto produtoras de H₂.

As bactérias mais comuns associadas à atividade hidrolítica em ambientes anaeróbios, especialmente em reatores, pertencem ao filo Firmicutes, tais como *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter*, *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Halocella* e *Eubacterium*, além de outras pertencentes aos filos Bacteroidetes, Fibrobacter, Spirochaetes e Thermotogae (AZMAN et al., 2015).

Em relação aos habitats mais frequentes em que são encontrados organismos com potencial celulolítico, o rúmen é certamente o mais estudado, sendo que se estima que há cerca de 10¹⁰ NMP por mL, sendo 10% delas celulolíticas. Além do rúmen, as composteiras

são outro tipo de ambiente amplamente estudado acerca de sua comunidade microbiana com potencial celulolítico, no qual a degradação da biomassa recalcitrante ocorre devido à atividade de bactérias celulolíticas termofílicas e mesofílicas, dependendo da etapa de degradação (WILSON, 2011).

Heerden et al. (2002) estudaram a microbiota do processo de compostagem contendo resíduos sólidos de citros. Os autores concluíram que os microrganismos predominantes do Domínio Bacteria durante a fase termofílica da compostagem foram semelhantes à *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. macerans* e *B. stearothermophilus*), além de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. luteola*). Bicas e Pastore (2008) também isolaram organismos predominantemente dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* em ensaios contendo resíduos de citros com até 0,1% de limoneno.

Há poucos relatos sobre o uso de resíduos sólidos de citros como substrato fermentativo para obtenção de compostos de interesse biotecnológico, especialmente biogás (hidrogênio e metano) (FORGÁCS et al., 2012; RUIZ; FLOTATS, 2014; CALABRÒ et al., 2016), especialmente sobre a comunidade microbiana autóctone deste material. Desse modo, justifica-se a realização de novos estudos acerca deste tema, especialmente em reatores anaeróbios, uma vez que os poucos dados existentes são relacionados apenas a comunidade microbiana aeróbia ou anaeróbia facultativa e passíveis de serem isoladas.

Lacava et al. (2006) realizaram a caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros, por meio das técnicas de isolamento e PCR/DGGE. Os autores identificaram bactérias semelhantes a *Methylobacterium mesophilicum*, *Xyllela fastidiosa*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Bacillus* spp.

Da mesma forma, Corrêa (2008) isolou organismos endofíticos de citros, sendo fungos filamentosos, leveduras e bactérias de diferentes partes da planta (folhas, ramos e fruto). Nesse último caso, verificaram que os fungos filamentosos contribuíram com 85,24% da abundância relativa deste vegetal, 0,75% de leveduras e, finalmente, 13,99% de bactérias da comunidade endofítica de citros, sendo 4,32% nos frutos.

Desta forma, a determinação da prevalência de microrganismos em citros, bem como sua relação com inóculos alóctones utilizados em reatores anaeróbios, torna-se informativa no estudo de grupos resistentes aos potenciais inibidores deste substrato, como

a matriz lignocelulósica e, ainda, o limoneno, que vem sendo relatado como um dos grandes obstáculos ao seu reuso.

A utilização de resíduos sólidos aplicada à obtenção de H₂, CH₄ e demais compostos orgânicos com potencial biotecnológico, como AOV e álcoois, vem sendo estudada pelo Grupo de Pesquisa em Processos Anaeróbios do LPB da EESC-USP, bem como os principais microrganismos associados à digestão anaeróbia destes resíduos (Tabela 3.4), sendo possível observar a ubiquidade dos clostrídeos. Entre os diversos resíduos sólidos estudados, destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar (AHMAD et al., 2018; BRAGA et al., 2018; RABELO et al., 2018b; SOARES et al., 2020), banana (MAZARELI et al., 2020), e resíduos do processamento de café (VILLA MONTOYA et al., 2019).

Tabela 3.4. Principais bactérias identificadas a partir de diferentes resíduos sólidos aplicados à obtenção de produtos de interesse biotecnológico em reatores em bateladas.

Resíduo sólido	pH inicial	°C	Inóculo	Principais bactérias	Principais compostos orgânicos	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	6,0	37	Consórcio obtido a partir de resíduo de compostagem	<i>Dysgonomonas</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Sporomusa</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Sedimentibacter</i>	H ₂ , CH ₄ e EtOH	Soares et al. (2020)
Banana	7,5	44	Autofermentação	<i>Clostridium</i> e <i>Lactobacillus</i>	H ₂ , HAc, HBu, HLac e EtOH	Mazareli et al. (2020)
Cascas de café	7,0	30	Autofermentação	<i>Clostridium</i>	H ₂ , HAc e HLac	Villa-Montoya et al. (2019)
Bagaço de cana-de-açúcar	6,8	37	Consórcio obtido a partir de efluente da fabricação de celulose e papel	<i>Clostridium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Routella</i> e <i>Desulfovibrio</i>	H ₂ e HBu	Rabelo et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	6,0	37	lodo UASB de avícola	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i>	H ₂ , CH ₄ e HAc	Braga et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	-	37	lodo UASB de avícola	Thermotogaceae, Anaerolinaceae, Syntrophaceae, Spirochaetaceae e Clostridiaceae	CH ₄ e HAc	Ahmad et al. (2018)

Nota: (-)= Não especificado. Temperatura de incubação (°C).

3.6.2 Arqueias metanogênicas

A metanogênese é a última etapa do processo de degradação anaeróbia e realizada por microrganismos do Domínio Archaea, que são anaeróbios estritos, cujo produto final é o gás metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), sendo um processo essencial para o ciclo do carbono. As arqueias metanogênicas podem ser encontradas em diversos ambientes

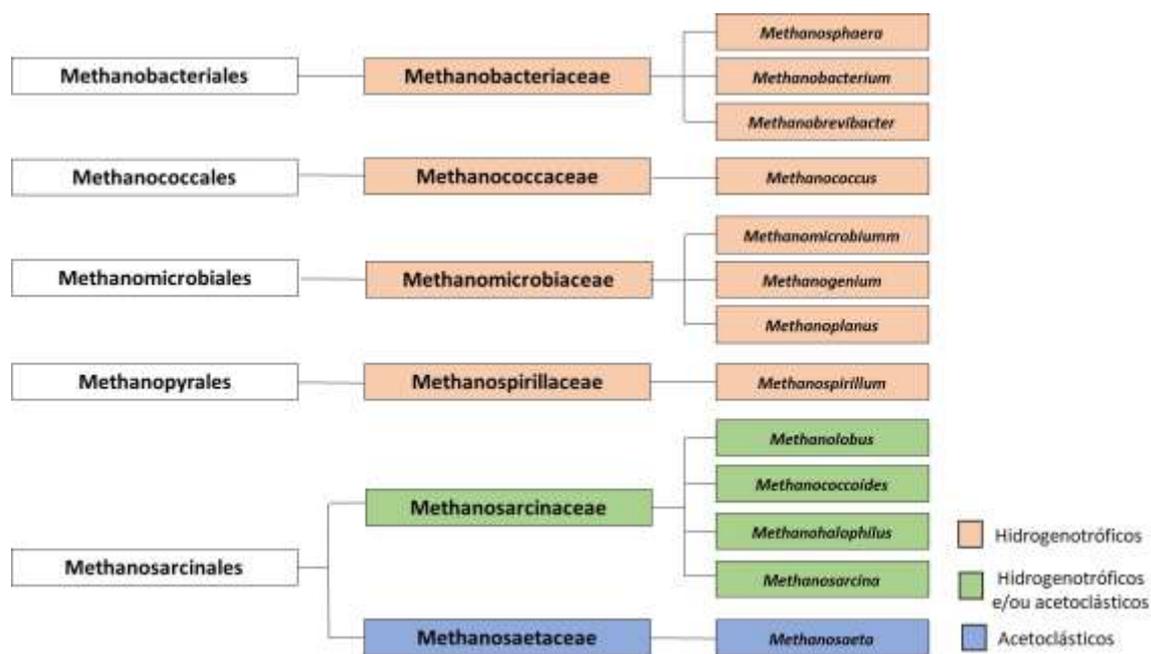
anaeróbios e limitados em relação à luminosidade, nitrato e sulfato, mas com disponibilidade de compostos orgânicos complexos, como fontes termais, sedimentos de água doce, digestor anaeróbio e também no intestino de animais de sangue quente e rúmen (DEPPENMEIER, 2002).

A obtenção de metano ocorre ao final das reações realizadas por consórcio microbiano, de hidrólise, acidogênese, acetogênese, para que finalmente a matéria orgânica seja convertida em biogás na etapa de metanogênese, sendo que do total de biogás formado, geralmente 50-80% é metano (WALTER et al., 2016). A metanogênese pode ser acetoclástica (Equação 3.7), ou seja, realizada a partir do acetato gerado durante a acetogênese ou hidrogenotrófica (Equação 3.8), a partir do H₂ e CO₂ (DEPPENMEIER, 2002; ZHENG et al., 2014).



Os organismos metanogênicos são diversos, tanto geneticamente quanto morfológicamente (DEPPENMEIER, 2002). Os principais gêneros associados à metanogênese em condições mesofílicas são *Methanobacterium*, *Methanocaldococcus* e *Methanosarcina* e, em condições termofílicas, os gêneros mais frequentes são *Methanothermobacter* e *Methanoculleus*, além da espécie *Methanosarcina thermophilus* (CHAPLEUR et al., 2016). As arqueias metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* são consideradas dominantes em reatores mesofílicos cujo inóculo ou substrato provém de esterco, uma vez que estes microrganismos possuem metabolismo versátil, podendo consumir H₂, CO₂, metanol, metilamina e também ácido acético como substrato (DEPPENMEIER, 2002; WALTER et al., 2016). As principais famílias e gêneros de arqueias metanogênicas, bem como os substratos utilizados para a metanogênese estão sumarizados na Figura 3.5.

Figura 3.5. Principais gêneros de arqueias envolvidos no processo de metanogênese e suas respectivas ordens e famílias taxonômicas.



Fonte: Modificado de Deppenmeier (2002).

Apesar da diversidade de organismos hidrogenotróficos conhecida ser maior em relação aos acetoclásticos, com predominância de gêneros pertencentes à ordem Methanosarcinales, são os acetoclásticos os principais responsáveis pela metanogênese em reatores anaeróbios voltados à obtenção de biogás (SOLLI et al., 2014). Além disso, as arqueias hidrogenotróficas possuem velocidade de crescimento superior em relação às acetoclásticas (MERLIN CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

A temperatura pode influenciar a comunidade microbiana dos reatores anaeróbios durante a metanogênese (CHAPLEUR et al., 2016). No estudo realizado por Walter et al. (2016), utilizando estrume bovino como inóculo e resíduos da indústria de papel como substrato, os autores apontam que o desenvolvimento de arqueias semelhantes a *Methanoculleus* é favorecido em condições termofílicas. Além disso, os autores avaliaram a influência de seis diferentes pré-tratamentos (térmico, ultrassom, enzimático, biodegradação, deslignificação alcalina e ultrassom mais deslignificação alcalina) e observaram que o gênero dominante em todos os reatores utilizando os substratos pré-tratados foi *Methanosarcina*, acompanhado por consórcio de microrganismos hidrogenotróficos.

Os inóculos utilizados com mais frequência para favorecer a obtenção de biogás são lodos de diversos tipos de estação de tratamento de águas residuárias (FORSTER-CARNEIRO; PÉREZ; ROMERO, 2008; FORGÁCS et al., 2012; LEITÃO et al., 2013; SU;

TAN; XU, 2016), estrume (CALABRÒ et al., 2016; SU; TAN; XU, 2016) e também o rúmeme de bovinos ou caprinos, na tentativa de prover consórcio rico em bactérias celulolíticas, fermentativas e metanogênicas (LEITÃO et al., 2013). Além da ampla variedade de inóculos aplicáveis aos processos metanogênicos tem-se verificado potencial de obtenção de CH₄ a partir de resíduos sólidos, tais como aqueles provenientes do processamento de alimentos (JIANG et al., 2019; YUSOF et al., 2019) e bagaço de cana-de-açúcar (AHMAD et al., 2018; BRAGA et al., 2018) (Tabela 3.5). Entretanto, pesquisas acerca do potencial de obtenção de CH₄ a partir de resíduos sólidos ainda são escassas na literatura, quando comparadas àquelas a partir de águas residuárias.

Tabela 3.5. Principais arqueias identificadas a partir de diferentes resíduos sólidos aplicados à obtenção de metano em reatores em batelada.

Resíduo sólido	pH inicial	Temperatura (°C)	Inóculo	Principais arqueias	Referência
Resíduos de alimentos	7,0	35	esterco de avícola	<i>Methanosaeta</i>	Yusof et al. (2019)
Resíduos de alimentos	-	37	lodo de esgoto e esterco suíno	<i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i>	Jiang et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	6,0	37	lodo UASB de avícola	Methanobacteriales, Methanomassiliicoccales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales	Braga et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	-	37	lodo UASB de avícola	<i>Methanolinea</i> , <i>Methanobacterium</i> e <i>Methanosaeta</i>	Ahmad et al. (2018)

Nota: (-)= Não especificado.

3.7 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS AO ESTUDO DE MICRORGANISMOS EM REATORES ANAERÓBIOS

Devido à ampla diversidade de microrganismos envolvidos na bioconversão de resíduos lignocelulósicos a produtos de valor agregado nas diferentes etapas do processo de digestão anaeróbia, como organismos sintróficos, celulolíticos, acidogênicos e acetogênicos, produtores de hidrogênio e metanogênicos, enfatiza-se a necessidade da aplicação de técnicas de biologia molecular para melhor entendimento do papel das diferentes comunidades microbianas envolvidas na assimilação de diferentes substratos, especialmente se tratando de biomassa residual complexa.

A caracterização da microbiota envolvida na degradação de resíduos sólidos é de grande importância para o entendimento deste processo, que pode ser conciliado à obtenção de produtos de interesse biotecnológico. Para identificação de microrganismos, comumente se utiliza como na análise comparativa os genes que codificam subunidades ribossômicas, envolvidos na tradução das informações do DNA em proteínas. Em procariotos os ribossomos são constituídos de três subunidades, a saber: 5S, 16S e 23S, com 120, 1.650 e 3.300 pares de base, respectivamente. O uso do gene que codifica a subunidade 16S para classificação taxonômica de procariotos foi difundido, uma vez que este gene é observado em todos os microrganismos do Domínio Bacteria e Archaea, cuja região é conservada,

além de possuir variações suficientes, possibilitando o cálculo de distâncias evolutivas (SCHLEIFER, 2009) e construção de dendrogramas de distância genética.

Uma vez que apenas 1% dos microrganismos conhecidos são cultiváveis em laboratório, técnicas baseadas em identificação por caracterização morfofisiológica e/ou biomolecular (amplificação do gene RNAr 16S), além de demandarem muito tempo, podem não fornecer resultados representativos acerca da comunidade envolvida em determinado processo (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008).

As técnicas tradicionalmente utilizadas para identificação em larga escala de comunidades microbianas de amostras ambientais, como sequenciamento de Sanger (SANGER; COULSON, 1975) utilizando preparo de bibliotecas de clones, geram dados com menor robustez (1.000 bases por corrida), quando comparados às técnicas mais modernas, como os sequenciamentos de terceira geração (pirossequenciamento, 10^9 - 10^{12} bases por corrida) e sequenciamentos de nova geração (DANIEL, 2005).

Entre as técnicas de Biologia molecular mais frequentes aplicadas ao estudo de reatores anaeróbios, é possível citar aquelas conhecidas como *fingerprint* (impressão digital) por meio da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), e mais recentemente, as técnicas que envolvem o uso de sequenciamento de alta performance ou de nova geração, como o sequenciamento massivo do gene RNAr 16S (*metabarcoding*) ou, mais recentemente, o sequenciamento *shotgun* metagenômico, utilizando plataformas como *Illumina* HiSeq (GUO et al., 2015).

As técnicas de *fingerprint*, apesar de úteis para avaliação dos índices ecológicos microbianos de amostras de reatores, não possibilitam a caracterização microbiana das amostras de interesse, tampouco fornecem informações concretas sobre seu metabolismo ao longo do processo, como as enzimas produzidas e o potencial funcional do consórcio microbiano do inóculo utilizado em diferentes condições operacionais. Desta forma, se justifica a análise metagenômica da comunidade microbiana na avaliação de diferentes condições experimentais, especialmente em condições otimizadas para obtenção de produtos de interesse biotecnológico (VOGEL, 1996).

Em relação as técnicas citadas de sequenciamento de nova geração, o *metabarcoding* (sequenciamento massivo de um gene de interesse, como RNAr 16S) possibilita apenas informações acerca da identidade dos microrganismos em determinada comunidade (metataxonômica), além da avaliação dos índices ecológicos pertinentes, como

índices de diversidade e dominância. Em contrapartida, o uso do *shotgun* metagenômico, assim como no *metabarcoding* tem-se acesso às informações para análise taxônomica e funcional da comunidade (BRUCE et al., 2010; COLOMBO et al., 2016). Por meio da técnica de *shotgun*, não se tem apenas sua identificação e estabelecimento de relações taxônomicas, mas também informações sobre genes codificadores de enzimas de interesse. Tal possibilidade é baseada no sequenciamento randômico do genoma, possibilitando o entendimento da diversidade fisiológica da microbiota do inóculo para possível relação com as variáveis operacionais em cada processo, e com as rotas metabólicas envolvidas na degradação da lignocelulose (BRUCE et al., 2010; COLOMBO et al., 2016; DELFORNO et al., 2017).

Apesar do estudo da comunidade microbiana envolvida no processo de digestão anaeróbia ser essencial para a compreensão do comportamento dos reatores anaeróbios sob diferentes condições operacionais e como estas afetam as vias metabólicas predominantes e conseqüentemente os metabólitos obtidos, além de informações acerca da resistência a potenciais agentes tóxicos e/ou recalcitrantes, diversas pesquisas ainda se baseiam apenas em dados físico-químicos para avaliação dos resultados obtidos (DATAR et al., 2007; MILLATI et al., 2018). Entretanto, é fundamental a obtenção de dados físico-químicos e biológicos para melhor compreensão de diferentes configurações de reatores anaeróbios. Encontram-se resumidas na Tabela 3.6 algumas das principais técnicas de Biologia molecular utilizadas com esta finalidade, bem como os gêneros mais abundantes em cada reator.

Tabela 3.6. Comparação entre técnicas de biologia molecular utilizadas em reatores anaeróbios.

Substrato	Gêneros mais abundantes	Aplicação	Reator	Inóculo	Técnica	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i>	Obtenção de H ₂ , CH ₄	Batelada	lodo UASB/avícola	<i>Illumina</i> MiSeq (16S)	Braga et al. (2018)
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Coprothermobacter</i> , <i>Anaerobaculum</i>	Obtenção de H ₂	Batelada	lodo UASB/vinhaça	<i>Illumina</i> MiSeq (16S)	Soares et al. (2018)
Xilose	<i>Clostridium</i>	Obtenção de H ₂	Batelada	lodo anaeróbio digerido	16S + Biblioteca de clones	Quéméneur et al. (2012)
Palha de arroz	Ruminococcaceae	Produção de Ácidos Orgânicos	Batelada	Lodo UASB doméstico	Pirosequenciamento	Woo et al. (2015)

Fonte: Elaboração própria.

Quéméneur et al. (2012), avaliaram a influência de potenciais agentes inibidores comumente formados no processo de degradação de compostos lignocelulósicos em populações de cultura bacteriana mista (lodo anaeróbio digerido). Para tanto, os autores avaliaram a obtenção de H₂ em reatores em batelada contendo xilose, furfural, 5-HMF (hidroxi metil furfural), furano, fenol e lignina (Kraft e Organosolv).

Toxicidade ao processo fermentativo foi observada para todos esses compostos, todavia, os mais inibitórios foram lignina e furanos, enquanto os fenóis os menos inibitórios. Além disso, os autores verificaram que os clostrídios foram predominantes independente do inibidor, e *C. beijerinckii* identificada em todos os ensaios, sendo considerada a cepa ideal para processos de obtenção de H₂ a partir da lignocelulose. Todavia, espécies comumente associadas à obtenção de H₂, como *C. acetobutylicum* e *C. pasteurianum* foram afetadas negativamente pela adição dos inibidores.

Braga et al. (2018) avaliaram a biomassa envolvida na obtenção de H₂ (Fase I) e CH₄ (Fase II) em reatores em batelada, sendo a Fase II alimentada com o efluente acidificado e rico em metabólitos gerado na Fase I, alimentada com bagaço de cana-de-açúcar. A partir do sequenciamento massivo do gene RNAr 16S foi possível identificar na Fase I gêneros produtores de celulasas, como *Clostridium* e *Enterococcus*, enquanto na Fase II foram identificadas bactérias pertencentes as famílias Methanoregulaceae e Methanosaetaceae de arqueias metanogênicas. Este caso exemplifica como o estudo das comunidades microbianas envolvidas no processo de obtenção de biogás é relevante, possibilitando o ajuste das condições operacionais mais indicados para cada fase, bem como o enriquecimento prévio deste inóculo com a finalidade de obtenção de maior eficiência do processo.

3.7.1 Ferramentas de bioinformática aplicadas à metagenômica

O campo de estudos em ecologia microbiana vem sendo revolucionado por técnicas de sequenciamento de alto rendimento. Uma das maiores vantagens relacionadas a estas técnicas é a possibilidade de análise simultânea de centenas de comunidades, permitindo a análise de padrões anteriormente inacessíveis por técnicas de sequenciamento de menor rendimento. No entanto, sabe-se que há certa limitação de técnicas comuns para atribuição taxonômica e análise de dados de sequenciamento massivo (CAPORASO et al., 2010).

A qualidade do sequenciamento é uma das barreiras na obtenção de uma análise precisa, uma vez que os possíveis problemas nesta etapa podem levar à superestimativa da diversidade microbiana. Este tipo de dado pode ser suscetível às falhas químicas e mecânicas ou contaminações, tanto no conteúdo do adaptador quanto no viés do conteúdo base, devido a problemas na obtenção de sequências e na preparação de bibliotecas. Desta forma, um dos principais passos na análise de dados de sequenciamento massivo é o controle da qualidade das sequências. Uma das ferramentas que podem ser usadas para o controle de qualidade de dados de sequenciamento massivo, como *shotgun*, é o Fastp, que fornece vários recursos, como qualidade da sequência base, pontuação da qualidade por sequência, conteúdo da sequência base, Conteúdo (GC), distribuição de comprimento de sequência, nível de duplicação de sequência, sequências super-representadas e conteúdo do adaptador, tanto para dados de sequenciamento *paired-end* quanto *single-end* (CHEN et al., 2018).

Em relação às sequências analisadas via *metabarcoding*, o *Quantitative Insights Microbial Ecology* (QIIME) é um pipeline que permite a análise de microbiomas a partir de sequências de DNA brutas, obtidas a partir de várias técnicas de sequenciamento, como *Illumina*, *Ion Torrent*, entre outros. Essa ferramenta é amplamente usada para desmultiplexação e filtragem de qualidade, coleta de OTU, atribuição taxonômica e reconstrução filogenética, além de análises e visualizações de diversidade (CAPORASO et al., 2010).

Um dos *pipelines* mais utilizados para atribuição taxonômica a partir de dados de metabolismo é o *Find Rapidly OTU with Galaxy Solution* (FROGS) (ESCUDIÉ et al., 2018), que inclui várias ferramentas de bioinformática para pré-tratamento, limpeza, desrepliação, remoção de quimera, agrupamento de OTUs e, finalmente, para anotação taxonômica de sequências. Após a anotação, o pacote *phyloseq*, usado na linguagem de programação R, é uma alternativa à análise de dados *metabarcoding* já agrupados em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), permitindo sua importação, armazenamento, análise estatística e exibição gráfica de dados complexos de sequenciamento filogenético (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Em dados metagenômicos obtidos via *shotgun*, a avaliação da significância biológica (classificação e análise filogenética) pode ser realizada usando diversas ferramentas, como o SortMeRNA, no qual alinhamentos locais de alta qualidade das leituras de RNAr são comparados com banco de dados de RNAr, como BLASTn

(KOPYLOVA; NOÉ; TOUZET, 2012), enquanto a anotação taxonômica pode ser realizada via Kaiju nr (MENZEL; NG; KROGH, 2016).

Além da significância biológica, a análise metagenômica via *shotgun* permite o estudo de genes e vias metabólicas, ou seja, uma oportunidade para elucidar a atividade e também interações ambientais. Para tanto, uma etapa importante na análise de dados é a montagem da sequência, ou seja, a montagem de *reads* (fragmentos curtos de RNA) em *contigs* (sequência montada), por meio de ferramentas como metaSPAdes e *Quality Assessment Tool for Genome Assemblies* (QUAST), para realização do controle de qualidade dos *contigs* e *reads* (GUREVICH et al., 2013; NURK et al., 2017).

Embora a etapa de montagem seja comumente aplicada, seu uso é controverso entre os bioinformatas, pois pode levar tempo e levar a erros na montagem do genoma. A FragGeneScan é uma ferramenta alternativa que permite a previsão de genes a partir de *reads* ao invés de *contigs* (RHO; TANG; YE, 2010), assim como o Bowtie (LANGMEAD, 2010), que alinha os *reads* por meio de um índice do genôma de referência ([http://bowtie-bio.sf.net](http://bowtie-bio.sourceforge.net)).

Além da anotação taxonômica, por meio da técnica de metagenômica *shotgun* tem-se a anotação funcional, ou seja, a identificação e caracterização das regiões funcionais de um genoma. Para tanto, existem servidores de anotação automática, como o GhostKOALA (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016), nos quais as atribuições são feitas em comparação com o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e a base de dados KEGG *Orthology* (KO) (KANEHISA, 2000), sendo que a anotação do genoma é realizada por meio da atribuição de identificadores KO (número K) às regiões de codificação. As vias metabólicas podem ser mapeadas, integradas e visualizadas a partir de diversas ferramentas, sendo o Pathview uma das mais utilizadas (LUO; BROUWER, 2013).

Por fim, os dados obtidos podem ser analisados em relação à sua relevância estatística e também visualizados graficamente por meio de pacotes específicos, como o ggplot2 (WICKHAM, 2009), tanto para dados de *metabarcoding* quanto *shotgun*. Dados de sequenciamento *shotgun* podem ser analisados estatisticamente quanto à variância média e à expressão diferencial baseada em modelo usando distribuição binomial negativa, através do pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

Uma vez que a análise de dados de sequenciamento massivo é um tópico emergente em bioinformática, nesta sessão apenas as principais ferramentas aplicadas nesta pesquisa

foram mencionadas (Tabela 3.7). Além disso, é importante mencionar que as ferramentas utilizadas podem variar de acordo com a técnica de sequenciamento.

Tabela 3.7. Principais ferramentas para análise massiva de dados de sequenciamento (*shotgun* ou *metabarcoding*) utilizados nesta pesquisa.

Ferramenta	Aplicação	Funcionalidade	Referência
Fastp	<i>Shotgun</i>	filtragem, controle de qualidade	Chen et al. (2018)
FROGS	<i>Metabarcoding, Shotgun</i>	pré-tratamento, limpeza, desreplicação, remoção de quimera, agrupamento em OTU, atribuição taxonômica	Escudié et al. (2018)
metaSPAdes	<i>Shotgun</i>	montagem de sequência (<i>reads</i> em <i>contigs</i>)	Nurk et al. (2017)
Kaiju nr	<i>Shotgun</i>	anotação taxonômica	Menzel, Ng, Krogh (2016)
GhostKOALA	<i>Shotgun</i>	anotação funcional	Kaneshia et al. (2016)
DESeq2	<i>Metabarcoding, Shotgun</i>	visualização gráfica e análise estatística	Love et al. (2014)
phyloseq	<i>Metabarcoding</i>	visualização gráfica e análise estatística	McMurdie e Holmes (2013)
QUAST	<i>Shotgun</i>	controle de qualidade (<i>contigs</i>)	Gurevich et al. (2013)
PathView	<i>Shotgun</i>	Mapeamento de vias metabólicas	Luo e Brouwer (2013)
SortMeRNA	<i>Shotgun</i>	controle de qualidade, caracterização filogenética desmultiplexação e filtragem de qualidade, coleta de OTU, atribuição taxonômica e reconstrução filogenética e análises e visualizações de diversidade	Kopylova et al. (2012)
QIIME	<i>Metabarcoding, Shotgun</i>	alinhamento de sequência, detecção e mapeamento de genes (<i>reads</i>)	Caporas et al. (2010)
FragGeneScan	<i>Shotgun</i>	alinhamento de sequência, detecção e mapeamento de genes (<i>reads</i>)	Rho, Tang, Ye (2010)
Bowtie	<i>Shotgun</i>	alinhamento de sequência, detecção e mapeamento de genes	Langmeand (2010)
ggplot2	<i>Metabarcoding, Shotgun</i>	visualização gráfica e análise estatística	Wickham (2009)

Fonte: Elaboração própria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESQUEMA OPERACIONAL

A fim de avaliar o potencial de uso de resíduos sólidos de citros para obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como H₂, CH₄, AOV e álcoois, foram realizados ensaios fermentativos e ensaios metanogênicos em diferentes condições operacionais. Primeiramente, foram realizados ensaios fermentativos a fim de comparar diferentes inóculos (autóctones, como o consórcio autofermentativo, e alóctones, como lodos de reator UASB de diferentes origens), diferentes faixas de temperatura (mesofílica, a 37°C, e termofílica, a 55 °C) e, finalmente, duas diferentes formas de pré-tratamento do substrato utilizado (via hidrotermólise, deslignificação alcalina ou *in natura*). Além disso, realizou-se o isolamento e caracterização de bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas a partir do consórcio autofermentativo.

Após estes ensaios preliminares, onde adotou-se os inóculos, faixa de temperatura e substrato cuja maior obtenção de H₂ foi observada, foram realizados novos ensaios fermentativos utilizando o método estatístico de Planejamento Sequencial (Plackett & Burman e Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR). Nos ensaios de Plackett & Burman, avaliaram-se dez diferentes variáveis operacionais (temperatura, pH, concentração de inóculo autóctone e alóctone, concentração de substrato, volume do *headspace*, e concentração dos componentes do meio reacional: NaCl, CaCO₃, extrato de levedura e peptona. As variáveis que foram consideradas mais significativas para obtenção de H₂ a partir dos resíduos de citros foram adotadas para os ensaios de DCCR (pH, concentração de inóculo alóctone e substrato), onde faixa ótima para estas variáveis por meio de superfície de resposta foi estimada e posteriormente confirmada por meio de um ensaio de validação.

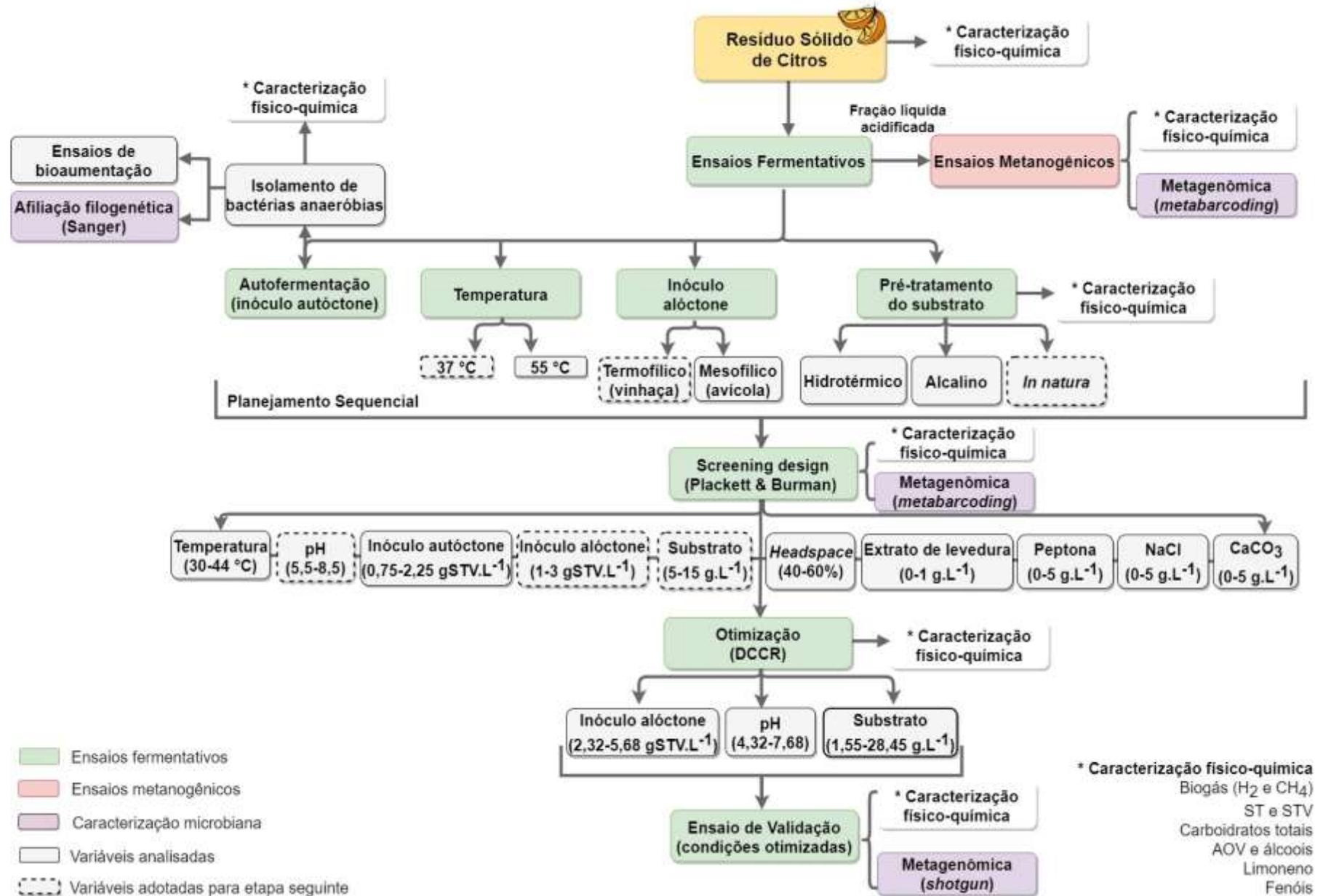
Os ensaios metanogênicos foram realizados após a fermentação dos resíduos sólidos de citros, utilizando como substrato a fração líquida obtida após acidificação, a fim de simular um sistema de duas fases (acidogênica e metanogênica).

Diferentes técnicas de biologia molecular foram empregadas para caracterização microbiana das diferentes etapas da pesquisa. Sequenciamento de Sanger (gene RNAr 16S) foi utilizado para afiliação filogenética da bactéria anaeróbia celulolítica isolada a partir do consórcio autofermentativo dos resíduos de citros, enquanto sequenciamento massivo do gene RNAr 16S (*metabarcoding*) foi utilizado para caracterização das comunidades

microbianas envolvidas nos ensaios fermentativos contendo resíduo sólido de citros após diferentes pré-tratamentos (*in natura* moído e após hidrotermólise), bem como para comparação entre a fase acidogênica (Fase I) e fase metanogênica (Fase II) a partir da fração líquida da Fase I. Por fim, utilizou-se a técnica de metagenômica *shotgun* para avaliar a comunidade microbiana e as vias metabólicas envolvidas no ensaio de validação da condição otimizada, em comparação com o inóculo autóctone utilizado nestas condições (lodo UASB/vinhaça).

A comparação entre os diferentes ensaios foi realizada por meio de dados obtidos pela caracterização do conteúdo de biogás (H_2 , CH_4), compostos orgânicos (AOV, álcoois), carboidratos totais e fenóis. Além disso, realizou-se a quantificação do teor de limoneno na fração líquida dos diferentes ensaios, a partir de metodologia via Cromatografia Líquida Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS), desenvolvida e validada no presente estudo. Encontra-se resumida na Figura 4.1 as diferentes etapas da pesquisa.

Figura 4.1. Fluxograma experimental simplificado, com destaque para os ensaios fermentativos (em verde), metanogênicos (rosa) e as etapas de caracterização microbiana (em roxo).



4.2 SUBSTRATO

4.2.1 Resíduos de citros

Os resíduos de citros *in natura*, utilizados como substrato para obtenção de inóculo autóctone e para os ensaios de obtenção de biogás, foram produzidos no Laboratório de Processos Biológicos da Universidade de São Paulo, *campus* São Carlos, espremendo laranjas do tipo pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio), frescas e maduras, para remoção do suco e das sementes e separando suas cascas e bagaços, a fim de obter um resíduo semelhante ao das plantas industriais.

O armazenamento foi realizado conforme descrito em Calabrò et al. (2016), sendo o resíduo desidratado em estufa de secagem a 50 °C durante 24 h e depois moído em moinho de facas (tipo Wiley TE-650/1) até que partículas $\leq 1\text{mm}$ fossem obtidas e acondicionadas em frascos plásticos a 4 °C até o momento de sua utilização.

4.2.2 Pré-tratamentos

Os resíduos (cascas e bagaço) foram submetidos aos pré-tratamentos de hidrotérmólise e deslignificação alcalina. Após aplicação desses pré-tratamentos, a separação do resíduo foi realizada por filtração em membrana com porosidade de 0,1 mm. A fração sólida foi lavada com água ultrapura para remoção dos açúcares residuais e utilizada nos ensaios subsequentes.

Ensaio em reatores anaeróbios em batelada foram conduzidos com os resíduos pré-tratados e ensaios controle com resíduos sem pré-tratamento utilizando as mesmas proporções (15 g.L⁻¹) de resíduo de citros.

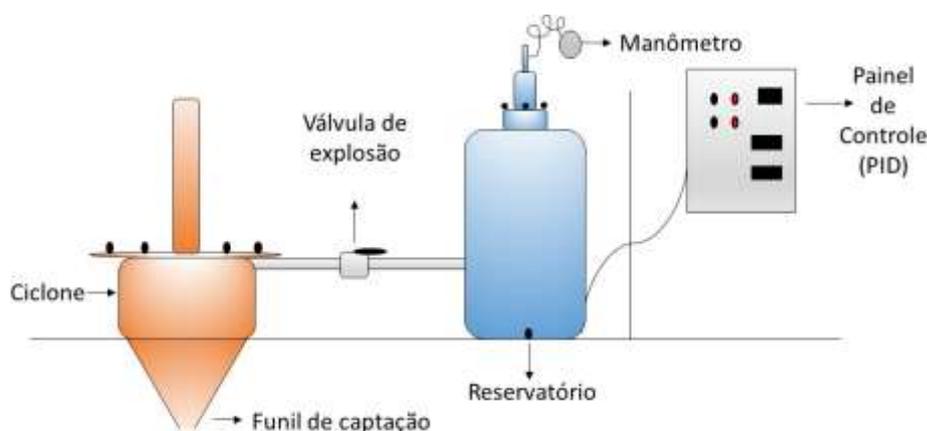
4.2.2.1 Hidrotérmólise

O pré-tratamento do resíduo (cascas e bagaço) por meio de hidrotérmólise foi realizado em reator de bancada, sob pressão de 10 bar a 180 °C por período de 15 minutos e com a massa total de 1,5% de substrato, como descrito em Jacquet et al. (2011) e Soares et al. (2017a). Após a explosão, a fração sólida foi levada para secagem em estufa a 50 °C e a fração líquida foi armazenada em frascos plásticos a -20 °C.

O reator hidrotérmico utilizado (Figura 4.2) foi desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP) e o Departamento de Engenharia Mecânica da mesma escola. Este reator foi confeccionado em aço e é composto pelo reservatório, com capacidade total de 200 mL, no qual ocorre o aquecimento da água e da biomassa na

temperatura programada via painel de controle derivativo integral proporcional (PID); e do ciclone, no qual ocorre a separação da fração sólida e líquida após a abertura da válvula de explosão, sendo o resíduo pré-tratado coletado no funil de captação. A pressão máxima alcançada neste equipamento é de 50 bar.

Figura 4.2. Esquema do reator hidrotérmico.



Fonte: Elaboração própria.

A severidade do tratamento foi calculada de acordo com Jacquet et al. (2011), por meio da Equação 4.1

$$Severidade = \int_0^t \exp\left[\frac{T(t) - 100}{14,75}\right] dt \times t \quad (Eq. 4.1)$$

sendo,

t= tempo (min),

T= temperatura (°C).

4.2.2.2 Deslignificação alcalina

Os ensaios de deslignificação alcalina foram realizados de acordo com Cabrera et al. (2014). Para tanto, adicionou-se 2,5 g de resíduo a solução de hidróxido de sódio (NaOH) e 1% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ajustada para pH 11,5 (± 0,2) com NaOH 5 mol.L⁻¹ durante 24 h. A proporção de sólido/líquido utilizada foi de 1:20 (peso/volume). A fração sólida obtida após centrifugação foi utilizada como substrato nos ensaios para obtenção de biogás.

4.3 ENSAIOS CINÉTICOS EM BATELADA

4.3.1 Inóculo

4.3.1.1 Inóculo autóctone

A obtenção do inóculo autóctone foi realizada a partir da autofermentação das cascas e bagaço *in natura*, separadamente e em conjunto foi realizada com o intuito de avaliar a hipótese de que o próprio resíduo de citros pode ser utilizado como fonte natural de microrganismos autóctones celulolíticos/produtores de biogás e adaptados aos potenciais agentes inibidores.

A estratégia utilizada para a obtenção do inóculo autofermentativo foi adaptada de Haruta et al. (2002) e Wang et al. (2011), sendo que a fonte de carbono foi substituída por 20 g.L⁻¹ de resíduo de citros *in natura* (cascas, bagaço e cascas + bagaço) em frascos de 500 mL com volume reacional de 250 mL contendo meio *Peptone Cellulose Solution* (PCS) (Tabela 4.1) em pH ajustado para 7,0 com HCl 1 mol.L⁻¹ e NaOH 1 mol.L⁻¹.

Os reatores anaeróbios em batelada foram submetidos a atmosfera de N₂/CO₂ (70/30%) durante 20 minutos (FORGÁCS et al., 2012) e fechados com tampa de butila e rosca plástica. Os frascos foram incubados em estufa com temperatura ajustada a 37 °C e a concentração de biogás foi o parâmetro adotados como indicador do crescimento microbiano. Amostras de aproximadamente 500 µL do *headspace* foram coletadas periodicamente, a cada duas horas durante 48 horas ou até a estabilização da concentração de H₂, utilizando seringas *gastight* equipadas com trava.

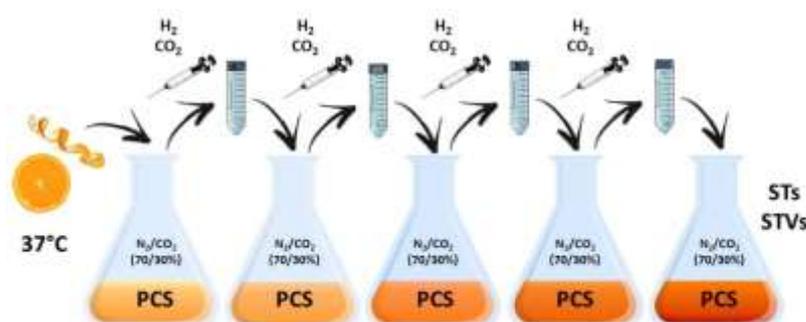
Tabela 4.1. Meio de cultivo *Peptone Cellulose Solution* (PCS) modificado e condições utilizadas no ensaio de autofermentação dos resíduos de citros *in natura*.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada	Batelada (500 mL)
Peptona (g)	5,0	1,25
Extrato de levedura (g)	1,0	0,25
CaCO ₃ (g)	5,0	1,25
NaCl (g)	5,0	1,25
Fonte de carbono (g)*	20	5,0
Condições		
headspace (%)	-	50
volume reacional (250 mL)	-	250
temperatura (°C)	-	37
pH	-	7,0

Fonte: Adaptado de Haruta et al. (2002). *Fonte de carbono= cascas e/ou bagaço de citros.

A fim de aumentar a densidade microbiana do inóculo, o meio foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado durante 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a biomassa recuperada transferida para um novo frasco contendo meio PCS fresco, nas mesmas condições reacionais definidas anteriormente, bem como mesmo volume reacional. Repetiu-se o procedimento aproximadamente cinco vezes (Figura 4.3).

Figura 4.3. Fluxograma experimental de obtenção de consórcio celulolítico-fermentativo.



Fonte: Elaboração própria.

4.3.1.1.1 Atividade celulolítica

A atividade celulolítica potencial do consórcio bacteriano fermentativo foi estimada. Para tanto, volume de 10% do consórcio obtido foi transferido para frascos de antibiótico com capacidade de 100 mL e 50% de volume reacional contendo o meio PCS em anaerobiose, contendo 5 g.L⁻¹ de papel filtro de celulose (0,3 cm²) como única fonte de carbono, sendo que a atividade celulolítica foi avaliada por meio da desintegração da fibra

de papel filtro após 21 dias de incubação. Para tanto, a cultura foi filtrada e a fração sólida ressuspensa em 100 mL de solução de ácido acético-ácido nítrico (1:1) aquecida a 100 °C por período de 30 minutos, a fim de remover o material biológico.

O ensaio controle foi realizado substituindo-se o inóculo por água destilada. O material celulósico restante foi lavado repetidas vezes com água destilada e, após a lavagem, o material foi centrifugado e o percentual de degradação foi determinado por análise gravimétrica, de acordo com a Equação 4.2.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{M_t - M_r}{M_t} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

sendo,

M_t= Massa Total de material celulósico;

M_r= Massa Residual.

4.3.1.2 Inóculo alóctone

Utilizou-se como inóculo o lodo granulado proveniente de reator UASB operado a 55 °C aplicado ao processamento de vinhaça de cana-de-açúcar e cedido pela Usina São Martinho (Pradópolis, São Paulo). Além disso, foi avaliado o potencial do mesmo lodo, porém proveniente do tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves em temperatura mesofílica, cedido pela Avícola Dacar, Tietê, São Paulo, a fim de comparar sua eficiência na obtenção de biogás a partir de resíduos de citros.

Os inóculos foram transportados das empresas ao Laboratório de Processos Biológicos em recipientes plásticos com capacidade de 30 L e armazenados a 4 °C a fim de reduzir sua atividade biológica e química, até o momento do uso. Antes de sua utilização, o inóculo foi submetido à trituração em liquidificador doméstico a fim de promover a desestruturação dos grânulos.

4.3.2 Faixa de temperatura

Ensaio nas faixas de temperatura mesofílica (37 °C) e termofílica (55°) foram realizados com os diferentes inóculos exógenos descritos (lodo granulado de reator UASB aplicado às avícolas e à vinhaça de cana-de-açúcar), a fim de estabelecer a faixa ideal para os ensaios subsequentes.

O potencial de obtenção de biogás em relação aos inóculos em adição ao consórcio celulolítico autóctone obtido a partir da autofermentação dos resíduos de citros foi avaliado. Para tanto, utilizou-se 15 g.L⁻¹ do substrato de citros *in natura* moído em frascos Duran de

250 mL, com 50% de *headspace* e 50% de volume reacional contendo meio PCS, em pH ajustado para 7,0 com HCl 1 mol.L⁻¹ e NaOH 1 mol.L⁻¹. A concentração de inóculo adicionada foi de 2 gSTV.L⁻¹ de consórcio alóctone e 1,5 g STV.L⁻¹ de consórcio autóctone. Os reatores anaeróbios em batelada foram submetidos a atmosfera de N₂/CO₂ (70/30%) durante 20 minutos (FORGÁCS et al., 2012) e fechados com tampa de butila e rosca plástica. Amostras de 500 µL do *headspace* foram coletadas em intervalos de duas horas durante aproximadamente 48 horas ou até que a concentração de biogás se estabilizasse, utilizando seringas de *gastight* equipadas com trava.

4.3.3 Ensaios de pré-tratamento

Ensaios preliminares foram realizados para definição do pré-tratamento mais adequado com resíduos de citros. Os ensaios foram conduzidos em reatores em batelada contendo 15 g.L⁻¹ de substrato de citros moído pré-tratado ou sem pré-tratamento, de acordo com as condições descritas na Tabela 4.2. Os reatores foram mantidos a 37 °C até a estabilização da concentração de H₂.

Tabela 4.2. Condições utilizadas nos ensaios de comparação entre resíduos de citros *in natura* e após diferentes pré-tratamentos (deslignificação alcalina e hidrotermólise).

Componentes	<i>In natura</i>	Deslignificação alcalina	Hidrotermólise
Peptona (g.L ⁻¹)	1,25	1,25	1,25
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,25	0,25	0,25
CaCO ₃ (g.L ⁻¹)	1,25	1,25	1,25
NaCl (g.L ⁻¹)	1,25	1,25	1,25
Fonte de carbono (g.L ⁻¹)*	3,75	3,75	3,75
Condições			
Volume do reator (mL)	500	500	500
<i>Headspace</i> (%)	50	50	50
Volume reacional (250 mL)	250	250	250
Temperatura (°C)	37	37	37
pH	7,0	7,0	7,0
Inóculo alóctone (gSTV.L ⁻¹)	2	2	2
Inóculo autóctone (gSTV.L ⁻¹)	1,5	1,5	1,5

*Fonte de carbono= cascas e bagaço de citros (1:1) após pré-tratamento ou *in natura*.

4.3.4 Ensaios fermentativos

4.3.4.1 Delineamento de Plackett & Burman

Para avaliação da obtenção de produtos de interesse biotecnológico, utilizou-se o método estatístico de Planejamento Experimental, por meio da superfície de respostas,

baseado na matriz de Plackett & Burman (P&B) (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Foram realizados ensaios para avaliação do efeito da temperatura (30-44 °C), pH inicial (5,5-8,5), concentração de inóculo autóctone (0,75-2,25 gSTV.L⁻¹) e alóctone (1-3 gSTV.L⁻¹), substrato (5-15 g.L⁻¹) e volume do *headspace* (40-60%).

As concentrações dos componentes do meio de cultura foram avaliadas, sendo extrato de levedura (0-1 g.L⁻¹), CaCO₃ (0-5 g.L⁻¹), NaCl (0-5 g.L⁻¹) e peptona (0-5 g.L⁻¹). Todos os ensaios foram realizados sob condições estáticas. As condições mínimas e máximas para cada parâmetro avaliado (Tabela 4.3) foram estabelecidas com base em trabalhos anteriores realizados pelo Grupo de Pesquisa em Processos Anaeróbios (LPB/EESC/USP) (SOARES et al., 2017; VILLA MONTOYA et al., 2019; MAZARELI et al., 2020).

Optou-se por utilizar um planejamento de três níveis (-1, 0, +1), resultando em uma matriz com 16 condições experimentais (Tabela 4.4). A escolha desta matriz se deu devido à necessidade de atender o mínimo de quatro ensaios a mais do que o número de variáveis (10) a serem estudadas no processo, a fim de garantir os graus de liberdade necessários para o cálculo do erro padrão (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 4.3. Condições mínimas (-1), máximas (+1) e do ponto central (0) para as diferentes variáveis.

	Variável	-1	0	+1
X ₁	Temperatura (°C)	30	37	44
X ₂	pH	5,5	7	8,5
X ₃	Consórcio (gSTV.L ⁻¹)	0,75	1,5	2,25
X ₄	Lodo (gSTV.L ⁻¹)	1	2	3
X ₅	Substrato (g.L ⁻¹)	5	10	15
X ₆	<i>Headspace</i> (%)	40	50	60
X ₇	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0	0,5	1
X ₈	CaCO ₃ (g.L ⁻¹)	0	2,5	5
X ₉	NaCl (g.L ⁻¹)	0	2,5	5
X ₁₀	Peptona (g.L ⁻¹)	0	2,5	5

Tabela 4.4. Matriz de Plackett & Burman codificada para o *screening design* com 16 condições experimentais e três repetições do ponto central.

Ensaio	Variáveis									
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
R1	+1	-1	-1	-1	1	-1	-1	+1	+1	-1
R2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
R3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
R4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1
R5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
R6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
R7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
R8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
R9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
R10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1
R11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
R12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
R13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
R14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
R15	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
R16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
R17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: Variáveis codificadas de acordo com a Tabela 4.2

4.3.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional

Após o *screening design* para determinação das variáveis significativas para o processo de obtenção de H₂ a partir de resíduos de citros via delineamento de Plackett & Burman, foram realizados nesta etapa da pesquisa os ensaios de otimização via Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A influência das variáveis independentes de concentração de inóculo (x_1 ; 2,32-5,68 gSTV.L⁻¹), concentração de substrato (x_2 ; 1,55-28,45 g.L⁻¹) e pH (X_3 ; 4,32-7,68) foi estimada por meio de um delineamento fatorial completo de 2³, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Matriz experimental com valores reais e valores codificados para os ensaios do DCCR de 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios.

Ensaio	Valores reais			Valores codificados		
	Inóculo (gSTV.L ⁻¹)	pH	Substrato (g.L ⁻¹)	Inóculo (gSTV.L ⁻¹)	pH	Substrato (g.L ⁻¹)
E1	3,0	7,0	4,5	-1	-1	-1
E2	5,0	7,0	4,5	1	-1	-1
E3	3,0	23,0	4,5	-1	1	-1
E4	5,0	23,0	4,5	1	1	-1
E5	3,0	7,0	7,5	-1	-1	1
E6	5,0	7,0	7,5	1	-1	1
E7	3,0	23,0	7,5	-1	1	1
E8	5,0	23,0	7,5	1	1	1
E9	2,3	15,0	6,0	-1,68	0	0
E10	5,7	15,0	6,0	1,68	0	0
E11	4,0	1,5	6,0	0	-1,68	0
E12	4,0	28,5	6,0	0	1,68	0
E13	4,0	15,0	3,5	0	0	-1,68
E14	4,0	15,0	8,5	0	0	1,68
E15	4,0	15,0	6,0	0	0	0
E16	4,0	15,0	6,0	0	0	0
E17	4,0	15,0	6,0	0	0	0

Encontram-se resumidas na Tabela 4.6 as condições experimentais adotadas para os ensaios de otimização da obtenção de H₂, sendo que a concentração de inóculo, pH inicial e concentração de substrato foram as variáveis adotadas, enquanto a concentração de consórcio celulolítico, temperatura de incubação, volume do *headspace* e os parâmetros já citados relacionados às condições nutricionais do meio foram fixadas de acordo com os resultados obtidos no ensaio de *screening design*.

Tabela 4.6. Condições experimentais dos ensaios de otimização da obtenção de H₂ por meio do método de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Variável		-1,68	-1	0	+1	+1,68
x ₁	Inóculo alóctone (gSTV.L ⁻¹)	2,32	3	4	5	5,68
x ₂	pH	4,32	5	6	7	7,68
x ₃	Substrato (g.L ⁻¹)	1,55	7	15	23	28,45
Condições fixas		Concentração				
Inóculo autóctone (gSTV.L ⁻¹)		2,25				
Temperatura (°C)		30				
<i>Headspace</i> (%)		40				
Peptona (g.L ⁻¹)		5				

O ensaio de validação foi planejado de acordo com as condições otimizadas de acordo com a superfície de resposta obtida, sendo: 4 gSTV.L⁻¹ de inóculo alóctone, 29,8

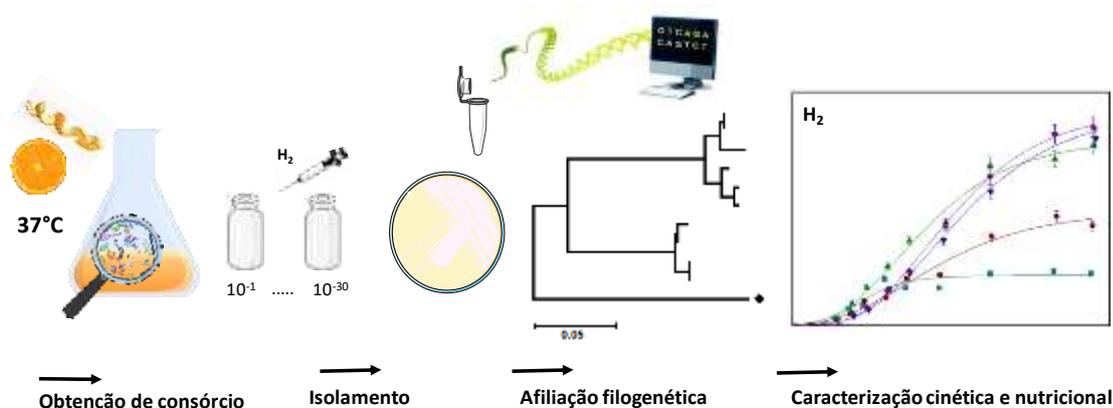
g.L⁻¹ de resíduo de citros *in natura* e pH 8,98, além das mesmas condições fixas descritas na Tabela 4.6. Para fins comparativos entre os resultados da validação experimental nas condições otimizadas após DCCR, considerou-se como condições não otimizadas as anteriores aos ensaios de Plackett & Burman e DCCR e com inóculo, tratamento do substrato e temperatura similares. Desta forma, as condições não otimizadas foram: 15 g.L⁻¹ de resíduo de citros *in natura*, 2 gSTV.L⁻¹ de inóculo alóctone, pH 7,0, 30 °C e meio de cultura PCS (HARUTA et al., 2002), onde se obteve 13,31 mmol H₂.L⁻¹.

4.3.4.3 Obtenção de bactérias anaeróbias celulolíticas

Após a obtenção do consórcio celulolítico-fermentativo a partir da autofermentação das cascas e bagaço de citros *in natura*, as bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio potencialmente celulolíticas foram isoladas de acordo com Wang et al. (2011) (Figura 4.4). Para tanto, realizou-se diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻³⁰) do consórcio em frascos de antibiótico contendo meio PCS, submetidos ao fluxo de N₂ por período de cinco minutos, com volume reacional de 50% e incubados sob condição estática e anaeróbia a 37 °C por período de 24 h.

Alíquotas de 500 µl do *headspace* foram analisadas em cromatografia gasosa após o período de incubação, e a presença de H₂ foi adotada como parâmetro, uma vez que a maior diluição na qual houve concentração de H₂ foi plaqueada em meio sólido (meio PCS acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico) por meio da técnica de *pour plate*.

Figura 4.4. Esquema da metodologia empregada para análise do consórcio celulolítico-fermentativo, desde a determinação gravimétrica da degradação das fibras de celulose, isolamento de colônias em meio PCS até a avaliação da comunidade microbiana por meio de técnicas de Biologia molecular.



Fonte: Elaboração própria.

As placas foram incubadas em Jarra Gas-Pack com sachê de anaerobiose (Oxoid™ AnaeroGen™) durante 48 h. Diferentes colônias foram transferidas do meio sólido para frascos Duran contendo meio PCS líquido e incubadas novamente por período de 48 h sob condições estáticas.

A biomassa dos ensaios com produção de H₂ foram novamente plaqueadas em meio sólido, a fim de verificar a pureza da cultura. As características micromorfológicas da cultura isolada foram observadas a partir do preparo de lâminas a fresco (com ágar 2%) e coloração de Gram, em microscópio óptico Olympus BX60 com câmera acoplada (*software* Olympus cellSens Dimension) em aumento total de 1000x. As amostras foram armazenadas em glicerina (1:1) a -80 °C, após lavagem com tampão PBS (NaCl 8%, KCl 0,2%, Na₂HPO₄ 1,44%, KH₂PO₄ 0,24%) (GREEN; SAMBROOK, 2012).

4.3.4.3.1 Caracterização da cepa isolada

Após a etapa de isolamento, a cepa de bactéria anaeróbia fermentativa produtora de hidrogênio e com maior atividade celulolítica foi caracterizada como descrito em Maintinguer et al. (2017) quanto aos seus requerimentos nutricionais. Foram realizados ensaios em batelada com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, xilose, amido, glicerol, celobiose, celulose e lactose), além do resíduo sólido de citros, em meio PCS modificado, contendo 3 g.L⁻¹ da respectiva fonte de carbono e utilizando 10% da cultura isolada como inóculo.

Ao final dos ensaios, foram quantificados os metabólitos produzidos (ácidos orgânicos e/ou álcoois), enquanto a concentração acumulada de H₂ foi analisada ao longo

de período de aproximadamente 30 h. Além disso, realizou-se a caracterização da fase líquida após o período de incubação quanto à matéria orgânica ($DQO_{filtrada}$), teor de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), quantificação de carboidratos totais e fenóis totais, bem como a determinação do consumo de substrato.

Após o estabelecimento do substrato no qual houve maior obtenção de hidrogênio foram realizados novos ensaios cinéticos a fim de determinar o efeito de sua concentração. Foram avaliadas entre 0,5-6,5 g.L⁻¹ da respectiva fonte de carbono, utilizando as condições de isolamento (37 °C; e meio reacional PCS com pH 7,0).

Os valores foram estabelecidos a fim de avaliar a condição ótima de crescimento da cepa em relação à variável fonte de carbono, por meio do método estatístico de Planejamento Experimental, de acordo com (RODRIGUES; IEMMA, 2014), totalizando 4 condições experimentais e 3 repetições do ponto central para que fosse possível obter os graus de liberdade necessários para o cálculo do erro padrão do experimento, obtenção do modelo de regressão e ANOVA dos resultados obtidos.

Os parâmetros cinéticos foram estabelecidos por meio de ensaios em batelada a fim de verificar a velocidade de crescimento (Rm), concentração máxima de H₂ (P) e tempo necessário para início da obtenção de H₂ (λ) do microrganismo isolado, a partir do modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1994).

Construiu-se curva de crescimento microbiano relacionando a biomassa produzida (densidade óptica ou massa seca). A partir do logaritmo natural (ln) da fase exponencial do ensaio cinético, o crescimento específico (μ) obtido por dados experimentais sobre a concentração celular (OD_{600}) em função do tempo foi ajustado com curvas polinomiais ($R^2 = 0,9882$), a partir das quais se obteve um conjunto de valores de $X = f(t)$, por meio do qual foi estimado o μ da reação (0,35 h⁻¹). Além disso, a partir da relação da densidade óptica com a massa seca celular, calculou-se o tempo de geração celular (Tg) da cepa utilizada (Equação 4.3). O valor obtido foi de 1,98 h.

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (Eq. 4.3)$$

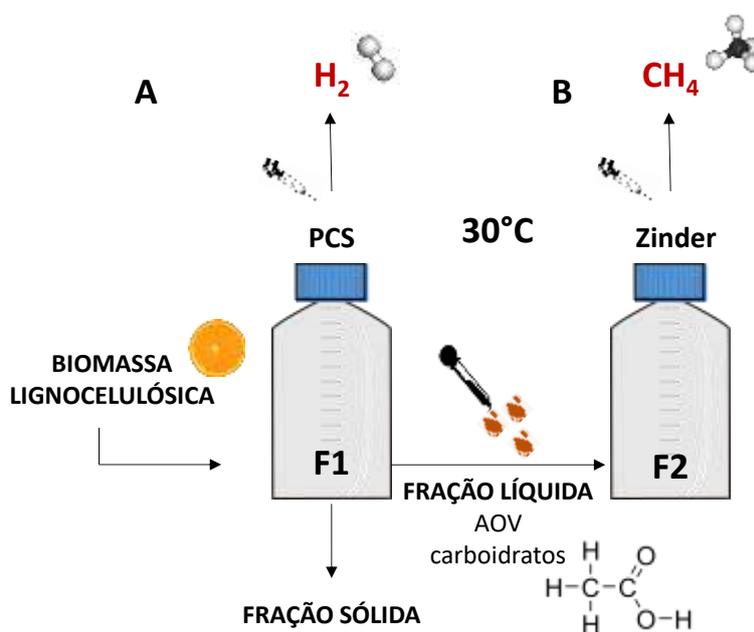
4.3.5 Ensaios metanogênicos

Uma vez que após o período de incubação necessário para a obtenção de hidrogênio a partir de resíduos de citros, há como consequência a geração de diversos metabólitos,

como ácidos orgânicos, álcoois e oligo/monossacarídeos, verificou-se o potencial desta fração líquida na obtenção de gás metano, simulando um sistema de digestão anaeróbia de duas fases (fase acidogênica a partir de resíduos sólidos de citros + fase metanogênica a partir da fração líquida do primeiro reator) (Figura 4.5).

As condições experimentais aplicadas na Fase I foram as mesmas do reator R5, descritos nos ensaios de Plackett & Burman, sendo: 15 g.L⁻¹ de resíduos de citros *in natura*, 2,25 gSTV.L⁻¹ e 3 gSTV.L⁻¹ de inóculo autóctone e alóctone, respectivamente, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 40% de *headspace*, pH 8,5 e temperatura 30 °C.

Figura 4.5. Esquema operacional do sistema de duas fases para digestão anaeróbia dos resíduos de citros, sendo (A) fase acidogênica a partir dos resíduos sólidos de citros e (B) fase metanogênica a partir da fração líquida do primeiro reator.



Fonte: Elaboração própria.

Após a Fase I, o conteúdo do reator foi filtrado em membrana de <0,1 mm, sendo a fração sólida descartada e a fração líquida utilizada como substrato na Fase II, sendo os ensaios realizados em frascos Duhran com volume total de 500 mL, sendo 250 mL de volume reacional e 50% de *headspace*.

A fração líquida resultante da Fase I foi suplementada com a mesma composição do meio mineral de Zinder (ZINDER; KOCH, 1984) (Tabela 4.7) acrescido de solução traço de metais (Tabela 4.8) e de solução traço de vitaminas (Tabela 4.9).

Tabela 4.7. Composição do meio de Zinder modificado, utilizado nos ensaios de obtenção de CH₄ e condições utilizadas nos ensaios em batelada.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada	Ensaio em Batelada
NH ₄ Cl (g)	0,5	0,125
KH ₃ PO ₄ (g)	0,4	0,1
MgCl ₂ .6H ₂ O (g)	0,1	0,025
CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	0,05	0,012
Solução traço de metais (mL)	10	2,5
Solução de vitaminas (mL)	10	2,5
Extrato de levedura (g)	2	0,5
NaHCO ₃ (g)	2	0,5
Condições		
Volume do reator (mL)	-	500
<i>Headspace</i> (%)	-	50
Volume reacional (mL)*	-	250
pH	-	7,0
Temperatura (°C)	-	37
Inóculo alóctone (gSTV.L ⁻¹)	-	3,0
Inóculo autóctone (gSTV.L ⁻¹)	-	-

Fonte: Adaptado de Zinder et al. (1984). *Volume reacional= fração líquida acidificada oriunda do ensaio fermentativo (fase acidogênica).

Tabela 4.8. Composição da solução de metais traço.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
ácido nitrilotriacético	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,08 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
H ₃ BO ₃	0,19 g
NiCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01 g

Fonte: Adaptado de Hirasawa et al. (2007).

Tabela 4.9. Composição da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água ultrapurificada
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Piridoxina HCl	0,010 g
Tiamina HCl.2H ₂ O	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
D-pantotenato de cálcio	0,005 g
Vitamina B12	0,0001 g
Ácido p-aminobenzoico	0,005 g
Ácido lipoico	0,005 g

Fonte: Adaptado de Hirasawa et al. (2007).

Após a inoculação com 3 gSTV.L⁻¹ de lodo UASB, o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH ou HCl 1 mol.L⁻¹. Os ensaios foram realizados em frascos Dühran de 250 mL, com 50% de *headspace* e 50% de volume reacional. Fluxionou-se N₂/CO₂ (70/30%) nos frascos (FORGÁCS et al., 2012), os quais foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados em condição mesofílica (30 °C) sob condições estáticas.

Os reatores foram monitorados quanto à composição do biogás (hidrogênio e metano) ao longo de aproximadamente 700 h, a fim de calcular os parâmetros de concentração máxima de CH₄ (*P*), velocidade máxima da reação (*Rm*) e tempo de início da obtenção de CH₄ (*λ*) a partir do modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1994). Amostras para quantificação dos metabólitos formados e produtos consumidos foram coletadas ao longo do processo.

4.4 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

4.4.1 Análises físico-químicas e cromatográficas

4.4.1.1 Caracterização de macro e microelementos

A determinação do teor total dos elementos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na e Zn, bem como da concentração total de fósforo (P) e nitrogênio (N) foi realizada pela empresa Bioagri Ambiental, de acordo com o método descrito em EPA 6010 D-3051 (USEPA, 2014).

4.4.1.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas de monitoramento dos reatores em batelada, sua periodicidade e métodos de referência, encontram-se resumidos na Tabela 4.10. Os Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV) foram quantificados de acordo com os métodos 2540B e 2540E, respectivamente (APHA/AWWA/WEF, 2012). A determinação dos ácidos

orgânicos voláteis (AOV) acético (HAc), propiônico (HPr), butírico (HBu), caproico (HCap) valérico (HVal) e etanol (EtOH) foi conduzida em cromatógrafo de gás Shimadzu® (2010) de acordo com Adorno et al. (2014).

Ao início e final de cada ensaio, analisou-se o teor de Sólidos Suspensos Totais e Voláteis (SST e SSV) e pH (APHA/AWWA/WEF, 2012), além de carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956), fenóis (BUCHANAN; NICELL, 1997; APHA/AWWA/WEF, 2012), (APHA/AWWA/WEF, 2012) e ácido láctico (TAYLOR, 1996).

Tabela 4.10. Análises físico-químicas utilizadas para o monitoramento dos reatores em batelada.

Análise	Frequência da análise	Referência
pH	Inicial e final	APHA/AWWA/WEF (2012)
DQO	Inicial e final	APHA/AWWA/WEF (2012)
SS e SSV	Inicial e final	APHA/AWWA/WEF (2012)
Ácidos orgânicos e álcoois	Inicial, intermediários e final	Adorno et al. (2014)
Ácido láctico	Inicial, intermediários e final	Taylor (1996)
Fenóis totais	Inicial e final	Buchanan e Nicell (1997)

4.4.1.3 Balanço de massa

O balanço de massa da condição otimizada foi realizado em termos de DQO, a partir da caracterização do efluente acidificado dos reatores. O balanço de massa da fase solúvel (BMS) foi realizado de acordo com a Equação 4.4 (MAZARELI, 2019).

$$BMS = \left(\frac{DQO_{metabólitos} + DQO_{carboidratos} + DQO_{fenóis}}{DQO_{experimental}} \right) \times 100 \quad (Eq. 4.4)$$

Sendo,

BMS= balanço de massa da fase solúvel (%);

$DQO_{metabólitos}$ = DQO equivalente à soma dos metabólitos solúveis ($mg.L^{-1}$);

$DQO_{carboidratos}$ = DQO equivalente aos carboidratos totais da fase solúvel ($mg.L^{-1}$);

$DQO_{fenóis}$ = DQO equivalente aos fenóis totais ($mg.L^{-1}$);

$DQO_{experimental}$ = DQO determinada experimentalmente.

Encontram-se resumidos na Tabela 4.11 os fatores de equivalência utilizados para determinação da DQO equivalente, de acordo com o descrito em Mazareli (2019).

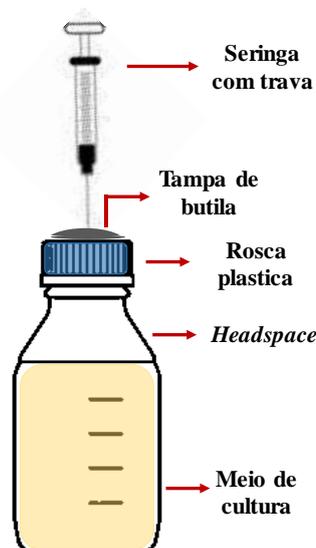
Tabela 4.11. Fatores de equivalência utilizados para determinação da DQO equivalente. Os carboidratos totais foram considerados em termos de g-glicose.

Metabólito solúvel	Reação de oxidação	Fator de equivalência
Ácido lático	$C_3H_6O_3 + 3O_2 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O$	1,07 gDQO.g ⁻¹
Ácido acético	$C_2H_4O_2 + O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$	1,07 gDQO.g ⁻¹
Ácido propiônico	$C_4H_6O_5 + 3O_2 \rightarrow 4CO_2 + 3H_2O$	1,51 gDQO.g ⁻¹
Ácido butírico	$C_4H_8O_2 + 5O_2 \rightarrow 4CO_2 + 4H_2O$	1,82 gDQO.g ⁻¹
Ácido valérico	$C_5H_{10}O_2 + 6,5O_2 \rightarrow 5CO_2 + 5H_2O$	2,04 gDQO.g ⁻¹
Ácido caproico	$C_6H_{12}O_2 + 8O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	2,21 gDQO.g ⁻¹
Etanol	$C_2H_6O + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O$	2,09 gDQO.g ⁻¹
Fenóis	$C_6H_6O + 4O_2 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O$	1,36 gDQO.g ⁻¹
Carboidratos totais	$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	1,07 gDQO.g ⁻¹

4.4.1.4 Análise da composição do biogás

A análise da composição do biogás em relação à concentração de gás hidrogênio, metano e dióxido de carbono foi realizada em cromatógrafo de gás Shimadzu® (2010), equipado com detector de condutividade térmica (DCT). A coluna utilizada foi a Carboxen 1010 PLOT, 30 m x 0,53 mm. A temperatura do injetor, do forno e do detector foram 220 °C, 130 °C e 230 °C, respectivamente. Utilizou-se gás argônio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 5,66 mL.min⁻¹ com volume de *Make-up* de 12 mL.min⁻¹. As amostras de biogás do *headspace* foram coletadas periodicamente (a cada 2 h) com uma tampa de butila usando seringa manual com trava (Figura 4.6).

Figura 4.6. Esquema de amostragem estática do *headspace*. O conteúdo de biogás no espaço superior é coletado periodicamente (a cada 2 h) através da tampa de butila, usando seringa manual com trava.



Fonte: Elaboração própria.

4.4.1.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier

A caracterização dos grupos funcionais presentes dos resíduos foi feita por meio do método qualitativo de FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) na faixa entre 4000-400 cm^{-1} e 32 *scans*, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) na concentração de 1%. A análise foi realizada com o resíduo seco em estufa a 40 °C até peso constante. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP) *campus* São Carlos. A verificação dos grupos funcionais correspondentes às bandas foi realizada de acordo com Silverstein e Webster (1981).

4.4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os resíduos de citros, tanto cascas quanto bagaço, antes e após os pré-tratamentos empregados, foram submetidos à análise microscópica em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de acordo com o método descrito em Nation (1983) e Soares (2017). Para tanto, as amostras foram fixadas em solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3) com glutaraldeído (2,5%) por um período de 12 h a 4 °C e lavadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3) durante 10 minutos e desidratadas em solução de etanol no gradiente de

concentrações de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% durante 10 minutos em cada concentração. Procedeu-se a secagem das amostras em estufa a 60 °C durante aproximadamente duas horas fixadas em *stub* por meio de fitas de carbono e revestidas com uma camada de 10 nm ouro.

As análises microscópicas foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) modelo DSM-960 do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise (LMEA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP) *campus* São Carlos.

4.4.1.7 Microscopia óptica

As características micromorfológicas do consórcio obtido foram observadas a partir do preparo de lâminas a fresco (com ágar 2%) e coloração de Gram, em microscópio óptico Olympus BX60 com câmera acoplada (*software* Olympus cellSens Dimension) em aumento total de 1000X. As amostras foram armazenadas em glicerina (1:1) sob refrigeração de -80 °C após lavagem com tampão PBS (NaCl 8%, KCl 0,2%, Na₂HPO₄ 1,44%, KH₂PO₄ 0,24%) (GREEN; SAMBROOK, 2012).

4.4.2 Determinação do teor de limoneno via GC-MS

4.4.2.1 Reagentes

A solução padrão de limoneno foi feita com (R)-(+)-limoneno (C₁₀H₁₆) com 90% de pureza (Sigma Aldrich-62122). Todos os demais reagentes (etanol e n-hexano) utilizados foram de pureza analítica ($\geq 98\%$).

4.4.2.2 Preparação das amostras

Amostras líquidas de reator anaeróbio foram coletadas no final do período de incubação e centrifugadas a 9000 rpm por 5 minutos e preservadas a -20 °C, sem adição de qualquer substância. As amostras foram diluídas em água MilliQ® conforme necessário, para análises posteriores na curva de calibração desenvolvida e descrita nos itens subsequentes.

4.4.2.3 Curva de calibração

A curva de calibração da solução padrão de limoneno foi realizada em triplicata. As diluições foram realizadas em água ultra-purificada. Etanol *p.a.* foi utilizado como solvente para obter concentrações de 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0 e 20,0 mg.L⁻¹.

4.4.2.4 Validação do método

A linearidade, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação foram estabelecidos de acordo com as recomendações de Ribani et al. (2004), Duarte et al. (2006) e Adorno et al. (2014), seguindo especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

A linearidade da resposta do detector para a curva de calibração foi avaliada por regressão linear, a partir de amostras com concentrações de 3 a 20 mg.L⁻¹ de limoneno. Três réplicas de cada nível padrão foram usadas para elaboração da curva analítica. A precisão instrumental (coeficiente de variação, CV%) foi estimada pelo tempo de retenção de nove injeções repetidas da solução padrão com 12 mg.L⁻¹ de limoneno.

O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com a Equação 4.5.

$$LD = 3 \times DesvPad/m \quad (Eq. 4.5)$$

Sendo:

DesvPad= desvio padrão;

m= coeficiente angular.

A menor concentração possível de medida foi estabelecida pelo limite de quantificação (LQ), calculado de acordo com a Equação 4.6.

$$LQ = 10 \times DesvPad/m \quad (Eq. 4.6)$$

Sendo:

DesvPad = desvio padrão;

m= coeficiente angular.

4.4.2.5 Ensaio de adsorção

Para estimar o potencial de adsorção do limoneno à matéria orgânica, sua recuperação foi medida pela adição da concentração conhecida (2000 mg.L⁻¹) ao lodo de

esgoto usado como inóculo em reatores anaeróbios. Os resultados foram calculados pela Equação 4.7.

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{concentração estimada/teórica}) \times 100 \quad (\text{Eq. 4.7})$$

A adsorção de limoneno foi estimada de acordo com Calabrò et al. (2016), em uma amostra controle (com água ultrapura ao invés de lodo de esgoto) e em uma amostra com 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno. A fim de extrair este composto, 1 mL de n-hexano (de pureza analítica ≥98%) foi adicionado a cada 1 mL de biomassa e agitado no vórtex por 5 minutos, e o procedimento foi repetido três vezes. A fração orgânica foi coletada e a porcentagem de recuperação estimada pela razão entre a concentração estimada na fase orgânica e a concentração teórica.

4.4.2.6 Aplicabilidade

Os ensaios foram conduzidos em batelada, com 5 g.L⁻¹ de glicose em frascos Duhran de 250 mL, com 50% de *headspace* e 50% de volume reacional, em condições estáticas a 30 °C. O meio de cultivo utilizado foi meio PCS (HARUTA et al., 2002), com pH ajustado para 7,0 com NaOH ou HCl 1 mol.L⁻¹, com adição de 0 a 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno (sem adição de limoneno; 50; 100; 250; 500; 1.000; 1500 e 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno). O inóculo utilizado foi o lodo de reator UASB aplicado ao processamento termofílico de vinhaça da cana-de-açúcar (2 gSTV.L⁻¹).

Após a inoculação, uma mistura de N₂/CO₂ (70/30%) foi fluxionada nos reatores, que foram fechados com tampa de butila e rosca plástica. A concentração de limoneno foi estimada em amostras líquidas no início e no final do tempo de operação.

4.5 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

A comunidade microbiana envolvida na digestão anaeróbia de resíduos sólidos de citros foi avaliada por meio de diferentes ferramentas de biologia molecular. A análise de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante foi aplicada em diferentes amostras (inóculos autóctone e alóctone, biomassa após hidrotermólise e deslignificação alcalina, e biomassa de citros *in natura*) a fim de observar o efeito de pré-tratamentos por meio dos índices de diversidade obtidos. Além disso, a técnica de sequenciamento massivo do gene 16S RNAr via Plataforma *Illumina* foi aplicada nas amostras onde foram observadas maiores concentrações de H₂ (resíduo *in natura* e após hidrotermólise) a fim de caracterizar e comparar sua comunidade microbiana.

As amostras de reatores aplicados à matriz de Plackett & Burman nas condições nas quais houve maior concentração de H₂ (R5 e R12) também foram analisadas via técnica de sequenciamento massivo do gene 16S RNAr (*metabarcoding*) via Plataforma *Illumina*, bem como do reator aplicado à obtenção de metano a partir do efluente acidificado dos ensaios otimizados. As colônias isoladas a partir da autofermentação do resíduo de citros *in natura* foram identificadas a partir do sequenciamento do gene RNAr16S via técnica de Sanger.

Por fim, tanto o inóculo alóctone (lodo UASB) quanto a biomassa do reator de validação das condições otimizadas via DCCR foram analisadas pela técnica de metagenômica *shotgun* via Plataforma *Illumina*, a fim de comparar sua comunidade microbiana e os genes que codificam enzimas relevantes para o processo.

4.5.1 Extração do DNA e amplificação da região-alvo

Após os ensaios cinéticos em batelada, as amostras para extração do DNA genômico foram coletadas após o término dos experimentos e mantidas sob refrigeração (-20 °C). Aproximadamente 50 mL do produto final de cada um dos reatores foram coletados e transferidos para tubos Falcon e centrifugados a 9000 rpm em microcentrifuga durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado em tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl 8%, KCl 0,2%, Na₂HPO₄ 1,44%, KH₂PO₄ 0,24%) (GREEN; SAMBROOK, 2012) e utilizado nas etapas posteriores. O DNA foi extraído utilizando o kit Powersoil DNA (Mobio, Solana Beach, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

A identificação das colônias celulolíticas e produtoras de hidrogênio isoladas do consórcio autofermentativo foi realizada via análise Amplicon 16S do DNA genômico, utilizando para extração do DNA genômico o kit Pure Link™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen) e para amplificação da região de RNAr correspondente ao gene 16S os *primers* 27F e 1492R.

O material genético amplificado foi purificado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram observados em eletroforese em gel de agarose (1%; 80 V; 1 hora), sendo que o produto da amplificação foi observado por meio de comparações utilizando o *Low*

DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific®) e o DNA foi quantificado utilizando método espectrométrico (Nanodrop 2000).

4.5.2 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

A região de RNAr do gene 16S dos do Domínio Archaea e Bacteria foi amplificada em reação em cadeia da polímeras (PCR) com os iniciadores 1100FGC – 1400R e 968FGC-1401R, respectivamente, de acordo com o descrito por Ahmad et al. (2020). Os resultados foram observados em eletroforese em gel de agarose (1,2%) e o marcador usado foi o Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific®).

O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante de 45% a 65% a temperatura constante de 60 °C e 75 V durante 16 h (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993). O DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), foi realizado no DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad).

Após a eletroforese, aplicou-se o corante brometo de etídeo no gel por um período de 15 minutos, para que as bandas fossem visualizadas em exposição UV (254 nm) e documentadas a partir do fotodocumentador L. PixTouch (Loccus Biotechnology) (AHMAD et al., 2020).

A similaridade entre as bandas foi calculada com o coeficiente de correlação de Pearson e apresentadas em dendograma, usando o *software* BioNumerics versão 7.3 (Applied Maths). Os índices de diversidade foram calculados utilizando o *software* Past versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.5.3 Sequenciamento e bioinformática

4.10.3.1 Bactérias anaeróbias celulolíticas

O sequenciamento das colônias celulolíticas e produtoras de hidrogênio isoladas do consórcio autofermentativo foi realizado pelo Centro de Genômica Funcional, do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo *campus* Piracicaba (ESALQ/USP). As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com o *software* BioEdit e foram comparadas com sequências disponíveis em bancos de dados através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

As sequências mais similares encontradas nesta base de dados (maior identidade, menor E-valor e maior cobertura) foram incluídas para fins comparativos na análise

filogenética. A fim de aumentar a representatividade da análise filogenética, também foram incluídas sequências relacionadas em trabalhos similares, nos quais foram analisados consórcios autofermentativos de resíduos lignocelulósicos.

Para inferência das relações do dendrograma de distância genética, utilizou-se a abordagem de estimativa por máxima verossimilhança (ML), por meio do *software* MEGA versão 6 e com ramificações calculadas utilizando 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo de substituição foi escolhido via Critério de Informação Akaike (AIC), ainda via MEGA versão 6. O grupo externo foi escolhido de acordo com a similaridade com os gêneros obtidos. As sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados NCBI sob os números de acesso MH999447 (IS_1), MH999448 (IS_02) e MH999449 (IS_3).

4.10.3.2 *Metabarcoding*

As amostras de RNAr analisadas por sequenciamento massivo do gene 16S das regiões V3 e V4 foram processadas na plataforma *Illumina* HiSeq PE250, com 2x250 pb ciclos, 100 reads e utilizando os *primers* universais para o domínio Bacteria 341F (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG -3') e 806 R (5'- GGACTACNNGGGTATCTAAT- 3'). As OTUs foram montadas com 97% de identidade e 80% de confiança na identificação dos táxons. As sequências referentes aos ensaios de *screening design* e potencial metanogênico foram submetidas ao banco de dados NCBI sob os números PRJNA526842 e PRJNA642905, respectivamente.

A inferência dos perfis funcionais nos ensaios de potencial metanogênico foi realizada por meio do *pipeline* Piphillin (<http://secondgenome.com/Piphillin/>) (Iwai et al., 2016) para a base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) de outubro de 2018, com identidade de 97%. Esta ferramenta de inferência metagenômica é baseada no conteúdo funcional de genes de microrganismos com base em informações conhecidas do genoma dos organismos mais próximos taxonomicamente (IBEKWE et al., 2020).

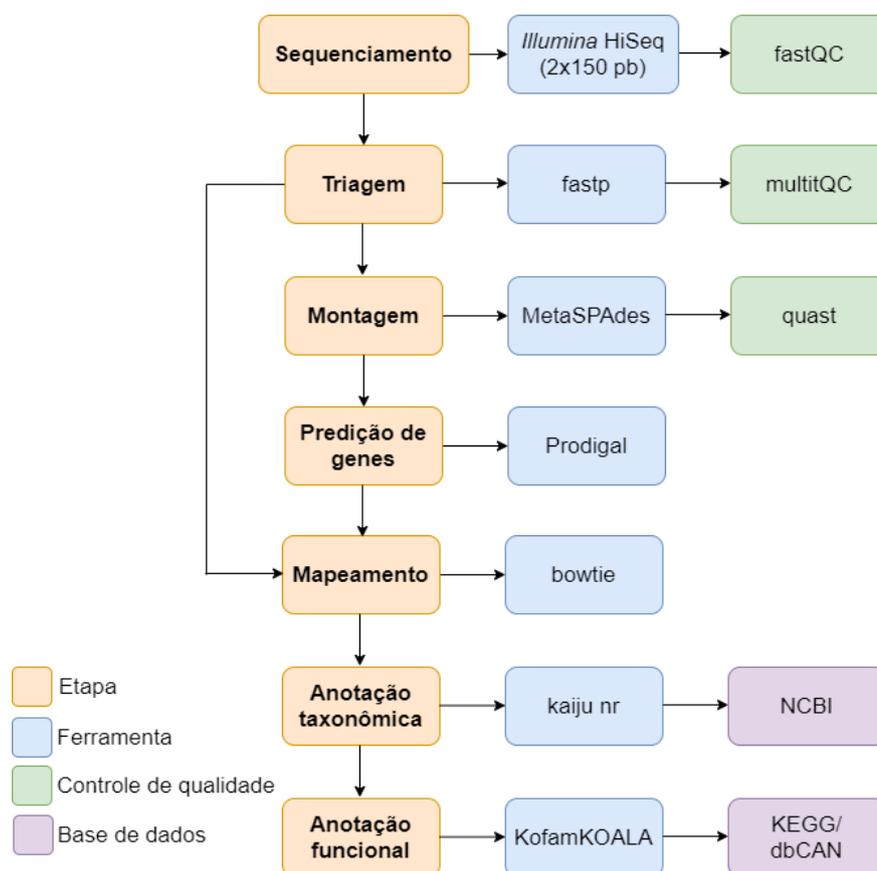
Os KO de interesse foram filtrados por meio de comandos básicos da linguagem R (<https://www.R-project.org/>) e analisados por meio do pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2009). Os KO de interesse para a via metanogênica foram filtrados de acordo com Macedo et al. (2020). Os mapas metabólicos foram inferidos com base na ferramenta KEGG Mapper – Reconstruct Pathway (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016). Os números EC (Enzyme Commission Numbers) referentes à cada KO foram analisados na plataforma *The*

Comprehensive Enzyme Information System (BRENDA) (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

4.10.3.3 Metagenômica *shotgun*

A preparação da biblioteca e o sequenciamento metagenômico foram realizados pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil) em Plataforma *Illumina* HiSeq (2x150 pb), seguindo as diretrizes do fabricante. As sequências no formato FASTAQ obtidas após o sequenciamento via plataforma *Illumina* HiSeq foram processadas, de acordo com o esquema simplificado de pipeline na Figura 4.7. As sequências foram submetidas no banco de dados NCBI sob o número PRJNA605706.

Figura 4.7. Pipeline aplicado ao tratamento de sequências obtidas após o seqeenciamento *shotgun* via Plataforma *Illumina* HiSeq.



Fonte: Elaboração própria.

O controle de qualidade da sequência foi realizado por meio de análises em FastQC e MultiQC em relação aos seguintes parâmetros: qualidade da sequência por base, escores de qualidade da sequência, conteúdo da sequência base, conteúdo de GC por sequência, conteúdo N por base, distribuição de comprimento de sequência, nível de duplicação de

sequência, sequências super-representadas e conteúdo do adaptador. Os parâmetros foram avaliados de acordo com Ewels et al. (2016).

As bases consideradas fora do padrão de qualidade mínimo foram filtradas via Fastp (CHEN et al., 2018), removendo as caudas de PoliG e PoliX nas extremidades de 3'. Após a triagem, as sequências curtas (*reads*) foram montadas em *contigs* através da montagem comparativa metaSPAdes (NURK et al., 2017), com reconstrução do genoma a partir dos dados obtidos e uma sequência comparativa específica. O controle de qualidade dos contigs foi realizado por meio do *Quality Assessment Tool for Genome Assemblies* (QUAST) em relação ao seu tamanho e porcentagem de GC, de acordo com Gurevich (2013).

A ferramenta bowtie (LANGMEAD, 2010) foi aplicada para mapeamento de genes. A anotação taxonômica foi realizada via kaiju nr (MENZEL; NG; KROGH, 2016) em comparação às sequências disponíveis no banco de dados NCBI. A anotação foi realizada com um ponto de corte $1E-5$ para o *E-value* e uma identidade $\geq 60\%$.

A anotação funcional e metabólica foi realizada via GhostKOALA (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016) em comparação com *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), KEGG Orthology (KO) (KANEHISA, 2000) e *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZymes) (<http://www.cazy.org/>) via servidor HMMER. As vias metabólicas foram mapeadas pelo banco de dados KEGG, utilizando o pacote Pathview (LUO; BROUWER, 2013).

As análises de expressão gênica diferencial com base na distribuição binomial negativa foram realizadas usando o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), enquanto a visualização de dados foi realizada com o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009) e funções básicas R (<https://www.R-project.org/>).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado nos dados obtidos, a fim de verificar sua parametricidade, ou seja, se possuem distribuição normal ($p \geq 0,05$) ou distribuição não normal ($p \leq 0,05$), possibilitando assim a escolha dos testes estatísticos mais adequados a serem utilizados posteriormente.

Os dados de distribuição normal e de amostras não pareadas foram comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA) e via Teste de Tukey ou Teste *t-Student*, avaliando-se desta forma sua relevância estatística, adotando-se um intervalo de confiança

de 95%, enquanto dados de distribuição não normal de amostras não pareadas foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis para o mesmo intervalo de confiança. Os dados experimentais foram ajustados para valores médios obtidos de réplicas de reatores e interpretados usando o *software* PAST versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.6.1 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais foram ajustados para valores médios obtidos de réplicas (duplicatas ou triplicatas) dos ensaios em batelada realizados, sendo que os dados de concentração acumulada de hidrogênio foram obtidos a partir do modelo cinético sigmoidal de Gompertz modificado por Zwieterin et al. (1994), específico para a modelagem preditiva de crescimento microbiano, sendo que os parâmetros foram calculados por meio da Equação 4.8 no *software* OriginPro 9.0.

$$Y(t) = P \cdot \exp\left\{-\exp\left(\frac{Rm \cdot e}{P} [\lambda - t] + 1\right)\right\} \quad (Eq. 4.8)$$

sendo,

$Y(t)$ = razão logarítmica entre a concentração de H_2 no tempo t e a concentração inicial,

Rm = velocidade específica máxima de obtenção de H_2 ($\mu\text{max}/\text{mmol } H_2 \cdot h^{-1}$),

e = constante de Euler (2,71828182)

λ = tempo de início da obtenção de H_2 (h),

P = potencial máximo de concentração de H_2 ($\text{mmol } H_2 \cdot L^{-1}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

5.1.1 Caracterização físico química

Realizou-se a caracterização físico-química do resíduo de citros, após moagem, em relação a sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), macronutrientes e micronutrientes (Tabela 5.1). Foram quantificados Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na, Zn, além nitrogênio total e fósforo total comparando-se composição similar aos resíduos de citros já relatados na literatura (MARTÍN et al., 2010; ANJUM et al., 2017).

Após a caracterização físico-química dos resíduos de citros, foi possível notar que as cascas possuem maior concentração de ST (300 g.kg^{-1}) e STV ($284,3 \text{ g.kg}^{-1}$), nitrogênio (8.200 mg.kg^{-1}), Fe ($50,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), Mn ($9,97 \text{ mg.kg}^{-1}$), K ($10.700 \text{ mg.kg}^{-1}$) e Na (428 mg.kg^{-1}) quando comparadas ao bagaço, no qual foram observados valores inferiores para ST ($121,5 \text{ g.kg}^{-1}$), STV ($117,9 \text{ g.kg}^{-1}$), nitrogênio (5.810 mg.kg^{-1}), Fe ($42,9 \text{ mg.kg}^{-1}$), Mn ($8,99 \text{ mg.kg}^{-1}$), K (8.440 mg.kg^{-1}) e Na (345 mg.kg^{-1}). Em relação a fósforo, Ca, Cu, Mg e Zn observadas verificou-se valores maiores para bagaço, de 5.650 , 99 , 1.270 e $26,6 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente, enquanto para a casca os valores obtidos foram de 4.930 , $25,9$, 977 e $20,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 5.1. Caracterização físico-química dos resíduos de citros.

Sólidos (g.kg^{-1})	Cascas	Bagaço
ST	300,6	121,5
STV	284,3	117,9
Macro e micronutrientes (mg.kg^{-1})		
Nitrogênio Total	8.200	5.810
Fósforo Total	847	917
Ca	4.930	5.650
Cu	25,9	99,0
Fe	50,1	42,9
Mg	977	1.270
Mn	9,97	8,99
Ni	≤ 1	≤ 1
K	10.700	8.440
Na	428	345
Zn	20,4	26,6

Nota: ST= sólidos totais, STV= sólidos totais voláteis, Ca = cálcio, Cu= cobre, Fe= ferro, Mg= magnésio, Mn= manganês, Ni= níquel, K= potássio, Na= sódio, Zn= zinco.

Tanto, nas cascas, quanto no bagaço de citros foi possível quantificar nitrogênio (8.200 e 5.810 mg.kg⁻¹, respectivamente) e fósforo (847 e 917 mg.kg⁻¹, respectivamente). Resíduos orgânicos com concentrações expressivas de N e P, como observado para os resíduos de citros, não devem ser dispostos diretamente no solo, devido ao risco de agravamento de impactos ambientais, como eutrofização, ou inibição das populações microbianas do solo com prejuízo para a sua diversidade. Além disso, a incineração tampouco é recomendada, uma vez que não elimina os metais potencialmente tóxicos (CECILIA et al., 2019).

Sabe-se que diversos macro e micronutrientes observados nos resíduos sólidos de citros são de grande relevância para processos de digestão anaeróbia, como Fe (42,9-50,01 mg.kg⁻¹), Cu (25,9-99,0 mg.kg⁻¹), Zn (20,4-26,6 mg.kg⁻¹), Mn (8,99-9,97 mg.kg⁻¹), Mg (977-1.270 mg.kg⁻¹), Ni (≤ 1 mg.kg⁻¹), Ca (4.930-5.650 mg.kg⁻¹) e K (8.840-10.700 mg.kg⁻¹). Especificamente, o Fe é essencial para bactérias fermentativas produtoras de H₂, que carecem deste elemento para atividade de suas enzimas que contém ferro ou enxofre (RUGGERI; TOMMASI; SANFILIPPO, 2015).

Entretanto, elevadas concentrações de Fe podem levar à inibição do processo fermentativo (FITZGERALD et al., 2019). A concentração de Fe nas cascas (50,01 mg.kg⁻¹) e no bagaço de citros (42,9 mg.kg⁻¹) foram consideradas abaixo do limite considerado inibitório para a produção biológica de H₂ (LEE et al., 2009). Até o momento, não há relatos sobre o efeito da concentração de Fe em reatores anaeróbios contendo especificamente resíduos sólidos de citros como substrato. Lee et al. (2009) avaliaram os efeitos de íons metálicos na obtenção de H₂ em reatores anaeróbios, utilizando glicose como fonte de carbono (16 g.L⁻¹). Os autores mencionados observaram redução da atividade da hidrogenase e consequente redução da obtenção de H₂ em concentrações de Fe acima de 125 mg.kg⁻¹.

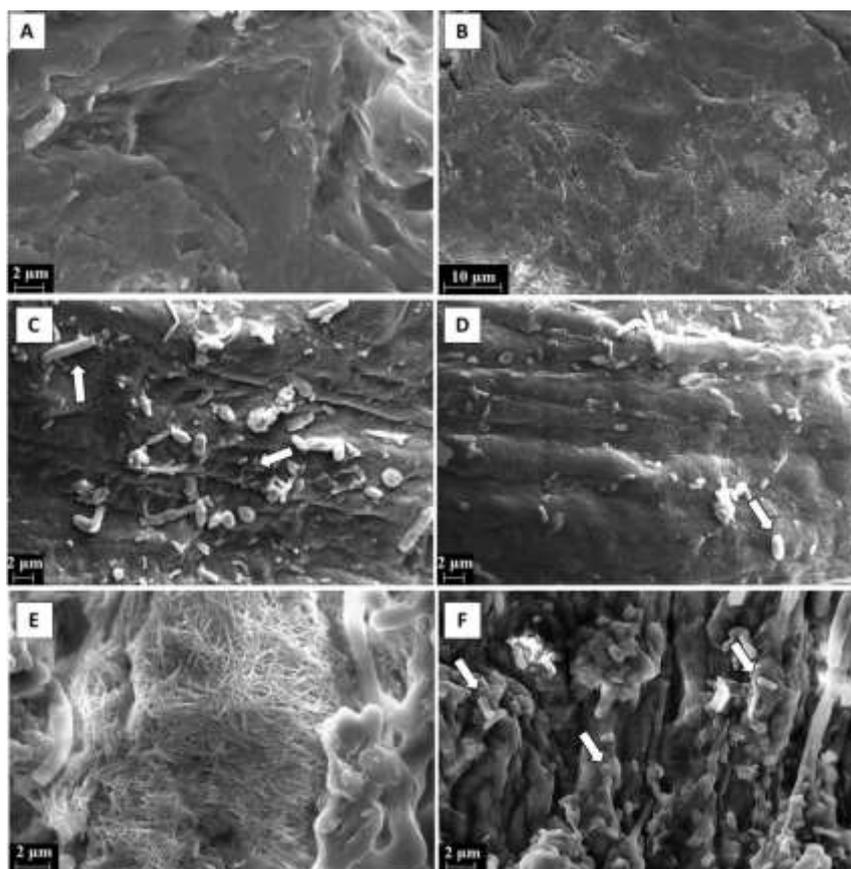
Da mesma forma, Na (345-428 mg.kg⁻¹) e Ca (4.930-5.650 mg.kg⁻¹), apesar de associados à inibição do crescimento microbiano em processos fermentativos foram observados na presente pesquisa abaixo do limite inibitório indicado por Khanna et al. (2011) em 10 g.L⁻¹ de glicose, de 27.000 mg.kg⁻¹ para Na e 10.000 mg.kg⁻¹ para Ca.

5.1.2 Exame Microscópico

Por meio da análise de MEV do bagaço de citros (Figura 5.1 C-F), foi possível notar diferença estrutural quando comparado às cascas, uma vez que este resíduo possui superfície mais fibrosa em relação às cascas, onde foi possível observar superfície mais

regular (Figura 5.1 A-B), bem como diferença na presença de microrganismos aderidos a sua superfície e reentrâncias, com destaque para a presença de bacilos e cocos, provavelmente de microrganismos autóctones do bagaço. Em relação às cascas, não foram observadas estruturas semelhantes a células microbianas em sua superfície.

Figura 5.1. Características micromorfológicas das cascas (A-B) e bagaço (C-F) de citros em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As setas brancas indicam a presença de estruturas semelhantes a bactérias/bacilos aderidas à superfície do material.

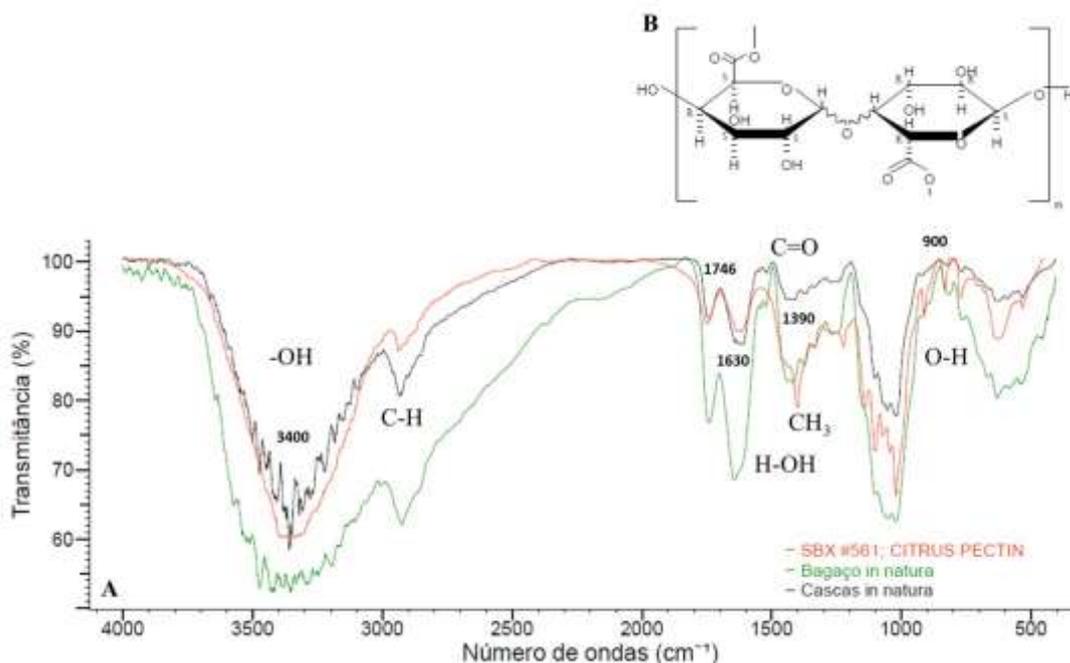


5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR das cascas e bagaço de laranja *in natura* (Figura 5.2) foram obtidos a fim de observar possíveis diferenças em sua composição e estrutura, para que posteriormente pudessem ser comparados aos espectros dos resíduos após os pré-tratamentos adotados, indicando possíveis alterações destas matrizes, especialmente em picos de grupos funcionais característicos para presença de celulose, hemicelulose e

lignina. Utilizou-se como base comparativa o espectro referente à estrutura da pectina de citros. Os resultados são apresentados na frequência de 4.000 a 400 cm^{-1} .

Figura 5.2. Espectrograma vibracional na região do infravermelho (FT-IR) dos resíduos de citros (cascas e bagaço *in natura*) (A) utilizados na presente pesquisa e espectro comparativo de pectina de citros (B).



Em relação a região entre 3.800 cm^{-1} e 2.800 cm^{-1} foi verificada duas bandas principais, sendo que a primeira zona de absorção forte e larga em aproximadamente 3.400 cm^{-1} , representa o alongamento de grupos -OH devido a ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, e a faixa de 2.900 cm^{-1} representa o alongamento C-H, sendo CH, CH₂ e CH₃. Esta região é comumente associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio (C-H, O-H e N-H).

Picos entre 2.848 a 2.912 cm^{-1} em resíduos alimentares estão relacionadas as vibrações de estiramento assimétricas e simétricas de CH₂ e CH₃ de óleos vegetais, ácidos graxos, ésteres, aldeídos de alto peso molecular e cetonas. Também é possível notar picos característicos relacionados a lignina, uma vez que sua resolução é na faixa de 1.510 a 1.650 cm^{-1} (NANDA et al., 2016). Bandas na região entre 2.300-1.900 cm^{-1} não foram observadas, sendo típicas de vibrações de deformação axial de triplas ligações e duplas acumuladas.

A absorção entre 1.500 a 600 cm^{-1} é associada a diversos tipos de vibração, como deformações axiais e angulares de ligações C-O, C-N, C-C e C-X. A presença de hemicelulose, no espectro correspondente às cascas e bagaço, pode ser notada a

aproximadamente 1.700 cm^{-1} . Os picos na faixa entre 900 e 1.200 cm^{-1} são relacionados a ocorrência de álcoois (O-H), ácido carboxílico, ésteres e éteres em resíduos de alimentos. Picos entre 800 e 900 cm^{-1} sugerem a presença de ligações C-H aromáticas e os picos em aproximadamente 700 cm^{-1} , de C-H alcanos (NANDA et al., 2016).

Em 1.718 cm^{-1} notou-se uma banda que pode ser atribuída às cetonas não conjugadas de carbonilas (C=O), que são frequentes e importantes grupos funcionais das cadeias laterais da estrutura da lignina. A faixa que compreende o pico em aproximadamente 1.350 cm^{-1} é atribuída ao alongamento com fenol hidroxila. As deformações em aproximadamente 1.630 cm^{-1} são associadas à absorção de água (H-OH) na amostra estudada. Por fim, a presença de bandas próximas a 1.320 cm^{-1} pode ser atribuída as vibrações de CH_2 de celulose e hemicelulose, enquanto em 1.160 cm^{-1} é representativa para os grupos C-O-C, presentes na celulose e hemicelulose. Picos na região entre 1.200 e 900 cm^{-1} são característicos de glicose, frutose e sacarose (ABID et al., 2017). Bandas similares foram encontradas em espectros de citros analisados em Abid, Cheikhrouhou, et al. (2017), He, Pang, et al. (2008) e Nanda, Isen, et al. (2016).

5.2 OBTENÇÃO DE INÓCULO

5.2.1 Inóculo autóctone

As cascas e bagaço de laranja (separadamente e em conjunto) foram utilizados como fonte de microrganismos fermentativos e potencialmente celulolíticos, autóctones dos resíduos de citros, por meio de ensaios de autofermentação e aumento da biomassa. Os ensaios foram realizados em temperatura mesofílica ($37\text{ }^\circ\text{C}$) em pH do meio de cultivo (meio PCS) ajustado para 7,0.

Após a obtenção das curvas de concentração de hidrogênio, foi possível comparar com base nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado (Tabela 5.2), as combinações de inóculo para os quais obtiveram-se os melhores resultados. A maior concentração de hidrogênio (P) de $7,78\text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ foi obtida no ensaio contendo a mistura de cascas e bagaço de citros *in natura*.

Tabela 5.2. Parâmetros de Gompertz dos ensaios de autofermentação dos resíduos de citros *in natura* para obtenção de H₂ a partir de cascas e bagaço de citros.

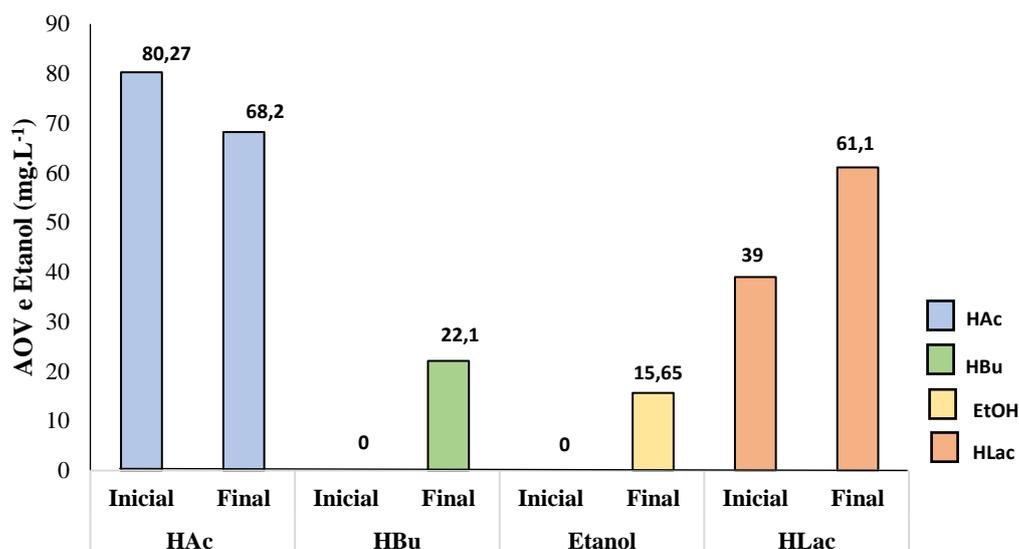
Parâmetro	Substrato		
	Cascas	Bagaço	Cascas + Bagaço
<i>P</i> (mmol H ₂ .L ⁻¹)	7,05	6,70	7,78
<i>Rm</i> (mmol H ₂ .h ⁻¹)	0,23	0,68	0,58
λ (h)	4,75	9,13	8,08
R ²	0,97	0,98	0,95

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

Aplicou-se o Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% a fim de avaliar a obtenção de H₂ nos ensaios autofermentativos contendo cascas, bagaço e cascas e bagaço em conjunto. Considerou-se que a diferença da concentração de H₂ observada não foi significativa ($p \geq 0,05$). Assim sendo, optou-se por utilizar a mistura entre cascas e bagaço de citros como fonte de microrganismos, uma vez que neste ensaio verificou-se maior concentração média de hidrogênio (7,78 mmol H₂.L⁻¹).

Em relação aos AOV e álcoois obtidos após a fermentação (Figura 5.3), verificou-se predominância de HAc (80,27 mg.L⁻¹) e HLac (39 mg.L⁻¹) no início dos ensaios, sendo que após a fermentação (24 h) verificou-se aumento do HLac para 61,1 mg.L⁻¹, e diminuição da concentração de HAc para 68,22 mg.L⁻¹. Além disso, verificou-se HBU (22,1 mg.L⁻¹) e EtOH (15,65 mg.L⁻¹). Por meio da autofermentação de resíduos de banana em reatores em batelada (pH 7,5 e 44 °C), Mazareli et al. (2020) obtiveram compostos similares aos do presente estudo a partir da autofermentação de resíduos de citros, sendo HAc (20–720 mg.L⁻¹), HBU (30–2.660 mg.L⁻¹), HLac (260–5.140 mg.L⁻¹) e EtOH (80–640 mg.L⁻¹). A maior concentração destes compostos orgânicos a partir dos resíduos de banana provavelmente ocorreu devido à maior disponibilidade de carboidratos solúveis neste resíduo (15 g.L⁻¹) em comparação aos resíduos sólidos de citros (1,2 g.L⁻¹).

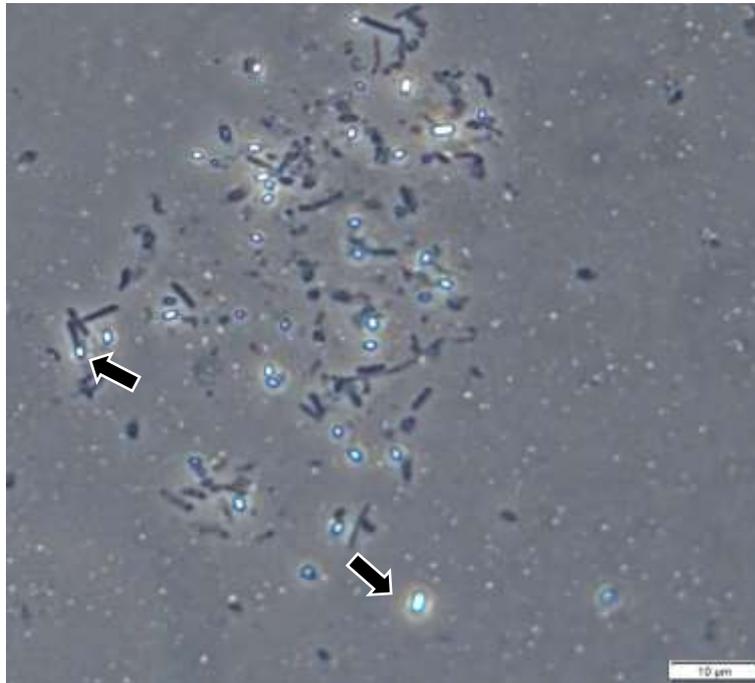
Figura 5.3. Ácidos orgânicos e etanol nos ensaios de autofermentação dos resíduos de citros *in natura*.



Por meio de exames microscópicos foi possível observar a prevalência de bactérias Gram-positivas, morfológicamente caracterizadas como bacilos, de aproximadamente 5x1 µm, além de diversas estruturas similares a endósporos, endósporos ovais e terminais (Figura 5.4).

Apesar de não ser possível afirmar apenas por meio de observações morfológicas em microscopia óptica, sabe-se que bactérias do filo Firmicutes, especialmente do gênero *Clostridium e Bacillus*, são ubíquos e abundantes em condições de anaerobiose, além de serem formadores de endósporos (GALPERIN, 2013) e muitas vezes celulolíticos (WANG et al., 2011; GALPERIN, 2013), que podem ser encontrados comumente em matéria orgânica em decomposição (ZVERLOV; SCHWARZ, 2008), estando muitas vezes relacionados à produção de hidrogênio (LIN; SHEI, 2008).

Figura 5.4. Características micromorfológicas do consórcio celulolítico autóctone das cascas e bagaço de laranja *in natura* em microscopia de contraste de fase. As setas apontam as estruturas similares a endósporos. Aumento total de 1.000X.



O consórcio autóctone obtido a partir da autofermentação dos resíduos de citros também foi caracterizado em relação à sua atividade celulolítica, por meio da análise gravimétrica da desintegração de fibra de papel filtro. Após período de 21 dias de incubação, estimou-se 13,44% de desintegração da fibra de papel para os ensaios contendo o consórcio autofermentativo como inóculo e 3,5% para os ensaios controle (sem inóculo).

Após a comparação de médias via Teste *t-Student*, considerou-se que a diferença obtida foi significativa ($p \leq 0,05$) para o intervalo de confiança adotado (95%). Além disso, também se observou a mudança de coloração nas fibras de papel após o período de incubação (Figura 5.5), uma vez que as fibras dos ensaios controle mantiveram-se com a coloração original (brancas) e as fibras dos ensaios contendo o consórcio celulolítico tornaram-se amareladas.

Figura 5.5. Fibras de papel após o período de incubação. Ensaio controle (A) e ensaio contendo consórcio celulolítico isolado de resíduo de citros *in natura* (B).



A partir dos resultados obtidos nesta etapa optou-se por utilizar o consórcio obtido a partir da autofermentação dos resíduos de citros *in natura* como inóculo autóctone nos ensaios subsequentes, a fim de aumentar a densidade de bactérias potencialmente celulolíticas e adaptadas aos resíduos de citros no processo.

5.2.2 Inóculo alóctone

O objetivo desta etapa foi comparar dois diferentes consórcios microbianos alóctones, os lodos granulados de reator UASB aplicado ao tratamento mesofílico e termofílico de águas residuárias de abatedouro de aves e vinhaça de cana-de-açúcar, respectivamente. Além disso, também foram avaliadas diferentes faixas de temperatura de operação dos reatores em batelada, mesofílica (37 °C) e termofílica (55 °C), a fim de determinar as melhores condições de operação para os ensaios subsequentes.

Em todos os ensaios realizados com esses inóculos não foi verificada concentração significativa de metano, ou seja, os valores observados foram inferiores a 1,27 mmol (limite de quantificação de metano do método utilizado). Desta forma, optou-se por prosseguir os ensaios com o foco voltado para a obtenção de hidrogênio e demais produtos de interesse biotecnológico, como ácidos orgânicos e álcoois.

Estima-se que o consórcio ideal para degradação de celulose é quando se tem ampla diversidade de bactérias celulolíticas e não celulolíticas, assim como ocorre no ambiente. Recentemente, a estratégia de uso de inóculos autofermentativo aplicados a material celulósico/lignocelulósico, conciliado a consórcios alóctones a fim de potencializar a obtenção de biogás (CH₄ e/ou H₂) vem sendo amplamente difundida (BRAGA et al., 2018; RABELO et al., 2018a; MAZARELI et al., 2020; SOARES et al., 2020; VILLA

MONTOYA et al., 2020). Desta forma, optou-se por utilizar consórcio complexo, sendo uma mistura de bactérias autóctones/endógenas dos resíduos de citros, provavelmente, adaptadas a seus potenciais inibidores e capazes de utilizar este resíduo complexo como substrato, aliado ao consórcio alóctone, rico em bactérias fermentativas produtoras de biogás, como o lodo de reator UASB.

Após a obtenção das curvas de concentração de hidrogênio foi possível comparar com base nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado (Tabela 5.3) as combinações de inóculo com melhores resultados, a fim de determinar qual o melhor consórcio microbiano alóctone para obtenção de hidrogênio.

Notou-se que P e Rm foram maiores nos ensaios a 37 °C, embora a maior concentração observada tenha sido obtida com o Lodo UASB/vinhaça (12,54 mmol H₂.L⁻¹), bem como a maior velocidade (2,64 mmol H₂.h⁻¹). A partir da comparação de médias realizada via Teste de Tukey foi possível afirmar que a diferença de resultados obtidos em diferentes temperaturas foi significativa ($p \leq 0,05$), sendo assim, optou-se pelo Lodo UASB oriundo do UASB de tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar para dar andamento aos ensaios de obtenção de hidrogênio nas etapas subsequentes.

Tabela 5.3. Parâmetros de Gompertz modificado dos reatores anaeróbios com inóculos de diferentes origens, aplicados à obtenção de H₂ a partir de casacas e bagaço de citros.

Parâmetros	Ensaio					
	37 °C			55 °C		
	Lodo UASB/avícola	Lodo UASB/vinhaça	Consórcio autóctone	Lodo UASB/avícola	Lodo UASB/vinhaça	Consórcio autóctone
P (mmol H ₂ .L ⁻¹)	8,46	12,54	6,93	3,33	5,19	1,51
Rm (mmol H ₂ .h ⁻¹)	1,07	2,64	1,69	0,06	0,39	0,15
λ (h)	3,50	4,72	7,14	0,18	5,10	16,46
R^2	0,99	0,98	0,94	0,89	0,84	0,95

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (P), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (Rm), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Uma vez que a produção de metano não foi significativa, optou-se por não realizar nenhum tipo de pré-tratamento do inóculo, tendo em vista que esta etapa não apenas inibe a atividade metanogênica, mas também a atividade de bactérias celulolíticas-fermentativas e produtoras de hidrogênio (REN et al., 2008; RATTI et al., 2015).

Assim como neste estudo, Lazaro et al. (2014) também observaram maior concentração de hidrogênio em reatores em batelada contendo vinhaça de cana-de-açúcar

como substrato e lodo de reator UASB como inóculo, na faixa mesofílica, quando comparado à faixa termofílica, obtendo 28,4 e 6,7 mmol H₂.L⁻¹, respectivamente.

Verificou-se para o Lodo UASB/vinhaça maior *P* (12,54 mmol H₂.L⁻¹) a partir do resíduo de citros em relação ao Lodo UASB/avícola (8,46 mmol H₂.L⁻¹), ambos incubados à 37 °C. Harada et al. (1996) relataram que em comparação com lodos oriundos de tratamento mesofílico, os lodos termofílicos comumente contém maiores concentrações de compostos orgânicos tóxicos, o que pode justificar seu maior potencial de obtenção de biogás a partir de substratos como os resíduos de citros, uma vez que os microrganismos autóctones deste tipo de lodo estão mais adaptados a potenciais inibidores orgânicos. De acordo com Harada et al. (1996), a temperatura ótima para a atividade microbiana depende do substrato e dos produtos de interesse, justificando a melhor faixa de obtenção de biogás na faixa mesofílica (37 °C).

Na Tabela 5.4 estão incluídos os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos dos reatores incubados com o Lodo UASB/avícola, Lodo UASB/vinhaça e consórcio autofermentativo a 37 °C e 55 °C. A partir da comparação da variação inicial e final dos diferentes parâmetros, notou-se que não houve um padrão entre o aumento ou redução de sólidos, matéria orgânica, carboidratos totais e fenóis totais, uma vez que se obteve diferentes respostas para os diferentes ensaios.

Após comparação via Kruskal-Wallis, foi possível observar diferença significativa para a variação na concentração de ST e STV para todos os ensaios realizados na faixa de 37 °C, sendo que houve redução dos ST e STV em todos os ensaios, exceto para o Lodo UASB/vinhaça, no qual foi observada maior concentração de H₂.

As análises da variação de matéria orgânica, carboidratos e fenóis foram significativas ($p \geq 0,05$) para todos os ensaios realizados. Em todos os ensaios a 37 °C verificou-se aumento da matéria orgânica, sendo que o maior aumento foi para o Lodo UASB/vinhaça, além de maior concentração de biogás. O aumento da matéria orgânica foi menor nos ensaios a 55 °C. Nos ensaios com Lodo UASB/avícola e Lodo UASB/vinhaça à 55 °C verificou-se redução da matéria orgânica (10 para 6,8 mg.L⁻¹ e de 7,2 para 5 g.L⁻¹, respectivamente). Apenas no ensaio com consórcio a 55 °C verificou-se aumento na concentração de carboidratos (de 2,7 para 3,2 g.L⁻¹), enquanto, nos demais houve remoção, sendo que nos ensaios nos quais houve mais redução do teor de carboidratos (por faixa de temperatura), foi observada maior concentração de biogás, como no ensaio com Lodo

UASB/vinhaça à 37 °C, no qual a concentração de carboidratos inicial foi reduzida de 1,0 g.L⁻¹ para 0,8 g.L⁻¹ ao final do período de incubação de 24 h.

A oscilação no pH ocorreu devido a produção de ácidos orgânicos (Figura 5.6). O pH é uma das principais variáveis para a digestão anaeróbia, sendo que na faixa ácida ($\leq 4,5$) pode inibir a atividade da enzima hidrogenase e conseqüentemente a produção de hidrogênio, favorecendo, além disso, a solvetogênese (SIVAGURUNATHAN et al., 2017b). Entre 4,5-6,0, a produção de HAc e H₂ é favorecida, enquanto na neutralidade ($\geq 6,0$) há maior produção de H₂ e metano, e consumo de hidrogênio.

Por fim, notou-se que houve aumento na concentração de fenóis nos ensaios com consórcio autofermentativo a 37 °C (18,6 para 19 mg.L⁻¹) e Lodo UASB/avícola a 55 °C (18,1 para 19,3 mg.L⁻¹). Nos ensaios com redução na concentração de fenóis (de 23,3 para 19,3 mg.L⁻¹), como aquele a partir de Lodo UASB/vinhaça a 37 °C verificou-se melhor desempenho em relação à concentração de hidrogênio (12,54 mmol H₂.L⁻¹).

Tabela 5.4. Parâmetros físico-químicos dos reatores anaeróbios com inóculos de diferentes origens.

	Alóctone- UASB/ avícola		Alóctone- UASB/ vinhaça		Inóculo autóctone	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
37 °C						
Sólidos (mg.L⁻¹)						
ST	24,5	22,0	23,7	23,2	25,8	22,4
STV	10,7	8,9	10,2	8,6	10,9	8,8
SS	2,7	1,1	0,9	1,2	1,0	0,9
SSV	2,1	1,3	0,6	0,9	0,6	0,8
DQO_{filtrada} (g.L⁻¹)	3,4	9,6	4,1	12,3	5,1	10,8
Carboidratos Totais (g.L⁻¹)	1,0	0,8	1,3	0,7	1,2	1,0
Fenóis Totais (mg.L⁻¹)	23,3	19,3	21,8	19,2	18,6	19,0
pH	7,4	5,3	7,6	5,3	7,4	5,3
55 °C						
ST	22,4	21,4	22,0	35,7	22,3	22,9
STV	9,4	13,4	9,5	8,0	8,9	5,4
SS	1,8	2,0	1,2	1,2	0,6	0,9
SSV	1,2	1,3	0,8	1,0	0,4	0,4
DQO_{filtrada} (g.L⁻¹)	10,0	6,8	7,2	5,0	2,5	5,1
Carboidratos Totais (g.L⁻¹)	2,5	1,3	3,1	1,1	2,7	3,2
Fenóis Totais (mg.L⁻¹)	18,1	19,3	19,2	17,6	19,0	18,6
pH	7,8	7,0	7,6	7,5	7,7	5,0

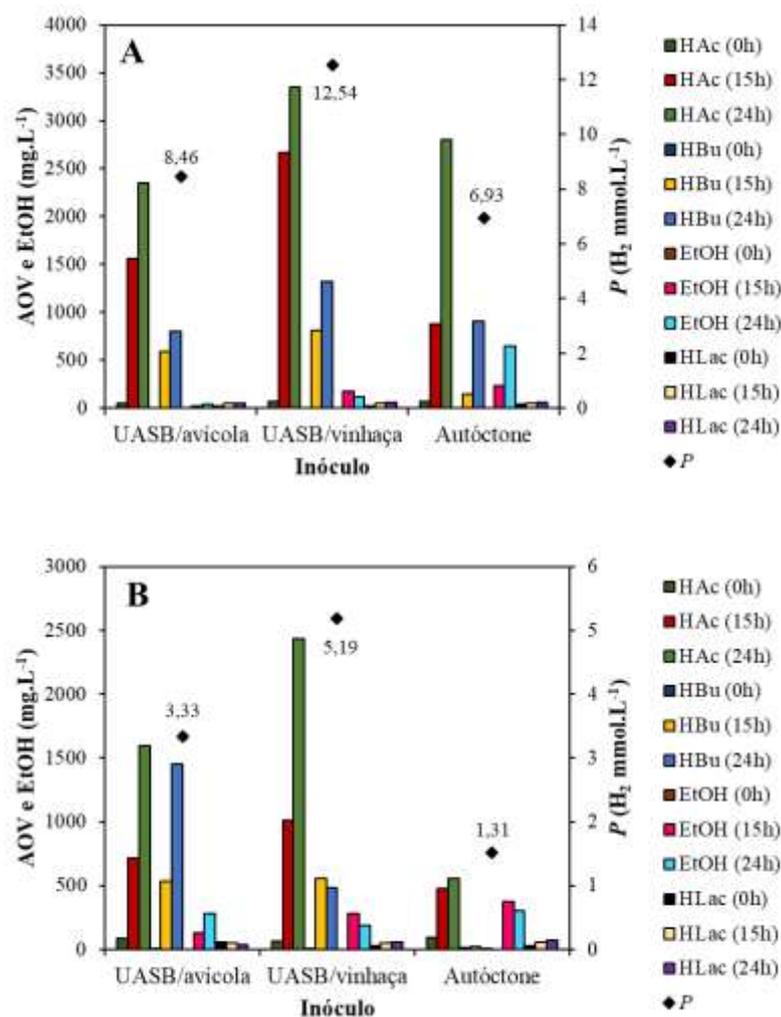
Notou-se relação entre a produção de ácidos orgânicos e/ou EtOH e valor de *P* nos ensaios com inóculos de diferentes origens (Figura 5.6). A concentração de H₂ foi diretamente proporcional à produção de HAc, ou seja, nos ensaios nos quais houve maior

produção deste ácido (Lodo UASB/vinhaça- 3,35 g.L⁻¹), houve ainda maior concentração de hidrogênio (12,54 mmol H₂.L⁻¹), e nos ensaios com menor produção de HAc (Inóculo autóctone, 2,8 g.L⁻¹), houve menor concentração de H₂ (6,93 mmol H₂.L⁻¹).

Para todos os ensaios, além do HAc, verificou-se H₂, HLac e EtOH, porém em menores proporções, após 24 h de incubação. Provavelmente, a via predominante foi a acetogênica, sendo o HAc o principal metabólito produzido durante a fermentação de bactérias do gênero *Clostridium* (VOS et al., 2009; GHIMIRE et al., 2015). Verificou-se produção de EtOH para os três inóculos analisados, sendo inversamente proporcional à concentração de H₂; ou seja, nos ensaios com maior produção de EtOH (Inóculo autóctone, 0,64 g.L⁻¹) verificou-se menor concentração de H₂.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, considerou-se que o lodo granular oriundo de reator UASB aplicado ao tratamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar seria mais adequado como fonte de microrganismos para obtenção de H₂ a partir de resíduo sólido de citros, tanto em condições mesofílicas quanto termofílicas. Sendo assim, optou-se por utilizá-lo como inóculo alóctone nos ensaios subsequentes, junto ao inóculo autóctone previamente estabelecido no item 5.2.1. Desta forma, o lodo granular oriundo de reator UASB aplicado ao tratamento mesofílico de resíduos de avícola não foi utilizado nas demais etapas.

Figura 5.6. Ácidos orgânicos e álcool no início e após 24h dos ensaios em reator anaeróbio em batelada a 37 °C (A) e 55 °C (B) com diferentes inóculos.



5.3 PRÉ-TRATAMENTOS APLICADOS AO RESÍDUO SÓLIDO DE CITROS

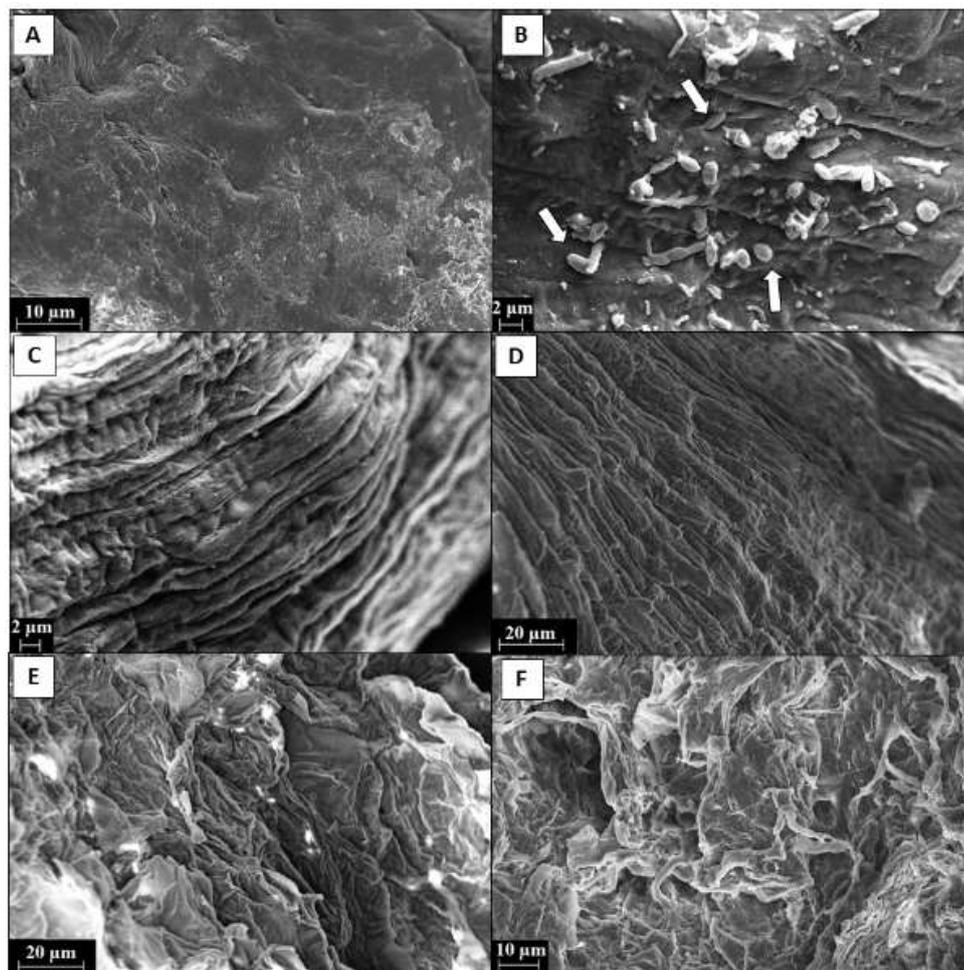
5.3.1 Efeitos dos pré-tratamentos nas características físico-químicas e morfológicas do substrato

A partir da análise em MEV do bagaço de citros *in natura* (Figura 5.7 A-B) verificou-se diferenças estruturais entre a casca e bagaço. Para tanto, verificou-se superfície mais fibrosa no bagaço em relação às cascas, bem como diferenças em relação aos microrganismos aderidos à superfície do bagaço, com destaque para bacilos e endósporos autóctones desse resíduo.

Na análise comparativa entre as características morfológicas das cascas e bagaço após os pré-tratamentos por hidrotérmólise (Figura 5.7 C-D) e deslignificação alcalina (Figura 5.7 E-F) verificou-se alteração na estrutura destes resíduos, sendo possível notar o

aumento da fibrosidade das cascas e aplanamento do bagaço, após ambos os pré-tratamentos. Além disso, é possível inferir que houve eliminação dos microrganismos autóctones, uma vez que estruturas semelhantes à bactérias não foram observadas após os pré-tratamentos.

Figura 5.7. MEV da superfície do resíduo sólido de citros. Casca (A) e bagaço *in natura* (B), casca (C) e bagaço (D) após hidrotérmólise e casca (E) e bagaço (F) após deslignificação alcalina. As setas indicam morfologias semelhantes a bactérias.



Após a aplicação da hidrotérmólise e deslignificação alcalina foi possível observar mudança estrutural no resíduo sólido de citros por meio dos espectros de FT-IR, tanto nas cascas, quanto no bagaço, quando comparado aos espectros obtidos para este resíduo *in natura*. Após a hidrotérmólise verificou-se diminuição na absorção na região entre 3.800 e 2.800 cm^{-1} , além da região de 2.900 cm^{-1} , provavelmente devido à redução dos grupos –OH, e do grupo C-H, respectivamente, com destaque para provável ruptura dos grupos metil e metileno da celulose da casca após este pré-tratamento. Em relação ao bagaço, não

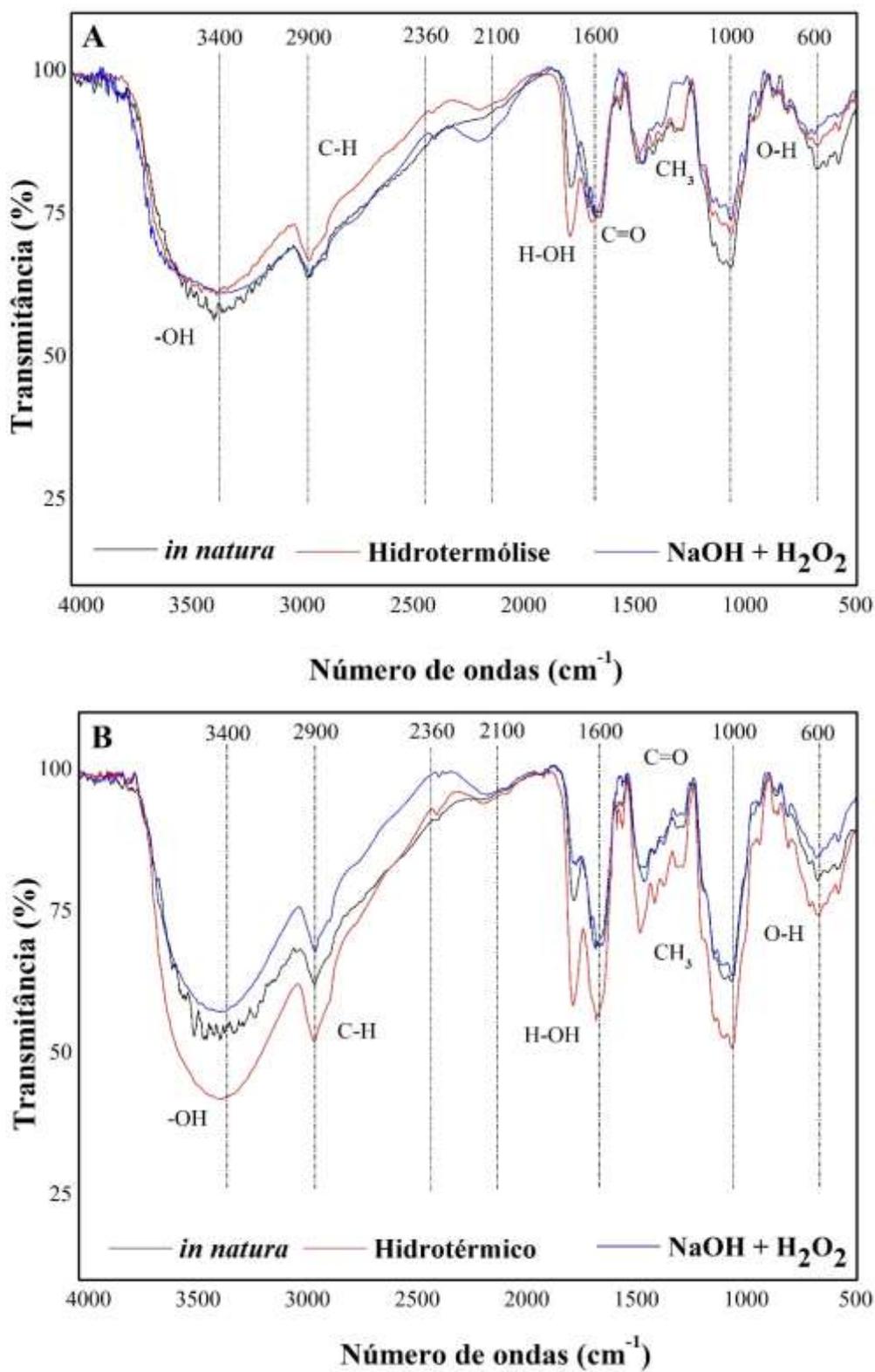
se verificou alterações na estrutura em relação à composição e intensidade dos grupos funcionais na análise comparativa desse material *in natura* e após ambos os pré-tratamentos avaliados (Figura 5.8).

Após a deslignificação alcalina foi possível notar modificações estruturais na zona de absorção entre 2.100 e 2.500 cm^{-1} , com o surgimento de um pico de intensidade fraca, sendo que a absorção nesta região pode ser associada às vibrações de deformação axial de ligações duplas acumuladas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1981; HE et al., 2008). Além disso, também fica nítida a redução da absorção, tanto na região entre 3.800 e 2.800 cm^{-1} , provavelmente devido à redução dos grupos $-\text{OH}$ após o pré-tratamento, quanto na região em aproximadamente 2.900 cm^{-1} , com redução do grupo C-H, e indicativo de ruptura dos grupos metil e metileno da celulose (HE et al., 2008).

He et al. (2008) observaram a redução de ligações de hidrogênio na estrutura da celulose, bem como a decomposição da cadeia lateral da lignina após deslignificação alcalina (NaOH 6%). Similarmente, no presente estudo, após o pré-tratamento de deslignificação alcalina, foi possível observar o desaparecimento de picos característicos de ligações C=O de amidas na faixa de absorção entre 1.640-1.660 cm^{-1} para os espectros das cascas (Figura 5.8), indicando que em concentrações mais brandas de NaOH, ainda ocorre remoção de lignina.

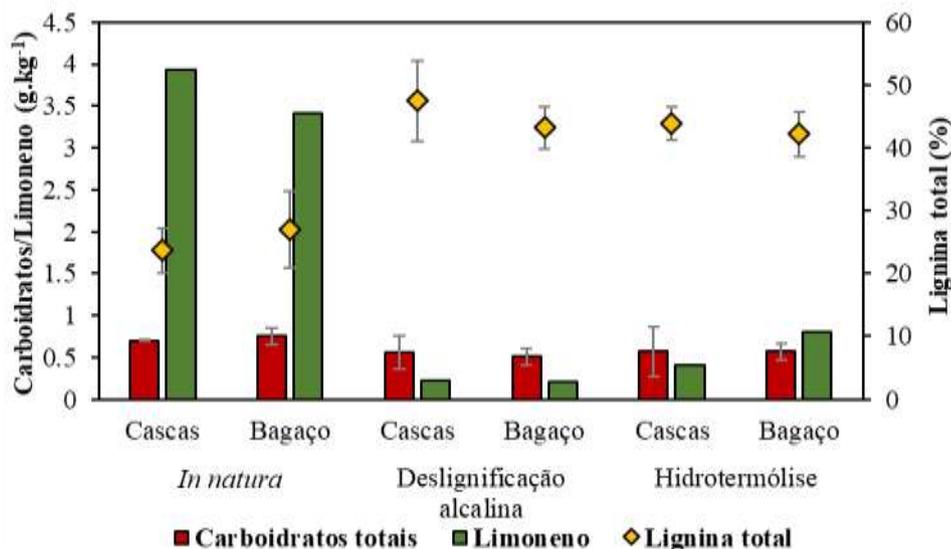
No presente estudo, a deslignificação alcalina foi conciliada ao uso de peróxido de hidrogênio (1%), uma vez que este reagente é considerado efetivo na liberação de açúcares monoméricos e celulose de biomassa lignocelulósica, a partir da remoção da hemicelulose (MICHALSKA; LEDAKOWICZ, 2014). Ahmad et. al. (2020) modelaram a obtenção de CH_4 em reatores em batelada a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado via impregnação com H_2O_2 (2-6%) seguida de hidrotermólise. Os autores observaram correlação positiva entre o aumento da concentração de H_2O_2 e a obtenção de CH_4 . Os autores concluíram que as condições ideais de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para uso como substrato para obtenção de CH_4 foram com impregnação do resíduo sólido de citros com H_2O_2 11% seguida de hidrotermólise a 138 °C, 14 bar e 31,45 minutos.

Figura 5.8. Espectrograma vibracional na região do infravermelho (FT-IR) do resíduo sólido de citros, cascas (A) e bagaço *in natura* (B), após hidrotérmólise e deslignificação alcalina.



O percentual de lignina, teor de carboidratos totais e limoneno do resíduo sólido de citros (cascas e bagaço, separadamente) *in natura* e após os pré-tratamentos de hidrotérmólise e deslignificação alcalina, estão apresentados na Figura 5.9.

Figura 5.9. Caracterização físico-química do resíduo sólido de citros (cascas e bagaço) antes e após diferentes pré-tratamentos.



Foi possível observar menor teor de lignina no resíduo sólido de citros *in natura* (23,65 e 26,90% de ST para cascas e bagaço, respectivamente), quando comparado ao resíduo sólido de citros após hidrotérmólise (43,87% de ST para cascas e 42,17% de ST para o bagaço) e deslignificação alcalina (47,51% de ST para cascas e 43,20% de ST para o bagaço). Com base nos resultados das análises por meio do teste de Kruskal-Wallis para 95% de confiança, a diferença do teor de lignina entre o resíduo sólido de citros (cascas e bagaço) *in natura* e pré-tratados foi estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

Em relação aos carboidratos totais quantificados para o resíduo sólido de citros, os valores foram similares entre as cascas e bagaços do resíduo sólido de citros *in natura* (6,1 e 6,5 g.kg⁻¹), após hidrotérmólise (4,9 e 4,9 g.kg⁻¹) e após deslignificação alcalina (4,9 e 4,4 g.kg⁻¹). Entretanto, apenas a diferença entre o resíduo sólido de citros *in natura* (casca e bagaço) foi significativa quando comparada aos demais ensaios, isto é, $p \leq 0,05$. É possível inferir que devido a aplicação dos pré-tratamentos ocorreu redução do teor de carboidratos totais do resíduo sólido de citros, devido ao rompimento das fibras das cascas e bagaço e, ainda, à hidrólise dos monossacarídeos (glicose e xilose) no resíduo sólido de citros (WILKINS et al., 2007; CHOI et al., 2013, 2015).

Por fim, em relação ao teor de limoneno do resíduo sólido de citros *in natura*, obtiveram-se os valores de 15,7 g.kg⁻¹ para as cascas e 13,7 g.kg⁻¹ para o bagaço. Após a aplicação dos pré-tratamentos, foi possível notar redução desta concentração, sendo 0,9 g.kg⁻¹ para cascas e 0,8 g.kg⁻¹ para o bagaço após a deslignificação alcalina, enquanto para o resíduo sólido de citros após hidrotérmólise, foram obtidos 1,6 g.kg⁻¹ para cascas e 3,2 para o bagaço.

A redução do teor de limoneno após a aplicação dos pré-tratamentos pode ser justificada devido ao caráter volátil deste composto (RUIZ; FLOTATS, 2014), ou, ainda, devido a sua transferência para a fração líquida após o pré-tratamento. Estudos anteriores indicam que a concentração inibitória mínima de limoneno é estimada em aproximadamente 0,2 mg.kg⁻¹ de resíduo sólido de citros (CALABRÒ et al., 2016; RUIZ e FLOTATS, 2016).

5.3.2 Efeitos dos pré-tratamentos na obtenção de H₂ e AOV

Nos ensaios cinéticos em batelada contendo 15 g.L⁻¹ de resíduo sólido de citros (cascas + bagaço; 1:1), foi possível verificar a influência do substrato (*in natura* ou pré-tratado) na obtenção máxima de H₂ (P), velocidade específica máxima (Rm) e tempo de início necessário para obtenção de H₂ (λ) (Figura 5.10).

Foram observados maiores valores de P (13,55 mmol H₂.L⁻¹), Rm (3,11 mmol H₂.h⁻¹) e λ (4,85 h) nos ensaios com resíduo sólido de citros *in natura* (Tabela 5.5). A partir das análises por meio do teste de Kruskal-Wallis para 95% de confiança, foi possível inferir que a maior obtenção de H₂ a partir do resíduo sólido de citros *in natura* foi significativa ($p \leq 0,05$) em comparação aos pré-tratados (hidrotérmólise e deslignificação alcalina).

A partir dos parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios com resíduo sólido de citros pré-tratado não se observou diferença significativa ($p \geq 0,05$) após hidrotérmólise e deslignificação alcalina. Entretanto, com base nos valores médios observados, notou-se maior tempo de início necessário para obtenção de H₂ no ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotérmólise (8,65 h), quando comparado ao resíduo sólido de citros após deslignificação alcalina (7,21 h).

Figura 5.10. Concentração de H₂ a partir do resíduo sólido de citros *in natura* (●), hidrotermólise (■) e deslignificação alcalina (▲). Modelo de Gompertz modificado (----).

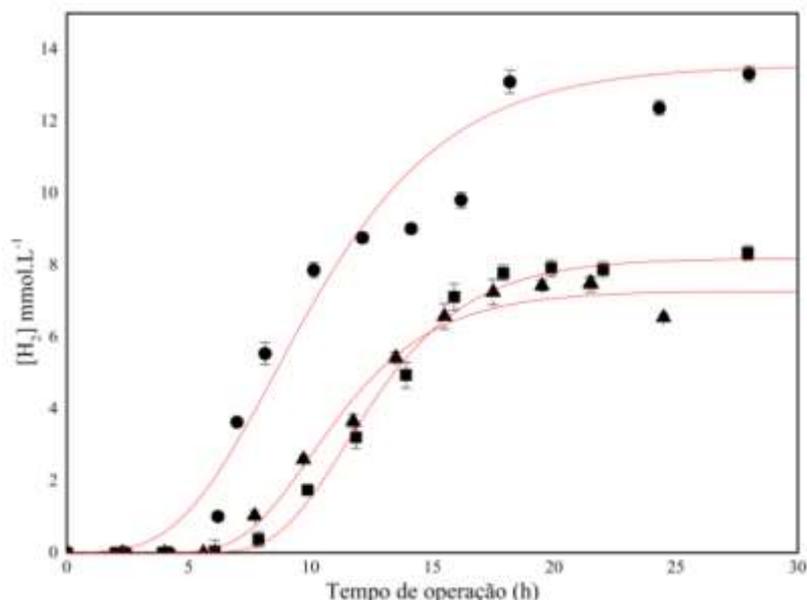


Tabela 5.5. Parâmetros de Gompertz modificado dos ensaios após diferentes pré-tratamentos do resíduo sólido de citros. Potencial máximo de concentração de H₂ (P), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (Rm), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Parâmetros	Substrato		
	<i>in natura</i>	Deslignificação alcalina	Hidrotermólise
P (mmol H ₂ .L ⁻¹)	13,55	7,27	8,19
Rm (mmol H ₂ .h ⁻¹)	1,27	0,96	1,08
λ (h)	4,60	7,21	8,65
R^2	0,94	0,98	0,99

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (P), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (Rm), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Apesar do maior λ , obtiveram-se no ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotermólise valores superiores de P (8,19 mmol H₂.L⁻¹) e Rm (1,08 mmol H₂.h⁻¹) em comparação com o resíduo sólido de citros após deslignificação alcalina. Nessa última condição, foram obtidos P de 7,27 mmol H₂.L⁻¹ e Rm de 0,96 mmol H₂.h⁻¹. Provavelmente, ocorreu favorecimento da biodegradação deste substrato após hidrotermólise, entretanto, com aumento do tempo necessário de adaptação da biomassa antes do início da obtenção de H₂, provavelmente em função da produção de inibidores após o rompimento das fibras do resíduo sólido de citros (QUÉMÉNEUR et al., 2012; CALABRÒ et al., 2016).

Soares et al. (2017) obtiveram resultados positivos para obtenção de H₂ (17,7 mmol H₂.L⁻¹) a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado via hidrotermólise em ensaios em batelada e em condições termofílicas (60 °C). Os autores conduziram o pré-tratamento a

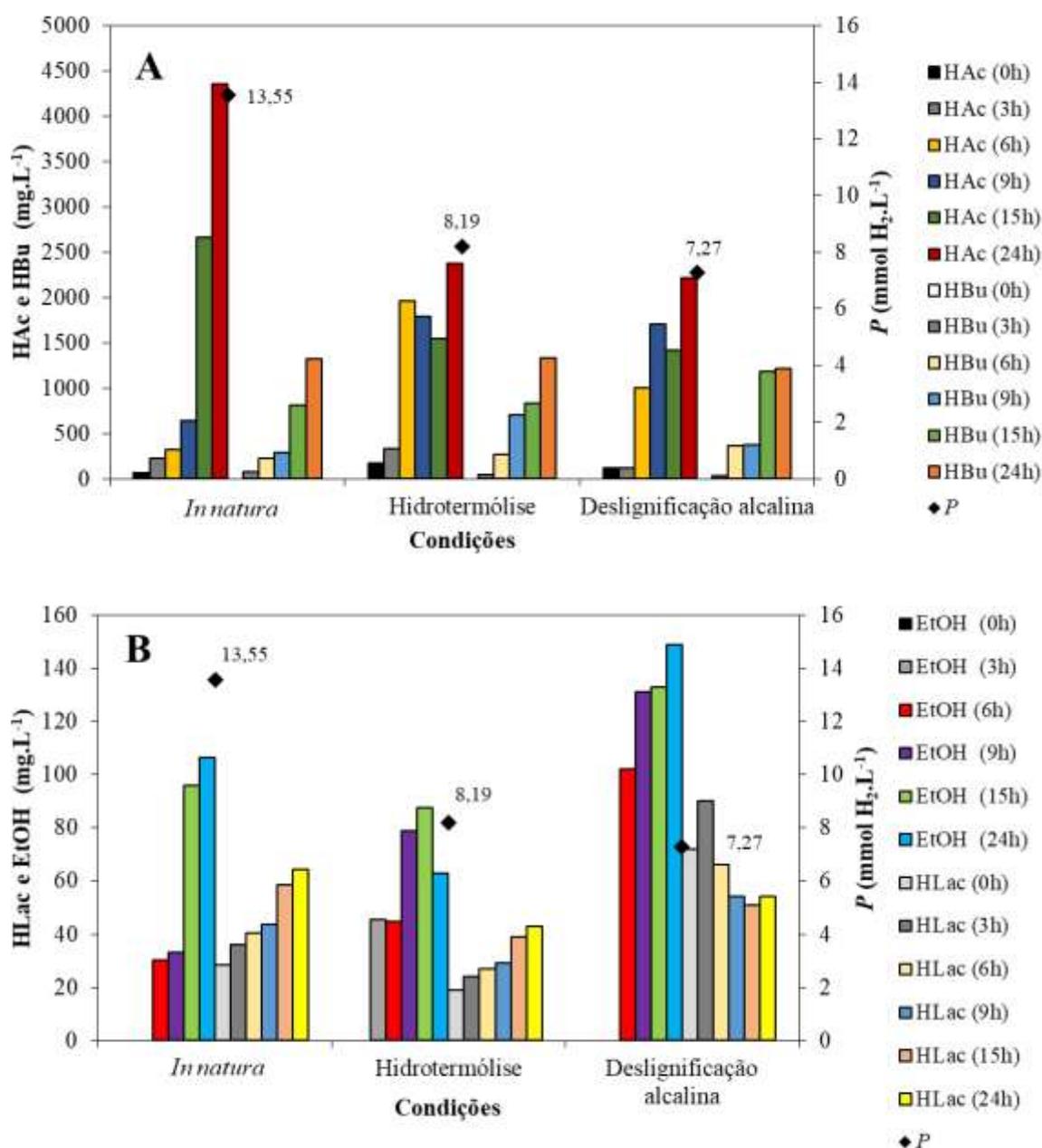
200 °C e 16 bar por 10 minutos, em severidade de 3,94, relativamente próxima a aplicada no presente estudo (3,53).

A maior severidade utilizada por Soares et al. (2017) pode ter contribuído para o rompimento das fibras do bagaço de cana-de-açúcar, aumentando sua biodegradabilidade, o que justifica a maior obtenção de H₂ (17,7 mmol H₂.L⁻¹) quando comparado ao presente estudo (8,19 mmol H₂.L⁻¹). De acordo com Ahmad et al. (2018), o aumento da severidade pode levar ao acúmulo de inibidores, como furfural e compostos fenólicos, tendo como consequência o aumento do tempo de adaptação da biomassa ao substrato (JACQUET et al., 2011; QUÉMÉNEUR et al., 2012; MONLAU et al., 2014).

Menor *P* (7,27 mmol H₂.L⁻¹) foi obtido para resíduo pré-tratado por deslignificação alcalina. He et al. (2008) obtiveram aumento de até 64% da obtenção de biogás a partir de palha de arroz pré-tratada com NaOH (6%) como substrato, além de remoção de 28,4% de lignina, 36,8% de hemicelulose e 16,4% da celulose deste substrato. Chandra et al. (2012) compararam os efeitos da deslignificação alcalina conciliada à hidrotermólise a partir de palha de arroz em temperatura mesofílica (37 °C) na obtenção de metano. Os autores obtiveram 3,8 e 2,1 mmol CH₄.L⁻¹ para os ensaios contendo o resíduo após deslignificação alcalina e hidrotermólise, respectivamente, comparados a 1,75 mmol CH₄.L⁻¹ para o resíduo *in natura*.

Além dos parâmetros relacionados à obtenção de H₂, verificou-se a produção de AOV e álcoois ao longo do período de incubação dos ensaios em batelada. A via acetogênica foi predominante, uma vez que o HAc foi o principal metabólito observado em resíduo sólido de citros *in natura* (4.355 mg.L⁻¹), pré-tratado por hidrotermólise (2.375 mg.L⁻¹) e deslignificação alcalina (2.210 mg.L⁻¹) (Figura 5.11). HBU foi observado em todos os ensaios, sendo de 1.317 mg.L⁻¹ resíduo de citros *in natura*, 1.329 mg.L⁻¹ (hidrotermólise) e 1.219 mg.L⁻¹ (deslignificação alcalina).

Figura 5.11. Ácidos orgânicos e etanol dos ensaios de diferentes pré-tratamentos. (A) ácido acético (HAc) e ácido butírico (HBu); (B) ácido láctico (HLac) e etanol (EtOH).



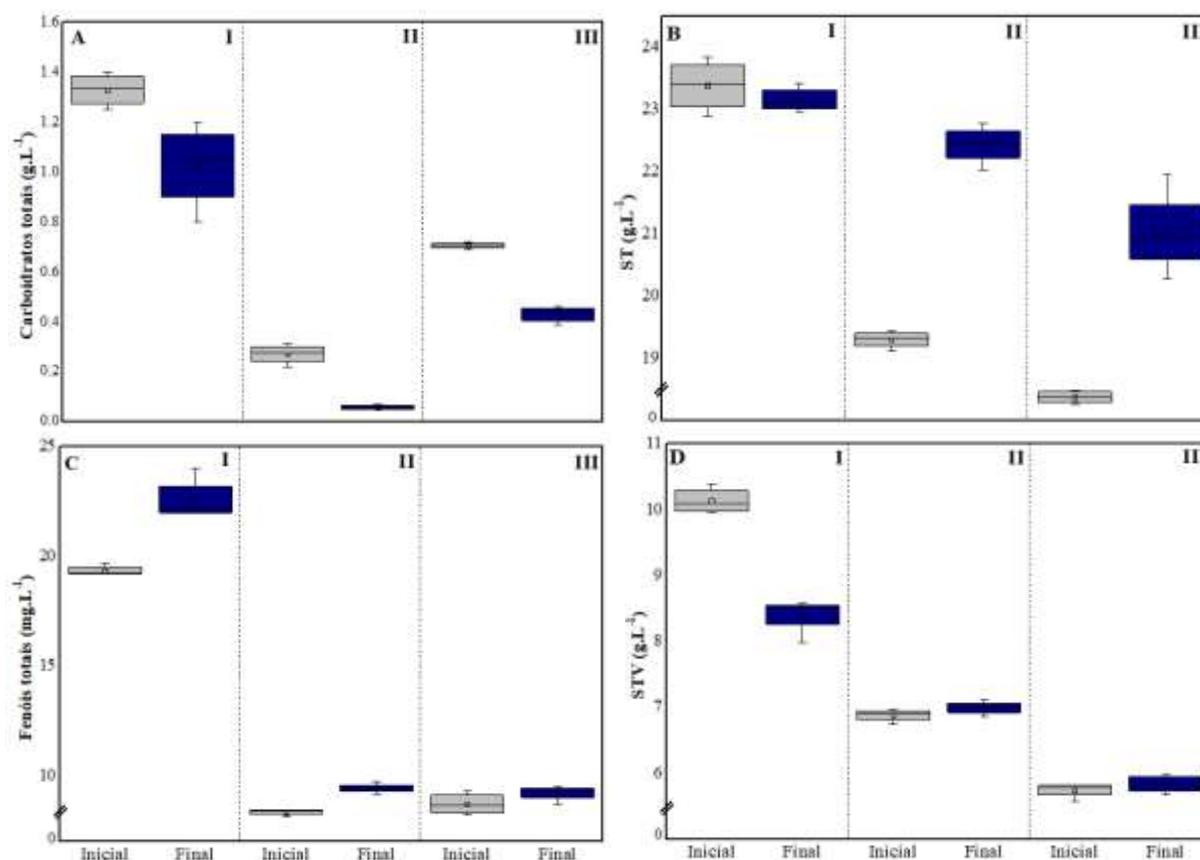
A partir da Figura 5.12, nota-se que houve consumo de carboidratos e acúmulo de fenóis significativas ($p \leq 0,05$) em todas as condições avaliadas (resíduo sólido de citros *in natura* ou pré-tratado). O maior consumo de carboidratos foi observado ao final do período de incubação do ensaio contendo resíduo de citros pré-tratado por deslignificação alcalina, de $0,26 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ ao final da incubação (24 h).

Em todos os ensaios houve acúmulo de fenóis, sendo que no ensaio contendo resíduo sólido de citros *in natura* verificou-se aumento da concentração de fenóis de 19,5

para 23 mg.L^{-1} , enquanto nos demais ensaios o aumento foi de 8,4 para $9,8 \text{ mg.L}^{-1}$ após deslignificação alcalina e de 8,9 para $9,5 \text{ mg.L}^{-1}$ após hidrotermólise. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Ahmad et al. (2020), os quais indicam que o acúmulo de fenóis pode causar alterações no fluxo de troca de elétrons, causando o acúmulo de HAc, bem como a inibição da metanogênese. Na presente pesquisa, maiores concentrações de H_2 ($13,55 \text{ mmol H}_2.\text{L}^{-1}$) e HAc ($4.355 \text{ mg HAc.L}^{-1}$) foram relacionadas à condição de maior acúmulo de fenóis, no ensaio contendo resíduo *in natura*, provavelmente devido a maior biodegradação da biomassa lignocelulósica neste ensaio. De acordo com Monlau et al. (2014), o aumento na concentração de compostos fenólicos pode estar relacionado à biodegradação da lignina.

Quanto a concentração de ST e STV, tanto nos ensaios contendo resíduo sólidos de citros *in natura*, quanto nos ensaios contendo resíduo sólido de citros pré-tratado (hidrotermólise e deslignificação alcalina) a variação não foi significativa ($p \geq 0,05$).

Figura 5.12. Parâmetros físico-químicos dos ensaios de comparação entre (I) resíduo sólido de citros *in natura*, (II) após deslignificação alcalina e (III) após hidrotérmólise. (A) carboidratos totais, (B) ST, (C) fenóis totais e (D) STV.



5.3.3 Análise da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade microbiana (Domínio Bacteria) envolvida na digestão anaeróbia dos resíduos sólidos de citros (*in natura* e pré-tratados) foi verificada por meio do DGGE. A análise foi realizada nas amostras dos inóculos utilizados (inóculo autóctone e inóculo alóctone), bem como da biomassa dos reatores em batelada ao final do período de incubação (Figura 5.13).

Figura 5.13. Dendrograma do coeficiente de similaridade (Correlação Pearson) a partir do perfil de bandas do DGGE para o Domínio Bacteria.

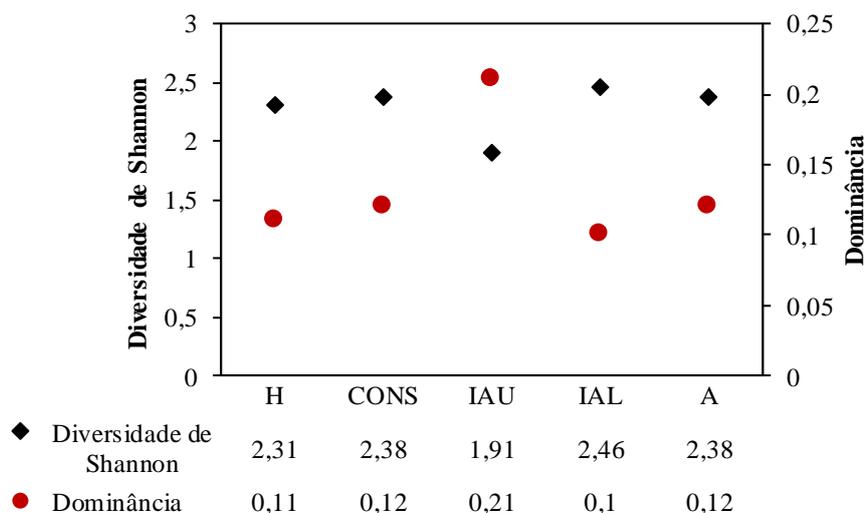


A similaridade entre as bandas das amostras de resíduo sólido de citros *in natura* e após hidrotermólise foi de 90%. No entanto, a concentração de H_2 foi maior no ensaio contendo resíduo sólido de citros *in natura* ($P= 13,31 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$) em relação ao resíduo sólido de citros após hidrotermólise ($P= 8,19 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$), bem como a produção de HAc, de 4.355 mg.L^{-1} e 2.375 mg.L^{-1} , respectivamente.

A menor similaridade observada foi entre as populações do inóculo alóctone e as demais amostras (50%). Provavelmente, ocorreu seleção das populações de bactérias após o processo fermentativo em todos os ensaios. Em relação ao inóculo autóctone, a similaridade observada quando comparado ao resíduo sólido de citros *in natura* foi de aproximadamente 80%, o que pode indicar que as populações celulolíticas do próprio resíduo foram favorecidas neste ensaio.

As amostras foram comparadas a partir dos índices da diversidade de Shannon-Wiener e Dominância (Figura 5.14), sendo observado maior diversidade para o inóculo alóctone (2,46), em relação as condições do resíduo sólido de citros *in natura* (2,38) e pré-tratado (2,31 e 2,38 para hidrotermólise e deslignificação alcalina, respectivamente) e também quando comparada ao inóculo autóctone (1,91).

Em relação à dominância, verificou-se menor valor para o inóculo alóctone (0,10), quando comparado ao resíduo sólido de citros *in natura* (0,12) e pré-tratado (0,11 e 0,12 para hidrotermólise e deslignificação alcalina, respectivamente). A maior dominância foi observada para o inóculo autóctone (0,21). Desta forma, é possível notar que a relação entre diversidade e dominância foi inversamente proporcional.

Figura 5.14. Variação dos índices de diversidade de Shannon-Wiener e Dominância para o Domínio Bacteria.

Nota: H= hidrotermólise; CONS= *in natura*; IAU= inóculo autóctone; IAL= inóculo alóctone; A= designificação alcalina.

Na análise de *metabarcoding* das amostras do resíduo sólido de citros *in natura* e pré-tratado por hidrotermólise, foi possível avaliar a composição da comunidade microbiana envolvida na biodegradação destes resíduos. Ao todo, foram obtidas 274.549 sequências de genes do RNAr 16S com tamanho médio de 456 pb, sendo 133.445 sequências para a amostra do ensaio com resíduo sólido de citros *in natura* e 141.104 sequências para o ensaio com resíduo sólido de citros após hidrotermólise.

As Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) obtidas foram agrupadas considerando similaridade superior a 97% e, após a remoção de *singletons*, obtiveram-se 217 OTU para a amostra do ensaio contendo resíduo sólido de citros *in natura* e 225 OTU para o resíduo sólido de citros após hidrotermólise. Além disso, foram calculados os índices de diversidade ecológica para cada amostra (Tabela 5.6).

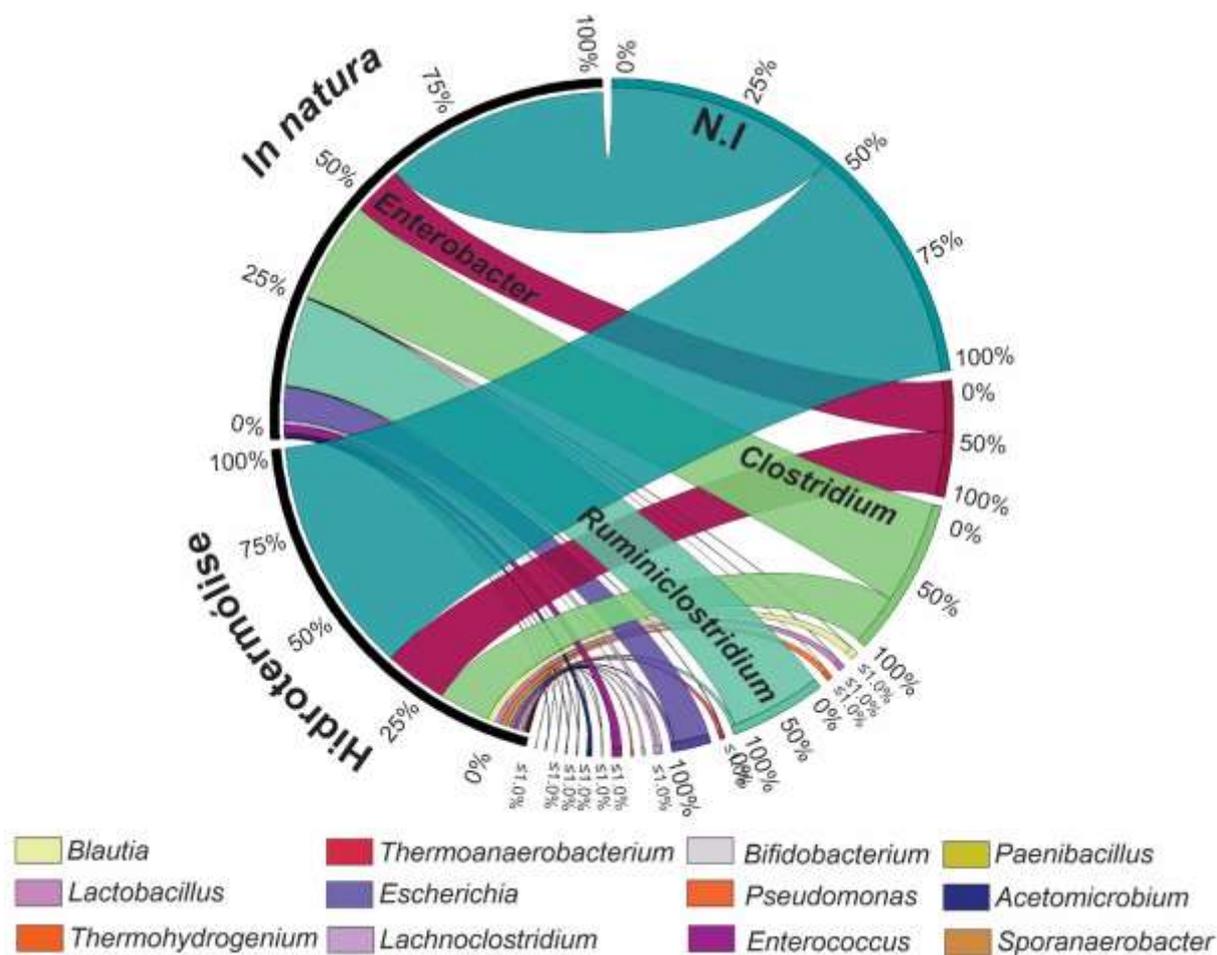
Tabela 5.6. Índices ecológicos das sequências obtidas a partir do sequenciamento massivo do gene RNAr 16S via Plataforma *Illumina* HiSeq para amostra (1) ensaio com resíduo *in natura* e (2) ensaio após hidrotermólise.

	<i>In natura</i>	Hidrotermólise
Parâmetros sequenciamento (RNAr 16S)		
Cobertura (%)	99,9	99,9
Numero total de sequências	133.445	141.104
Total de OTUs	217	225
Índices ecológicos		
Diversidade de Shannon-Wiener	3,21	3,03
Dominância	0,08	0,10
Índice de riqueza (Chao-1)	228,5	242,5

A maior parte das populações microbianas foram acessadas e boa cobertura das amostras analisadas ($\geq 99\%$). A partir da estimativa dos índices ecológicos, foi possível notar redução da diversidade bacteriana após os pré-tratamentos do resíduo sólido de citros, de 3,21 para a amostra de resíduo sólido de citros *in natura* para 3,03 após hidrotermólise.

É possível inferir que os microrganismos do filo Firmicutes, especialmente semelhantes a *Clostridium*, possuem afinidade com o resíduo sólido de citros (*in natura* e pré-tratado), uma vez que no presente estudo foi observada maior abundância relativa deste grupo. A composição da comunidade bacteriana para os filós e gêneros mais abundantes ($\geq 0,01\%$) pode ser visualizada na Figura 5.15.

Figura 5.15. Ideograma circular “Circos”. Gêneros microbianos identificados nos resíduos *in natura* e após hidrotermólise. O círculo externo representa a abundância relativa em função do número de leituras. N.I.= não identificado.



Verificou-se que os filos mais abundantes para resíduo de citros *in natura* e após hidrotermólise foram Firmicutes (77,2 e 58,9%, respectivamente) e Proteobacteria (17,40 e 40,2%, respectivamente). Representantes pertencentes a Firmicutes são conhecidos especialmente por suas relações sintróficas em reatores anaeróbios, bem com à produção e degradação de ampla diversidade de AOV (VOS et al., 2009). Em relação à composição microbiana do inóculo alóctone, Soares et al. (2017) observaram abundância relativa de 78,24% para o filo Firmicutes e 21,53% para o filo Synergistetes em reatores contendo bagaço de cana-de-açúcar, sendo que os principais gêneros identificados foram *Coprothermobacter* (41,73%), *Anaerobaculum* (21,51%), *Clostridium* (6,42%), *Symbiobacterium* (6,20%) e *Thermoanaerobacterium* (1,61%).

Bactérias semelhantes a *Clostridium* (Firmicutes) foram identificadas em ambas as amostras analisadas, com 19,0% de abundância relativa para o ensaio contendo resíduo

sólido de citros *in natura* e 12,2% após hidrotermólise. São bacilos Gram-positivos, possuem metabolismo diverso, produzem AOV e álcoois (HBu, HAc, HFor, HLac e HSuc e EtOH) a partir de carboidratos, peptonas e outros compostos orgânicos (VOS et al., 2009; GHIMIRE et al., 2015).

A faixa ótima de crescimento de *Clostridium* é entre 30-37 °C e pH 6,5-7,0 (VOS et al., 2009), o que condiz tanto com a temperatura (30 °C) e pH (7,0) utilizados nesta pesquisa, quanto aos principais metabólitos (HAc e HBu) observados ao final da fermentação nos ensaios contendo resíduo *in natura* e pré-tratado por hidrotermólise.

Resultados similares foram obtidos por Rabelo et al. (2018), que identificaram diversas espécies da ordem Clostridiales em reatores anaeróbios aplicados à obtenção de H₂ a partir de resíduo lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar), como *C. bifermentans* (atual *Paraclostridium bifermentans*), *C. cellobioparum* (atual *Ruminiclostridium cellobioparum*), *C. cellulolyticum* (atual *Ruminiclostridium cellulolyticum*) e *C. sartagoforme*, sendo o principal metabólito observado foi o HAc, compreendendo 60% do total de ácidos orgânicos produzidos.

De acordo com Vos et al. (2009), a maior parte das espécies de *Clostridium* são capazes de hidrolisar a pectina, um dos principais componentes do resíduo sólido de citros, o que justifica a elevada abundância relativa deste grupo no substrato utilizado na presente pesquisa. Os autores afirmam que a biotina é a única vitamina requerida por *Clostridium*, sendo que produtos derivados de leveduras são ricos em biotina, como o extrato de levedura que compõe o meio PCS utilizado nesta pesquisa, favorecendo o crescimento de *Clostridium*.

Ruminiclostridium foi o segundo gênero identificado mais abundante, todavia, houve redução de sua abundância relativa, de 16,6% no ensaio contendo resíduo de citros *in natura*, para 1,0% no ensaio contendo resíduo de citros após hidrotermólise. Da mesma forma, foi possível notar redução da abundância relativa de *Paraclostridium* (0,70 para 0,01%), *Trichococcus* (0,15 para $\leq 0,01\%$) e *Clostridioides* (0,28 para 0,01%) no ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotermólise.

Ruminiclostridium é comum em rúmen e em resíduos lignocelulósicos, sendo de grande interesse para a biodegradação desta biomassa (KEGGI; DORAN-PETERSON, 2019). Os organismos deste gênero, anteriormente classificados em *Clostridium*, possuem diversas características morfológicas e metabólicas comuns a *Clostridium*.

Diversas espécies de *Ruminiclostridium* hidrolisam pectina (VOS et al., 2009) e celulose, com produção de AOV (HAc e HLac) e álcoois (EtOH) (RAVACHOL et al., 2015; DUMITRACHE et al., 2016). Uma vez que a aplicação da hidrotermólise causa o rompimento das fibras e hidrólise dos polissacarídeos, como a pectina, é possível inferir que este gênero foi identificado em maior abundância no ensaio contendo resíduo sólido de citros *in natura* devido à maior disponibilidade de carboidratos totais (6,3 g.kg⁻¹) em relação ao resíduo sólido de citros após hidrotermólise (4,9 g.kg⁻¹).

Houve redução da abundância relativa de *Acetomicrobium* (filo Bacteroidetes), de 0,71% no resíduo de citros *in natura*, para 0,16% no resíduo de citros após hidrotermólise. *Acetomicrobium* são bactérias Gram-negativas, com faixa de crescimento ótima em pH 6,2-8,0 e temperaturas termofílicas (58-73 °C). Espécies deste gênero fermentam glicose em ácido acético, láctico, EtOH, CO₂ e H₂ (KRIEG et al., 2010). Desta forma, é possível inferir que este gênero contribuiu, tanto para a hidrólise do substrato, quanto para a maior concentração de H₂ no ensaio contendo resíduo *in natura* ($P=13,31$ mmol H₂.L⁻¹) em relação ao resíduo após hidrotermólise ($P= 8,19$ mmol H₂.L⁻¹).

De acordo com Kozianowski et al. (1997), *Acetomicrobium* não são capazes de assimilar substratos complexos, como pectinas, sendo possível inferir que os organismos deste gênero identificados nas amostras dos reatores em batelada são oriundos do inóculo alóctone utilizado (lodo de reator UASB), pois são comumente isoladas de lodos de tratamento de esgoto sanitário (KRIEG et al., 2010).

Os gêneros mais abundantes de Proteobacteria na amostra do ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotermólise foram *Pseudomonas* e *Enterobacter*. De acordo com Heerden et al. (2002), bactérias semelhantes a *Pseudomonas* e *Enterobacter* são comuns em resíduo sólido de citros. Zhong et al. (2011), reportaram a degradação de celulose, hemicelulose e lignina por *Pseudomonas*, além de grupos bifênica (Bugg et al., 2011) e pectinas (GEETHA et al., 2012).

Em relação a *Pseudomonas*, houve aumento da abundância relativa de $\leq 0,01$ para 0,40%, respectivamente, nos ensaios contendo resíduo sólido de citros *in natura* e pré-tratados por hidrotermólise. Apesar de *Pseudomonas* ser comum em resíduos de citros, Bakkali et al. (2008) apontam que concentrações de limoneno superiores a 0,2 mg.kg⁻¹ podem ser tóxicas a organismos deste gênero. Sendo assim, é possível supor que o resíduo sólido de citros após hidrotermólise foi mais favorável a estas bactérias, uma vez que seu

teor de limoneno foi inferior ao observado para o resíduo sólido de citros *in natura* (14,7 e 2,4 g.kg, respectivamente).

Enterobacter foi um dos gêneros com maior abundância relativa identificados na amostra de resíduo sólido de citros após hidrotermólise (15,74% e 9,32% no resíduo sólido de citros *in natura*). Organismos deste gênero são comumente identificados em amostras de água, solo, lodos de esgoto e também vegetais e frutas, e são capazes de fermentar carboidratos à AOV e gás, na estequiometria de $2\text{CO}_2:1\text{H}_2$ (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005; MAINTINGUER et al., 2017). Desta forma, é possível inferir que a presença deste gênero e ambas as amostras analisadas contribuiu para a obtenção de H_2 a partir dos resíduos sólidos de citros.

Park et al. (2003) isolaram uma cepa de *Enterobacter agglomerans* de citros (*Citrus junos*) e observaram seu potencial de crescimento em meio de cultura contendo limoneno como única fonte de carbono, na faixa entre 0-5%. Os autores concluíram que o aumento da concentração de limoneno foi diretamente proporcional ao efeito inibitório deste composto. Sendo assim, entende-se que o resíduo de citros após hidrotermólise foi menos tóxico aos organismos deste gênero, devido ao seu menor teor de limoneno ($2,4 \text{ g.kg}^{-1}$) em comparação do resíduo de citros *in natura* ($14,7 \text{ g.kg}^{-1}$).

Apesar de menos abundantes, foi possível observar aumento da abundância relativa de outros gêneros identificados no ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotermólise, como *Thermoanaerobacterium* (0,13 para 0,28%). A identificação de organismos deste gênero em reatores fermentativos vem sendo relacionada, tanto às temperaturas termofílicas, quanto à degradação de compostos lignocelulósicos, como espiga de milho e palha de trigo (CAO et al., 2014).

Apesar de comuns, tanto em resíduos lignocelulósicos, quanto em lodo de esgoto anaeróbio, o baixo percentual observado para *Thermoanaerobacterium* pode estar relacionado à sua temperatura ótima de crescimento ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) (KANOKSILAPATHAM et al., 2015), uma vez que no presente estudo aplicou-se a faixa mesofílica ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), provavelmente desfavorável ao estabelecimento de organismos deste gênero nos ensaios realizados.

Vale ressaltar que, tanto o resíduo sólido de citros *in natura*, quanto os pré-tratados utilizados nos ensaios em batelada possuem teor de limoneno na faixa de inibição indicada para este composto, de aproximadamente $0,2 \text{ g.kg}^{-1}$ (POURBAFRANI et al., 2010;

CALABRÒ et al., 2016; RUIZ; FLOTATS, 2016). A concentração de limoneno pode ser considerada como um dos causadores de pressão seletiva nas populações microbianas em reatores contendo resíduo sólido de citros, além de favorecer a acidogênese e o consequente acúmulo de AOV, acarretando na inibição da atividade metanogênica (BICAS; PASTORE, 2007).

Uma vez que se observou nos ensaios contendo resíduo sólido de citros *in natura* maior teor de carboidratos totais (solúveis), fenóis totais e limoneno, é possível inferir que os gêneros com maior abundância relativa no ensaio contendo resíduo sólido de citros após hidrotérmólise, podem ser menos resistentes a este óleo essencial e aos compostos fenólicos (CHAPLEUR et al., 2016), devido às menores concentrações neste substrato (2,4 g de limoneno.kg⁻¹) quando comparado ao resíduo sólido de citros *in natura* (14,7 g de limoneno.kg⁻¹).

A redução da abundância relativa de *Clostridium*, *Anaerobacterium* e *Ruminiclostridium*, no ensaio contendo resíduo sólido de citros pré-tratado pode ter contribuído para a menor obtenção de H₂ e AOV a partir deste resíduo (Figura 5.16), uma vez que todos os gêneros citados são conhecidamente produtores de HAc e H₂ e, ainda, produtores de H₂ em processos anaeróbios (VOS et al., 2009; KRIEG et al., 2010; KANOKSILAPATHAM et al., 2015; RABELO et al., 2018b).

Os gêneros *Lactococcus*, *Caldicoprobacter*, *Bacillus*, *Thermacetogenium*, *Desulfotomaculum*, *Syntrophothermus*, *Fusobacterium*, *Thermobrachium*, *Tepidanaerobacter*, *Soehngenia*, *Oscillibacter*, *Dialister*, *Desulfotomaculum* e *Tepidimicrobium* foram identificados com abundância relativa menor do que 0,1% em ambos os ensaios. Entretanto, estes gêneros podem ter contribuído para a obtenção de H₂ e AOV, como destacado por Benomar et al. (2015), que indicam a importância dos grupos menos abundantes em consórcios, ocasionando aumento significativo na obtenção de H₂, não apenas devido à sintrofia mas, devido à interação célula-célula e à troca de metabólitos.

Em relação ao Domínio Archaea foram identificados microrganismos pertencentes apenas ao filo Euryarchaeota, com abundância relativa de 1,21% no ensaio contendo resíduo *in natura*, e 0,03% no ensaio contendo resíduo após hidrotérmólise. A menor abundância relativa no resíduo pré-tratado pode indicar que esta biomassa pré-tratada pode ter sido desfavorável a estes microrganismos.

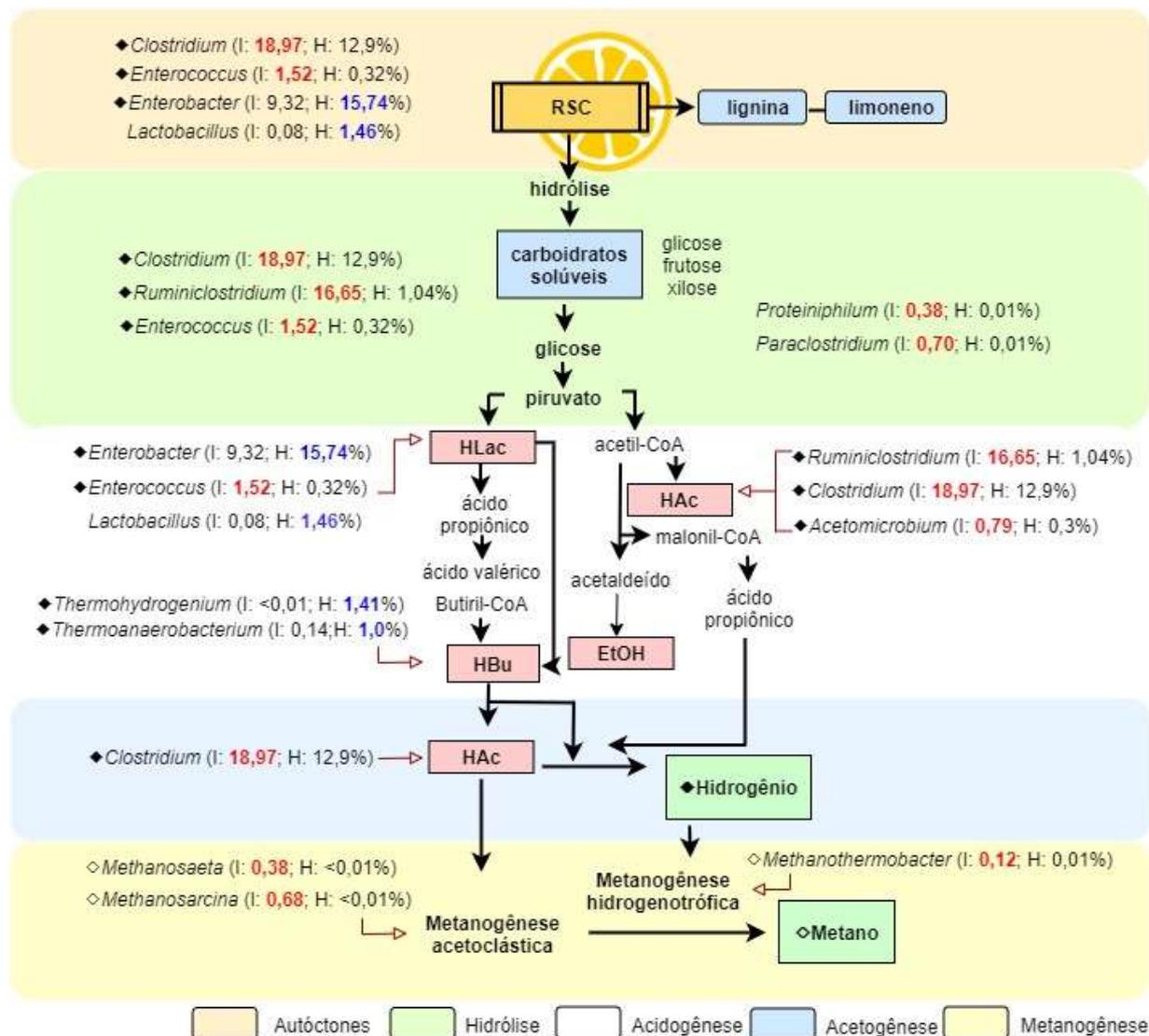
Os principais gêneros de arqueias identificados foram *Methanosarcina*, *Methanothermobacter* (0,68 e ≤0,01%), *Methanoculleus* (0,12 e 0,01%) e *Methanosaeta*

(0,38 e $\leq 0,01\%$), para os ensaios contendo resíduo de citros *in natura* e pré-tratado via hidrotermólise, respectivamente.

Todos os gêneros mencionados são capazes de produzir metano, entretanto, *Methanothermobacter* e *Methanosarcina* são capazes de produzir este biogás a partir, tanto do metabolismo acetoclástico, quanto hidrogenotrófico, enquanto *Methanosaeta* apresenta metabolismo estritamente acetoclástico. Além disso, *Methanosaeta* e *Methanosarcina* vem sendo relacionada à formação inicial de grânulos em reatores anaeróbios (SCHMIDT; AHRING, 1996). Vale ressaltar que não houve produção detectável de metano nos ensaios contendo resíduos de citros *in natura* ou pré-tratados.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa considerou-se que os resíduos sólidos de citros *in natura* moídos foram mais favoráveis à obtenção de H₂ em relação àqueles pré-tratados via hidrotermólise ou deslignificação alcalina. Desta forma, utilizou-se resíduos sem pré-tratamento nas etapas subsequentes, junto ao inóculo autóctone e alóctone previamente estabelecidos nos itens 5.2.1 e 5.2.2, respectivamente.

Figura 5.16. Rotas de conversão do resíduo sólido de citros (RSC) a carboidratos, AOV, H₂ e CH₄ e abundância relativa dos gêneros envolvidos nas diferentes etapas da digestão anaeróbia, sendo I= resíduo sólido de citros *in natura* e H= resíduo sólido de citros após hidrotérmólise. HAC= Ácido acético; HBU= Ácido butírico; HLac= Ácido láctico; EtOH= etanol. (♦) Produtores de H₂; (◇) Produtores de CH₄.



Fonte: Elaboração própria.

5.4 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS VIA PLACKETT & BURMAN

Os ensaios de *screening design* para seleção das variáveis operacionais mais significativas para obtenção de H₂ foram realizados por meio do método de Plackett & Burman (P&B), utilizando o inóculo autóctone, inóculo alóctone (lodo UASB termofílico/vinhaça) e resíduo de citros *in natura*, conforme estabelecido nos ensaios preliminares descritos nos itens 5.2.1, 5.2.2 e 5.3.2, respectivamente. As variáveis analisadas foram pH (5,5, 7,0 e 8,5), temperatura (30, 37 e 44 °C), concentração de inóculo alóctone (1, 2 e 3 gSTV.L⁻¹) e de substrato (5, 10 e 15 g.L⁻¹), volume do *headspace* (40, 50

e 60%) e concentrações de componentes do meio de cultura, sendo extrato de levedura (0, 0,5 e 1 g.L⁻¹), CaCO₃ (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹), NaCl (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹) e peptona (0, 2,5 e 5 g.L⁻¹).

Após a realização dos ensaios preditos pela matriz de Plackett & Burman e cálculo dos parâmetros do modelo de Gompertz modificado (P , Rm e λ) (Tabela 5.7), obtiveram-se as curvas de concentração de hidrogênio (Figura 5.17) para cada condição. A significância de cada uma das respostas foi avaliada para o intervalo de confiança de 90%, como recomendado em Rodrigues & Iemma (2014), por meio da comparação dos efeitos e do p-valor (Tabela 5.8) e diagrama de Pareto (Figura 5.18).

Foram obtidos P entre 13,29 e 0,03 mmol H₂.L⁻¹, Rm entre 3,10 e 0,01 mmol H₂ h⁻¹ e λ entre 3,33 e 20,91 h. Em R5, maior P (13,55 mmol H₂.L⁻¹) foi obtido nas condições de 30 °C, pH 8,5, 2,25 gSTV.L⁻¹ de inóculo autóctone, 3 gSTV.L⁻¹ de inóculo alóctone, 15 g.L⁻¹ de resíduo sólido de citros, 40% de *headspace*, 5 g.L⁻¹ de NaCl e sem suplementação de extrato de levedura, carbonato de cálcio (CaCO₃) e peptona.

A curvatura dos resultados não foi significativa para as respostas P e Rm , o que indica que os pontos centrais estabelecidos estão entre os valores intermediários entre os pontos -1 e +1 adotados, ou seja, os dados obtidos foram ajustados ao modelo de 1ª ordem/linear, não havendo curvatura (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Para a resposta do tempo de início da obtenção de H₂ (λ), foi observado efeito positivo para curvatura, indicando que a resposta não se encaixa no modelo de 1ª ordem. Além disso, no ensaio R1 (44 °C, pH 5,5, inóculo 1 gSTV.L⁻¹, substrato 15 g.L⁻¹, *headspace* 40%, CaCO₃ 5 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹) não se observou obtenção de H₂ ao longo do período de incubação.

Figura 5.17. Concentração acumulada de H₂ dos ensaios de *screening design* para seleção de variáveis significativas por meio da matriz de Plackett & Burman.

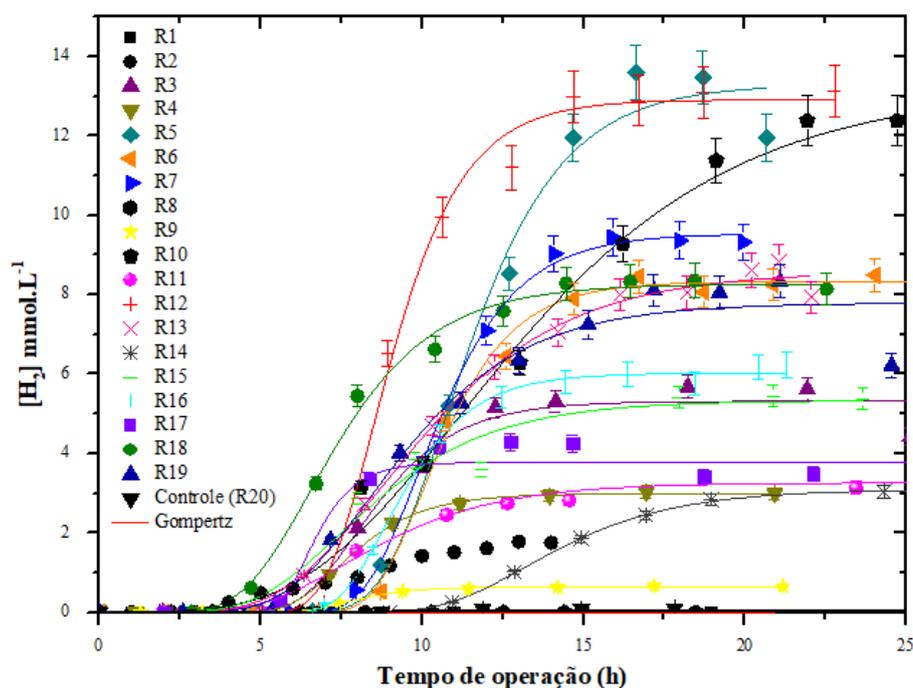


Tabela 5.7. Matriz de Plackett & Burman codificada para o *screening design* com 16 condições experimentais e três repetições do ponto central (x_1 - x_{10}) e respostas obtidas para os ensaios cinéticos em batelada (Y_1 - Y_4).

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	R^2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
R1	+1	-1	-1	-1	1	-1	-1	+1	+1	-1	-	-	-	-	0
R2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,99	2,07	0,21	3,33	203
R3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0,97	5,32	1,14	6,21	0
R4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	1,00	2,99	0,76	5,89	0
R5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,99	13,29	2,46	8,73	1.340
R6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,99	8,33	2,00	8,49	113
R7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	0,99	9,53	2,09	8,20	1.118
R8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0,99	0,03	0,01	20,91	0
R9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,99	0,65	0,20	6,34	93
R10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0,99	13,23	1,02	6,31	940
R11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0,97	3,26	0,46	4,97	140
R12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	0,99	12,91	3,10	6,98	1.040
R13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	0,98	8,59	1,02	5,65	540
R14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	0,99	3,09	0,45	10,66	213
R15	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,96	5,33	0,76	4,84	0
R16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,99	6,02	1,52	7,43	336
R17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,94	7,78	1,00	5,39	140
R18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,99	8,26	1,44	4,42	440
R19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,97	7,79	1,09	5,73	130

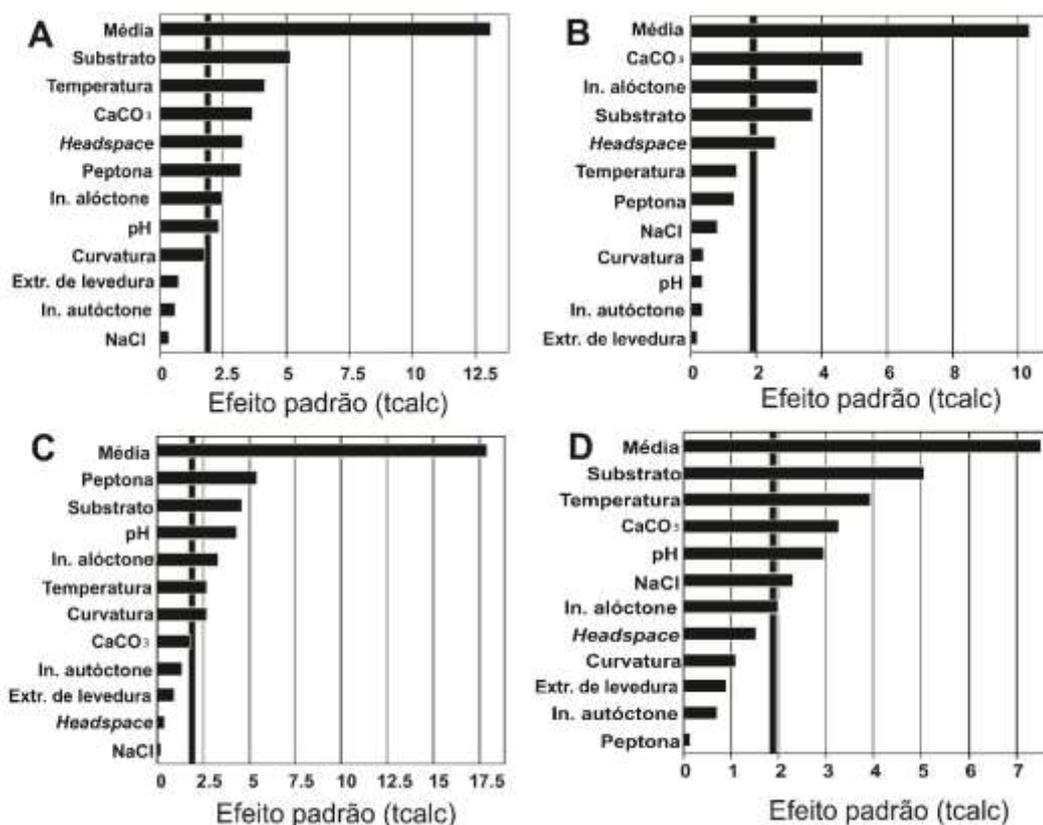
Nota: x_1 = temperatura (°C); x_2 = pH; x_3 = inóculo autóctone (gSTV.L⁻¹); x_4 = inóculo alóctone (gSTV.L⁻¹); x_5 = substrato (g.L⁻¹); x_6 = *headspace* (%); x_7 = extrato de levedura (g.L⁻¹); x_8 = CaCO₃ (g.L⁻¹); x_9 = NaCl (g.L⁻¹); x_{10} = peptona (g.L⁻¹). Y_1 = P (mmol H₂.L⁻¹), Y_2 = R_m (mmol H₂.h⁻¹), Y_3 = λ (h), Y_4 = HAc (mg.L⁻¹).

Tabela 5.8. Dados estatísticos obtidos após a realização dos ensaios para seleção de variáveis significativas para as respostas P , Rm , λ e HAc para obtenção de H_2 a partir de resíduos sólidos de citros.

Variável	Parâmetros															
	P (mmol $H_2 \cdot L^{-1}$)				Rm (mmol $H_2 \cdot h^{-1}$)				λ (h)				HAc (mg $\cdot L^{-1}$)			
	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	5,92	0,45	13,11	0,0000	1,08	0,10	10,34	0,0000	8,37	0,47	17,92	0,0000	379,75	50,51	13,11	0,0000
Curvatura	4,06	2,27	1,79	0,1173	0,20	0,52	0,39	0,7091	-6,38	2,35	-2,71	0,0300	-286,17	254,22	1,79	0,1173
Temperatura	-3,75	0,90	-4,16	0,0042	-0,30	0,21	-1,42	0,1988	2,54	0,93	2,72	0,0296	-397,25	101,02	-4,16	0,0042
pH	2,09	0,90	2,31	0,0540	0,08	0,21	0,36	0,7289	-4,08	0,93	-4,36	0,0033	299	101,02	2,31	0,0540
Consórcio celulolítico	0,56	0,90	0,61	0,5581	-0,07	0,21	-0,36	0,7289	-1,30	0,93	1,39	0,2068	-73	101,02	0,61	0,5581
Inóculo	2,24	0,90	2,48	0,0419	0,81	0,21	3,88	0,0060	-3,13	0,93	-3,35	0,0122	201,5	101,02	2,48	0,0419
Substrato	4,65	0,90	5,15	0,0013	0,78	0,21	3,73	0,0074	4,33	0,93	4,63	0,0024	513,25	101,02	5,15	0,0013
Headspace	-2,94	0,90	-3,26	0,0139	-0,54	0,21	-2,60	0,0355	0,40	0,93	0,42	0,6852	-154,5	101,02	-3,26	0,0139
Extrato de levedura	0,69	0,90	0,77	0,4681	0,04	0,21	0,20	0,8438	0,87	0,93	0,93	0,3829	91,5	101,02	0,77	0,4681
CaCO ₃	-3,31	0,90	-3,67	0,0080	-1,09	0,21	-5,26	0,0012	1,73	0,93	1,86	0,1058	-331,25	101,02	-3,67	0,0080
NaCl	0,30	0,90	0,33	0,7534	-0,17	0,21	-0,84	0,4277	-0,16	0,93	-0,17	0,8669	232,75	101,02	0,33	0,7534
Peptona	2,93	0,90	3,25	0,0141	0,28	0,21	1,33	0,2237	-5,05	0,93	-5,40	0,0010	-15,5	101,02	3,25	0,0141

Nota: (-) efeito negativo. Potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade específica máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Figura 5.18. Diagramas de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 90%. (A) P , (B) Rm , (C) λ e (D) HAc.



As variáveis X_6 e X_8 (volume do *headspace* e concentração de CaCO_3 , respectivamente) foram significativas, tanto para o parâmetro P (potencial máximo de concentração de H_2), quanto para Rm (velocidade específica máxima de obtenção de H_2), sendo seu efeito negativo, ou seja, quanto menor o volume do *headspace* e menor a concentração de CaCO_3 , maior P e Rm de H_2 .

De acordo com Liu et al. (2017), a pressão parcial de H_2 está intimamente relacionada com a obtenção de H_2 e HAc no processo de digestão anaeróbia. O volume do *headspace* está relacionado com a pressão parcial de H_2 no meio reacional, uma vez que o seu acúmulo altera o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, as reações bioquímicas catalisadas por microrganismos, reduzindo a concentração de H_2 (CAZIER et al., 2015; VILLA MONTOYA et al., 2020). Desta forma, foi possível notar que os maiores valores de P e Rm (R5, R10 e R12) foram obtidos nos reatores com menores volumes de *headspace* (40%). Wang et al. (2017) verificaram que quanto maior a porcentagem inicial de H_2 no *headspace* do reator, maior será a concentração de H_2 durante o processo fermentativo a partir de glicose. Assim como no presente estudo, Villa-Montoya et al. (2019) observaram que menores volumes de *headspace* favoreceram maior obtenção de H_2 a partir de resíduos

do processamento de café, sendo obtido $29,46 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ em reatores operados com 40% de *headspace*, mesmo volume considerado ótimo no presente estudo.

Concentração de peptona (X_{10}), pH (X_2) e concentração de inóculo (X_4) foram significativas, tanto para P , quanto para a duração do tempo de início da obtenção de H_2 , com efeito positivo para P e negativo para λ . Neste estudo, o tempo de início da obtenção de H_2 foi entre 1,02-3,10 h, para os mesmos ensaios em que houve maior P de H_2 (R5, R10 e R12). Resultados similares foram observados por Hwang et al. (2011), sendo que o tempo de início da obtenção de H_2 observado foi entre 3-4 h para reatores operados com resíduos do processamento de uva e pH inicial de 5,5.

Resultados similares foram observados por Villa-Montoya (2019), que avaliaram via delineamento de Plackett & Burman diversos fatores para a obtenção de H_2 a partir de resíduos do processamento de café. Assim como na presente pesquisa, os fatores considerados como mais significativos para obtenção de H_2 foram pH (7,0), temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), volume de *headspace* (50%) e concentração de substrato ($30 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ de água residuária e $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cascas de café). Nestas condições ótimas, os autores observaram concentração máxima de $29,46 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e $1.956 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de HAc. Semelhante ao presente estudo com resíduo sólido de citros também foi observado $13,29 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e $1.340 \text{ mg HAc}\cdot\text{L}^{-1}$, em pH (8,5), temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), volume de *headspace* (40%) e concentração de resíduo sólido de citros ($15 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$).

Cahyari et al. (2019) observaram que a faixa de temperatura termofílica ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) pode ser vantajosa em relação à mesofílica para obtenção de H_2 a partir de resíduos de alimentos, uma vez que pode reduzir compostos voláteis potencialmente tóxicos, como o limoneno. Entretanto, na presente pesquisa o aumento da temperatura (x_1) teve efeito negativo em P ($3,75 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$), o que pode justificar as menores valores nos ensaios R1 ($\leq 0,01 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e R8 ($0,03 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$), ambos em pH inicial de 5,5 e operados a $44 \text{ }^\circ\text{C}$. Nota-se ainda que os maiores valores de P foram observados nos reatores operados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, como R5 ($13,29 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e R10 ($13,23 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$).

Em temperaturas elevadas, há maior gasto de energia associada às vias catabólicas para manutenção do pH intracelular, levando a menor síntese de biomassa (SSV) (INFANTES et al., 2011; MAZARELI et al., 2019). Além disso, temperaturas elevadas podem ser associadas ao aumento na permeabilidade da membrana celular aos ácidos orgânicos, acarretando em inibição das bactérias produtoras de hidrogênio (INFANTES et

al., 2011). Nos ensaios R1 e R8, houve menor tempo de início da obtenção de H₂, provavelmente devido às maiores temperaturas do processo (44 °C), que podem favorecer a atividade da enzima Fe-hidrogenase (INFANTES et al., 2011; MAZARELI et al., 2019). Assim como na presente pesquisa, Villa-Montoya et al. (2019) observaram que a elevação da temperatura, de 30 °C para 50 °C teve efeito negativo no potencial máximo de concentração de H₂.

A resposta adotada como de maior relevância para a presente pesquisa foi o valor de *P* (potencial máximo de concentração de H₂), as variáveis escolhidas como mais relevantes para o processo foram consideradas de acordo com os resultados de significância para esta resposta. Efeito significativo e positivo foi observado para concentração de substrato (*x*₅), enquanto concentração de NaCl (*x*₉) e extrato de levedura (*x*₇) não foram significativas. Desta forma, considerou-se que as variáveis significativas mais indicadas para otimização da obtenção de H₂ a partir dos resíduos de citros foram concentração de substrato, inóculo e pH inicial do meio.

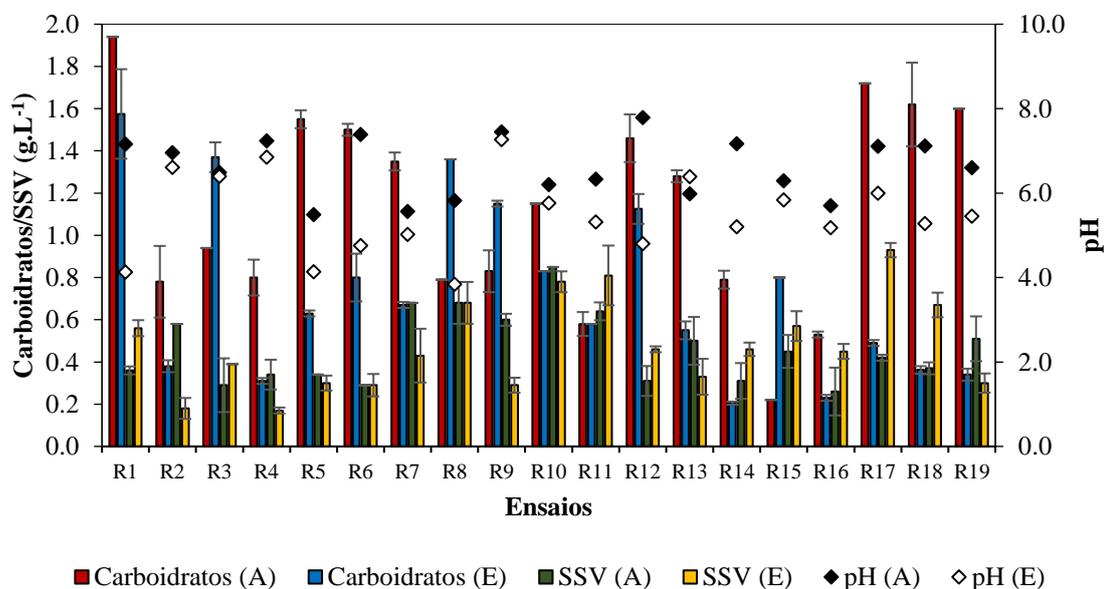
A suplementação com peptona teve efeito positivo e significativo no processo (2,93 mmol H₂.L⁻¹), provavelmente, aumentou a disponibilidade de aminoácidos e peptídeos. Em R10 e R12, ensaios em que houve suplementação de 5 g.L⁻¹ de peptona, foram obtidos 13,23 e 12,91 mmol H₂.L⁻¹, enquanto nos reatores R1 e R8, foram observadas concentrações ≤0,03 mmol H₂.L⁻¹, sem adição de peptona.

O extrato de levedura é rico em biotina, um dos principais nutrientes requeridos por bactérias semelhantes a *Clostridium* (VOS et al., 2009). Todavia, ao contrário do observado para peptona, o aumento da concentração de extrato de levedura não foi significativo (*p*=0,4681) para *P*. Entretanto, observou-se efeito positivo significativo para *Rm*, ou seja, até 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura foi favorável para ligeiro aumento de *P* (0,04 mmol H₂.h⁻¹). Nos ensaios dos pontos centrais (R17, 18 e 19), a suplementação com extrato de levedura foi de 0,5 g.L⁻¹, e o *Rm* médio de 1,17 mmol H₂.h⁻¹, enquanto em R12, observou-se maior *Rm* (3,10 mmol H₂.h⁻¹) e houve suplementação de 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Villa-Montoya et al. (2019) verificaram efeito não significativo da suplementação com extrato de levedura para a obtenção de H₂ a partir de resíduos de café, tanto para *P*, quanto para *Rm*.

A fim de estabelecer possíveis relações entre os parâmetros físico-químicos analisados (concentração de carboidratos e fenóis totais, pH inicial e SSV) (Figura 5.19),

realizou-se a Análise de Componente Principal (PCA) entre estes parâmetros e as respostas do modelo de Gompertz modificado (P , Rm e λ) (Figura 5.20).

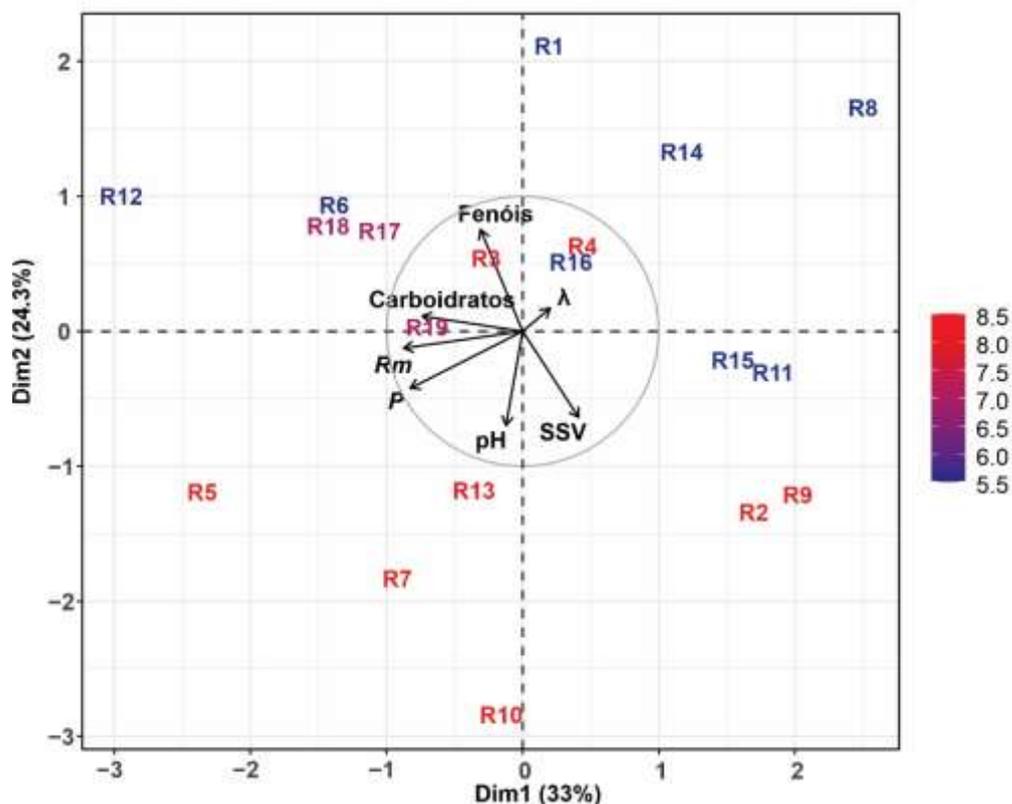
Figura 5.19. Parâmetros físico-químicos de carboidratos, SSV e pH, obtidos para os ensaios *screening design* baseado na matriz de Plackett & Burman (P&B).



Os maiores P de H_2 ocorreram nos reatores com pH inicial acima de 8,0, sendo de 13,29 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R5), 9,53 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R7), 13,23 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R10) e 8,59 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R13). Todavia, ressalta-se que em pH inicial de 5,5 (R12) também foi observado P de 12,91 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Além disso, maiores valores de Rm também foram associados a estes reatores, sendo de 2,46, 2,09, 1,02, 1,02 e 3,10 $\text{mmol H}_2\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Villa-Montoya et al. (2019) observaram maior P (29,46 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{pH} \geq 7,0$, em reatores em batelada operados com resíduos do processamento de café como substrato. Além disso, os autores observaram que o aumento do pH na faixa de 4,0 a 7,0 teve efeito positivo em P e Rm , de 22,67 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e 1,18 $\text{mmol H}_2\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Entretanto, em pH inicial de 5,5 (R8) e 60% de *headspace*, obteve-se menor P (0,03 $\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$), bem como maior tempo de início da obtenção de H_2 (20,91 h). Em R5, R10 e R12 com 40% de *headspace* e pH de 8,5 (em R5 e R10) e 5,5 (em R12) foram obtidos maiores valores de P e Rm .

Figura 5.20. Análise de Componente Principal (PCA) dos parâmetros físico-químicos iniciais (concentração de fenol e carboidratos, SSV e pH) e respostas do modelo de Gompertz (modificado) para os ensaios de *screening design*. A primeira dimensão (eixo x; 33%), está relacionada às variáveis SSV e λ , enquanto a segunda dimensão (eixo y; 24,3%) está relacionada as variáveis P , concentração de fenóis e carboidratos, R_m e pH, totalizando 57,3% da variância das análises.



Nota: A escala de cores representa o pH inicial dos diferentes ensaios. O primeiro e o segundo eixo do PCA representam 57,3% da variância total.

Os menores valores de P foram observados nos reatores com maiores valores de fenóis, como por exemplo, em R8, de $0,03 \text{ mmol H}_2\text{L}^{-1}$ para $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$ de fenóis. Em R12, com P de $12,91 \text{ mmol H}_2\text{L}^{-1}$, não foi observado acúmulo de compostos fenólicos acima do limite de quantificação de $\leq 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Além disso, para o aumento da concentração de compostos fenólicos, verificou-se efeito significativo para a variável temperatura ($p= 0,0265$), sendo que o efeito de sua elevação é positivo ($2,58 \text{ mg.L}^{-1}$ de fenóis totais), ou seja, quanto maior a temperatura de incubação maior será a geração de compostos fenólicos.

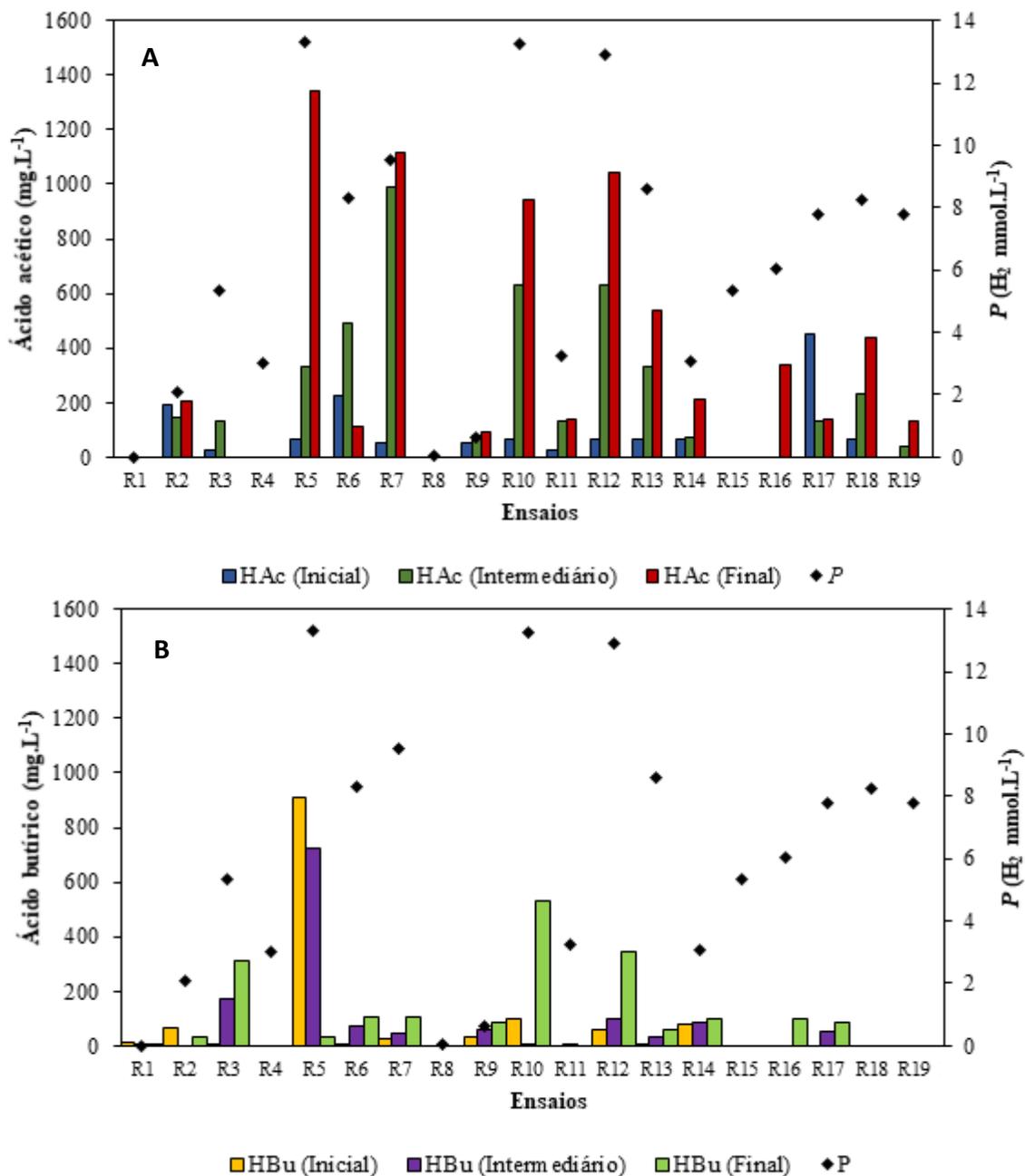
De acordo com Monlau et al. (2014), o aumento na concentração de compostos fenólicos pode estar relacionado à biodegradação da lignina. Além disso, de acordo com Sawatdeenarunat et al. (2015), temperaturas termofílicas podem favorecer a biodegradação de resíduos lignocelulósicos. Soares et al. (2017) observaram que a temperatura foi um dos

fatores mais influentes na obtenção de H₂ a partir de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado via hidrotérmólise), sendo que a concentração máxima de H₂ (17,7 mmol H₂.L⁻¹) ocorreu a 60 °C, enquanto a menor concentração de H₂ (3,5 mmol H₂.L⁻¹) foi observada a 35,8 °C.

Para as variáveis P , Rm e λ , foi possível quantificar os ácidos orgânicos e álcoois ao longo do processo fermentativo. A significância dos resultados foi avaliada para o intervalo de confiança de 90%, como recomendado em Rodrigues & Iemma (2014), por meio da comparação dos efeitos e do p-valor e Diagrama de Pareto (Figura 5.18). Entre os compostos orgânicos analisados (HAc, HBu, HPr, HLac, EtOH), apenas a produção de HAc foi significativa (Figura 5.21 A), portanto, foi considerado como resposta do *screening design* realizado, junto aos demais parâmetros de obtenção de H₂ obtidos via modelo de Gompertz (modificado).

Mesmo com resposta não significativa ($p \geq 0,1$), entre os demais compostos mencionados apenas HBu foi observado ao longo do período de incubação (Figura 5.21 B), com concentração máxima em R10 e R12 (528 e 347 mg.L⁻¹, respectivamente). Stein et al. (2017) compararam a produção de HBu em condições mesofílicas (37 °C) em pH ácido (5,5) e alcalino (9,0), e concluíram que as condições alcalinas são mais favoráveis à produção de HBu, possivelmente devido a menor solubilização do substrato. Sendo assim, é possível inferir que as condições avaliadas no presente estudo em R10 favoreceram a produção de HBu, possivelmente devido ao pH mais alcalino deste reator (8,5) em comparação ao R12 (5,5).

Figura 5.21. Concentração de HAc (A) e HBU (B) e potencial máximo de concentração de H₂ dos ensaios de delineamento de Plackett & Burman.



As variáveis significativas para produção de HAc foram as mesmas para P , R_m e λ de H₂. Foi possível observar efeito significativo ($p \leq 0,1$) para concentração de substrato, temperatura, pH e concentração de CaCO₃ em relação à produção de HAc. As variáveis relativas à concentração de inóculo, NaCl, extrato de levedura, consórcio autofermentativo, peptona e volume do *headspace* não foram consideradas significativas para produção de HAc ($p \geq 0,1$). Ainda, foi possível observar efeito positivo da concentração de substrato e pH do meio reacional, em relação ao HAc. Por outro lado, para as variáveis concentração

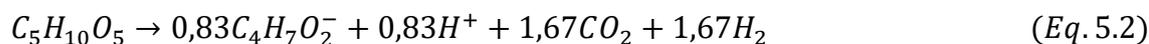
de CaCO_3 e temperatura, efeito negativo em relação ao HAc foi observado, ou seja, quanto maior a concentração de CaCO_3 e maior a temperatura de incubação, menor a concentração de HAc, possivelmente devido ao efeito tamponante do sistema reacional.

Nota-se que a menor produção de HAc foi relacionada aos ensaios de menor concentração de H_2 (R1 e R8) de $\leq 0,01$ e $0,07 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, nos ensaios com maior produção de HAc foram relacionados com o maior valor de P , sendo de $13,29 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R5), $9,53 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R7), $13,23 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R10) e $12,91 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (R12).

Em relação ao HBu foi possível notar que houve maior concentração em R10 e R12 (528 e $347 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). Em R5, foram obtidos $700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de HBu ao longo de 10 h de operação, entretanto, no final do processo (25 h de operação), esta concentração foi reduzida para apenas $31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Soares et al. (2019a) também observaram esse mesmo padrão a partir de bagaço de cana-de-açúcar em condições termofílicas ($50\text{-}70 \text{ }^\circ\text{C}$). Entretanto, na presente pesquisa nenhuma das variáveis estudadas teve efeito significativo na produção de HBu ($p \geq 0,1$).

Sabe-se que as vias metabólicas de produção de HAc e HBu estão intimamente relacionadas à obtenção de H_2 ; ou seja, a partir da glicose tem-se a formação de 4 mols (Equação 3.3) e 2 mols (Equação 3.4), respectivamente.

Além da glicose, a xilose é outro monômero abundante em resíduos sólidos de citros (WILKINS et al., 2007; CHOI et al., 2013, 2015) e a formação de H_2 é de $3,33 \text{ mol}$ via HAc (Equação 5.1) e $1,67 \text{ mol}$ via HBu (Equação 5.2) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012).



Os efeitos dos diferentes parâmetros analisados sobre as respostas físico-químicas envolvidas no processo encontram-se resumidos na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Efeito dos diferentes parâmetros na obtenção de H₂, AOV em reatores em batelada com resíduo sólido de citros.

Variáveis	Obtenção de H ₂			AOV		Parâmetros físico-químicos	
	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	HAc	HBu	Acúmulo de Fenóis	Consumo de carboidratos
x ₁ (Temperatura)	↓x ₁ ↑ <i>P</i>	NS	↑x ₁ ↑ λ	↓x ₁ ↑HAc	NS	↑x ₁ ↑ <i>phe</i>	NS
x ₂ (pH)	↑x ₂ ↑ <i>P</i>	NS	↓x ₂ ↑ λ	↑x ₂ ↑HAc	NS	NS	NS
x ₃ (Consórcio)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
x ₄ (Lodo)	↑x ₄ ↑ <i>P</i>	↑x ₄ ↑ <i>Rm</i>	↓x ₄ ↑ λ	↑x ₄ ↑HAc	NS	NS	NS
x ₅ (Substrato)	↑x ₅ ↑ <i>P</i>	↑x ₅ ↑ <i>Rm</i>	↑x ₅ ↑ λ	↑x ₅ ↑HAc	NS	NS	↑x ₅ ↑ <i>carbs</i>
x ₆ (<i>Headspace</i>)	↓x ₆ ↑ <i>P</i>	↓x ₆ ↑ <i>Rm</i>	NS	NS	NS	NS	NS
x ₇ (YE)	NS	↑x ₇ ↑ <i>Rm</i>	NS	NS	NS	NS	↓x ₇ ↑ <i>carbs</i>
x ₈ (CaCO ₃)	↓x ₈ ↑ <i>P</i>	↓x ₈ ↑ <i>Rm</i>	NS	↓x ₈ ↑HAc	NS	NS	↓x ₈ ↑ <i>carbs</i>
x ₉ (NaCl)	NS	NS	NS	↑x ₉ ↑HAc	NS	NS	NS
x ₁₀ (Peptona)	↑x ₁₀ ↑ <i>P</i>	NS	↓x ₁₀ ↑ λ	NS	NS	NS	NS

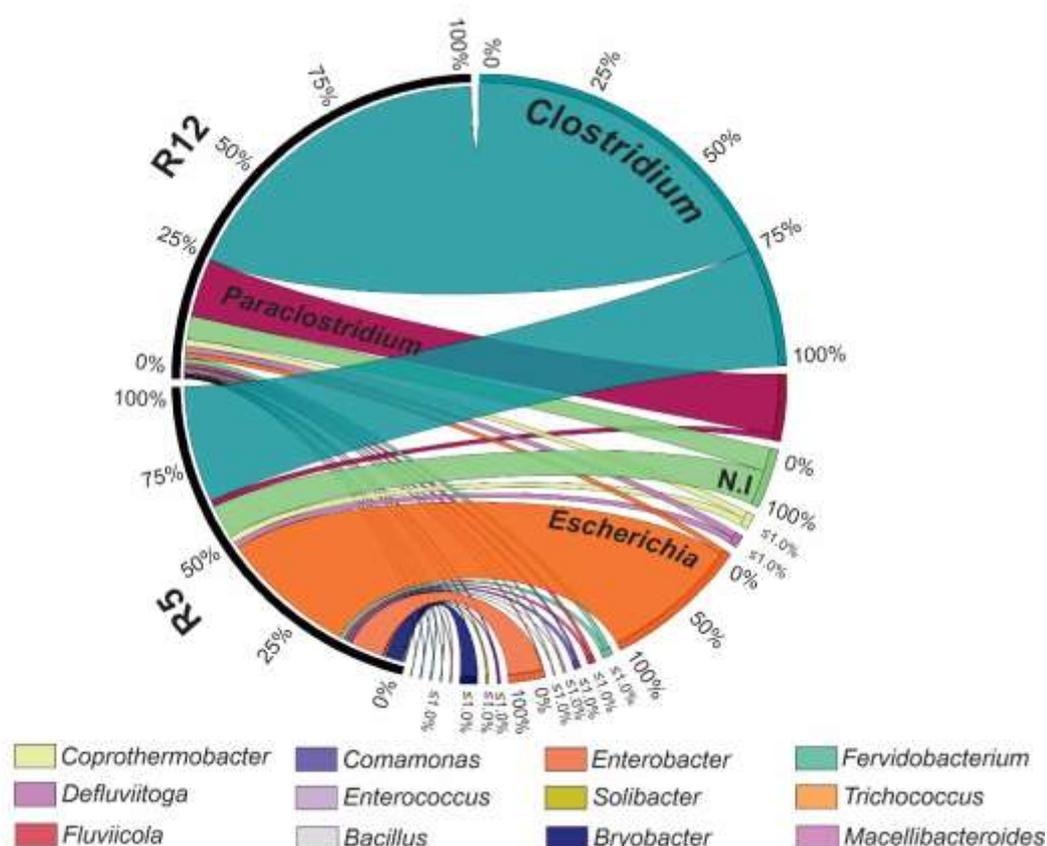
Nota: YE= extrato de levedura; acúmulo de fenóis= *phe*; consume de carboidratos= *carbs*. ↑= aumento devido ao efeito positivo; ↓= diminuição devido ao efeito negativo. Apenas o efeito das respostas significativas ($p \leq 0,1$) foram considerados, enquanto as demais foram representadas como não significativas (NS). Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, considerou-se as amostras dos reatores R5 e R12 para sequenciamento e análise da comunidade microbiana, uma vez que foram as condições nas quais observaram-se maiores concentrações de H₂ (R5-13,29 e R12-12,91 mmol H₂.L⁻¹) e maiores concentrações de HAc (R5-1340 e R12-1.040 mg.L⁻¹).

5.4.1 Análise da comunidade microbiana

A partir das análises via *metabarcoding* (RNAr 16S), foi possível caracterizar e comparar a estrutura da comunidade microbiana (Domínio Bacteria) envolvida na fermentação do resíduo de citros, para os ensaios nos quais foram obtidos maiores *P* (R5-13,29 e R12-12,91 mmol H₂.L⁻¹) e HAc (R5-1340 e R12-1.040 mg.L⁻¹) (Figura 5.22).

Figura 5.22. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros bacterianos identificados nos reatores R5 e R12 dos ensaios de *screening design* via delineamento de Plackett & Burman.



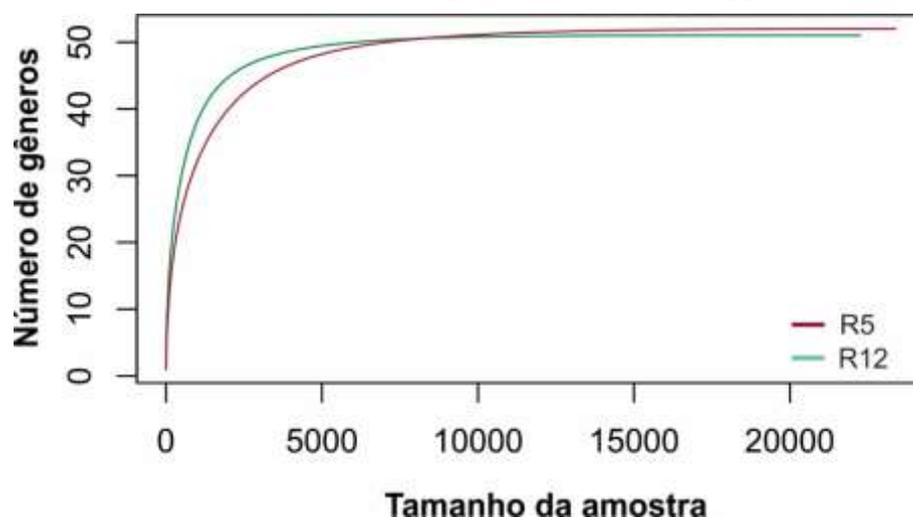
Nota: O círculo exterior representa a abundância relativa em função do número de leituras. N.I.= não identificado.

No total, foram obtidas 76.929 sequências de RNAr 16S com tamanho médio de 412 pb (pares de base), sendo 35.485 sequências para R5 e 41.444 sequências para R12. As OTUs obtidas foram agrupadas considerando-se similaridade $\geq 97\%$ e, remoção de *singletons*, sendo 648 para R5 e 581 OTUs para R12. Além disso, os índices de diversidade ecológica foram calculados para cada amostra (Tabela 5.10). A partir dos valores de cobertura ($\geq 99\%$) referentes à proporção de sequências representativas, foi possível notar que a maioria das populações microbianas foi acessada, indicando boa cobertura (Figura 5.23).

Tabela 5.10. Índices ecológicos para as sequências do RNAr 16S via plataforma *Illumina* dos ensaios R5 e R12.

Reatores Anaeróbios		
	R5	R12
Parâmetros sequenciamento (RNAr 16S)		
Cobertura (%)	99,6	99,4
Numero total de sequências	35.485	41.444
Comprimento medio (nt)	418	406
GC (%)	55,12	53,24
Total de OTUs	648	581
Índices ecológicos		
Shannon	3,936	2,789
Simpson	0,809	0,635
Chao-1	643,138	585,484

Figura 5.23. Curvas de rarefação do RNAr 16S via plataforma *Illumina* HiSeq para os reatores R5 e R12.



Os reatores R5 e R12 foram inoculados com a mesma quantidade de inóculo alóctone (3 gSTV.L^{-1}) e $0,75$ e $2,25 \text{ g.L}^{-1}$ de inóculo autóctone, respectivamente. Apesar disso, maior diversidade de Shannon foi observada em R5 (2,01), quando comparado a R12 (1,49), bem como para o índice de Simpson (0,76 e 0,59, respectivamente). Entretanto, como mencionado anteriormente, o aumento da concentração de biomassa autóctone nos reatores não foi considerado significativo para nenhum dos parâmetros avaliados no processo fermentativo ($p \geq 0,1$).

Os filos mais abundantes foram Firmicutes (88,87 e 40,69% para R5 e R12, respectivamente) e Proteobacteria (4,11 e 47,93% para R5 e R12, respectivamente). Organismos do filo Firmicutes são abundantes em reatores anaeróbios, comumente associados as interações sintróficas e produção de diversos AOV, como HAc e HBU (VOS

et al., 2009), condizente com os principais metabolitos obtidos na presente pesquisa (HAc 1.340 mg.L⁻¹ e H₂Bu 528 mg.L⁻¹).

Clostridium foi identificado em ambos os reatores, sendo mais abundante em R12 (70,87%) em relação ao R5 (29,93%). De acordo com Vos et al. (2009), a biotina é uma das principais vitaminas requeridas por *Clostridium*. Desta forma, a maior abundância relativa de *Clostridium* em R12 quando comparado a R5 pode ser justificada pela composição do meio reacional, uma vez que em R5 não houve suplementação com extrato de levedura, rico em biotina (SATO et al., 1992). Entretanto, a partir dos dados operacionais, constatou-se que a concentração de H₂ foi similar em ambos os ensaios (12,91 e 13,29 mmol H₂.L⁻¹, respectivamente), indicando que a influência deste componente no meio de cultura não foi significativa para *P*. Desse modo, com a finalidade de tornar o processo fermentativo mais vantajoso a ausência de suplementação com extrato de levedura poderá favorecer a redução dos custos, tornando atrativa sua ampliação à escala real (GROOTSCHOLTEN et al., 2013).

Na caracterização do inóculo bruto, Soares et al. (2017) observaram apenas 6,42% de abundância relativa para *Clostridium* em lodo de reator UASB aplicado ao processamento termofílico de vinhaça, semelhante ao utilizado no presente estudo. Provavelmente, as condições reacionais de R12 (44 °C, 40% de *headspace*, pH 5,5 e 15 g.L⁻¹ de substrato) foram favoráveis para tais bactérias. De acordo com Valentín-Reyes (2018), bactérias deste gênero são comumente resistentes à elevada pressão parcial de H₂. Desta forma, é possível inferir que menor volume de *headspace* (40%) utilizado na presente pesquisa pode ter contribuído para a prevalência de *Clostridium* nestes reatores (R12 e R5).

Resultados similares foram observados também por Rabelo et al. (2018a), uma vez que *Clostridium* foi o gênero mais abundante em reatores anaeróbios aplicados a fermentação mesofílica de bagaço de cana-de-açúcar. Da mesma forma, Villa-Montoya et al. (2019) observaram maior abundância relativa de *Clostridium* em pH superior a 7,0 e temperatura mesofílica (30 °C) a partir de resíduos do processamento de café.

Paraclostridium foi o segundo gênero identificado em maior abundância relativa no ensaio R12 (12,89%), enquanto em R5, este gênero foi observado em apenas 1,52% de abundância relativa. Uma vez que, ao contrário de R5, no ensaio R12 houve suplementação com 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Provavelmente, a composição do meio pode ter favorecido estas bactérias em R12. Rabelo et al. (2020) isolaram uma cepa de

Paraclostridium CR4 a partir de bagaço de cana-de-açúcar, e indicaram sua recorrência em resíduos lignocelulósicos e seu potencial para obtenção de H₂ a partir deste tipo de substrato. Além disso, os autores supracitados suplementaram o meio de cultura utilizado para isolamento desta cepa com 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, mesma concentração utilizada na presente pesquisa em R12. De acordo com Yang et al. (2019), além de *Paraclostridium* ser um dos gêneros mais dominantes em lodo anaeróbio de esgoto doméstico, a dominância deste gênero pode ser comumente associada à elevada obtenção de H₂ em reatores anaeróbios, com concomitante produção de HAc.

Escherichia é bactéria resistente ao limoneno, um dos principais inibidores presentes em resíduo sólido de citros (CALABRÒ et al., 2016), sendo identificada em maior abundância relativa em R5 (34,5%), enquanto em R12 a abundância foi de apenas 1,18%. Da mesma forma, a abundância relativa observada para *Enterobacter* nos ensaios R5 e R12 foi de 8,55 e 0,26%, respectivamente, ambos do filo Proteobacteria (família Enterobacteriaceae) e geralmente crescem em temperatura ótima na faixa mesofílica (22-37 °C) e pH 7,0 (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Provavelmente, as condições operacionais em R12 (44 °C, pH 8,5) não foram favoráveis a estas bactérias. Além disso, é importante salientar que HAc é o principal metabolito produzido por estes gêneros, o que condiz com o observado ao final do período de incubação em R5 (1.340 mg.L⁻¹), superior ao observado em R12 (1.040 mg.L⁻¹).

Coprothermobacter, foi identificado com abundância relativa de 1,89% em R5 e 1,63% em R12. Soares et al. (2017) também identificaram esse gênero com abundância relativa de 41,73% no inóculo de mesma origem, possivelmente devido à sua afinidade às condições termofílicas (50-70 °C) (GAGLIANO et al., 2015), como o reator UASB aplicado ao processamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar. Além das menores temperaturas utilizadas no presente estudo (30-44 °C), a menor abundância relativa observada em reatores aplicados à obtenção de H₂ pode ser justificada porque bactérias deste gênero são conhecidas por estabelecer relações sintróficas com arqueias hidrogenotróficas, as quais foram identificadas em abundância relativa ≤0,01%.

As bactérias anaeróbias termofílicas da família Thermotogae (*DeFluviitoga* e *Fervidobacterium*) são comumente identificadas em reatores aplicados à digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos, como silagem de milho e cevada (MAUS et al., 2015). Apesar de sua faixa ótima de crescimento a 55 °C (HANIA et al., 2012) foram identificadas em maior abundância em R5 (1,57 e 1,19%) quando comparado a R12 (1,33

e 1,12%) operados a 30 e 44 °C, respectivamente. Maus et al. (2015) observaram que o principal metabolito acumulado a partir da fermentação de carboidratos complexos (xilano e celulose) por cepa de *D. tunisiensis* L3 foi HAc, com concomitante obtenção de H₂. Da mesma forma, no presente estudo foi observada maior produção de HAc em R5 (1.340 mg.L⁻¹), bem como maior abundância relativa destes gêneros.

Os demais gêneros identificados com abundância relativa superior a 1,0% foram *Trichococcus* (4,19 e 0,11%) e *Comamonas* (1,04 e 0,49%) para os ensaios R5 e R12, respectivamente. Membros do gênero *Trichococcus* são comumente identificados em lodos de esgoto, sendo que sua temperatura ótima é entre 25-30 °C (PARSHINA et al., 2019), o que pode explicar sua maior abundância relativa em R5, operado a 30 °C, quando comparado a R12, operado a 44 °C. Da mesma forma, *Anaerobaculum*, *Symbiobacterium* e *Thermoanaerobacterium*, relatados por Soares et al. (2017) com abundância relativa de 21,51%, 6,20% e 1,61% em lodo de reator UASB aplicado ao processamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar, foram identificados abaixo de 0,01%, tanto para R5, quanto para R12 no presente estudo, no qual utilizou-se o mesmo inóculo. Entretanto, como enfatizado por Benomar et al. (2015), mesmo gêneros pouco abundantes em determinado sistema podem contribuir significativamente para a obtenção de H₂ e demais metabolitos, devido a sua importância para reações sintróficas e, ainda, interações célula-célula.

Na Figura 5.24, é possível resumir a relação entre a comunidade microbiana observada nas amostras nas quais houve maior potencial máximo de concentração de H₂ (R5, 13,29 mmol H₂.L⁻¹) e maior velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (3,10 mmol H₂.h⁻¹). Os gêneros associados ao inóculo alóctone utilizado foram *Clostridium*, *Coprothermobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Deffluviitoga* (SOARES et al., 2017).

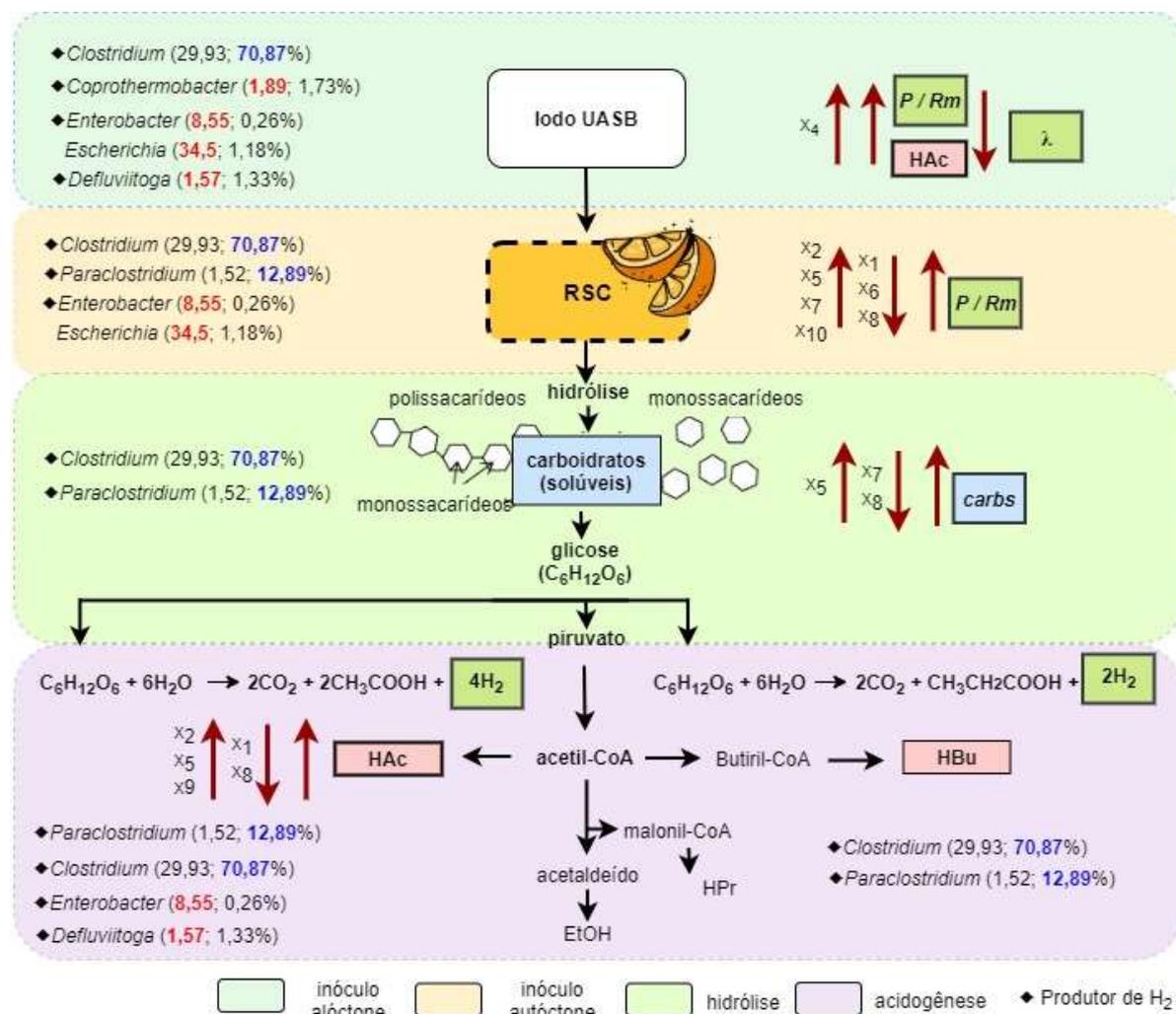
Além disso, foi possível estabelecer relação direta entre o aumento de 1 para 2 gSTV.L⁻¹ de inóculo alóctone (x₄) com o aumento de *P*, *Rm* e produção de HAc, possivelmente porque, com exceção de *Escherichia*, os demais gêneros mencionados estão relacionados com a obtenção de H₂ e HAc durante o processo de fermentação (VOS et al., 2009; HANIA et al., 2012; GAGLIANO et al., 2015; MAUS et al., 2015; RABELO et al., 2018a; SOARES et al., 2019b). Não foi possível estabelecer o mesmo tipo de relação para o inóculo autóctone (x₃), uma vez que este parâmetro não foi considerado como significativo, entretanto, com base em trabalhos anteriores (BAKKALI et al., 2008;

CALABRÒ et al., 2016; MUBARAK; SORAYA, 2018), os gêneros identificados no inóculo autóctone foram *Clostridium*, *Paraclostridium*, *Enterobacter* e *Escherichia*.

Foi possível relacionar as concentrações de substrato (x_5), extrato de levedura (x_7) e CaCO_3 (x_8) com o consumo de carboidratos solúveis. Os principais gêneros relacionados com a etapa de hidrólise na presente pesquisa foram *Clostridium* e *Paraclostridium*, ambos em maior abundância relativa em R12 (70,87 e 12,89%) quando comparados a R5 (29,93 e 1,52%, respectivamente). A maior abundância relativa de grupos hidrolíticos em R12 pode ser um dos fatores responsáveis pelo maior R_m em R12 ($3,10 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{h}^{-1}$) em relação a R5 ($2,46 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{h}^{-1}$).

Por fim, os principais gêneros envolvidos com a produção de HAc e concomitante obtenção de H_2 observados foram *Paraclostridium*, *Clostridium*, *Enterobacter* e *Deffluviitoga* (VOS et al., 2009; HANIA et al., 2012; GAGLIANO et al., 2015; MAUS et al., 2015; RABELO et al., 2018a; SOARES et al., 2019b). Em relação à hidrólise, a maior abundância de *Clostridium* e *Paraclostridium* em R12 pode ter favorecido a maior velocidade específica máxima de obtenção de H_2 neste ensaio ($3,10 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{h}^{-1}$), apesar de concentrações similares de H_2 em R5 e R12 ($13,29$ e $12,91 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente).

Figura 5.24. Possíveis vias de conversão de resíduos sólidos de citros (RSC) em carboidratos, AOV e H₂ e abundância relativa de gêneros relacionados aos inóculos alóctone e autóctone, hidrólise e acidogênese. Os valores entre parênteses representam abundância relativa nos ensaios R5 e R12, respectivamente. As setas vermelhas representam o efeito positivo (↑) ou negativo (↓) em cada variável (x1-x10) em diferentes respostas (P, Rm, λ, HAc).



Fonte: Elaboração própria.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, considerou-se o pH, concentração de inóculo alóctone e concentração de substrato como variáveis significativas para obtenção de H₂ a partir de resíduos sólidos de citros. Além disso, uma vez que foi possível estabelecer entre os componentes do meio PCS (peptona, NaCl, extrato de levedura e CaCO₃), apenas efeito significativo da peptona na obtenção de H₂, os demais componentes não foram considerados nos ensaios realizados nas demais etapas.

Desta forma, considerou-se como variáveis independentes para os ensaios de otimização via DCCR a concentração de inóculo (x_1 ; 2,32-5,68 gSTV.L⁻¹), concentração de substrato (x_2 ; 1,55-28,45 g.L⁻¹) e pH (x_3 ; 4,32-7,68).

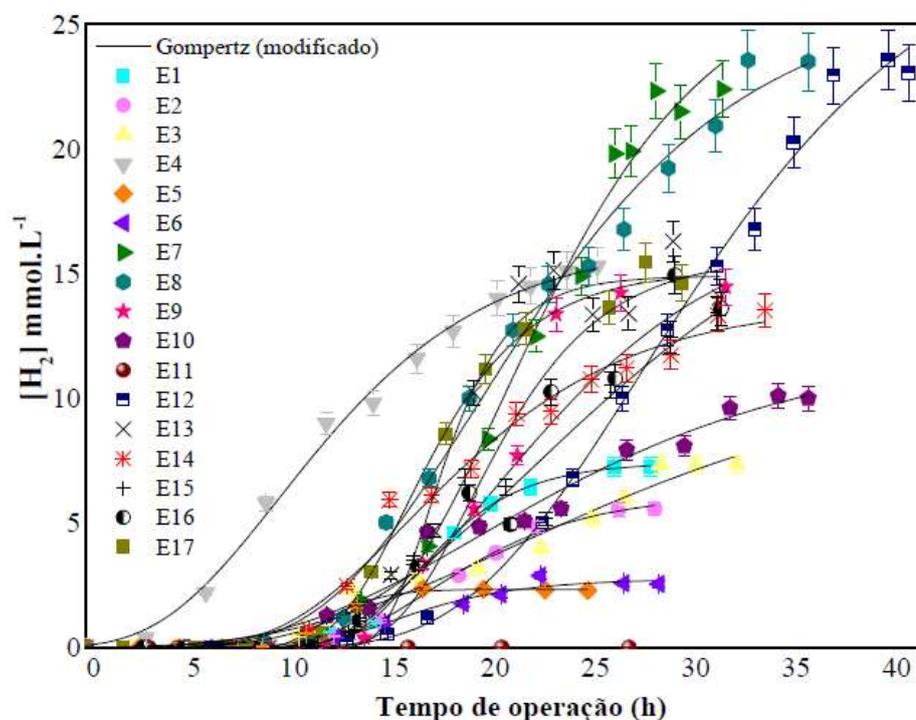
5.5 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE H₂ VIA DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

5.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado de acordo com os resultados obtidos no *screening design* via delineamento de Plackett & Burman, cujas condições fixadas foram as seguintes: concentração de consórcio autóctone fermentativo-celulolítico (5%), temperatura (30 °C), volume do *headspace* (40%) e concentração de peptona (5 g.L⁻¹).

A fim de avaliar a influência das variáveis independentes de concentração de inóculo (x_1 ; 2,32-5,68 gSTV.L⁻¹), concentração de substrato (x_2 ; 1,55-28,45 g.L⁻¹) e pH (x_3 ; 4,32-7,68), realizou-se o delineamento fatorial completo de 2³, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios em triplicata (Figura 5.25).

Figura 5.25. Variação da concentração de hidrogênio dos ensaios de DCCR.



As condições experimentais e os resultados obtidos para as respostas P (Y_1), Rm (Y_2) e λ (Y_3) e valores de significância para estas respostas e suas interações encontram-se resumidas na Tabela 5.11 e Tabela 5.12, respectivamente. Conforme as condições

estabelecidas para cada ensaio, foram obtidos P entre 0,01 (E11) e 29,26 mmol H₂.L⁻¹ (E8), Rm entre 0,01 (E11) e 2,48 mmol H₂.h⁻¹ (E13) e λ entre 3,74 (E4) e 20 h (E8).

Tabela 5.11. Respostas relativas à obtenção de hidrogênio nos ensaios de DCCR.

Ensaio	Variáveis			Respostas			
	Inóculo (gSTV.L ⁻¹)	Substrato (g.L ⁻¹)	pH	P (mmol H ₂ .L ⁻¹)	Rm (mmol H ₂ .h ⁻¹)	λ (h)	R ²
E1	3,0	7,0	4,5	7,44±0,1	0,91±0,1	13,22±0,3	0,98
E2	5,0	7,0	4,5	6,17±0,2	0,52±0,0	12,70±0,3	0,99
E3	3,0	23,0	4,5	11,24±2,6	0,37±0,0	10,21±1,1	0,97
E4	5,0	23,0	4,5	16,29±0,5	1,02±0,1	3,74±0,4	0,99
E5	3,0	7,0	7,5	2,35±0,0	0,52±0,0	9,88±0,2	0,98
E6	5,0	7,0	7,5	2,75±0,2	0,28±0,0	11,43±0,8	0,98
E7	3,0	23,0	7,5	27,39±1,2	1,72±1,1	15,0±0,5	0,99
E8	5,0	23,0	7,5	29,26±1,4	1,20±0,1	20,0±0,5	0,96
E9	2,3	15,0	6,0	15,66±1,1	1,56±0,3	15,41±0,8	0,98
E10	5,7	15,0	6,0	12,10±1,3	0,47±0,0	9,99±1,0	0,98
E11	4,0	1,5	6,0	0,01±5,2	0,01±0,0	8,52±0,3	0,98
E12	4,0	28,5	6,0	20,75±1,7	1,46±0,1	19,61±0,4	0,96
E13	4,0	15,0	3,5	14,90±0,6	2,48±0,5	14,89±0,6	0,97
E14	4,0	15,0	8,5	13,85±0,7	0,82±0,0	9,86±0,7	0,98
E15	4,0	15,0	6,0	19,69±6,9	0,76±0,1	12,80±1,3	0,95
E16	4,0	15,0	6,0	17,51±3,0	0,95±0,5	13,69±1,1	0,96
E17	4,0	15,0	6,0	15,69±0,3	1,63±0,1	12,47±0,3	0,99
Otimizado	4,0	29,8	8,98	48,47±2,2	4,69±0,6	17,35±0,6	0,97
Não otimizado	2,0	15	7,0	13,31±0,7	1,27±0,2	4,60±1,0	0,94

Nota: Os erros apresentados (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado em cada condição para os resultados obtidos por meio do modelo de Gompertz. Potencial máximo de concentração de H₂ (P), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (Rm), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

Tabela 5.12. Valores de significância para o intervalo de confiança de 10% das respostas para as variáveis dos ensaios de DCCR.

Interações	p-valor		
	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ
x_1	0,0000	0,0132	0,0005
x_1^2	0,9956	0,3256	0,5086
x_2	0,2003	0,5730	0,7743
x_2^2	0,0000	0,0799	0,1812
x_3	0,0267	0,2888	0,8938
x_3^2	0,1336	0,4198	0,5790
$x_1 \cdot x_2$	0,2626	0,5238	0,6997
$x_1 \cdot x_3$	0,3900	0,6664	0,8186
$x_2 \cdot x_3$	0,8641	0,5650	0,2382

Nota: x_1 = Concentração de inóculo (gSTV.L⁻¹); x_2 = Concentração de substrato (g.L⁻¹); x_3 = pH. Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

Estudos envolvendo a variação de único fator por vez acabam não sendo totalmente representativos, uma vez que a partir dessa possibilidade, não se tem análise da influência entre os diferentes fatores (JUNG et al., 2011). O aumento da temperatura, por exemplo, está relacionado com o aumento do metabolismo celular (INFANTES et al., 2011). Entretanto, seu aumento também está relacionado ao aumento da permeabilidade celular em função da inibição por AOV não dissociados, o que justifica o estabelecimento de uma faixa ótima para cada processo, uma vez que há maior gasto de energia para manter o pH intracelular e menor síntese de biomassa.

O modelo de regressão (reparametrizado) obtido para a resposta *P* (Y_1) ao nível de significância de 10%, conta apenas com os termos estatisticamente significativos ($p \leq 0,1$), sendo dois termos lineares (x_2 e x_3), um termo quadrático (x_2^2) e uma interação ($x_2 \cdot x_3$), referentes às variáveis de pH (x_2) e concentração de substrato e pH (x_3) (Equação 5.3). Para a referida resposta, a variável de concentração de inóculo (x_1) não foi considerada como significativa ($p=0,9972$) dentro do intervalo de confiança de 10%, bem como sua interação com as demais variáveis (Figura 5.26).

$$Y_1 = 15,29 + 7,35x_2 - 1,97x_2^2 + 1,38x_3 + 4,70x_2x_3 \quad (Eq. 5.3)$$

sendo,

$Y_1 = P$, concentração máxima predita de H₂;

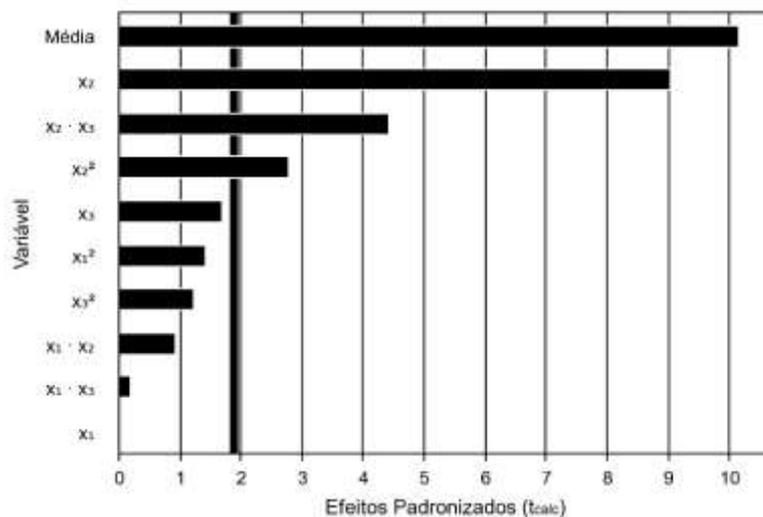
$x_2 = \text{pH}$, efeito linear;

$x_2^2 = \text{pH}$, efeito quadrático;

x_3 = concentração de substrato (g.L^{-1}), efeito linear;

x_2x_3 = interação entre x_2 e x_3 .

Figura 5.26. Diagrama de Pareto ilustrando a significância dos resultados obtidos para a resposta P para o intervalo de confiança de 90%.

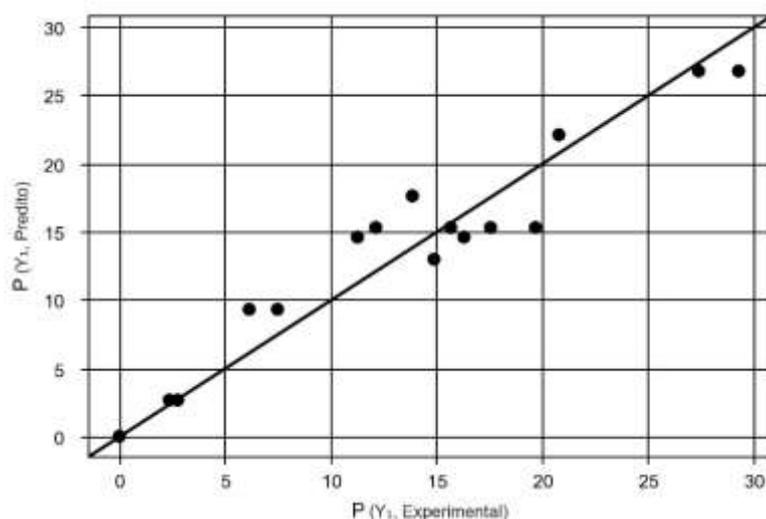


Nota: x_1 = Concentração de inóculo (g STV.L^{-1}); x_2 = Concentração de substrato (g.L^{-1}); x_3 = pH; Y_1 = P ; Y_2 = Rm ; Y_3 = λ . Potencial de concentração de H_2 (P), velocidade máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

A partir do teste ANOVA (Tabela 5.13) observa-se que o modelo obtido é estatisticamente significativo, uma vez que a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de 91,21% (Figura 5.27). O valor de F calculado para regressão/resíduos é aproximadamente 12,5 vezes superior ao F tabelado (2,48) para experimentos com intervalo de confiança de 10% e com 4 graus de liberdade de regressão e 12 graus de liberdade de resíduos.

O F calculado da falta de ajuste/erro puro (1,3) é menor do que o F tabelado para os experimentos com 10 graus de liberdade para falta de ajuste e 2 graus de liberdade para erro puro (9,39) no mesmo intervalo de confiança, sugerindo um bom ajuste do modelo.

Além disso, observa-se que o p -valor da falta de ajuste (0,5053) não foi considerado como significativo, enquanto o p -valor da regressão foi considerado como altamente significativo ($p \leq 0,00001$).

Figura 5.27. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta P .

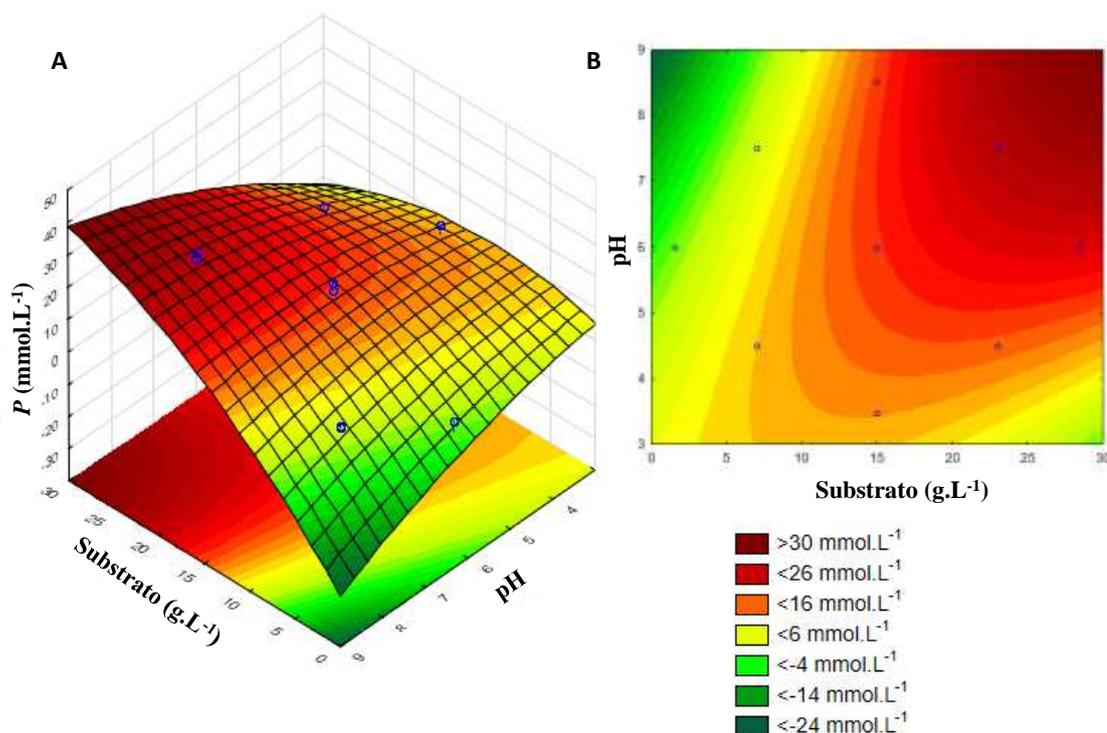
Nota: P = Potencial de concentração de H_2 (Y_1).

Tabela 5.13. Dados estatísticos (ANOVA) obtidos para os ensaios de DCCR, para a resposta P e intervalo de confiança de 90%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	990,7	4	247,7	31,1	0,00000
Resíduos	95,5	12	8,0		
Falta de ajuste	87,5	10	8,7	2,2	0,35505
Erro puro	8,0	2	4,0		
Total	1.086,2	16	246,79	30,93	

Uma vez que foi possível considerar o modelo de regressão obtido como significativo, foi possível avaliar a superfície de resposta (Figura 5.28) para Y_1 . De acordo com a superfície e com a derivação da função do modelo considerou-se para a validação experimental como condição ótima para obtenção de H_2 (P) as condições de 4 g.L⁻¹ de inóculo, pH inicial do meio reacional de 8,98 e 29,8 g.L⁻¹ de resíduo de citros como substrato.

Figura 5.28. Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B) obtida para a interação entre as variáveis substrato (g.L^{-1}) e pH.



Nota: P = Potencial de concentração de H_2 (Y_1).

Para a resposta Rm (Y_2), apenas um termo linear (x_2) referente à concentração de substrato foi considerado como estatisticamente significativo ao nível de significância adotado (10%) (Figura 5.29). De acordo com a ANOVA (Tabela 5.14) obtida para esta resposta, considera-se que a regressão foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,1$) (Equação 5.4), ao contrário da falta de ajuste observada ($p \geq 0,1$).

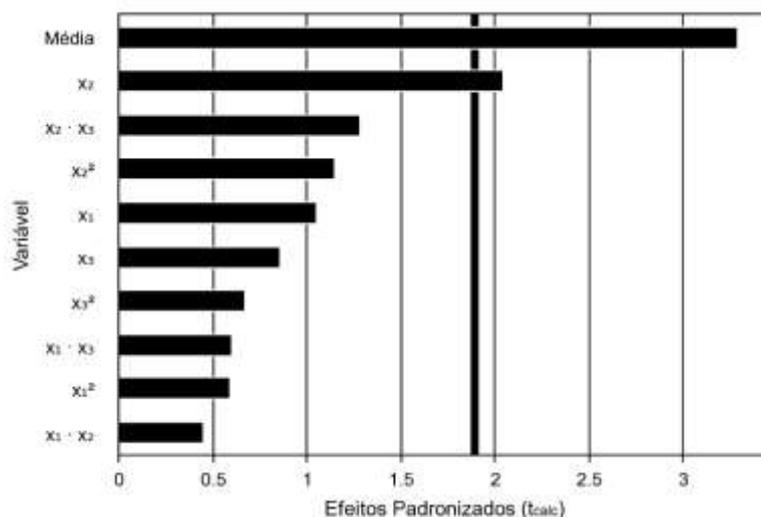
O F calculado para regressão/resíduos (4,6) foi 1,5 vez maior do que o F tabelado para experimentos com 1 grau de liberdade de regressão e 15 graus de liberdade de resíduos (3,07).

$$Y_2 = 0,98 + 0,33x_2 \quad (\text{Eq. 5.4})$$

sendo,

$Y_2 = Rm$, velocidade máxima da obtenção de H_2 ($\text{mmol H}_2 \cdot \text{h}^{-1}$);

$x_2 = \text{pH}$, efeito linear.

Figura 5.29. Diagrama de Pareto para a resposta Rm para o intervalo de confiança de 90%.

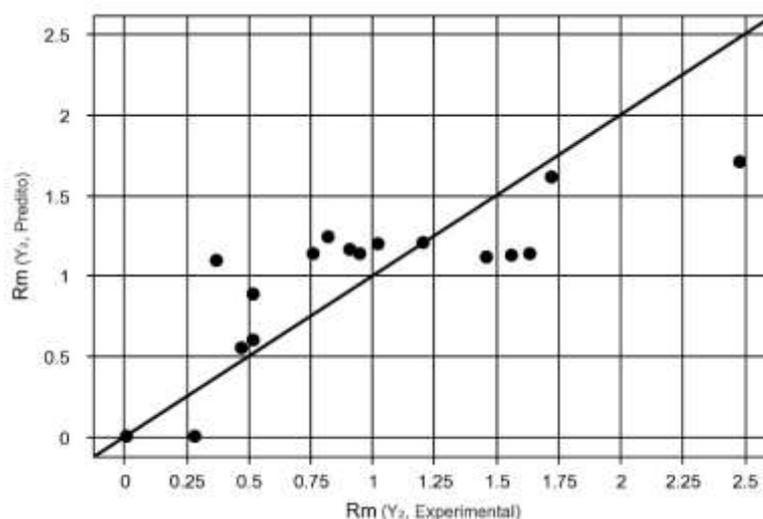
Nota: x_1 = Concentração de inóculo (g STV.L^{-1}); x_2 = Concentração de substrato (g.L^{-1}); x_3 = pH; Y_1 = P ; Y_2 = Rm ; Y_3 = λ . Potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Tabela 5.14. Dados estatísticos (ANOVA) dos ensaios de DCCR para a resposta Rm e intervalo de confiança de 90%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	1,5	1	1,5	4,57	0,0494
Resíduos	4,9	15	0,3		
Falta de ajuste	4,5	13	0,3	1,65	0,4397
Erro puro	0,4	2	0,2		
Total	6,4	16			

Para o erro puro, que conta com 13 graus de liberdade para falta de ajuste e 2 graus de liberdade para o erro puro, o F calculado (1,7) foi menor que o F tabelado (9,41). Entretanto, o percentual de variação obtido (R^2) para esta resposta foi demasiadamente baixo, de apenas 61% (Figura 5.30), ou seja, pouca variação foi observada dentro do erro experimental de medição da análise.

Para a faixa estudada no DCCR não se verificou efeito das variáveis estabelecidas referente a resposta Rm . Ainda assim, foi possível notar que as condições experimentais ótimas em relação à x_2 para otimização desta resposta seriam próximas às obtidas para a resposta P , com $28,45 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato para Rm máximo de $1,54 \text{ mmol H}_2.\text{h}^{-1}$.

Figura 5.30. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta R_m .

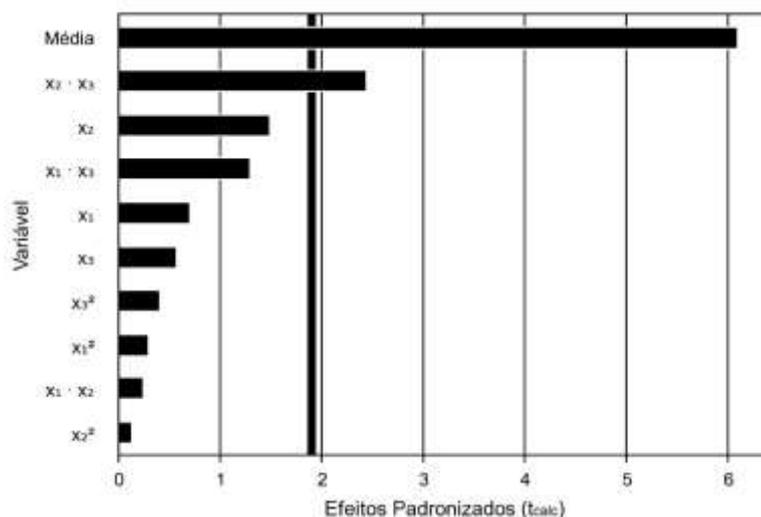
Nota: R_m = velocidade máxima de obtenção de H_2 (Y_2).

Por fim, para a resposta λ (Y_3), apenas a interação entre x_2 e x_3 (concentração de substrato e pH) verificou-se efeito significativo ($p \leq 0,1$) (Figura 5.31). Apesar disso, para os demais parâmetros da ANOVA (Tabela 5.15) calculada para esta resposta, foi observado baixo percentual de variação explicada ($R^2 = 33,14\%$) (Figura 5.32). Ainda, a falta de ajuste observada foi significativa ($p \leq 0,1$) e demasiadamente alta (165,2).

Tabela 5.15. Dados estatísticos (ANOVA) dos ensaios de DCCR, para a resposta λ e intervalo de confiança de 90%.

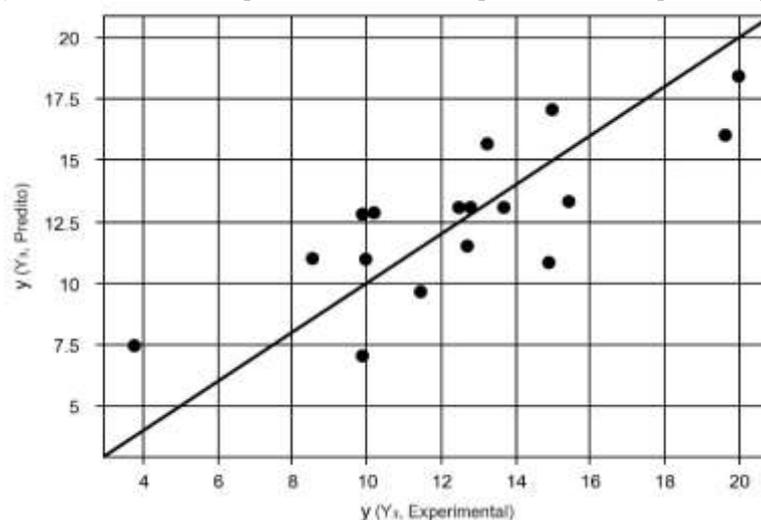
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	82,3	1	82,3	7,44	0,0156
Resíduos	166,0	15	11,1		
Falta de ajuste	165,2	13	12,7	31,92	0,0308
Erro puro	0,8	2	0,4		
Total	248,3	16			

Figura 5.31. Diagrama de Pareto para a resposta λ e intervalo de confiança de 90%.



Nota: x_1 = Concentração de inóculo (g STV.L^{-1}); x_2 = Concentração de substrato (g.L^{-1}); x_3 = pH; Y_1 = P ; Y_2 = Rm ; Y_3 = λ . Potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Figura 5.32. Relação entre os valores experimentais e valores preditos obtidos para a resposta λ .



Nota: λ = tempo de início da obtenção de H_2 (Y_3).

De acordo com o modelo de regressão (Equação 5.5) obtido para a resposta Y_3 (λ), estimou-se que o pH ideal do meio reacional para que o tempo necessário para a produção de H_2 seja reduzido seria em torno de 3,0. Entretanto, verificou-se que este modelo não foi estatisticamente significativo e optou-se por manter o pH em torno de 8,0, na condição otimizada indicada pelos modelos de regressão obtidos para as respostas Y_1 (P) e Y_2 (Rm).

$$Y_3 = 12,55 + 3,21x_2x_3 \quad (\text{Eq. 5.5})$$

sendo,

$Y_3 = \lambda$, tempo necessário para início da obtenção de H_2 (h);

$x_2 = \text{pH}$, efeito linear;

$x_3 =$ concentração de substrato (g.L^{-1}), efeito linear.

5.5.1.1 Validação experimental

A partir da superfície de resposta obtida para a resposta Y_1 (P) foi possível avaliar as regiões ótimas para aumento da concentração de H_2 e optar pela região na qual seria possível obter o maior valor de P e, ainda, maior Rm , sendo tais condições apresentadas na Tabela 5.16.

Tabela 5.16. Teste ANOVA e valores ótimos para as respostas P e Rm dos ensaios de DCCR.

Variável independente	Y_1	Y_2	Y_3
Inóculo (gSTV.L^{-1})	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Substrato (g.L^{-1})	$+\alpha$ (28,45)	$+\alpha$ (28,45)	Indiferente
pH	$+\alpha$ (8,52)	Indiferente	Indiferente

Nota: $x_1 =$ Concentração de inóculo (g STV.L^{-1}); $x_2 =$ Concentração de substrato (g.L^{-1}); $x_3 = \text{pH}$; $Y_1 = P$; $Y_2 = Rm$; $Y_3 = \lambda$. Potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

A condição adotada para o ensaio experimental de validação (Figura 5.33) foi de 4 gSTV.L^{-1} de inóculo, 29,8 g.L^{-1} de substrato e pH inicial do meio reacional de 8,98, além de 5% de consórcio autofermentativo, 5 g.L^{-1} de peptona, 40% de *headspace* e temperatura de incubação de 30 °C, como definido no delineamento preliminar de Plackett & Burman. Na Tabela 5.17 encontram-se resumidos os valores experimentais obtidos em comparação com os valores preditos pelos modelos.

Os resultados obtidos no ensaio de comparação entre diferentes pré-tratamentos utilizando resíduo de citros *in natura* foram usados como base comparativa, sendo considerado como ensaio não otimizado. Assim, as condições não otimizadas foram: 15 g.L^{-1} de resíduo de citros *in natura*, 2 gSTV.L^{-1} de inóculo alóctone, pH 7,0, 30 °C e meio de cultura PCS (HARUTA et al., 2002), onde se obteve 13,31 $\text{mmol H}_2.\text{L}^{-1}$.

Figura 5.33. Concentração acumulada de H₂ no ensaio de validação. Otimizado (◆); Não otimizado (●). Os desvios padrão foram calculados em cada condição para os resultados obtidos por meio do modelo de Gompertz.

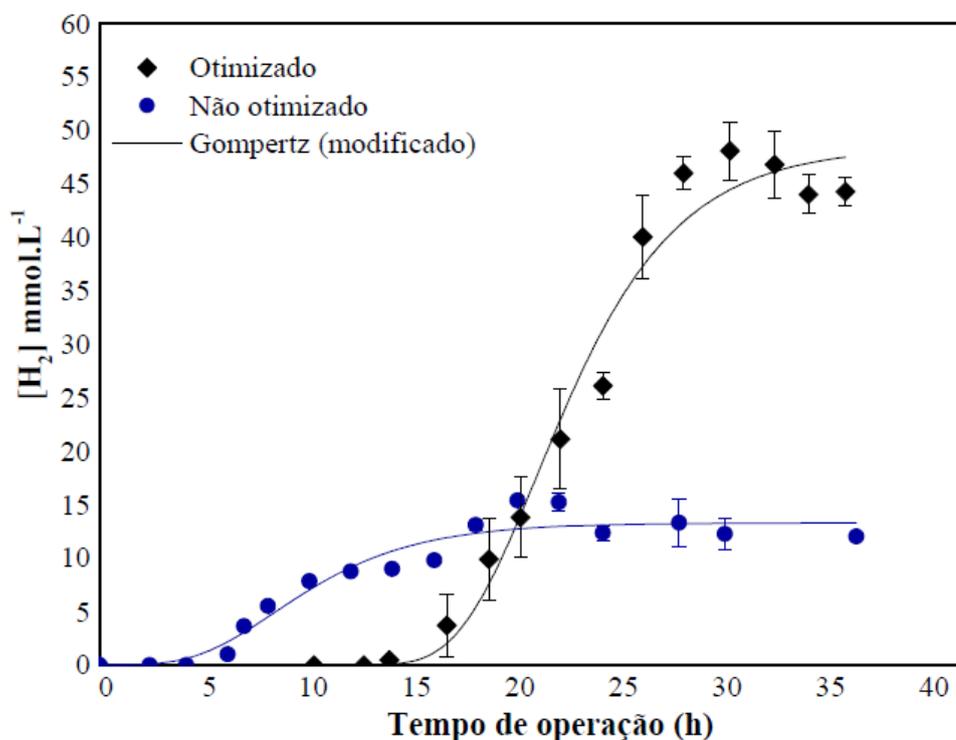


Tabela 5.17. Comparação entre os resultados para concentração de H₂ (*P*) preditos pelo modelo obtido por meio de DCCR e os resultados experimentais obtidos.

Resposta	<i>P</i> experimental (mmol H ₂ .L ⁻¹)	<i>P</i> predito (mmol H ₂ .L ⁻¹)
Y ₁	48,47±2,2	42,18±5,1

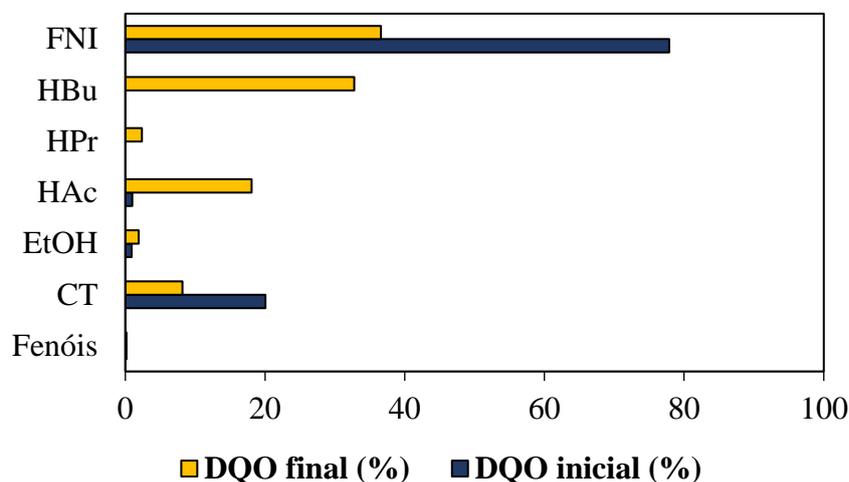
Nota: Y₁= *P*.

A partir do ensaio experimental de validação é possível afirmar que a obtenção de H₂ foi otimizada, uma vez que o valor de *P* obtido (48,47 mmol H₂.L⁻¹) foi 3,87 vezes superior ao valor de *P* obtido antes de sua otimização (12,54 mmol H₂.L⁻¹). Além disso, o valor de *Rm* obtido (4,70 mmol H₂.h⁻¹) também foi superior nos ensaios anteriores, nos quais o *Rm* máximo observado foi de 2,64 mmol H₂.h⁻¹.

O balanço de massa de fase solúvel (BMS) da condição otimizada foi realizado em termos de DQO_{filtrada}, a partir da caracterização do efluente dos experimentos de validação, de acordo com a Equação 4.3. Os valores obtidos para as condições iniciais e finais foram

22 e 63%, respectivamente. Os percentuais de acidificação dos metabólitos considerados para o BMS encontram-se resumidos na Figura 5.34.

Figura 5.34. Balanço de Massa da fase Solúvel (BMS) do reator em batelada nas condições otimizadas aplicadas à obtenção de H₂ a partir de resíduos sólidos de citros.



Nota: FNI= fração não identificada, HBu= ácido butírico, HPr= Ácido propiônico, HAc= ácido acético, EtOH=etanol, CT= carboidratos totais.

Por meio da comparação da contribuição relativa de cada composto, nota-se que HBu e HAc foram os compostos identificados que mais contribuíram para o aumento da matéria orgânica em termos de DQO_{filtrada} no ensaio de validação (33 e 18%, respectivamente). Destaca-se ainda contribuição considerável da fração não identificada (FNI) para a BMS (78 e 37%, respectivamente), sendo, tanto para os compostos do início da reação do resíduo sólido de citros e/ou inóculo, quanto os compostos produzidos ao longo da reação, como ácido cítrico, ácido gálico, ácido vanílico, entre outros (KANDASAMY; ARADHYA, 2014).

5.5.1.2 Parâmetros físico-químicos e AOV

Os resultados das análises referêntes aos diferentes parâmetros cinéticos (P , R_m e λ) e físico-químicos (pH, concentração de carboidratos e fenóis totais) encontram-se resumidos na Tabela 5.18, tanto para os ensaios em diferentes condições de DCCR, quanto para comparação entre o reator em condições otimizadas no ensaio de validação.

O pH é um fator influente na obtenção de H₂ e, concomitantemente, na produção de AOV na digestão anaeróbia, especialmente devido ao seu efeito na enzima hidrogenase,

uma vez que, em condições ácidas, o ATP é usado para garantir a neutralidade celular ao invés de produzir hidrogênio (CHUENCHART et al., 2020). Além disso, o pH pode ter influência na resistência de microrganismos ao limoneno, devido ao mecanismo de defesa conhecido como adaptação homeoviscosa, onde as células tendem a manter a fluidez da membrana constante, independentemente das condições, por meio de alterações no conteúdo e comprimento das cadeias de ácidos graxos (RUIZ; FLOTATS, 2014). Neste estudo, foi observada relação entre o pH e a concentração de substrato, uma vez que a interação entre estes parâmetros foi significativa para P ($p \leq 0,1$).

Resultados similares foram observados por Mu, Wang e Yu (2006), que otimizaram P e Rm , indicando como condições ótimas o pH 5,5, 34,8 °C e 24,8 g.L⁻¹ de sacarose, onde obtiveram P de 139,5 mmol H₂.L⁻¹. Vale ressaltar que, assim como no presente estudo, os autores supracitados indicaram as variáveis pH e concentração de substrato como interdependentes ($x_2 \times x_3$), onde 29,8 g.L⁻¹ de resíduo de citros e Rm de 4,17 mmol H₂.h⁻¹ foram obtidos ao final do tempo operacional em condições otimizadas.

Nos ensaios de DCCR, os ensaios para os quais foram observados os menores valores finais de pH, como E3 (4,51) e E7 (4,96), podem estar relacionados com maior λ (≥ 10 h) e maiores concentrações de substrato (23 g.L⁻¹). Todavia, elevadas concentrações de H₂ foram observadas nesses ensaios (11,24 e 27,39 mmol H₂.L⁻¹, respectivamente). Sendo assim, é possível inferir que mesmo com maior período de adaptação necessário devido ao acúmulo de AOV e pH ácido ocasionado pelo aumento da concentração do substrato, essa limitação foi superada pelo consórcio microbiano. Da mesma forma, menor concentração de H₂ foi observada nos ensaios em que pH $\geq 6,0$ foi alcançado ao final da operação, como E6 (2,75 mmol H₂.L⁻¹) e E11 ($\leq 0,01$ mmol H₂.L⁻¹), onde foram avaliadas menores concentrações de substrato (7,0 e 1,5 g.L⁻¹).

Em suma, a concentração de compostos fenólicos e a remoção de carboidratos dissolvidos também foram quantificados nos ensaios de DCCR, no entanto, nenhum padrão foi observado para os parâmetros de Gompertz (P , Rm ou λ) para as concentrações iniciais e finais. Resultados similares foram observados por Villa-Montoya et al. (2020), uma vez que nenhum aumento na concentração (P) foi observado para os mesmos parâmetros, usando resíduos do processamento de café como substrato. Uma possível explicação para os resultados obtidos é a relação entre as diferentes proporções entre o inóculo (2,0-5,7 gSTV.L⁻¹) e o substrato (1,5-29,8 g.L⁻¹) com diferentes pH iniciais (3,5-8,9) utilizados na presente pesquisa, o que pode alterar a disponibilidade e a interação entre os diferentes

components da biomassa lignocelulósicas (celulose, hemicelulose, lignina, monômeros dissolvidos, ácidos e álcoois).

Ao comparar apenas as condições otimizadas e não otimizadas, é possível inferir que a maior remoção de carboidratos dissolvidos (51 e 42%) esteve relacionada às maiores concentrações de H_2 (8,8 e 3,9 mmol $H_2 \cdot g^{-1}$ STV de inóculo) nos mesmos ensaios, devido à bioconversão de carboidratos em AOV, como HAc e HBU, com concomitante obtenção de H_2 . Além disso, nota-se que mesmo com pH inicial mais elevado nas condições otimizadas (8,98) em comparação com as não otimizadas (7,0), o pH final no primeiro caso foi menor do que no segundo (4,80 e 5,30, respectivamente), o que pode estar relacionado com a maior bioconversão de carboidratos devido à sua maior disponibilidade (SHEN et al., 2018).

Em relação às variações observadas na concentração de fenóis nos ensaios do DCCR, constatou-se que nos reatores em que houve menor acúmulo de fenóis após a fermentação (0,5-1,7 mg.L⁻¹), maiores valores de P foram observados (E4, E8, E9, E10, Otimizado e Não otimizado, de 12,10-48,47 mmol $H_2 \cdot L^{-1}$). Contudo, foi possível observar que na maioria dos ensaios verificou-se aumento da concentração de fenóis, o que pode ser atribuído à despolimerização da lignocelulose durante a hidrólise, gerando compostos derivados da lignocelulose (ou seja, derivados de furano, compostos fenólicos e lignina), e pode afetar o crescimento microbiano, danificando suas membranas celulares (QUÉMÉNEUR et al., 2012). No presente estudo, as concentrações de fenol foram de 16,69 a 22,82 mg.L⁻¹, o que sugere que esse parâmetro provavelmente não teve efeito significativo nas condições aplicadas (BUITRÓN; CARVAJAL, 2010; TAI et al., 2010).

Tabela 5.18. Parâmetros cinéticos e físico-químicos dos ensaios de DCCR e ensaio de validação (otimizado).

Reator	Variáveis			Resultados										
	Inóculo alóctone (gSTV.L ⁻¹)	Substrato (g.L ⁻¹)	pH inicial	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	R ²	pH final	Produção específica	Carboiratos totais			Fenóis (mg.L ⁻¹)	
										Inicial	Final	Remoção (%)	Inicial	Final
E1	3,0	7,0	4,5	7,44±0,1	0,91±0,1	13,22±0,3	0,98	5,51	1,7	2,13±0,3	1,39±0,2	35	17,09±0,2	17,72±0,4
E2	5,0	7,0	4,5	6,17±0,2	0,52±0,0	12,70±0,3	0,99	6,14	0,9	0,96±0,3	0,51±0,1	47	16,81±0,2	18,90±1,3
E3	3,0	23	4,5	11,24±2,6	0,37±0,0	10,21±1,1	0,97	4,51	2,5	0,96±0,1	0,74±0,4	23	19,77±0,3	20,86±0,3
E4	5,0	23	4,5	16,29±0,5	1,02±0,1	3,74±0,4	0,99	5,34	2,5	2,11±0,3	1,03±0,4	51	21,61±3,1	20,03±0,2
E5	3,0	7,0	7,5	2,35±0,0	0,52±0,0	9,88±0,2	0,98	5,73	0,5	1,09±0,1	0,54±0,1	50	17,06±1,2	17,37±0,1
E6	5,0	7,0	7,5	2,75±0,2	0,28±0,0	11,43±0,8	0,98	6,63	0,4	2,11±0,1	1,03±0,2	51	16,69±2,1	18,48±0,1
E7	3,0	23	7,5	27,39±1,2	1,72±1,1	15,0±0,5	0,99	4,96	6,1	0,89±0,1	0,49±0,3	45	19,67±0,4	20,88±0,4
E8	5,0	23	7,5	29,26±1,4	1,20±0,1	20,0±0,5	0,96	5,58	4,5	2,30±0,6	1,09±0,3	53	21,13±3,4	20,63±3,2
E9	2,3	15	6,0	15,66±1,1	1,56±0,3	15,41±0,8	0,98	5,53	4,1	1,39±0,8	0,74±0,5	47	20,35±3,0	18,64±0,5
E10	5,7	15	6,0	12,10±1,3	0,47±0,0	9,99±1,0	0,98	6,18	1,7	1,10±0,1	0,44±0,2	60	21,50±0,2	19,07±1,3
E11	4,0	1,5	6,0	0,01±5,2	0,01±0,0	8,52±0,3	0,98	7,34	0,0	0,30±0,1	0,25±0,1	17	16,37±1,2	17,25±0,3
E12	4,0	28,5	6,0	20,75±1,7	1,46±0,1	19,61±0,4	0,96	5,10	3,8	3,43±0,8	1,13±0,1	67	20,91±0,8	32,82±0,3
E13	4,0	15	3,5	14,90±0,6	2,48±0,5	14,89±0,6	0,97	5,05	2,7	1,99±0,4	0,88±0,5	56	18,55±0,8	19,14±1,1
E14	4,0	15	8,5	13,85±0,7	0,82±0,0	9,86±0,7	0,98	5,37	2,5	1,68±0,2	0,94±0,4	44	18,63±1,3	20,44±0,5
E15	4,0	15	6,0	19,69±6,9	0,76±0,1	12,80±1,3	0,95	5,43	3,6	1,60±0,3	0,80±0,4	50	17,73±1,4	18,90±0,4
E16	4,0	15	6,0	17,51±3,0	0,95±0,5	13,69±1,1	0,96	5,43	3,2	1,60±0,3	0,80±0,4	50	17,73±1,4	18,90±0,4
E17	4,0	15	6,0	15,69±0,3	1,63±0,1	12,47±0,3	0,99	5,43	2,9	1,60±0,3	0,80±0,4	50	17,73±1,4	18,90±0,4
Validação	4,0	29,8	8,98	48,47±2,2	4,69±0,6	17,35±0,6	0,97	4,80	8,8	3,25±0,2	1,58±0,3	51	22,82±0,0	22,16±0,0
Não-otim.	2,0	15	7,0	13,31±0,7	1,27±0,2	4,60±1,0	0,94	5,30	3,9	1,25±0,1	0,73±0,1	42	21,76±0,1	19,21±0,1

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*, mmol H₂.L⁻¹), Produção específica= mmol H₂.g⁻¹ STV (inóculo autóctone + alóctone), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*, mmol H₂.h⁻¹), tempo de início da obtenção de H₂ (λ , h). As barras de erros (\pm) correspondem ao desvio padrão calculado em cada condição.

Em relação à concentração de substrato, Desvaux (2005) indica que este parâmetro é relevante para a fermentação da biomassa lignocelulósica, uma vez que microrganismos celulolíticos devem aderir ao substrato para poder hidrolisá-lo, o que justifica as altas concentrações de resíduos sólidos de citros nas condições otimizadas (29,8 g.L⁻¹). Além disso, altas concentrações de substrato tem como consequência o aumento da concentração de carboidratos solúveis prontamente assimiláveis, resultando em rápida hidrólise e maior acúmulo de AOV (JIANG et al., 2018).

Sabe-se que altas concentrações de AOV ionizados no ambiente podem levar ao acúmulo excessivo de ânions no citoplasma, e a acidificação pode ocorrer devido aos AOV que atravessam livremente a membrana celular e se dissociam dentro da célula, diminuindo a força motriz de prótons através da membrana, afetando o metabolismo celular e reduzindo seu potencial de crescimento (JIANG et al., 2018). A maior produção de AOV ao longo do tempo de operação teve como consequência diminuição do pH no final do período de operação e também o maior λ observado no ensaio otimizado (17,35 h, pH 4,80), quando comparado com o ensaio não otimizado (4,60 h, pH 5,30). Provavelmente, seja necessário tempo maior de adaptação para as bactérias consumidoras de AOV e produtoras de H₂ (JIANG et al., 2018); além disso, a elevada recalcitrância da celulose e a toxicidade da lignina e seus derivados podem afetar a atividade hidrolítica, uma vez que as enzimas celulolíticas podem ficar adsorvidas irreversivelmente na lignina dissolvida (MASIH-DAS; TAO, 2018).

A partir da análise dos AOV produzidos ao longo das diferentes condições operacionais estudadas nos ensaios de DCCR (Figura 5.35), é possível notar que os principais metabólitos produzidos foram HAc e HBU. Nas condições operacionais do reator R8 reator foram observadas as maiores concentrações destes compostos, sendo 2.244 mg.L⁻¹ de HAc e 1.683 mg.L⁻¹ de HBU ao final do período operacional (35 h). Vale ressaltar que, no mesmo ensaio, foi observada a maior concentração de H₂ (29,26 mmol H₂.L⁻¹). Da mesma forma, os principais AOV observados nos demais reatores com maior concentração de H₂ ($P \geq 20$ mmol H₂.L⁻¹) foram HAc e HBU, como em R12 (20,75 mmol H₂.L⁻¹, 797 mg HAc.L⁻¹ e 3.181 mg HBU.L⁻¹) e R07 (27,39 mmol H₂.L⁻¹, 1.228 mg HAc.L⁻¹ e 1.815 mg HBU.L⁻¹). Todos os ensaios mencionados foram operados com resíduo sólido de citros acima de 20 g.L⁻¹ e pH acima de 7,0.

As maiores concentrações de HPr e HVal foram observadas em R3 (1.353 e 691 mg.L⁻¹, respectivamente). Sob tais condições, foram obtidas concentrações máximas de $P=11,24$ mmol H₂.L⁻¹, devido à produção concomitante de HAc (2.713 mg.L⁻¹). É possível inferir que a elevada produção de AOV tenha ocorrido devido ao menor pH deste ensaio (4,5) e maior concentração de substrato utilizada (23 g.L⁻¹). Além disso, foi possível observar produção de EtOH em R4, onde foi aplicada a mesma concentração de substrato e mesmo pH, sendo observada P de 16,29 mmol H₂.L⁻¹ para essas condições.

O reator R5 foi operado com maior pH (7,5) e menor concentração de substrato (7 g.L⁻¹), sendo que o principal composto orgânico produzido ao longo do tempo operacional foi o EtOH (2.777 mg.L⁻¹). Neste ensaio, foi observada uma das menores produções de H₂ ($P=2,35$ mmol H₂.L⁻¹), provavelmente devido ao predomínio da via solvetogênica (ŁUKAJTIS et al., 2018).

No ensaio de otimização, os principais metabólitos observados foram HBU (3.731 mg.L⁻¹) e HAc (3.516 mg.L⁻¹). A concentração de HBU em condições otimizadas foi superior à observada no reator não otimizado (1.317 mg.L⁻¹). Além disso, as concentrações de EtOH e HPr foram sutilmente superiores no reator otimizado (188 e 324 mg.L⁻¹) quando comparado com o não otimizado (116 e 209 mg.L⁻¹).

Sabe-se que a produção de HPr não é favorável à obtenção de H₂, sendo inclusive um indicador de inibição da digestão anaeróbia (XING et al., 2020). Entretanto, em nenhum dos experimentos foram obtidas concentrações superiores ao limite inibitório, de 1.000 mg.L⁻¹ (SHEN et al., 2018). Além disso, o HPr pode ser convertido em HAc, com concomitante obtenção de H₂ (Equação 5.6) (MAZARELI et al., 2019).



Woo, Charles e Kwonsu (2015) otimizaram a produção de AOV a partir de palha de arroz como substrato em reatores em batelada. Os autores concluíram a partir da superfície de resposta obtida que as variáveis temperatura, concentração de substrato e pH inicial foram significativas no processo de fermentação, com produção máxima de AOV de 12,37 g.L⁻¹ a 39,23 °C, 52,23 g.L⁻¹ de substrato e pH 10. Assim como no presente estudo, os autores observaram que a interação entre as variáveis temperatura e concentração de substrato não foi significativa ($p \geq 0,05$).

5.5.2 Caracterização microbiana

Ao final do período de incubação em condições otimizadas, a comunidade microbiana foi comparada com amostras do inóculo alóctone utilizado, a partir da técnica de metagenômica *shotgun*. Esta abordagem teve como objetivo obter informações sobre os mecanismos de fermentação do resíduo sólido de citros e obtenção de H₂, identificando os microrganismos e as vias metabólicas envolvidas no processo. As anotações taxonômicas e funcionais foram atribuídas a cada gene detectado, permitindo uma análise taxofuncional das comunidades microbianas.

Após a análise das leituras via *fastp* e ordenação via *fastQC* foi possível obter análise estatística global das sequências (Tabela 5.19). O tamanho médio das sequências foi de 150 pares de bases (pb), conforme esperado via aplicação da plataforma *Illumina HiSeq*. Nota-se que a proporção entre os quatro pares de bases foi satisfatória, ou seja, manteve-se proporcionalidade. Além disso, nenhuma cauda de *PoliG* ou *PoliX*, comum neste tipo de sequenciamento foi detectada (CHEN et al., 2018).

Para evitar que a abundância de determinadas sequências seja superestimada, espera-se que a taxa de duplicação seja baixa, em uma biblioteca diversificada e sem qualquer tipo de contaminação ou viés (EWELS et al., 2016). Vale ressaltar que a análise em *fastQC* não suporta dados emparelhados, sendo que a detecção é feita a partir de cada leitura individual, o que pode resultar em superestimativa da taxa de duplicação. Assim, esse parâmetro foi considerado satisfatório para todas as amostras analisadas, uma vez que ocorreram apenas leituras $\geq 85\%$ em todas as amostras. Além disso, é possível notar que a maioria das sequências apresenta baixo índice de duplicação.

O número de bases “N” é outro parâmetro importante para a análise da qualidade das sequências, ou seja, posições com bases desconhecidas e substituídas por N, que podem comprometer a confiabilidade dos dados gerados. A quantidade esperada de bases N em uma amostra foi abaixo de 5% (EWELS et al., 2016), e todas as amostras analisadas foram consideradas dentro da faixa esperada, e para apenas uma amostra bruta (Amostra 2) verificou-se 0,22% de bases N, enquanto nas demais amostras, não foram observadas. Além disso, as sequências brutas foram filtradas usando a ferramenta *fastp*. O conteúdo dos adaptadores das sequências obtido foi considerado de boa qualidade, ou seja, representam menos de 5% do total das sequências.

Em suma, é possível concluir que as sequências obtidas estão dentro dos padrões considerados nas etapas de controle de qualidade, como por qualidade de sequência de base,

por *score* de qualidade de sequência, conteúdo de sequência de base, conteúdo de base citosina-guanina (GC), conteúdo GC, conteúdo por base N, distribuição de comprimento de sequência, nível de duplicação de sequência, sequências super-representadas e conteúdo do adaptador.

Por meio da análise dos índices ecológicos (Tabela 5.20), foi possível comparar os valores obtidos para amostras de biomassa em condições otimizadas e inóculo. O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') leva em consideração o número de taxons e sua dominância, indicando maior diversidade nas amostras de inóculo ($H' = 6,0$) em comparação aquelas do ensaio otimizado ($H' = 2,7$). A partir do índice de Simpson, foi possível observar que menor dominância ocorreu nas amostras do ensaio otimizado (0,8), em relação à biomassa do inóculo (1,0), provavelmente devido à seleção das populações após a aplicação das condições otimizadas, o que levou ao aumento da dominância e consequentemente diminuição da diversidade.

A riqueza das amostras foi comparada por meio do índice Chao-1 e número observado de táxons, sendo possível observar maior riqueza e número de táxons para a amostra de inóculo (10.204,6 e 10.202, respectivamente) em comparação às amostras das condições otimizadas (9.222,7 e 8.216, respectivamente). Vale salientar que a diferença entre os valores de riqueza calculados via Chao-1 e o número Observado refere-se à correção da variância adotado no cálculo do primeiro índice, uma vez que se assume que o número de observações para um táxon tem uma distribuição de Poisson (distribuição de probabilidade de variável aleatória discreta) e corrige sua variância. Desta forma, os valores de Chao-1 são ligeiramente maiores em relação ao número observado de táxons, uma vez que este índice é calculado como $Chao-1 = S_0 + a_0$, onde S_0 é o número de táxons observados ao menos uma vez em na amostra, e a_0 é a inferência do número desconhecido de táxons presente na comunidade, mas que não foi observado nas amostras (HUGHES et al., 2001). Além disso, para a variação estimada por meio do erro padrão (Chao-1 *se*), verificou-se boa reprodutibilidade, tanto para as amostras de inóculo (*se*= 3.2, 10.198, 10.199 e 10.209), quanto para as amostras do ensaio otimizado (*se*= 84,5, 7.708, 8.140 e 8.800).

Tabela 5.19. Parâmetros estatísticos e de qualidade para as sequências brutas e filtradas obtidas a partir do inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio otimizado (Amostra 4-6).

Parâmetros	Amostras					
	Inóculo			Otimizado		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
	reads brutos					
Total reads	17.290.172	12.526.754	19.814.318	10.345.642	9.309.040	16.350.010
Tamanho médio (pb)	150	150	150	150	150	150
Duplicação <i>foward</i> (%)	9,0	12,0	11,2	12,7	12,4	14,4
Duplicação <i>reverse</i> (%)	7,7	11,5	6,4	12,1	11,9	12,9
GC <i>foward</i> (%)	43	44	43	32	32	32
GC <i>reverse</i> (%)	43	44	43	32	32	33
Falha <i>foward</i> (%)	8	9	8	9	9	17
Falha <i>reverse</i> (%)	17	9	17	9	9	17
Total de sequencias (milhões)	8,6	6,3	9,95	5,2	4,7	8,2
	reads filtrados					
Total	16.921.042	12.473.842	19.084.252	10.314.652	9.288.216	15.850.520
Mapeadas	12.254.406	8.801.212	13.999.335	7.176.259	6.406.724	10.980.601
Filtradas	11.533.978	8.223.774	13.178.577	7.015.467	6.250.879	10.701.743
Duplicação (%)	8,2	13,3	8,0	11,7	12,3	16,2
GC (%)	43,3	44,3	43,7	32,0	32,8	32,8
<i>reads</i> filtrados (%)	97,9	99,6	96,3	99,7	99,8	96,9
Adaptadores removidos (%)	0,4	0,4	0,4	1,0	0,7	0,9
	Montagem					
<i>contigs</i> (total)	78.123		Comprimento total	289.363.813	N50	6.819
<i>contigs</i> (≥ 0 pb)	78.123		≥ 0 pb	289.363.813	N75	2.191
<i>contigs</i> (≥ 1.000 pb)	78.123		≥ 1.000 pb	289.363.813	L50	6.406
<i>contigs</i> (≥ 5.000 pb)	9.331		≥ 5.000 pb	161.611.757	L75	26.860
<i>contigs</i> (≥ 1.0000 pb)	3.949		≥ 10.000 pb	124.512.722	GC (%)	46,52
<i>contigs</i> (≥ 25.000 pb)	1.250		≥ 25.000 pb	83.880.261	N	0
<i>contigs</i> (≥ 50.000 pb)	478		≥ 50.000 pb	57.094.463	N's/100 kpb	0
Maior <i>contig</i>	932.907					

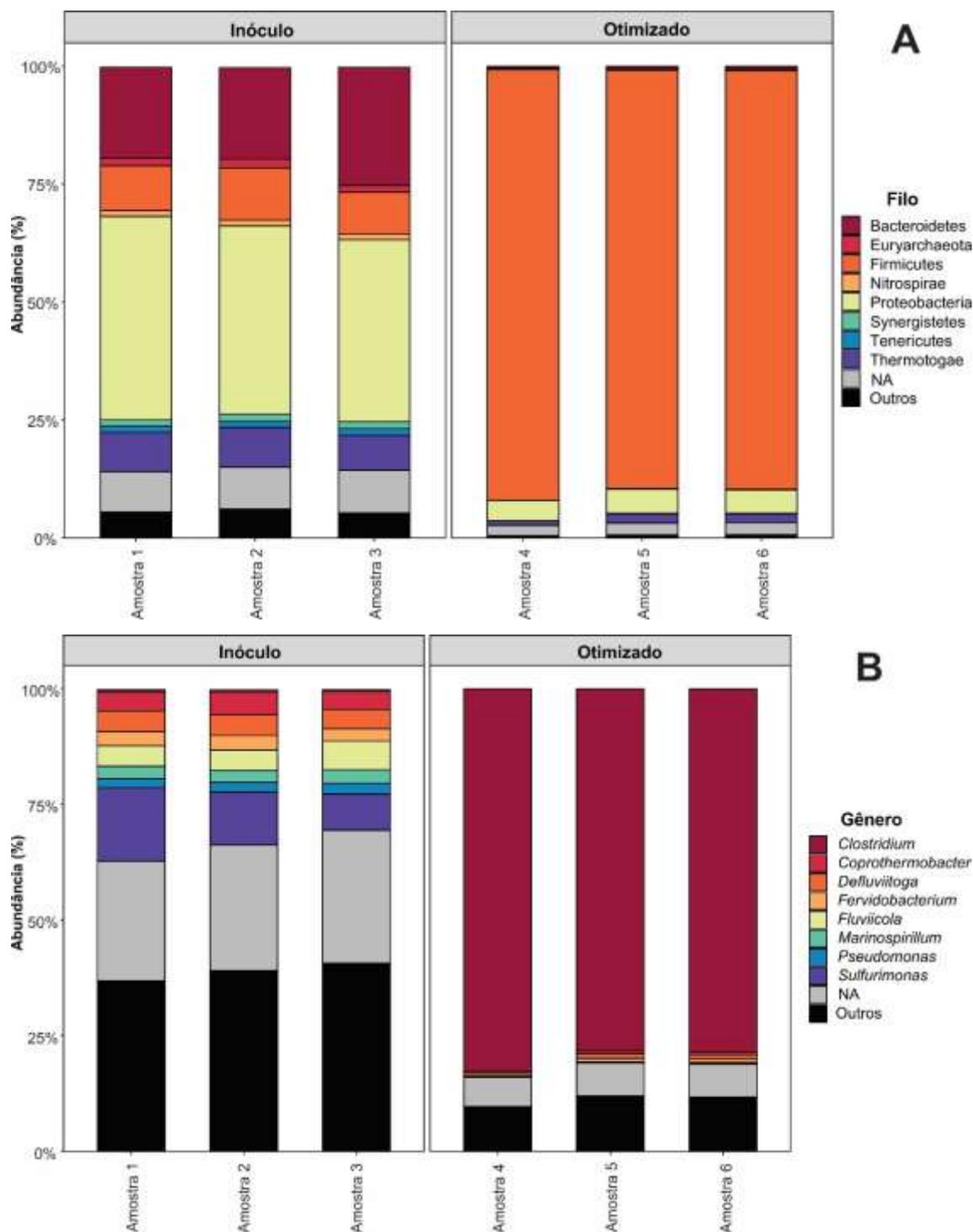
Tabela 5.20. Índices ecológicos (Observado, Chao-1, Shannon-Wiener e Simpson) para sequências filtradas obtidas a partir do inóculo (Amostras 1-3) e ensaio otimizado (Amostras 4-6). *se* = Erro Padrão calculado a partir de triplicatas.

Índice ecológico	Amostras	
	Inóculo	Otimizado
Observado	10.202	8.216
Chao-1	10.204,6	9.222,7
Chao-1 (<i>se</i>)	3,2	84,5
Shannon-Wiener	6,0	2,7
Simpson	1,0	0,8

As variações na comunidade microbiana após a otimização foram analisadas para diferentes níveis taxonômicos. O conjunto de dados foi associado a 3 domínios diferentes (Archaea, Bacteria, Eukaryota) e Vírus, 163 filios, 466 ordens, 423 classes, 848 famílias e 2581 gêneros. Proteobacteria (40,51%), Bacteroidetes (21,24%), Firmicutes (9,76%) e Thermotogae (8,04%) foram os filios mais abundantes no inóculo. Nas amostras do ensaio otimizado verificou aumento da dominância de Firmicutes (89,54%), enquanto a abundância dos demais filios citados diminuiu drasticamente (4,78; 0,55 e 1,57%, respectivamente) (Figura 5.36).

As bactérias do filo Firmicutes são conhecidas principalmente por suas relações sintróficas em reatores anaeróbios, bem como pela produção e degradação de ampla diversidade de AOV, como HAc e HBU (YUTIN; GALPERIN, 2013). Os principais metabólitos obtidos nos reatores otimizados foram HAc (3516 mg.L⁻¹) e HBU (3731 mg.L⁻¹). Woo, Charles e Kwonsu (2015) aplicaram DCCR a fim de otimizar a produção de AOV a partir da palha de arroz, e verificaram que as variáveis temperatura (39,23 °C), concentração de substrato (52,23 g.L⁻¹) e pH inicial (10) foram significativas na obtenção da concentração máxima de AOV (12370 mg.L⁻¹). Assim como no presente estudo, os autores relataram Firmicutes como o filo mais dominante nestas condições.

Figura 5.36. Abundância relativa dos filos (A) e gêneros (B) de bactérias mais abundantes no inóculo (Amostras 1-3) e amostras otimizadas (Amostras 4-6). NA = não identificado. As abundâncias relativas foram calculadas considerando o número total de leituras pré-processadas nas amostras.



Consistente com os valores do índice ecológico, maior diversidade foi observada nas amostras de inóculo em comparação com aquelas obtidas do ensaio de otimização. Vários gêneros foram identificados no inóculo em abundâncias médias semelhantes, como *Coprothermobacter* (4,32%), *Defluviitoga* (4,36%), *Fervidobacterium* (2,93%), *Fluviicola*

(5,01%), *Marinospirillum* (2,75%), *Pseudomonas* (2,14%) e *Sulfirimonas* (11,68%). Em relação ao ensaio de otimização ficou evidente forte seleção do gênero *Clostridium*, cuja abundância relativa foi de 0,43% no inóculo a 79,78% nas amostras dos reatores otimizados. Além disso, foi observado ligeiro aumento na abundância relativa de *Paraclostridium*, de $\leq 0,01\%$ no inóculo para 1,93% nos reatores otimizados.

Organismos do gênero *Clostridium* são bacilos Gram-positivos que possuem metabolismos diversos, produzem AOV e álcoois (HBu, HAc, HLac, HFor e EtOH) a partir de carboidratos, peptonas e outros compostos orgânicos (YUTIN; GALPERIN, 2013). Rabelo et al. (2018), identificaram várias espécies da ordem Clostridiales em reatores anaeróbios aplicados na obtenção de H₂ a partir de resíduo lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar). As espécies identificadas pelos autores supracitados foram *Paraclostridium bifermentans* (anteriormente *C. bifermentans*), *Ruminiclostridium cellobioparum* (anteriormente *C. cellobioparum*), *R. cellulolyticum* (anteriormente *C. cellulolyticum*) e *C. sartagoforme*.

C. beijerinckii, uma das espécies frequentemente identificada em reatores anaeróbios, tem sua fisiologia ainda pouco compreendida, mas sabe-se que é capaz de produzir HAc, HBu, EtOH, isopropanol e acetona em diferentes condições operacionais (FONSECA et al., 2019). Esta espécie pode consumir diversos açúcares, como glicose, amido, xilose, celobiose, e não apresenta preferência entre glicose e xilose como substrato, podendo consumi-los simultaneamente (CEBREIROS; FERRARI; LAREO, 2019), o que é relevante para a presente pesquisa, uma vez que a xilose é um dos principais monômeros em resíduos sólidos de citros (CHOI et al., 2015).

De acordo com Gomez-Flores et al. (2017), *C. beijerinckii* não é capaz de hidrolisar celulose. No entanto, Cebreiros et al. (2019) relataram produtos de hidrólise de celulose levando à produção de butanol (4,2 g.L⁻¹), usando uma cepa *C. beijerinckii* DSM6423 após pré-tratamento enzimático de serragem de eucalipto como substrato principal. No presente estudo, não foi observada produção de butanol, provavelmente devido às diferentes condições operacionais aplicadas. Deve-se destacar que Cebreiros et al. (2019) utilizaram uma cepa isolada, ou seja, sem interações sintróficas, importantes uma vez que essas interações podem determinar as principais vias de fermentação de *C. beijerinckii* (GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2017), levando à acetogênese em vez de solvetogênese.

A despeito dos poucos estudos relacionando a capacidade de *C. beijerinckii* em produzir H₂ (GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2017; WU et al., 2019), *C. butyricum*, é amplamente conhecida por ser produtora de H₂ em reatores anaeróbios pela conversão de açúcares em H₂, pela via glicolítica, ou alternativamente, H₂Lac e H₂Ac também podem ser convertidos em H₂ (DETMAN et al., 2019). Neste estudo foram observadas concentrações de H₂ de 3.731 mg.L⁻¹ ao longo do tempo operacional, provavelmente devido à conversão de monômeros solúveis.

A maioria das espécies de *Clostridium* são capazes de hidrolisar pectina (YUTIN; GALPERIN, 2013), um dos componentes dos resíduos de citros, ressaltando a sua alta abundância relativa no ensaio otimizado. Além disso, a biotina é a única vitamina exigida por *Clostridium* (YUTIN; GALPERIN, 2013), e os produtos derivados da levedura são ricos em biotina, como o extrato de levedura, componente do meio PCS utilizado nesta pesquisa, favorecendo o crescimento de *Clostridium*.

Resultados semelhantes foram observados por Villa-Montoya (2019), com maior abundância de *Clostridium* (88%) em pH $\geq 7,0$ e 30 °C, durante a obtenção de H₂ a partir dos resíduos do processamento do café. Soares et al. (2018) também indicaram a partir do bagaço da cana-de-açúcar a predominância de *Clostridium* (33%) nas condições otimizadas (2,77 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5,84 g.L⁻¹ de cana-de-açúcar). Rabelo et al. (2018) identificaram *Paraclostridium bifermentans* (62,69%) como um dos principais gêneros em reatores otimizados (7,0 g.L⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar e pH 7,2) e concentração de 23,10 mmol H₂.L⁻¹. No presente estudo, houve abundância relativa de *Clostridium* de até 79,78% nas condições otimizadas.

Nas condições não otimizadas (15 g.L⁻¹ de resíduo *in natura*, 2 gSTV.L⁻¹ de inóculo alóctone, pH 7,0, 30 °C e meio de cultura PCS), foi possível observar menor abundância relativa de *Clostridium* (18,67%) com 15 g.L⁻¹ de resíduo sólido de citros *in natura*, 2 g.L⁻¹ de inóculo alóctone, 37 °C e meio de crescimento PCS em pH inicial de 7,0. Nestas condições, 13,31 mmol H₂.L⁻¹ e 4.355 mg.L⁻¹ de H₂Ac foram obtidos. Provavelmente, as condições aplicadas aos reatores otimizados (4 gSTV.L⁻¹ de inóculo, 29,8 g.L⁻¹ de substrato e pH 8,98) foram favoráveis para este gênero cuja abundância relativa observada foi de 79,78%.

Coprothermobacter foi identificada em abundância relativa de 4,32% no inóculo e $\leq 0,01\%$ para as amostras otimizadas. Soares et al. (2017) usaram inóculo semelhante (lodo de reatores UASB aplicado ao processamento termofílico da vinhaça de cana-de-açúcar)

do presente estudo e observaram 41,73% de abundância relativa para o inóculo. Da mesma forma, a abundância relativa de *Defluviitoga* foi reduzida (4,36 para $\leq 0,01\%$, respectivamente), nas amostras do inóculo e reator otimizado, respectivamente. Tais gêneros são identificados em reatores aplicados à digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos, como silagem de milho e cevada, mas tem afinidade com temperaturas termofílicas (55 °C) (MAUS et al., 2015).

Coprothermobacter é comumente associada à atividade hidrolítica devido à produção de proteases extracelulares, com concomitante obtenção de H₂, majoritariamente via acetogênese, que atua como um dos principais responsáveis pela transferência de elétrons entre estas bactérias e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (TANDISHABO et al., 2012; GAGLIANO et al., 2015). Entretanto, de acordo com Tandishabo et al. (2012), a abundância deste gênero em reatores não está associada apenas à termodinâmica de produção de H₂ no sistema, mas principalmente com as características do resíduo utilizado como substrato. Desta forma, é possível inferir, que além da faixa de temperatura aplicada na presente pesquisa (30 °C) destoar da faixa ótima de crescimento deste gênero (55 °C), provavelmente um dos motivos para a redução de sua abundância relativa nos ensaios otimizados foi o maior teor de carboidratos e menor teor de proteínas (58 g.kg⁻¹) nos resíduos sólidos de citros, por se tratar de biomassa lignocelulósica (MAMMA; CHRISTAKOPOULOS, 2014).

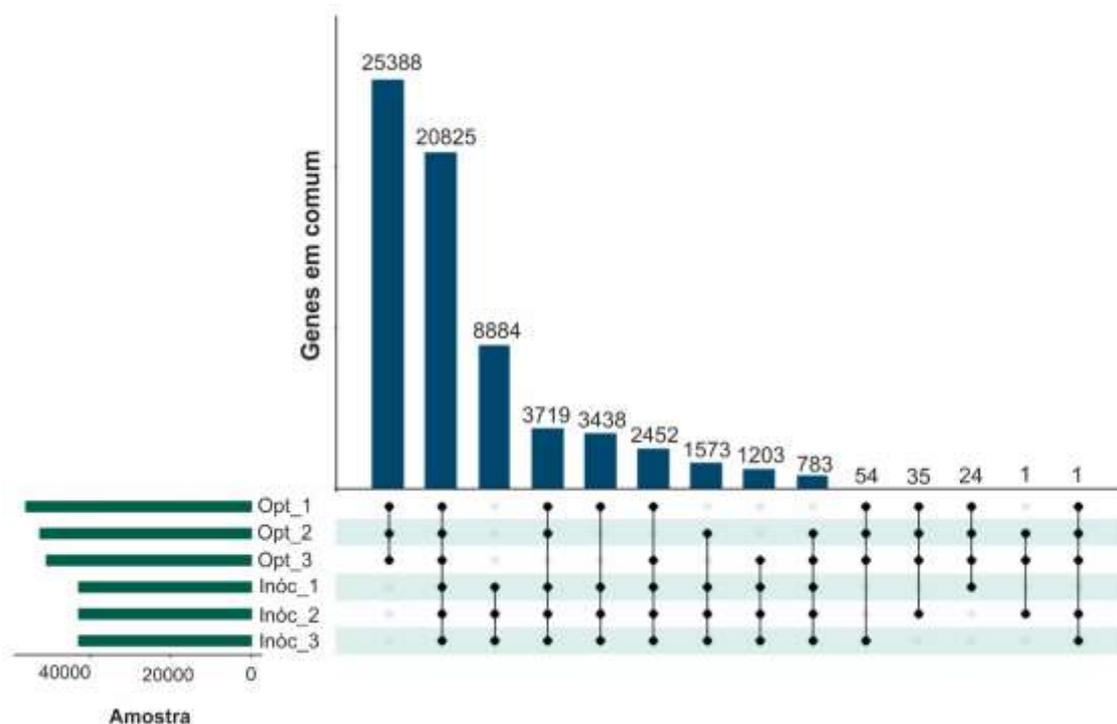
Defluviitoga, apesar de também ser considerada como um gênero majoritariamente proteolítico, pode consumir diferentes carboidratos na ausência de proteínas, como arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, sacarose, xilose, celulose, entre outros, sendo H₂, CO₂, HAc e EtOH os principais produtos finais de sua atividade fermentativa (HANIA et al., 2012; MAUS et al., 2016). Desta forma, é possível inferir que, neste caso, os reatores em condições otimizadas não foram favoráveis aos organismos deste gênero quando comparados ao inóculo, principalmente, senão unicamente, devido à temperatura utilizada, uma vez que Hania et al. (2012) indicam que não há crescimento de *Defluviitoga* a 30 °C, enquanto o inóculo provém de reator operado a 55 °C, dentro da faixa de crescimento ótima deste gênero.

5.5.2.1 Anotação funcional e mapeamento de vias metabólicas

Após a anotação de genes e comparação entre as diferentes amostras, foi possível observar boa reprodutibilidade entre as repetições biológicas, uma vez que houve agrupamento entre as amostras de inóculo (8.884 genes em comum) e as amostras de biomassa dos reatores otimizados (25.388 genes em comum) (Figura 5.37).

Vale ressaltar que, devido à homologia, diferentes genes podem expressar os mesmos número KO, especialmente quando se trata de amostra composta/consórcio. Além disso, existem mais genes em comum entre as amostras do reator otimizado devido ao maior domínio e maior Chao-1 tornando-se mais distintos em relação as amostras do inóculo (genes mais exclusivos).

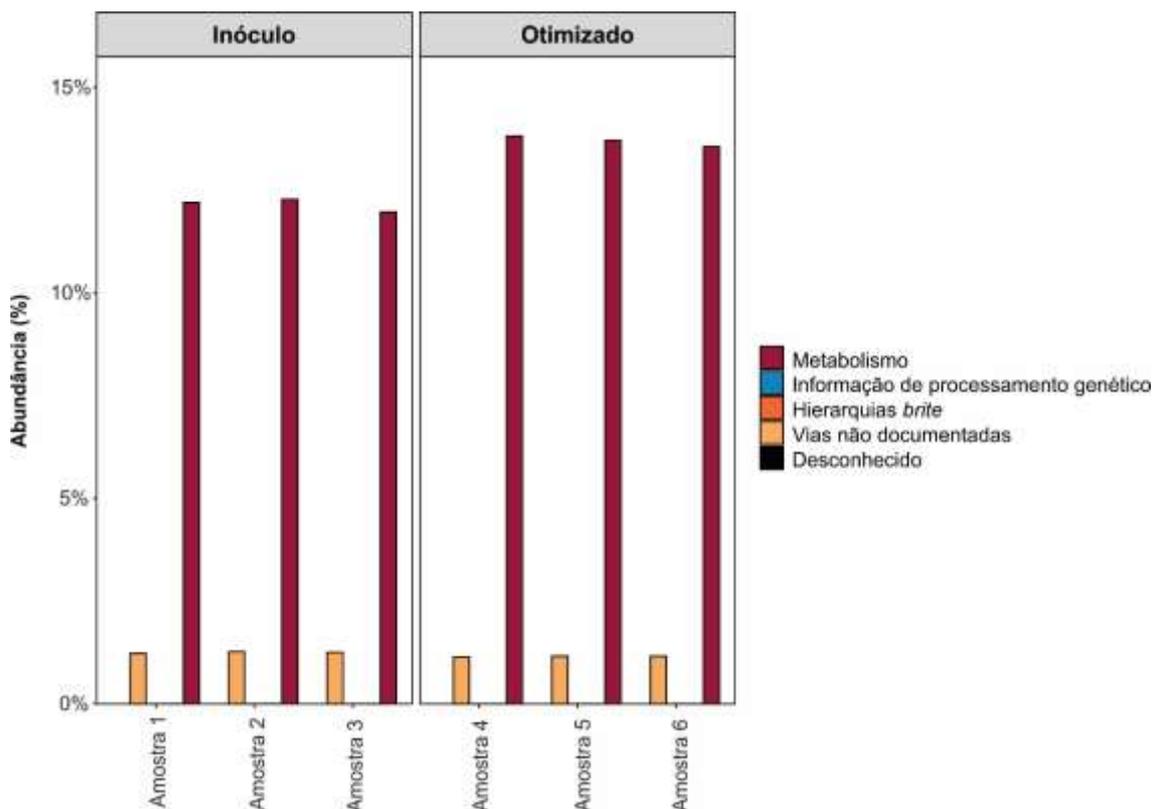
Figura 5.37. Visão geral do número de genes para todos os níveis metabólicos entre as amostras analisadas e suas interseções por meio do gráfico Upset.



Metabolismo foi o primeiro nível mais abundante (12,15 e 13,70%) (Figura 5.38) entre as categorias de KEGG, às quais os genes identificados puderam ser atribuídos, tanto para o inóculo, quanto para as amostras do ensaio otimizado, respectivamente. Nenhuma categoria KEGG foi atribuída para 78,90% das amostras do inóculo e 83,50% das amostras do ensaio otimizado. Vale ressaltar que a impossibilidade de aumentar a porcentagem de genes anotados com sucesso é uma limitação atual da metagenômica, uma vez que baixos

percentuais podem levar ao entendimento incompleto da taxonomia e do potencial funcional da comunidade microbiana.

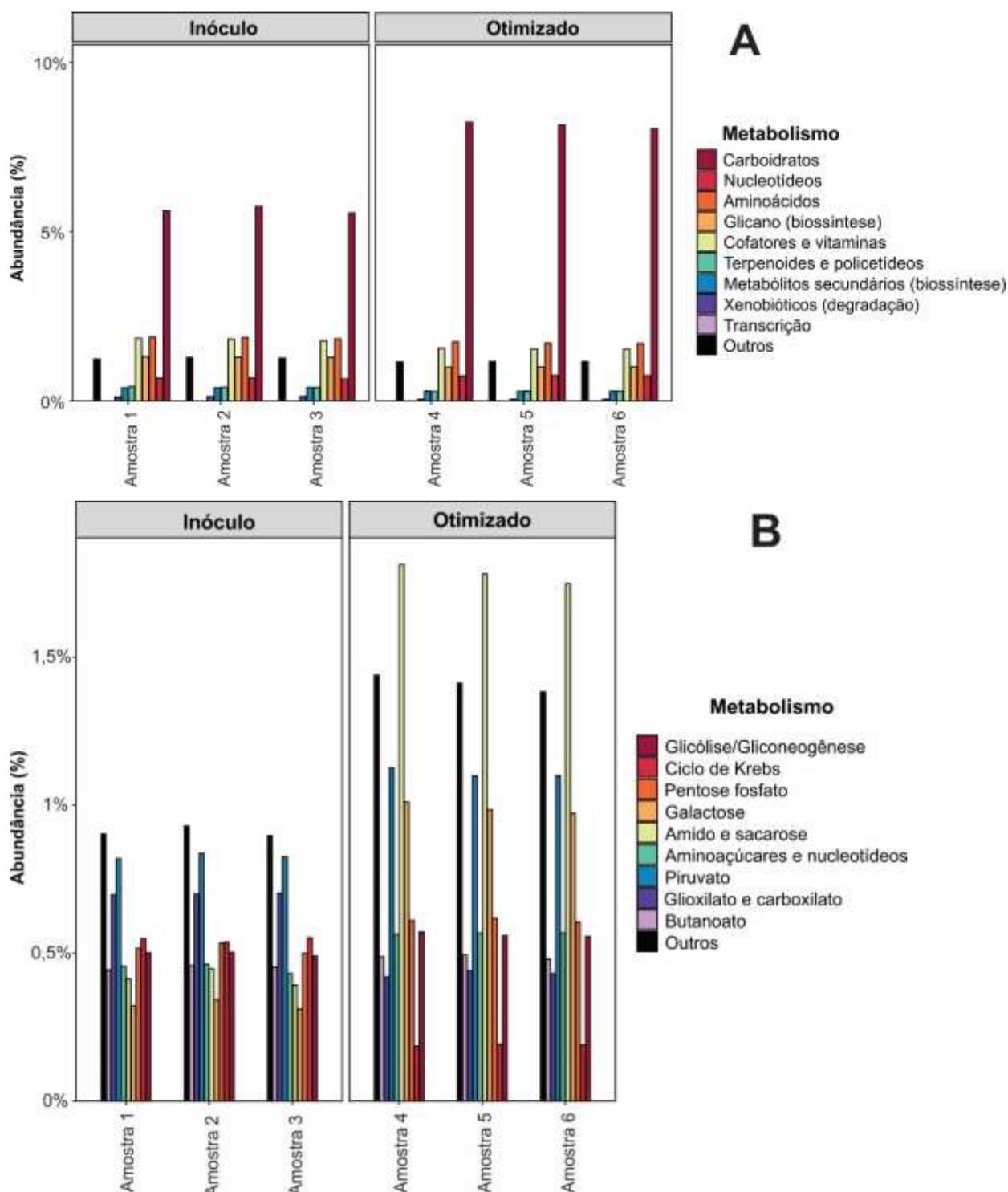
Figura 5.38. Abundância relativa das vias metabólicas predominantes nas amostras de inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio otimizado (Amostras 4-6) para os níveis de KEGG.



Na categoria Metabolismo, as principais vias observadas foram relacionadas a carboidratos (5,64 e 8,14%), nucleotídeos (0,66 e 0,74%), aminoácidos (1,87 e 1,71%), biossíntese de glicano (1,29 e 0,99%), vitaminas e cofatores (1,84 e 1,54%), terpenóides e policetídeos (0,40 e 0,28%), metabólitos secundários (0,39 e 0,28%), entre outros (0,012 e 0,04%), para o inóculo e ensaio de otimização, respectivamente (Figura 5.39).

Uma vez que houve aumento apenas de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, apenas as vias metabólicas relacionadas a essa categoria foram consideradas para análises posteriores. Entre as principais vias, destacam-se glicólise e gliconeogênese (0,50 e 0,56%), ciclo de Krebs (0,55 e 0,19%), pentose fosfato (0,52 e 0,61%), galactose (0,32 e 0,99%), amido e sacarose (0,42 e 1,78%), aminoaçúcares e nucleotídeo (0,45 e 0,57%), piruvato (0,83 e 1,11%), glioxilato e dicarboxilato (0,70 e 0,43%), butanoato (0,45 e 0,49%), entre outros (0,91 e 1,41%), para o inóculo e as amostras do ensaio de otimização, respectivamente.

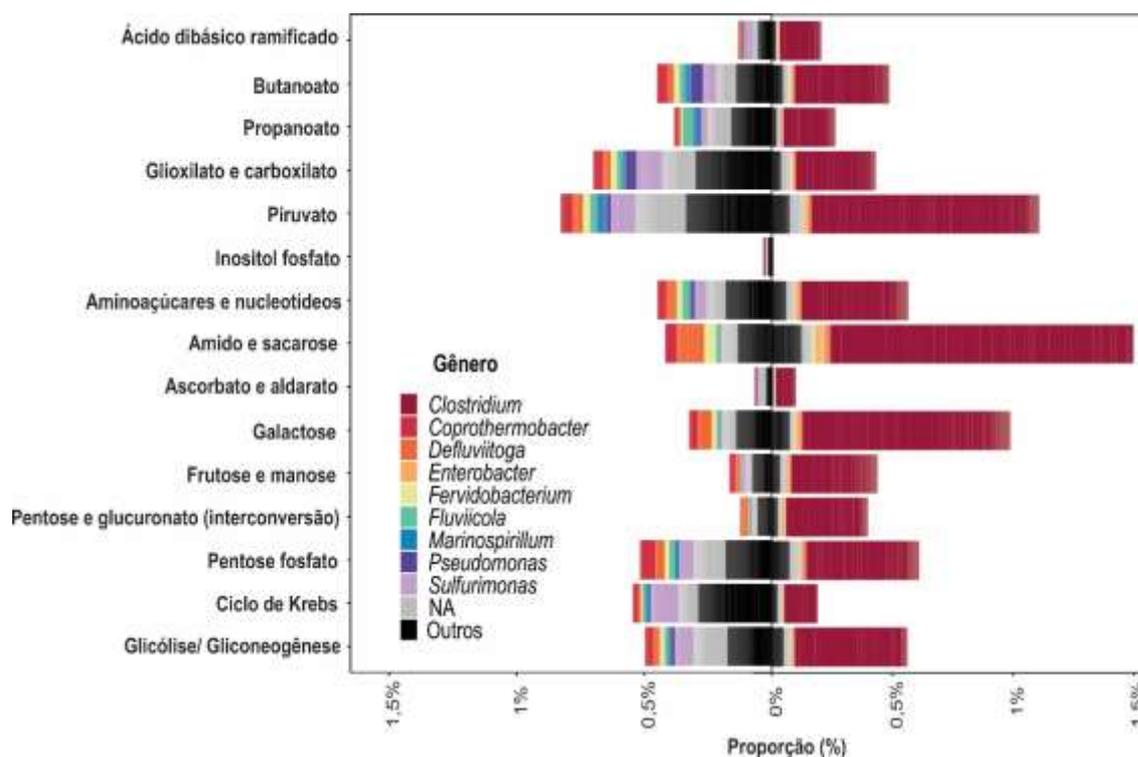
Figura 5.39. Abundância relativa das vias metabólicas predominantes nas amostras do inóculo (Amostras 1-3) e do ensaio de otimização (Amostras 4-6) para todos os níveis metabólicos (A) e filtradas para metabolismo de carboidratos (B).



Visivelmente, *Clostridium* foi o principal gênero associado ao aumento de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos. De fato, seu aumento foi observado na glicólise e gliconeogênese (0,18 a 83,93%), pentose fosfato (0,33 a 77,05%), galactose

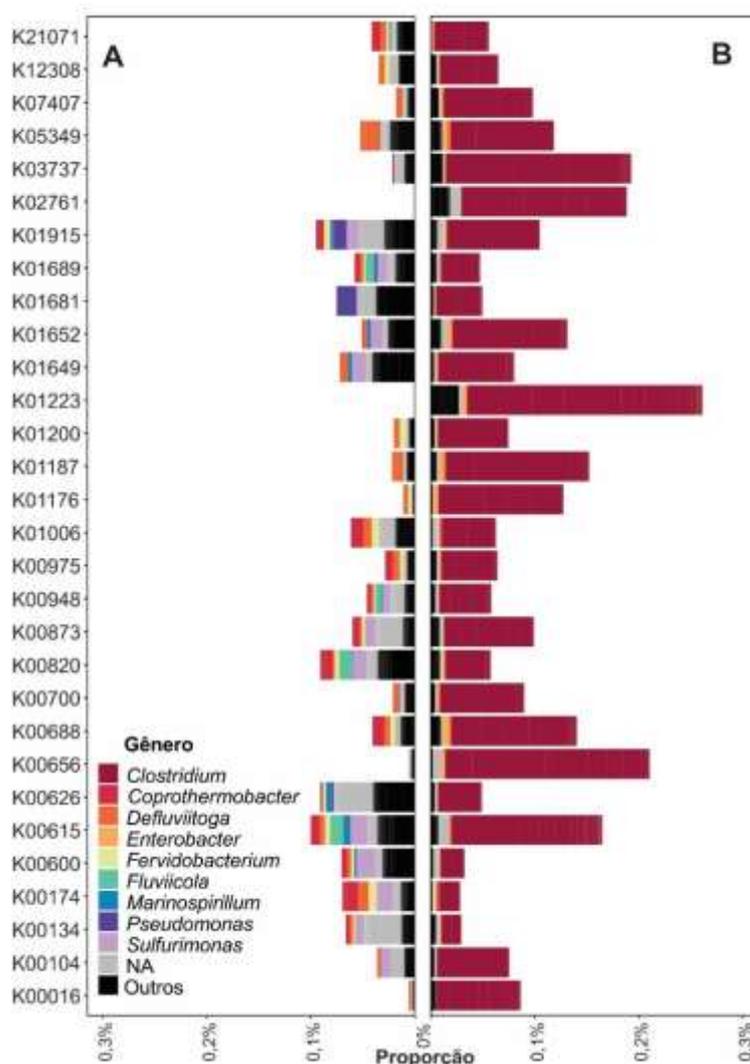
(0,10 a 86,87%), piruvato (0,90 a 84,68%) e, principalmente, metabolismos de amido e sacarose (1,69 a 86,52 %) (Figura 5.40).

Figura 5.40. Abundância relativa das vias metabólicas predominantes nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B) para a categoria de metabolismo de carboidratos, com as contribuições dos 10 gêneros mais abundantes. As proporções foram calculadas considerando as médias do número total de leituras pré-processadas em triplicata.



Da mesma forma, foram verificados os KO mais abundantes na categoria metabolismo de carboidratos (Figura 5.41), bem como os principais gêneros relacionados com cada um deles, principalmente aquelas com maiores proporções nas amostras do ensaio de otimização em relação ao inóculo. É possível notar que *Clostridium* foi o principal gênero relacionado a estas alterações nas condições otimizadas. K00615, uma transcetolase [EC: 2.2.1.1] envolvida na via da pentose fosfato, teve proporções de cerca de 0,10% no inóculo e 0,17% nas amostras do ensaio de otimização.

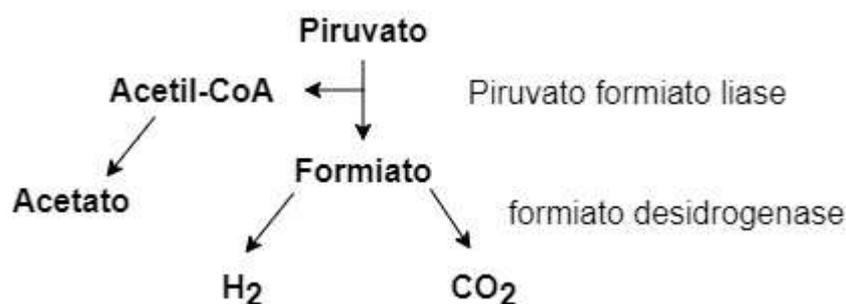
Figura 5.41. Proporção dos 30 KO mais abundantes nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B) para o metabolismo de carboidratos, com os 10 gêneros mais abundantes associados a estes KO. As proporções foram calculadas considerando o número total de leituras em triplicata.



Nota: K21071= fosfofrutoquinase dependente de ATP/fosfofrutoquinase dependente de difosfato, K12308= β -galactosidase, K07407= α -galactosidase, K05349= β -glicosidase, K03737= piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoreductase, K02761= componente EIIC do sistema PTS de celobiose, K01915= glutamina sintetase, K01689= enolase, K01681= aconitato hidratase, K01652= acetolactato sintase I/II/III, K01649= 2-isopropilmalato sintase, K01223= 6-fosfo- β -glicosidase, K01200= pululanase, K01187= α -glicosidase, K01176= α -glicosidase, K01006= piruvato, ortofosfato diquinase, K00948= ribose-fosfato pirofosfoquinase, K00873= piruvato quinase, K00820= frutose-6-fosfato transaminase, K00700= enzima de ramificação de 1,4- α -glicano, K00686= glicogênio fosforilase, K00686= glicogênio fosforilase C-acetiltransferase, K00615= transcetolase, K00600= glicina hidroximetiltransferase, K00174= 2-oxoglutarato/2-oxoácido ferredoxina oxidoreductase subunidade α , K00134= gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, K00104= glicolato desidrogenase, K00104= lactolato desidrogenase.

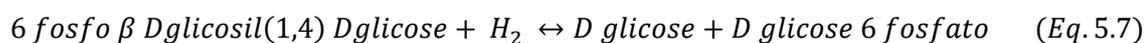
O K00656, formiato C-acetiltransferase [EC: 2.3.1.54] envolvido no metabolismo de piruvato (piruvato formiato liase), também foi observado em proporções mais altas nas amostras do ensaio de otimização (0,21%) do que no inóculo (0,01%). Esta enzima é importante na catálise da conversão da coenzima A em formiato e acetil-CoA em condições anaeróbias (SRIVASTAVA et al., 2017). A reação envolvendo K00656 é uma etapa intermediária na produção de ácido acético a partir de acetil-CoA, com produção concomitante de H₂ (SRIVASTAVA et al., 2017); geralmente associada a várias espécies de *Clostridium* (LEVIN et al., 2006). Nesta reação reversível, piruvato e CoA são convertidos em formiato e acetil-CoA que por sua vez, pode ser convertido pela formiato desidrogenase em H₂ e CO₂ (JIA et al., 2017) (Figura 5.42).

Figura 5.42. Ação da piruvato formiato liase na clivagem do piruvato em formiato e acetil-CoA.



Fonte: Modificado de Jia et al. (2017).

O K01223 foi um dos mais abundantes ($\leq 0,001\%$ e $0,26\%$, respectivamente no inóculo e ensaio de otimização). Este KO refere-se a uma hidrolase 6-fosfo- β -glicosidase [EC: 3.2.1.86] envolvida na glicólise (Equação 5.7). Esta enzima catalisa a hidrólise do monofosfato de celobiose (6-fosfo- β -D-glicosil-1,4-D-glicose) em D-glicose + D-glicose 6-fosfato. O mesmo KO foi observado em reatores em batelada aplicados à obtenção de H₂ a partir de substrato lignocelulósico (resíduo de processamento de café) por Villa-Montoya et al. (2020) e em condições operacionais semelhantes (reatores em batelada operadas a 30 °C em pH 7,0).

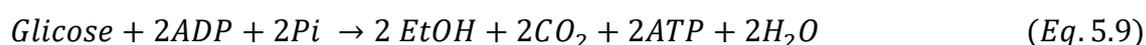
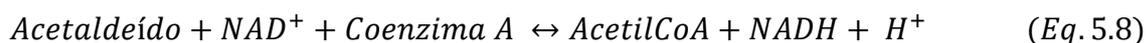


O K02761 é uma enzima do sistema de fosfotransferase (PTS) dependente de fosfoenolpiruvato de celobiose, relacionada com o metabolismo do amido e sacarose, e catalisa a fosforilação de açúcar com sua translocação através da membrana celular

(KEYHANI; BACIA; ROSEMAN, 2000). Este KO foi observado em porcentagens $\leq 0,001\%$ no inóculo e $0,19\%$ nas amostras do ensaio de otimização.

K03737 é uma piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoreductase [EC: 1.2.7.1, 1.2.7.-] e catalisa a interconversão entre piruvato e acetil-CoA. Esta enzima pode estar relacionada com o metabolismo de piruvato, propanoato e também butanoato (NAKAYAMA et al., 2013). Este KO foi observado em $0,02\%$ nas amostras de inóculo e $0,19\%$ nas amostras do ensaio de otimização. Além disso, ao analisar apenas os KO envolvidos em vias conhecidamente relacionadas à obtenção de H_2 (VILLA MONTOYA et al., 2020) (Figura 5.43), ficou claro que K03737 foi mais abundante e verificado em maior porcentagem nas amostras do ensaio de otimização.

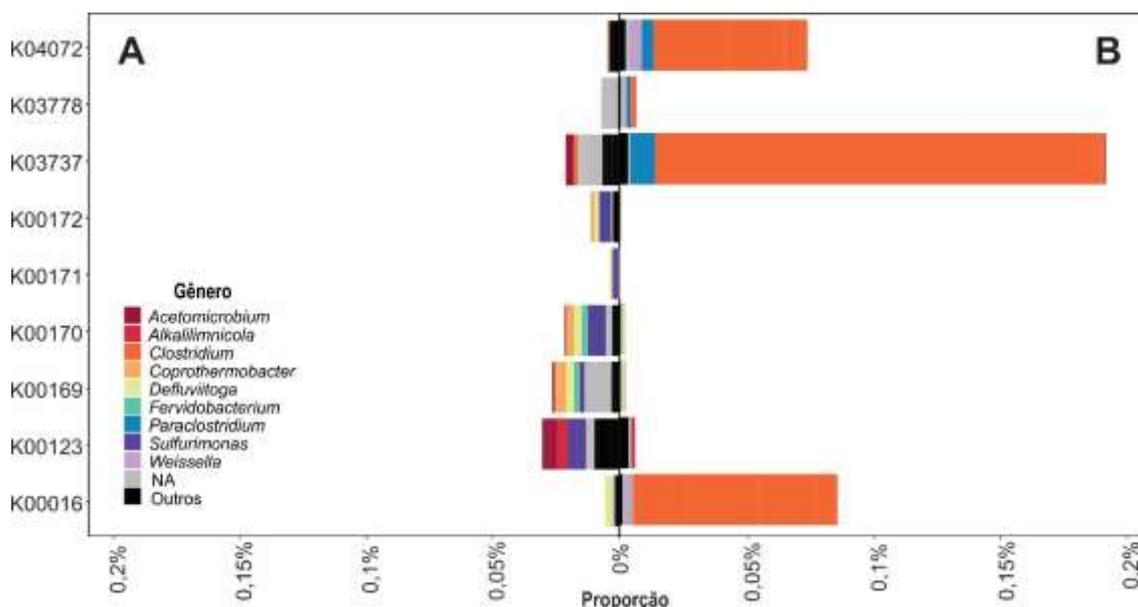
Outros KO relacionados com a produção de H_2 foram observados em maiores proporções nas amostras do ensaio de otimização, a saber: K04072 ($0,1\%$) e K00016 ($0,08\%$). K04072 é uma acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase [EC: 1.2.1.10, 1.1.1.1] envolvida em diversas vias, como glicólise, degradação de ácidos graxos, degradação de compostos aromáticos, metabolismo de piruvato e butanoato, entre outras. Estas desidrogenases podem catalisar a conversão de acetaldeído em ácido acético (Equação 5.8), além da fermentação de glicose em etanol e CO_2 (Equação 5.9) (GOODLOVE et al., 1989).



Finalmente, K00016 é uma L-lactato desidrogenase [EC: 1.1.1.27] que ativa as vias da glicólise/gliconeogênese e usual em todos os seres vivos. Segundo Villa-Montoya (2020), essa enzima poderia estar envolvida, tanto na síntese de ácido lático e álcoois, quanto na rota inversa, que permite a obtenção de H_2 a partir dos mesmos metabólitos. Nessa via, o ácido lático pode ser convertido em ácido pirúvico após redução do NAD^+ (Equação 5.10), que pode ser convertido em H_2 , CO_2 e HBU.



Figura 5.43. Proporções de KO relacionadas com a obtenção de H₂ nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B), com os 10 gêneros associados mais abundantes. As proporções foram calculadas considerando o número total de leituras processadas em triplicata.



Nota: K04072= acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase, K03778= D-lactato desidrogenase, K03737 = piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoreductase, K00172= piruvato ferredoxina oxidoreductase γ -subunidade, K00171= piruvato-ferredoxina subunidade β -16001 piruvato oxidoreductase, K00171= subunidade deluvato de oxidoreduto-subunitase, K00171= subunidade de oxidoreduto-oxidato-K0016701 piruvato ferredoxina oxidoreductase α subunidade, K00123= subunidade principal formato desidrogenase, K00016 = L-lactato desidrogenase.

Visivelmente, diversos KO relacionados à obtenção de H₂ foram observados em menores proporções nas amostras do ensaio de otimização em relação ao inóculo, como K00172, K00171, K00170, K00169 e K00123. A maioria destes KO foi relacionada a *Coprothermobacter*, *Defluviitoga*, *Helicobacter* e *Sulfurimonas*. Pode-se supor que as condições operacionais utilizadas nos ensaios de otimização não foram favoráveis a estas bactérias, uma vez que a maioria delas são termofílicas (GAGLIANO et al., 2015; MAUS et al., 2015) e os ensaios no presente estudo foram realizados a 30 °C.

As enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) no inóculo e nas amostras do ensaio de otimização foram analisadas, com enfoque naquelas diretamente relacionadas com a degradação de celulose/hemicelulose ou lignina (XIA et al., 2014; JANUSZ et al., 2017). Além de quantificadas, foram relacionadas aos 10 gêneros mais abundantes associadas a cada CAZy (Figura 5.44). Vale ressaltar que as CAZymes foram definidas de acordo com a

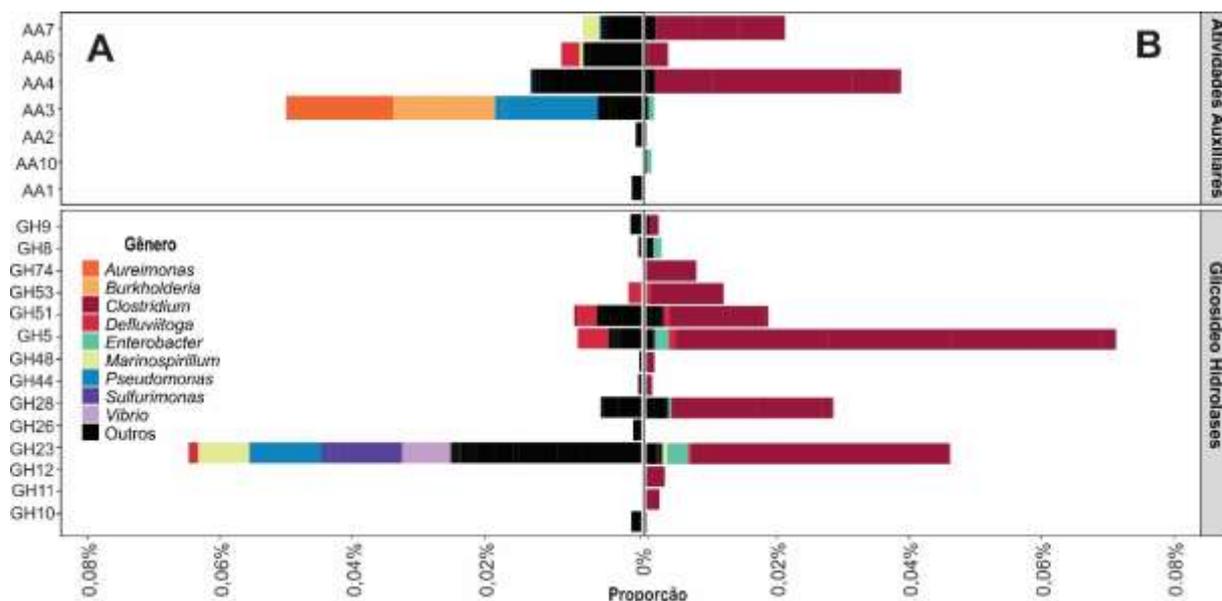
homologia de proteínas, ou seja, a mesma CAZy pode representar enzimas distintas com atividades distintas (YIN et al., 2012).

O grupo ligninolítico das Atividades Auxiliares (AA) não corresponde adequadamente às enzimas ativas dos carboidratos, mas por ser composto por enzimas redox que atuam de forma complementar são consideradas em conjunto. A lignina, por exemplo, não é um carboidrato, mas está invariavelmente associada a polissacarídeos na parede celular da planta, na qual as fibras de celulose são incorporadas em uma matriz de lignina (JANUSZ et al., 2017). Neste estudo, alguns genes AA foram identificados, mas um aumento entre a amostra do ensaio de otimização e o inóculo foi observado para apenas dois deles: AA7 (de $\leq 0,001$ a 0,04%, respectivamente) e AA4 (de $\leq 0,01$ a 0,02%, respectivamente). De acordo com Li et al. (2019), a maioria das enzimas relacionadas à despolimerização da lignina, como as peroxidases e lacases ligninolíticas, são produzidas por fungos e poucas bactérias aeróbias, as quais oxidam os polímeros heterogêneos a pequenas moléculas aromáticas, sendo as cepas e mecanismos envolvidos em sua degradação em anaerobiose ainda pouco conhecido.

A família lignolítica AA7 está associada às atividades de glicoligossacarídeos e quitoligossacarídeos oxidase [EC 1.1.3.-], reduzindo os resíduos de glicosila finais de oligossacarídeos ligados por ligações α ou β -1,4-glicose. AA4 é um grupo álcool vanílico oxidase [EC 1.1.3.38] cujas enzimas podem catalisar a conversão de compostos fenólicos com cadeias laterais em seus anéis aromáticos em aldeídos.

É importante ressaltar que o grupo AA3, principalmente relacionado à atividade da celobiose desidrogenase [EC 1.1.99.18] foi observado em menor proporção nas amostras do ensaio de otimização (0,001%), quando comparado ao inóculo (0,054%). No inóculo, os principais gêneros relacionados com este grupo foram *Aureimonas* (24,07%) e *Burkholderia* (22,22%). Zámocký et al. (2004) e Melo-Nascimento et al. (2018) relacionaram o gênero *Burkholderia* à produção extracelular de celobiose desidrogenase. Nas amostras do inóculo, o gênero *Burkholderia* foi altamente relacionado (22,22%) com AA3 (celobiose desidrogenase), sendo importante mencionar a capacidade metabólica dessas bactérias em degradar lignina (AKITA et al., 2017), porém, foram obtidos 0,14 e 0,046% de abundância relativa nas amostras do ensaio de otimização e inóculo, respectivamente, provavelmente devido ao ambiente anaeróbio das condições experimentais.

Figura 5.44. Proporções das Enzimas Ativas por Carboidrato (CAZymes) das classes Atividades Auxiliares (AA) ou Hidrólise Glicosídica (GH) nas amostras de inóculo (A) e do ensaio de otimização (B), com os 10 gêneros mais abundantes associados. As proporções foram calculadas considerando o número total de leituras processadas em triplicata.



Nota: AA7= glicoligossacarídeo/quitilgossacarídeo oxidase, AA6= 1,4-benzoquinona redutase, AA4= vanilil-álcool oxidase, AA3= celobiose desidrogenase, AA2= lignina peroxidase, AA10= celulose monoxigenase, AA1= lacase, GH9= celulase GH74= endoglicanase, GH53= endo- β -1,4-galactanase, GH51= endoglicanase/ β -xilosidase, GH5= exocelulase, GH48= endocelulase, GH44= endoglicanase/xiloglicanase, GH28= poligalacturonase, β -mananase/ β -GH26 1,3-xilanase, GH23= lisozima, GH10= endo-1,4- β -xilanase.

Os grupos AA e GH atuam de forma sinérgica, visto que ambos atuam nas estruturas lignocelulósicas (MELO-NASCIMENTO et al., 2018). As Glicosídeo Hidrolases (GH) [EC 3.2.1.-] estão incluídas no grupo das enzimas que hidrolizam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos. A família da celulase GH5 foi aquela que foi observado maior aumento nas amostras otimizadas quando comparadas ao inóculo (0,071 a 0,015%, respectivamente). De acordo com Xia et al. (2014), GH5 é uma exocelulase e membros da ordem Clostridiales são conhecidos por desempenhar papel essencial na quebra da cadeia da celulose, expressando essas enzimas como um complexo enzimático extracelular (celulossomas) ou CAZymes livres não celulossomais, que degradam a celulose cristalina.

Entre as muitas funções relacionadas com a família de enzimas GH, é possível destacar endo- β -1,4-glicanase/celulase [EC 3.2.1.4], endo- β -1,4-xilanase [EC 3.2.1.8], β -glicosidase [EC 3.2.1.21], β -manosidase [EC 3.2.1.25] e celulose β -1,4-celobiosidase [EC 3.2.1.91]. De acordo com Aspeborg et al. (2012), muitas enzimas neste grupo são

componentes celulosômicos de bactérias, como *Ruminiclostridium* (e.g., *R. cellulolyticum*, anteriormente *C. cellulolyticum*) e sua faixa de temperatura ótima está em condições mesófilas (YUTIN; GALPERIN, 2013). Dessa forma, é possível afirmar que a temperatura utilizada neste estudo (30 °C) pode ter sido favorável para a expressão desses genes relacionados a tais enzimas.

Outras famílias relacionadas com a atividade celulase/hemicelulase cujo aumento foi observado em pequenas proporções de $\leq 0,001\%$ no inóculo a cerca de 0,01% nas amostras do ensaio de otimização, como GH74, GH28, GH8 e GH48. Dentre essas famílias, GH74 merece destaque, pois possui atividades de endoglicanase [EC 3.2.1.4], oligoxiloglicano redutor de celobiohidrolase [EC 3.2.1.150] e xiloglicanase [EC 3.2.1.151].

GH48 é uma endocelulase conhecida, com atividade celobiohidrolase [EC 3.2.1.176], endo- β -1,4-glicanase [EC 3.2.1.4] e atividade da quitinase [EC 3.2.1.14], sendo geralmente relacionada com membros da ordem Clostridiales (XIA et al., 2014). Vale ressaltar que algumas espécies da ordem Clostridiales, como *C. beijerinckii*, mesmo não sendo produtores de celulase (GOMEZ-FLORES; NAKHLA; HAFEZ, 2017), podem estar indiretamente relacionadas a esta função devido a sua capacidade de hidrolisar em subprodutos de celulose e hemicelulose, como glicose, celobiose e xilose (CEBREIROS; FERRARI; LAREO, 2019).

Após sequenciar o genoma completo de *C. beijerinckii* isolado de uma planta de processamento de vinhaça de cana-de-açúcar, Fonseca et al. (2019) identificaram diversas classes enzimáticas funcionais do grupo GH [EC 3.2.1.-], especialmente relacionadas à atividade de β -glicosidase, como β -D-glicosídeo e glicohidrolases [EC 3.2.1.21], que possibilitam a hidrólise da celulose, uma vez que completam sua etapa final de degradação. Além disso, os autores supracitados identificaram enzimas que codificam genes que estão diretamente envolvidas na obtenção de H₂, como os genes que codificam o portador de elétrons ferredoxina, piruvato-flavodoxina oxidoreductase [EC 1.2.7.-] e Fe-hidrogenase [EC 1.12.7.2]. No presente estudo, o principal KO relacionado com os números EC mencionados para a atividade da β -glicosidase foi K05349 (55%), e com a obtenção de H₂ foi K03737 (27,89%) no ensaio de otimização.

Vale ressaltar que a família GH23 foi visivelmente reduzida nas amostras otimizadas, quando comparadas com o inóculo, de 0,11% para 0,01%. Esta lisozima também é conhecida como peptidoglicano transglicosilase lítica [3.2.1.17]. Uma possível explicação é que as condições utilizadas no ensaio otimizado não foram favoráveis à

Sulfurimonas, gênero mais abundante relacionada a este CAZyme no inóculo (16,36%). A atividade da β -1,3-endoglicanase nesta espécie foi observada por Villa e Veiga-Crespo (2009).

A ferramenta DESeq2 foi usada para identificar genes diferencialmente abundantes. O total de 76.061 genes diferencialmente abundantes foi identificado, representando 52% do total de 147.274 genes. Genes diferencialmente abundantes foram considerados como aqueles com p-valor $\leq 0,005$, e mais abundantes nas amostras de biomassa do ensaio de otimização do que nas amostras de inóculo. Estes resultados foram utilizados para analisar as potenciais vias metabólicas do processo, por meio da ferramenta Pathview.

Encontra-se em resumo na Figura 5.45 as possíveis vias de conversão de resíduos sólidos de citros em H_2 , bem como os principais compostos orgânicos acumulados durante sua fermentação nas condições otimizadas (30 °C, pH 8,98 e 29,8 g.L⁻¹ de substrato). De maneira geral, é possível afirmar que as condições aplicadas nos ensaios otimizados foram favoráveis ao estabelecimento, tanto de bactérias degradadoras dos principais componentes da biomassa lignocelulósica, como de bactérias produtoras de H_2 , como *Clostridium* e *Paraclostridium*.

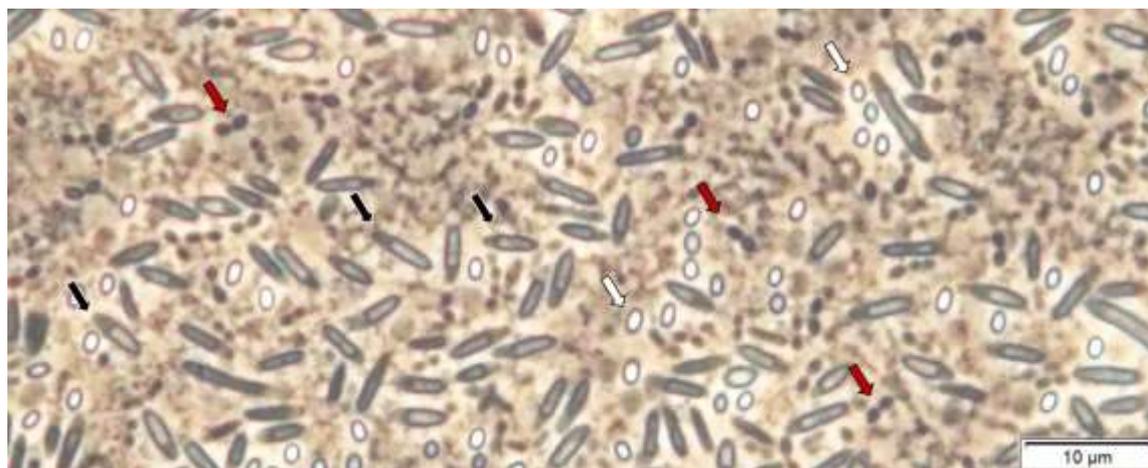
5.6 OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS CELULOLÍTICAS

5.6.1 Atividade celulolítica, isolamento e identificação

Após a autofermentação das cascas e bagaços de citros (1:1) em reatores em batelada, operados durante 48 h, com glicose como fonte de carbono e pH 7,0, foi possível isolar 12 colônias de bactérias anaeróbias, sendo observada produção de H₂ em apenas 3 destas cepas. Em relação ao isolamento da cepa, foi possível observar em placas de Petri suas características macromorfológicas, com colônias pequenas ($\leq 2\text{mm}$), de forma irregular, superfície planoconvexa, com bordas inteiras e lisas.

Morfologias semelhantes a bacilos de microrganismos autóctones aderidos a superfície do bagaço de citros *in natura* foram observados por MEV. Além disso, por meio de microscopia óptica (Figura 5.46), foi possível observar a prevalência de bacilos Gram-positivos, além de diversas estruturas similares a endósporos e bacilos em fase de esporulação, com endósporos ovais e terminais.

Figura 5.46. Características micromorfológicas do consórcio celulolítico autóctone das cascas e bagaço de laranja *in natura*, após diluição seriada (10^{-26}) em microscopia de contraste de fase.



Nota: As setas vermelhas indicam as células de diplococos, as setas pretas indicam os bacilos contendo endósporos e as setas brancas indicam os esporos. Aumento total de 1600X.

A cepa isolada (IS_2) para a qual foi observada maior obtenção de H₂ foi identificada como 99% similar à *Enterococcus casseliflavus* (Figura 5.47). Bactérias semelhantes a *Enterococcus* podem ser entéricas, endofíticas e epifíticas. Bactérias deste gênero são anaeróbias facultativas, Gram-positivas, formadoras de células ovóides, que

ocorrem individualmente ou em duplas, com crescimento ótimo entre 30-37 °C (VOS et al., 2009), como a temperatura utilizada neste estudo (37 °C).

Apesar de seu pH ótimo de crescimento ser 7,5, bactérias semelhantes a *Enterococcus* possuem membrana celular impermeável à ácidos orgânicos, o que confere resistência a ampla faixa de pH (4,5 a 10,0) (JOHN; CARVALHO, 2011). Na presente pesquisa, o pH inicial dos reatores em batelada foi ajustado para 7,0. De acordo com Huycke (2002), a via metabólica predominante em *Enterococcus* pode variar de acordo com suas condições de crescimento, com produção de HLac, HFor, HAc ou EtOH como principais produtos finais da fermentação.

A presença de *Enterococcus* no consórcio autofermentativo obtido a partir do resíduo sólido de citros se justifica devido à característica epifítica deste gênero, bem como sua resistência a ambientes ácidos. Cibis et al. (2016) observaram bactérias semelhantes à *Enterococcus casseliflavus*, em sistemas mesofílicos de biogás alimentados com silagem de milho, o que pode indicar afinidade destes organismos aos resíduos lignocelulósicos. Além disso, Mubarak e Soraya (2018) observaram resistência significativa ($p \leq 0,05$) de *Enterococcus* sp. em diferentes concentrações de extrato de lima (*Citrus aurantiifolia*) (6,25-100%), em pH mínimo de 2,89, em temperatura mesofílica (37 °C) por período de incubação de 72 h.

Nos testes de atividade celulolítica para a cultura IS_2, foi possível observar atividade significativa ($p \leq 0,05$) quando comparada ao ensaio controle (sem inóculo) (Tabela 5.21). Após o isolamento, a taxa de degradação de celulose para a cepa obtida (IS_2) foi de $61,3 \pm 0,1\%$, aproximadamente 4,6 vezes maior em relação ao consórcio autóctone. Além disso, houve mudança de coloração das fibras de papel após o período de incubação, uma vez que as fibras nos ensaios controle mantiveram-se com a coloração original (brancas), e as fibras dos ensaios contendo o consórcio celulolítico tornaram-se amareladas, como descrito por Wang et al. (2011). Desta forma, é possível inferir que a cepa isolada seja celulolítica. De acordo com Herdian et al. (2018), diversas espécies de *Enterococcus* podem apresentar atividade celulolítica.

Nas mesmas condições de pH (7,0) e meio de cultivo (PCS) do presente estudo, Wang et al. (2011) caracterizaram consórcio autóctone obtido a partir da autofermentação de palha de arroz, e observaram a predominância de bactérias semelhantes à *Clostridium*. A atividade celulolítica do consórcio em fibra de papel filtro foi de $99,0 \pm 0,7\%$. A maior eficiência na degradação de celulose observada por estes autores pode ser atribuída à maior

temperatura de incubação (50 °C), favorecendo o crescimento de bactérias conhecidamente celulolíticas neste consórcio, como *Clostridium thermobutyricum* e *Clostridium thermosuccinogenes* (atual *Ruminiclostridium thermosuccinogenes*) (YUTIN; GALPERIN, 2013). No caso específico com resíduos de citros, todos os ensaios foram feitos a 37 °C.

Figura 5.47. Dendrograma de distância genética do gene RNAr 16S de bactérias anaeróbias isoladas de resíduo sólido de citros *in natura*. A barra de escala representa o número de substituições por posição de nucleotídeo para cada dendrograma. Os números de acesso de cada sequência estão representados entre parênteses. Os valores dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas). Utilizou-se a sequência do gene RNAr 16S de *E. coli* (X80725.1) como grupo externo (♦).

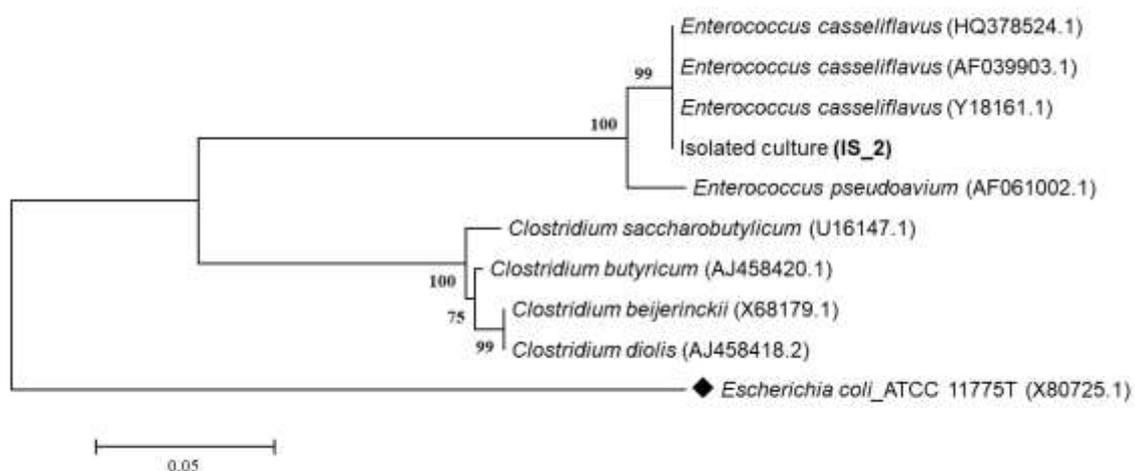


Tabela 5.21. Remoção da fibra de papel filtro e *p* valor obtido^a para a cepa isolada (IS_2), consórcio autofermentativo e ensaio controle (sem inóculo).

	Remoção (%)	<i>p</i> valor	Significância (95%)
IS_2	61,3±0,1 ^a	0,0216	Significativo
Consórcio	13,4±0,3 ^b	0,0397	Significativo
Controle	3,3±0,1 ^c	-	-

^a *p* valor obtido em comparação ao ensaio controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si para o intervalo de confiança de 95% via Teste de Tukey.

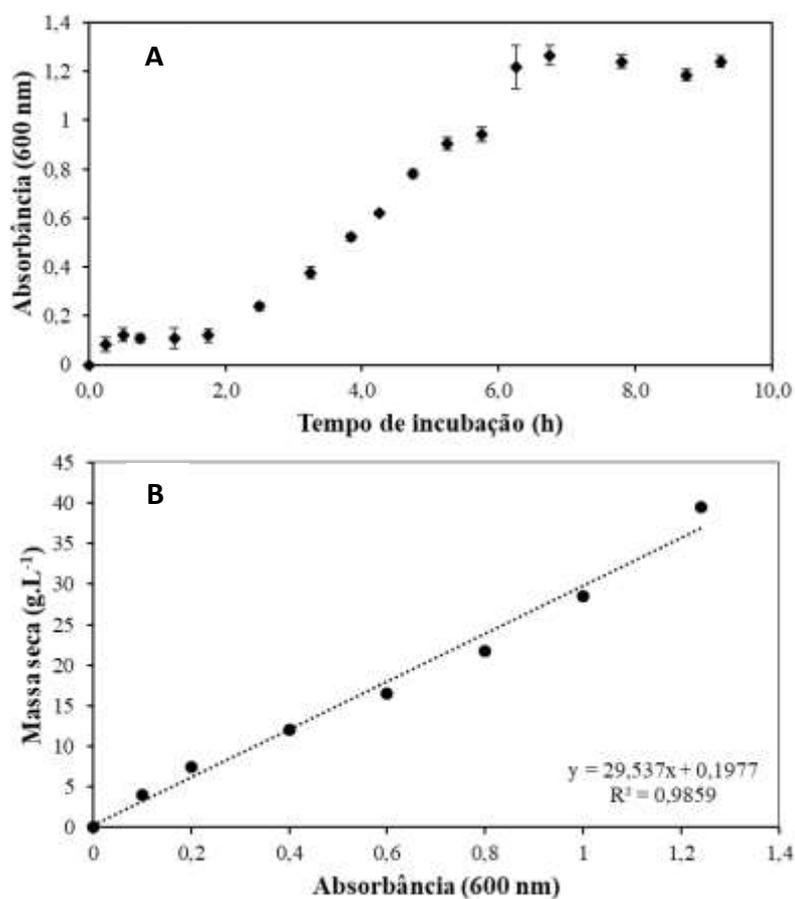
5.6.2 Parâmetros cinéticos

A massa seca celular (MSC) observada para a cepa (IS_2) nas condições de isolamento (37 °C, pH 7,0, 2 g de glicose por litro) foi proporcional à absorbância de 600 nm (OD_{600}), podendo ser calculada seguindo a proporção de $MSC_{E. casseliflavus}$: 29,54 OD_{600} (Figura 5.48). A velocidade de crescimento específico obtida neste estudo, em 2 g.L⁻¹ de glicose e pH 7,0 ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$), foi inferior à obtida por Parente et al. (1997) ($\mu = 1,85 \text{ h}^{-1}$) para *E. faecium* em pH 5,5 e 5 g.L⁻¹ de glicose a 37 °C. Além disso, o tempo de geração (T_g) calculado para IS_2 foi de 1,98 h.

Uma das possíveis explicações para a menor velocidade de crescimento específico obtida no presente estudo, além de se tratar de espécie diferente, é que Parente et al. (1997) utilizaram uma cepa padrão de *Enterococcus* (*E. faecium* DPC1146), enquanto no presente estudo, utilizou-se uma cepa selvagem, nativa de resíduos sólidos de citros, que poderia estar menos adaptada às condições de cultivo laboratorial. Até o momento, não há dados para comparação de caracterização de *E. casseliflavus* na literatura.

Para outras espécies de *Enterococcus*, é possível observar valores de T_g similares aqueles obtidos para a cepa isolada (IS_2). Orandi et al. (2005) obtiveram T_g de 1,21 h para *Enterococcus faecium* isolada de soro de queijo de reatores em batelada, operados com meio de cultivo MRS (Sharlau Microbiology, Spain) a 37 °C, pH 6,5 e condições estáticas, durante 16 h. Martínez et al. (2003) obtiveram T_g de 1,5 h em reatores operados a 37 °C e pH 7,0 durante 48 h em *Brain Heart Infusion* (BHI), também para *E. faecium* (ATCC 49624). A partir destes resultados é possível inferir que o T_g (1,98 h) da cepa isolada (IS_2) foi similar ao de *E. faecium* nas mesmas condições operacionais.

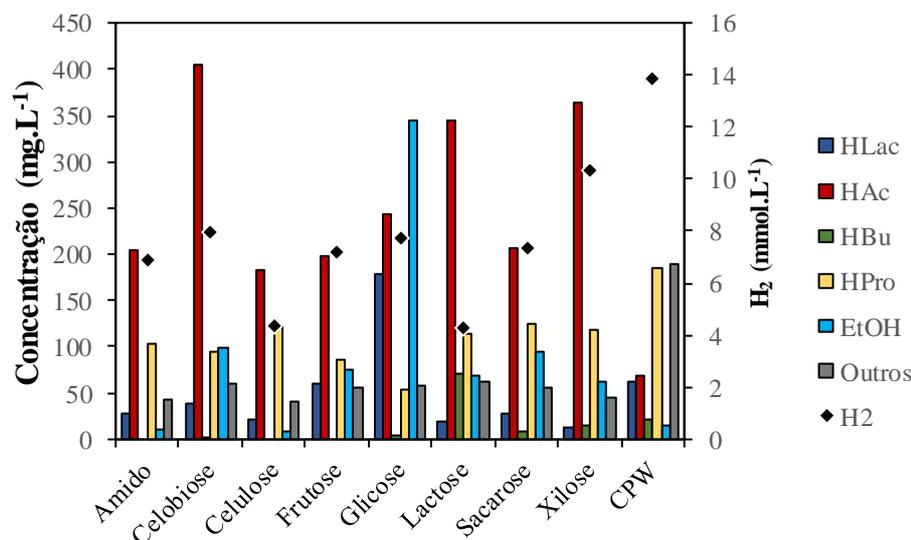
Figura 5.48. Tempo de geração (b) e relação entre massa seca e absorvância (b) para a cepa isolada (IS_2).



5.6.3 Vias fermentativas e metabolitos da cepa isolada

A cepa isolada filogeneticamente semelhante à *E. casseliflavus* (IS_2) foi caracterizada quanto a utilização de diferentes fontes de carbono (2 g.L⁻¹ de amido, celobiose, celulose, frutose, glicose, lactose, sacarose, xilose e resíduo sólido de citros). Após período de incubação de aproximadamente 30 h verificou-se produção de H₂ em todas as condições, para as diferentes fontes de carbono testadas. Os principais metabólitos observados foram ácido acético (HAc, 365 mg.L⁻¹) a partir de xilose; etanol (EtOH, 345 mg.L⁻¹) a partir de glicose; ácido lático (HLac, 178 mg.L⁻¹) a partir da glicose; ácido propiônico (HPr, 184 mg.L⁻¹) a partir do resíduo sólido de citros e ácido butírico (HBu, 70 mg.L⁻¹) a partir de lactose (Figura 5.49).

Figura 5.49. Produção de AOV e etanol a partir de diferentes fontes de carbono e potencial máximo de concentração de H₂ (♦) pela cepa isolada (IS_2).



A partir das fontes complexas de carbono (polissacarídeos amido e celulose) e biomassa lignocelulósica (resíduo de citros), a maior concentração de H₂ foi a partir do resíduo sólido de citros (13,9 mmol H₂.L⁻¹). Apesar de sua composição lignocelulósica, o resíduo sólido de citros é rico em monômeros prontamente assimiláveis, especialmente glicose e xilose (CHOI et al., 2015), o que pode ter contribuído para maior obtenção de H₂ a partir deste substrato. Em relação à concentração de H₂ observada a partir de celulose (4,3 mmol H₂.L⁻¹), é possível inferir que a cepa isolada (IS_2) não é eficiente em sintetizar as enzimas necessárias para hidrólise das ligações β entre as moléculas de glicose que compõe este polissacarídeo, como apontado em Ács et al. (2015).

Wang et al. (2009) avaliaram o potencial de *Enterococcus gallinarum*, isolada de rúmem, na bioconversão de celulose em H₂ em condições mesofílicas (37 °C) e pH inicial de 6,5. Após período de 5 h a conversão foi de aproximadamente 2,4 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose, sendo que os principais AOV produzidos foram HAc (971 mg.L⁻¹), HPr (623 mg.L⁻¹) e HBu (450 mg.L⁻¹). Na presente pesquisa, o rendimento foi de 0,34 mmol de H₂.g⁻¹ de celulose, além de predominância de HAc (182 mg.L⁻¹) e HPr (121 mg.L⁻¹), o que pode indicar menor afinidade da cepa isolada (IS_2) com esta fonte de carbono, quando comparada à *E. gallinarum*.

A concentração de H₂ a partir de dissacarídeos e polissacarídeos foi similar aos ensaios contendo glicose, amido e celobiose, respectivamente, de 7,7, 6,9 e 8,0 mmol H₂.L⁻¹. Da mesma forma, foram obtidas concentrações de H₂ semelhantes para as condições com frutose (7,2 mmol H₂.L⁻¹) e sacarose (7,3 mmol H₂.L⁻¹). Sabe-se que a sacarose é um

dissacarídeo de ligações α entre uma molécula de glicose e uma molécula de frutose (AN et al., 2014).

Dentre os monossacarídeos a maior concentração observada foi a partir da xilose ($10,3 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$), bem como a maior produção de HAc (365 mg.L^{-1}). A xilose é um dos principais monômeros encontrados em resíduos de citros (WILKINS et al., 2007; CHOI et al., 2013, 2015), o que pode justificar a maior assimilação por microrganismos autóctones deste tipo de substrato. A xilose tem estrutura com menos átomos de carbono ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), quando comparado à glicose e frutose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), além da sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) e demais substratos utilizados, como os dissacarídeos lactose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) e celobiose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), os polissacarídeos celulose e amido [$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$].

A partir da xilose, via rota do HAc a produção teórica é de $3,33 \text{ mol de H}_2$ (Equação 5.1) e $1,67 \text{ mol de H}_2$ quando há formação de HBU (Equação 5.2) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012). A partir da cepa isolada (IS_2), o rendimento foi de $1,0 \text{ mol de H}_2$ por mol de xilose nos ensaios em pH 7,0.

Apesar do rendimento teórico de H_2 a partir da glicose ser maior em relação à xilose, de 4 mols de H_2 na via HAc e 2 mols de H_2 via HBU (Equações 5.1 e 5.2, respectivamente) verificou-se menor rendimento nos ensaios contendo glicose ($0,91 \text{ mol de H}_2\text{.mol}^{-1}$ de glicose) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; ŁUKAJTIS et al., 2018). Resultados similares foram obtidos por Yin e Wang (2016), que utilizaram como inóculo uma cepa de *E. faecium*, obtendo $1,69 \text{ mol de H}_2\text{.mol}^{-1}$ de glicose em reatores em batelada. Além disso, os autores avaliaram diferentes pH iniciais (5-10) do meio reacional, sendo que o maior rendimento de H_2 ocorreu em pH 7,0, mesmo pH utilizado no presente estudo.

Nos ensaios contendo glicose como fonte de carbono, houve acúmulo de EtOH ao final da operação (345 mg.L^{-1}), enquanto nos ensaios a partir de xilose, houve menor produção deste álcool (61 mg.L^{-1}). Sabe-se que a predominância da via solvetogênica em reatores pode resultar em baixa obtenção de H_2 , uma vez que há produção de EtOH a partir de HAc, ao invés de H_2 (Equação 5.11) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; ŁUKAJTIS et al., 2018). Provavelmente, a variação da via metabólica predominante acarretou em menor concentração de H_2 a partir da glicose ($7,7 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$) em relação à xilose ($10,3 \text{ mmol H}_2\text{.L}^{-1}$).

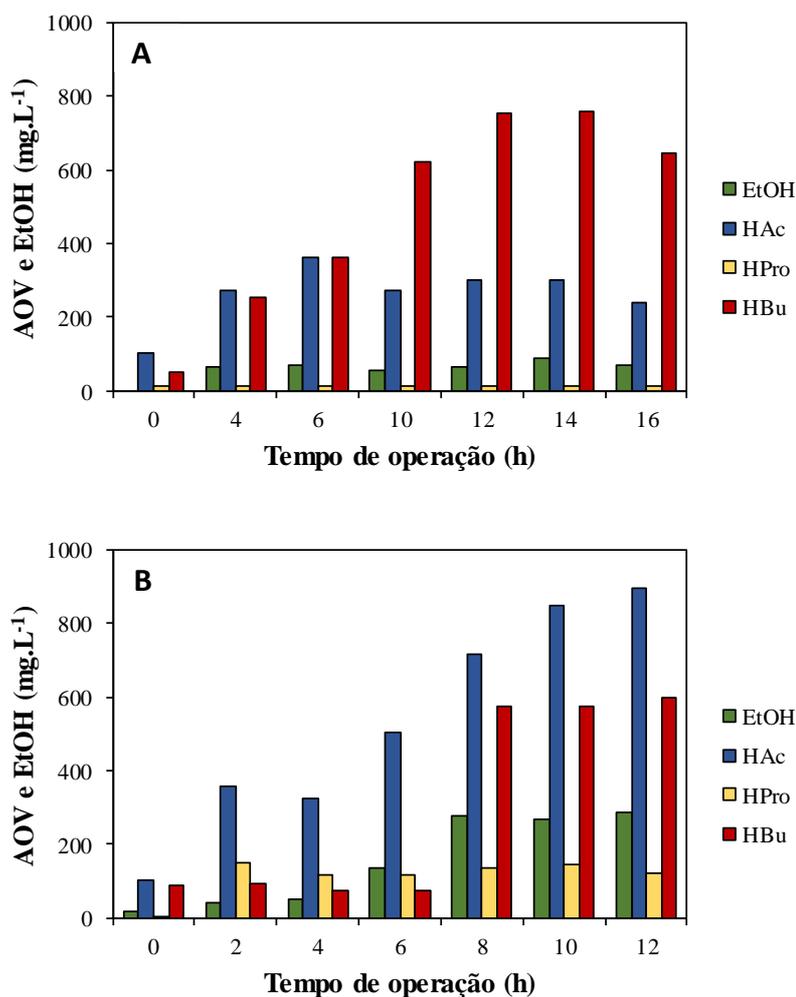


Mäkinen et al. (2012), avaliaram a obtenção de H₂ a partir de diferentes fontes de carbono por cultura mista de *Clostridium acetobutylicum* e *Citrobacter freundii*, em reatores batelada operados a 45 °C. Estes autores observaram que o rendimento de H₂ foi maior a partir de pentoses do que a partir de hexoses, ou seja, de 0,71 mol H₂.mol⁻¹ de xilose e 0,61 mol H₂.mol⁻¹ de arabinose em relação à glicose (0,54 mol H₂.mol⁻¹ de glicose). Além disso, os autores indicam que a fermentação de pentoses (xilose e arabinose) resulta em maior obtenção de H₂ e HAc, enquanto a fermentação de hexoses (glicose) favorece a produção de HLac.

Na presente pesquisa, foi possível observar que houve maior produção de HLac a partir da glicose (178 mg.L⁻¹) em relação à xilose (12 mg.L⁻¹). O mesmo não ocorreu nos ensaios contendo polissacarídeos de glicose, como amido (27 mg HLac.L⁻¹) e celulose (21 mg HLac.L⁻¹), provavelmente porque o produto final predominante a partir da fermentação de glicose por *Enterococcus* é o HLac (VOS et al., 2009).

Em relação à produção de AOV e álcoois a partir de glicose e xilose, utilizando a cepa isolada (IS_2), os principais metabólitos obtidos foram HAc, HBu, HPr e EtOH (Figura 5.50). Foram obtidos 880 mg.L⁻¹ e 619 mg.L⁻¹ de AOV nos ensaios contendo glicose e xilose, respectivamente. O acúmulo de AOV pode acarretar na inibição da produção de H₂ devido ao aumento da permeabilidade de ácidos orgânicos não dissociados na membrana celular, e conseqüente gasto de energia, a fim de excretar os prótons via transporte ativo contra o gradiente de concentração da membrana celular (INFANTES et al., 2011). O acúmulo de AOV resultou em menor pH final a partir da glicose (pH 5,7) em relação à xilose (pH 6,4), o que pode ter contribuído para a inibição da produção de H₂ da cepa de *E. casseliflavus* (IS_2) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012).

Figura 5.50. Ácidos orgânicos e álcool ao longo do período de incubação com glicose (a) e xilose (b) para a cepa isolada (IS_2).



Yun, Wee e Ryu (2003) observaram que a fonte de carbono pode afetar diretamente a rota metabólica prevalente para cepa de *Enterococcus faecalis*. A partir de glicose, frutose e maltose houve maior rendimento de HLac (0,96 g de HLac.g⁻¹ de carboidrato), enquanto a partir de galactose, amido e xilose houve maior produção dos ácidos fórmico e HAc.

Da mesma forma, no presente estudo, houve diferença entre os metabólitos a partir de diferentes fontes de carbono. O ácido em menor concentração ao longo de ambos os ensaios foi HPr, com produção máxima de 14 mg.L⁻¹ e 151 mg.L⁻¹ a partir de glicose e xilose, respectivamente. Na via metabólica de formação do HPr, há consumo de 2 mols de H₂ a cada mol de glicose consumida (Equação 3.5) (LI; FANG, 2007; GHIMIRE et al., 2015).

Apesar da desvantagem da produção de HPr em processos de obtenção de H₂, houve maior produção deste ácido (119 mg HPr.L⁻¹) no reator contendo xilose, no qual houve maior produção de H₂, em relação à glicose (53 mg HPr.L⁻¹). Entretanto, maior acúmulo de HAc a partir da xilose (365 mg HAc.L⁻¹) foi observado em relação à glicose (243 mg HAc.L⁻¹), o que pode justificar a maior obtenção de H₂ a partir da xilose, mesmo com maior acúmulo de HPr.

De acordo com Infantes et al. (2011), a acidificação do meio reacional pode levar à retenção de prótons (H⁺) e à formação de HPr. O pH final do meio reacional após a fermentação de xilose e glicose foram de 5,4 e 5,7, respectivamente. Desta forma, é possível inferir que o favorecimento da produção de HAc ocasionou maior acúmulo de AOV e consequente acidificação do meio reacional, levando a mudança na via metabólica e produção de HPr.

No ensaio contendo glicose, HBU e HAc foram os principais metabólitos (758 mg.L⁻¹ e 362 mg.L⁻¹, respectivamente), enquanto a partir da xilose, houve mudança de rota metabólica, uma vez que o principal metabólito observado foi HAc (897 mg.L⁻¹). Resultados similares foram obtidos por Mäkinen (2012), com consórcio misto de *Clostridium acetobutylicum* e *Citrobacter freundii*, sendo que HBU foi o principal produto metabólico a partir de glicose.

Em relação a remoção de carboidratos (Tabela 5.22), não foi verificada diferença significativa para o intervalo de confiança de 95%, sendo que houve consumo máximo de 94% a partir de frutose. Resultados similares foram observados por Maintinguer et al. (2017) na caracterização nutricional de uma cepa de *Enterobacter* sp. isolada de resíduos de cervejaria, com 85,6% de consumo de glicose após 8,8 h de incubação. O maior percentual de remoção de carboidratos observado no presente estudo pode ter ocorrido devido ao maior tempo de incubação dos reatores (30 h).

Nos ensaios contendo resíduo de citros como substrato, verificou-se variação significativa ($p \leq 0,05$) do pH, sendo o menor valor (pH 5,3) ao final do período de incubação de 12 h. É possível inferir que a redução do pH inicial (7,0) ocorreu devido à produção de AOV ao final do processo fermentativo. Além disso, no ensaio contendo resíduo sólido de citros, houve conversão total dos carboidratos solúveis disponíveis no início do processo e, ainda, a maior concentração de H₂ (13,9 mmol H₂.L⁻¹).

A menor obtenção de H₂ ocorreu a partir de lactose (4,3 mmol H₂.L⁻¹) e celulose (4,3 mmol H₂.L⁻¹), além de menor variação de pH (6,4 e 6,6, respectivamente). De acordo

com Ács et al. (2015), polissacarídeos podem não ser ideais como substrato para *Enterococcus*, que não possuem aparato enzimático para clivagem destes polímeros. Sendo assim, é possível inferir que a obtenção de H₂ a partir de resíduo sólido de citros foi favorecida devido à presença de glicose e xilose como principais componentes deste resíduo (CHOI et al., 2015).

Foram observados 2,90 mg.L⁻¹ de fenóis no ensaio contendo resíduo sólido de citros, provavelmente devido à degradação de componentes de resíduos lignocelulósicos, como a lignina e a hemicelulose (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018).

Tabela 5.22. Remoção de carboidratos e pH final dos reatores em batelada, operados com diferentes fontes de carbono para a cepa isolada (IS_2).

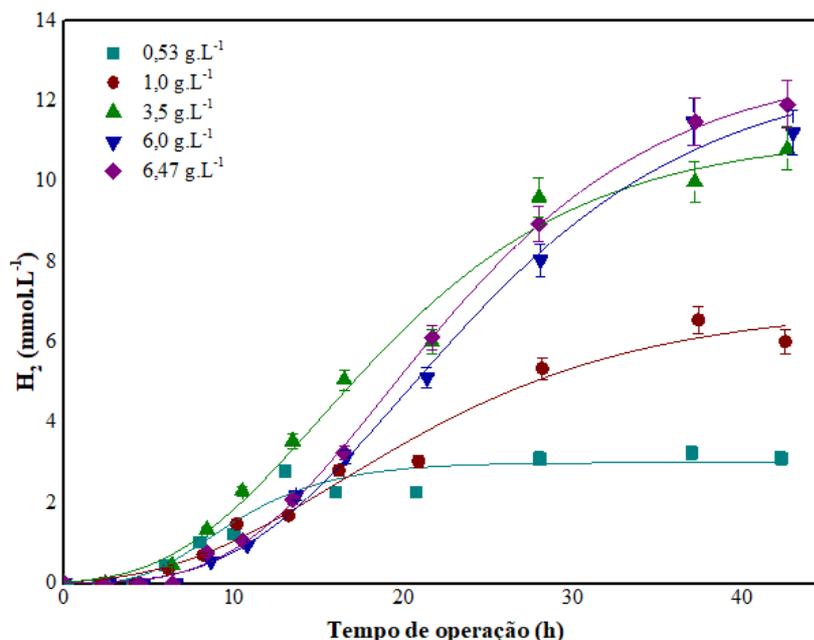
Fonte de Carbono	Remoção de carboidratos (%)	pH
Amido	94±2,1	6,62±0,0
Celobiose	94±0,7	6,45±0,0
Celulose	94±1,4	6,61±0,1
Frutose	95±2,5	6,44±0,0
Glicose	94±2,1	5,73±0,0
Lactose	94±1,4	6,44±0,0
Sacarose	93±0,7	6,49±0,0
Xilose	94±4,9	5,38±0,0
Resíduo sólido de citros	94±5,4	5,30±0,1

5.6.4 Efeito da concentração de xilose

Uma vez que a xilose é um dos principais monômeros que compõe os resíduos do processamento de citros, informações acerca de sua faixa ótima de concentração para uso em processos anaeróbios tornam-se desejáveis. A xilose foi o monômero a partir do qual houve maior obtenção de H₂ (10,3 mmol H₂.L⁻¹) e HAc (365 mg.L⁻¹), portanto, realizou-se a caracterização da concentração de H₂ obtida a partir de diferentes concentrações desta pentose (0,53 a 6,47 g.L⁻¹), sendo de 3,0 a 12,9 mmol H₂.L⁻¹.

Nos ensaios com menor concentração de substrato (0,53 e 1,0 g xilose.L⁻¹), houve estabilização da concentração de H₂ em menor tempo quando comparados aos ensaios com maior concentração (3,5; 6,0 e 6,45 g de xilose.L⁻¹). No ensaio com 0,53 g de xilose.L⁻¹, a estabilização da concentração de H₂ ocorreu em aproximadamente 10 h, enquanto no ensaio contendo 6,45 g de xilose por litro, a estabilização ocorreu em aproximadamente 40 h de operação (Figura 5.51).

Figura 5.51. Concentração de H₂ pela cepa isolada (IS_2) em função do tempo com diferentes concentrações de xilose.



Quanto maior a concentração de xilose, maiores velocidade específica máxima de obtenção de H₂ foram observados, sendo a maior de 0,53 mmol H₂.h⁻¹ para 6,47 g.L⁻¹ de xilose e a mínima de 0,28 mmol H₂.h⁻¹ para 0,53 g.L⁻¹ de xilose. Da mesma forma, maiores λ (10,02 h⁻¹) foram observados para maior concentração de xilose (6,47 g de xilose.L⁻¹) e o menor de 4,49 h⁻¹ em 0,53 g de xilose.L⁻¹ (Tabela 5.23).

Tabela 5.23. Parâmetros de Gompertz modificado e densidade óptica da cepa isolada (IS_1) obtidos a partir de diferentes concentrações de xilose.

Xilose (g.L ⁻¹)	<i>P</i> (mmol H ₂ .L ⁻¹)	<i>Rm</i> (mmol H ₂ .h ⁻¹)	λ (h ⁻¹)	R ²	pH	OD ₆₀₀ (nm)	Consumo de carboidratos (%)
0,53	3,0	0,28	4,49	0,93	6,77	0,29	92,73
1,0	6,9	0,26	6,30	0,98	6,18	0,32	94,70
3,5	11,5	0,46	6,45	0,99	6,00	0,65	98,70
6,0	12,9	0,48	10,26	0,99	5,54	1,09	92,10
6,47	12,9	0,53	10,02	0,98	5,57	1,17	92,07

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

A remoção de carboidratos foi superior a 90% em todas as condições avaliadas, entretanto, o maior valor observado foi para o ensaio com 3,5 g de xilose.L⁻¹, seguido do ensaio contendo 0,53 g de xilose.L⁻¹ (98,70 e 92,73%, respectivamente). A menor remoção de carboidratos (92,07%) foi observado no ensaio com 6,47 g de xilose.L⁻¹. Para avaliação das respostas *P*, *Rm*, λ , pH, OD₆₀₀ e remoção de carboidratos considerou-se a significância

da regressão, resíduos, a falta de ajuste e erro puro a partir da Análise de Variância (ANOVA), no intervalo de confiança de 95% (Tabela 5.24). Em relação à P , considerou-se que a concentração de substrato teve efeito positivo ($3,7 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$) para potencial máximo de concentração de H_2 . O valor máximo de P previsto via modelo de regressão foi de $13,1\pm 0,9 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$, com $5,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose. Concentrações similares de substrato (5 g de glicose $\cdot\text{L}^{-1}$) foram avaliadas por Yin e Wang (YIN; WANG, 2016), que obtiveram $6,1 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$, utilizando *E. faecium*, em reatores em batelada operados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7,0. Desta forma, é possível inferir maior afinidade de *Enterococcus* à xilose em relação à glicose.

Em relação a R_m , o aumento da concentração de substrato foi proporcional ao aumento deste parâmetro, ou seja, teve efeito positivo ($0,11 \text{ mmol H}_2\cdot\text{h}^{-1}$). Desta forma, o R_m previsto foi de $0,54\pm 0,03 \text{ mmol H}_2\cdot\text{h}^{-1}$ para 5 g de xilose $\cdot\text{L}^{-1}$. Para λ , foram obtidos $9,92\pm 0,64 \text{ h}^{-1}$ para $6,47 \text{ g}$ de xilose $\cdot\text{L}^{-1}$. Entretanto, sabe-se que o aumento de λ não é desejável para o processo, uma vez que há aumento do tempo necessário de reação.

Para o pH, foi observado efeito negativo, ou seja, quanto maior a concentração de substrato, menor o pH da reação ($5,52\pm 0,13$), provavelmente devido à produção de AOV oriundos da fermentação (ŁUKAJTIS et al., 2018). O acúmulo de AOV pode levar à diminuição do pH, o que pode acarretar em inibição da biomassa fermentativa e, conseqüentemente, menor obtenção de H_2 (ROSA; SILVA, 2017; FONSECA; SCHMIDELL; REGINATTO, 2018).

A OD_{600} foi proporcional ao aumento da concentração de substrato, uma vez que quanto maior a concentração inicial de xilose, maior a absorvância (efeito positivo de $1,12\pm 0,09$), devido ao crescimento celular. Por fim, para o consumo de carboidratos, observou-se efeito negativo, sendo possível inferir que quanto maior a concentração de substrato, maior o consumo de carboidratos. Entretanto, a partir de $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, este aumento não foi significativo. Apesar do aumento da concentração de substrato ter efeito positivo na concentração de H_2 , e no aumento da biomassa, a partir de determinada concentração de xilose ($3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sua adição não foi mais significativa tanto para o aumento da concentração de H_2 quanto para o consumo de carboidratos.

Rabelo et al. (2018a) avaliaram a influência de diferentes concentrações de substrato ($2,0$; $5,0$ e $10,0 \text{ g}$ de celulose $\cdot\text{L}^{-1}$) na obtenção de H_2 , partir de consórcio composto por *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Routella* sp. e *Desulfovibrio* sp., sendo obtido $14,77$;

39,25 e 22,53 mmol H₂.L⁻¹, respectivamente. Os autores observaram que o aumento da concentração de substrato de 5,0 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹ causou maior acúmulo de AOV e redução do pH, o que justifica a menor concentração de H₂ nos ensaios com 10 g.L⁻¹ (22,5 mmol H₂.L⁻¹), em comparação a 5 g.L⁻¹ (39,2 mmol H₂.L⁻¹) de celulose. Na presente pesquisa, foi observada maior concentração de H₂ proporcional ao aumento da concentração de substrato de 0,53 para 3,5 g de xilose.L⁻¹, obtendo-se 13,0 e 11,5 mmol H₂.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 5.24. Modelo de regressão e ANOVA para as respostas potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (*λ*), pH, densidade óptica (OD₆₀₀) e consumo de carboidratos nos ensaios em diferentes concentrações de xilose (0,53 a 6,47 g.L⁻¹) pela cepa isolada (IS_2).

Modelo	Fonte de Variação	Soma de quadrados	Quadrados médios	R ²	F calculado	p valor
<i>P</i> (mmol. L ⁻¹) 11,71 + 3,69 x ₁ - 2,37 x ₁ ²	Regressão	77,5	38,8	96,44	40,6	0,0067
	Resíduo	2,9	1,0			
	Falta de ajuste	2,5	1,3		4,0	0,3318
	Erro puro	0,3	0,3			
<i>Rm</i> (mmol. h ⁻¹) 0,41 + 0,11 x ₁	Regressão	0,1	0,0	94,35	25,1	0,0134
	Resíduo	0,0	0,0			
	Falta de ajuste	0,0	0,0		8,7	0,2331
	Erro puro	0,0	0,0			
<i>λ</i> (h) 7,33 + 2,18 x ₁	Regressão	24,4	12,2	91,91	17,0	0,0230
	Resíduo	2,1	0,7			
	Falta de ajuste	2,1	1,1		214,2	0,0482
	Erro puro	0,0	0,0			
pH = 6,03 - 0,43 x ₁	Regressão	0,9	0,0	85,96	9,2	0,0526
	Resíduo	0,1	0,1			
	Falta de ajuste	0,1	0,0		6,9	0,2600
	Erro puro	0,0	0,0			
OD ₆₀₀ 0,68 + 0,38 x ₁	Regressão	0,7	0,3	93,67	22,2	0,0159
	Resíduo	0,0	0,0			
	Falta de ajuste	0,0	0,0		0,0	0,9938
	Erro puro	0,0	0,0			
Consumo de carboidratos 98,40 - 4,50 x ₁ ²	Regressão	45,1	22,6	94,94	22,8	0,0113
	Resíduo	2,4	0,8			
	Falta de ajuste	2,0	1,0		2,8	0,3921
	Erro puro	0,4	0,4			

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (*λ*) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

5.6.5 Aplicação em resíduo sólido de citros e bioaugmentação

Apesar do resíduo sólido de citros se tratar de resíduo lignocelulósico, contém elevadas concentrações de carboidratos prontamente disponíveis, como os monômeros glicose (35,5% da massa seca) e xilose (2,2% da massa seca) (CHOI et al., 2015). Esta composição pode ser conveniente para uso deste resíduo como substrato fermentativo.

A partir da glicose como fonte de carbono, foram obtidos potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade específica máxima de obtenção de H_2 (Rm) e λ de 9,1 mmol $H_2.L^{-1}$, 0,14 mmol $H_2.h^{-1}$ e 4,08 h, respectivamente. Foi possível constatar que houve maior concentração de H_2 no ensaio de bioaugmentação com *E. casseliflavus* (13,9 mmol $H_2.L^{-1}$) com resíduo sólido de citros (Tabela 5.25) (Figura 5.52).

Maiores Rm foram obtidos em ensaios contendo glicose (1,99 mmol $H_2.h^{-1}$), quando comparado ao ensaio de autofermentação (1,03 mmol $H_2.h^{-1}$) e bioaugmentação (1,01 mmol $H_2.h^{-1}$), provavelmente devido à facilidade de assimilação da glicose quando comparado a substratos complexos, como resíduo sólido de citros. Além disso, o acúmulo de fenóis a partir do resíduo sólido de citros (2,90 mg. L^{-1}) pode ter contribuído para menor Rm nestes ensaios.

Tabela 5.25. Parâmetros referentes ao modelo de Gompertz modificado^a, para concentração de H_2 para os ensaios com diferentes substratos (glicose e resíduo sólido de citros), bioaugmentação e autofermentação.

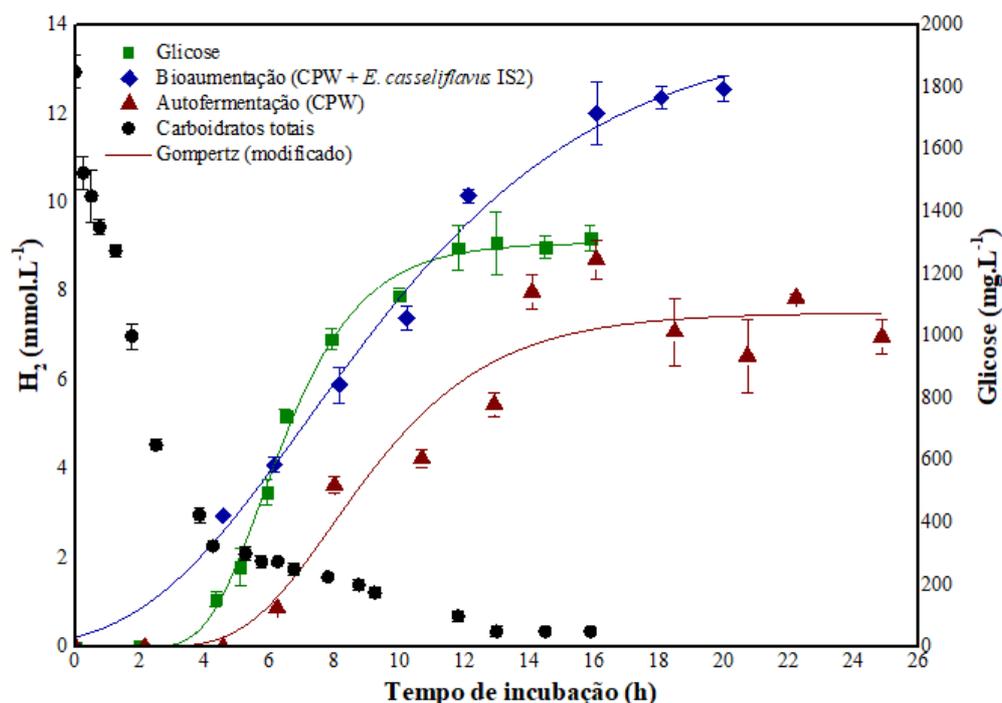
Parâmetros	Ensaio		
	Glicose	Bioaugmentação	Autofermentação + bioaugmentação
P (mmol $H_2.L^{-1}$)	9,1	7,5	13,9
Rm (mmol $H_2.h^{-1}$)	1,99	1,03	1,01
λ (h)	4,08	5,27	2,12
R^2	0,99	0,96	0,97

^a potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade específica máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Uma vez que a xilose é o principal monômero em resíduos de citros (WILKINS et al., 2007; CHOI et al., 2015), e a maior concentração de H_2 ocorreu nos ensaios contendo xilose como única fonte de carbono (10,3 mmol $H_2.L^{-1}$), é possível inferir que o resíduo sólido de citros foi favorável à obtenção de H_2 . Além disso, a presença de microrganismos autóctones presentes no bagaço de citros pode ter contribuído para o aumento da disponibilidade de açúcares fermentáveis no meio reacional (HARUTA et al., 2002).

É possível inferir que o aumento da biomassa da cepa isolada (IS_2) conciliada à comunidade autóctone do resíduo sólido de citros (autofermentação + bioaugmentação) afetou positivamente a obtenção de H₂. De acordo com Lin et al. (2017) e Valdez-Vazquez et al. (2015), as bactérias autóctones tem maior afinidade ao seu resíduo de origem do que quando aplicadas em outros substratos, o que justifica a importância do estudo da microbiota específica do resíduo sólido de citros.

Figura 5.52. Remoção de carboidratos totais (●) e potencial máximo de concentração de H₂ do ensaio contendo glicose (■), bioaugmentação (resíduo sólido de citros + IS_2) (◆) e autofermentação + bioaugmentação (apenas resíduo sólido de citros) (▲) nos reatores em batelada inoculados com a cepa (IS_2) isolada de resíduo sólido de citros.



A obtenção de H₂ utilizando a cepa isolada (IS_2) pode ser comparada ao uso de consórcios com predominância de *Clostridium* a partir de diferentes resíduos, como xilose (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012), resíduos lignocelulósicos (BRAGA et al., 2017; LIN et al., 2017; VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2019) e celulose (RABELO et al., 2018b), e em condições operacionais similares (pH neutro e temperatura mesofílica) (Tabela 5.26).

Yin e Wang (2016) obtiveram 116 mmol H₂.L⁻¹ a partir da fermentação de glicose com *E. faecium*, o que pode indicar maior afinidade desta cepa com a glicose em comparação à cepa isolada (IS_2). Entretanto, estes autores utilizaram maiores concentrações de glicose (15 g.L⁻¹) do que no presente estudo (2 g.L⁻¹). A partir destes

resultados, é possível inferir que novos estudos acerca das condições ótimas para obtenção de H₂ por meio de cepas isoladas são necessários para o estabelecimento das condições operacionais mais indicadas para cada organismo em diferentes substratos.

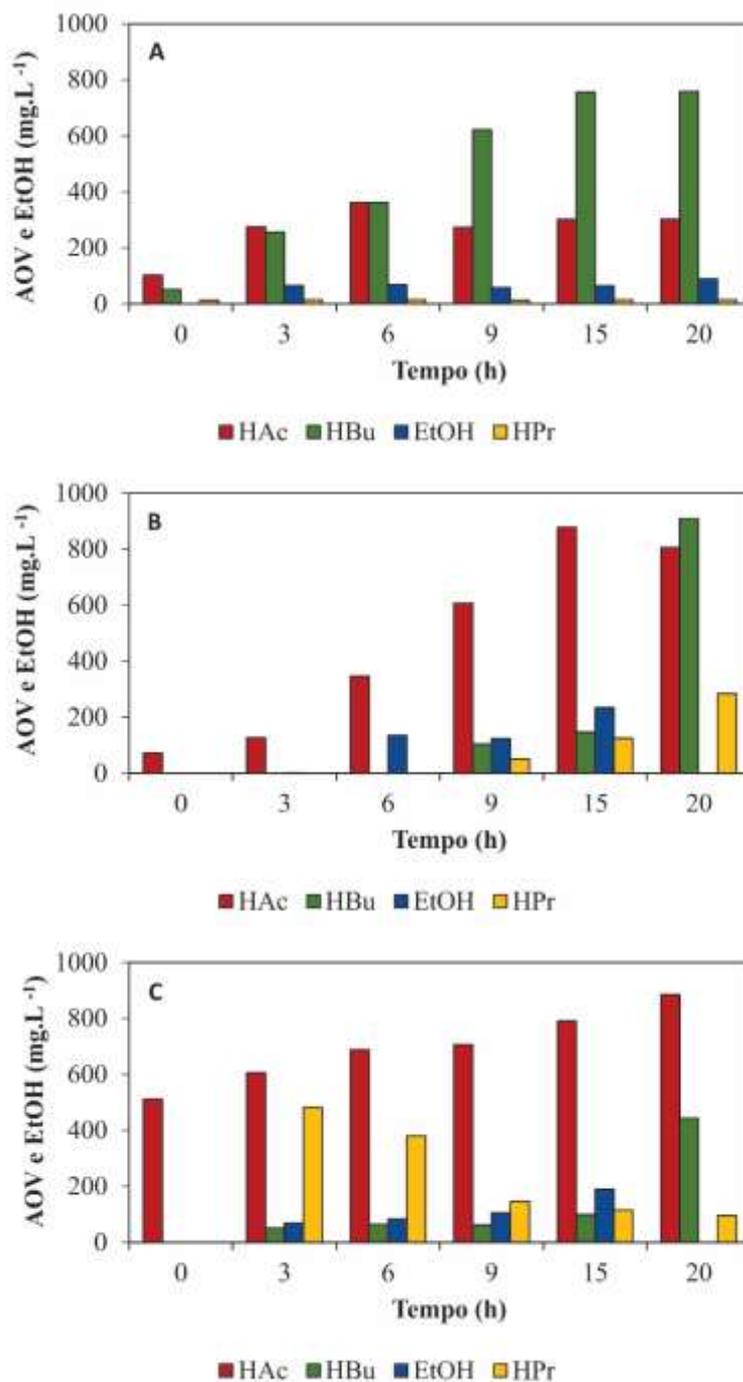
Tabela 5.26. Concentração de H₂ a partir de diferentes substratos e inóculos.

Inóculo	Substrato	Reator	pH	t °C	mmol H ₂ .L ⁻¹	Referência
<i>C. acetobutylicum</i> + <i>Citrobacter freundii</i>	Xilose	CSTR*	6,8	45	7,3	Mäkinen et al. (2012)
Consórcio autóctone	Resíduos de cogumelos	Batelada	8,0	55	6,4	Lin et al. (2017)
Consórcio misto	Celulose	Batelada	6,8	37	39,2	Rabelo et al. (2018a)
<i>C. acetobutylicum</i> + <i>C. cellulovorans</i>	Palha de trigo	Batelada	5,5	37	17,6	Valdez-Vazquez et al. (2019)
<i>C. cellulolyticum</i> (atual <i>R. cellulolyticum</i>)	Bagaço de cana-de-açúcar	Batelada	7,0	37	7,6	Braga et al. (2017)
<i>Enterococcus faecium</i>	Glicose resíduo	Batelada	7,0	35	116	Yin e Wang (2016)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	sólido de citros	Batelada	7,0	37	13,9	Presente pesquisa

* *continuous stirred-tank reactor*.

A partir do monitoramento da produção de AOV ao longo do período de incubação (Figura 5.53), é possível notar que HAc e HBU foram os principais metabólitos tanto a partir de glicose quanto a partir de resíduo sólido de citros. Entretanto, a partir de resíduo sólido de citros, houve maior produção de HPr, de 284 mg.L⁻¹ no ensaio de autofermentação + bioaugmentação e 95 mg.L⁻¹ no ensaio de bioaugmentação, comparados a apenas de 14 mg.L⁻¹ a partir da glicose.

Figura 5.53. Compostos orgânicos a partir da glicose (A), autofermentação do resíduo sólido de citros + bioaumentação (B) e bioaumentação (C) ao longo do tempo de operação dos reatores em batelada.



De acordo com Ruiz e Flotats (2016), quanto maior a concentração de limoneno, maior o acúmulo de AOV, especialmente HPr. Os principais metabólitos observados a partir da autofermentação do resíduo sólido de citros foram HAc (805 mg.L⁻¹), HBu (909 mg.L⁻¹) e HPr (284 mg.L⁻¹). A produção de HPr foi crescente no ensaio de autofermentação do resíduo sólido de citros, sendo que foram obtidos 50 mg.L⁻¹ em 9 h de incubação e 284 mg.L⁻¹ ao final da fermentação. No ensaio de bioaumentação, foram obtidos 482 mg.L⁻¹ de

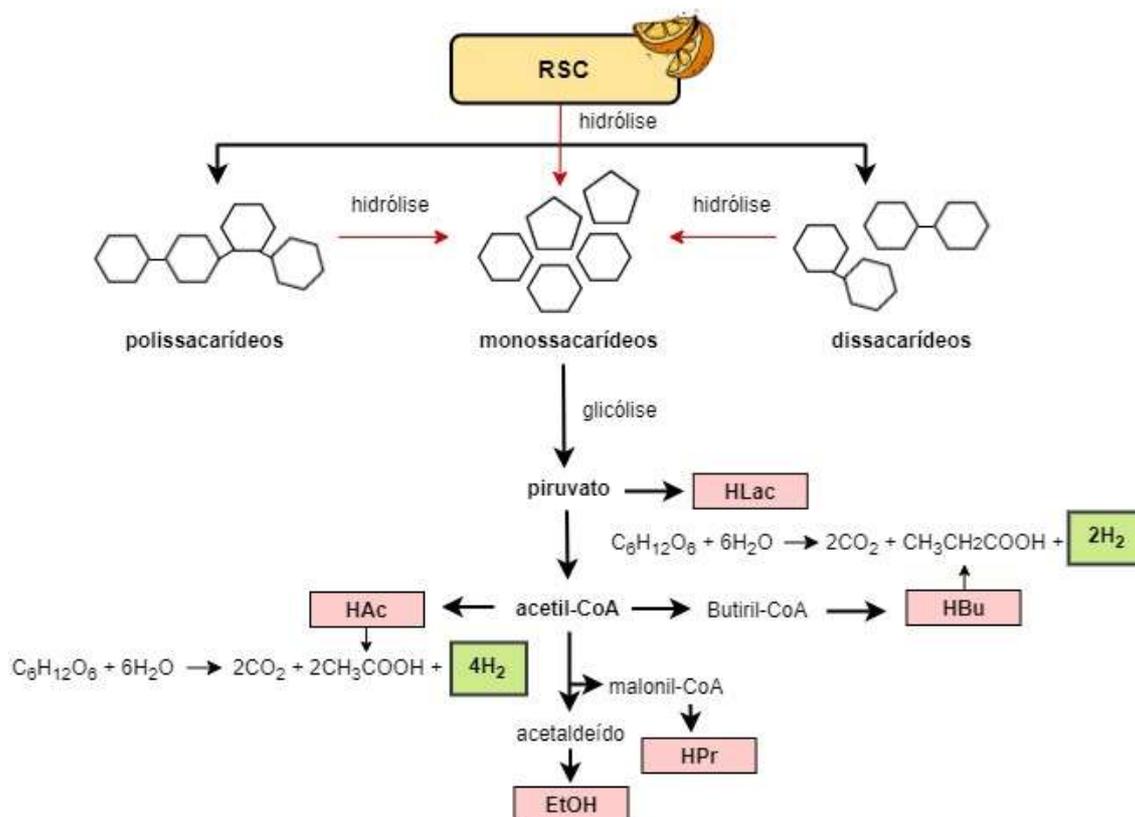
HPr após 3 h, sendo que a concentração deste composto ao final do processo fermentativo foi reduzida para 95 mg.L⁻¹. Desta forma, é possível inferir que a bioaugmentação da cepa isolada (IS_2) favoreceu a produção de HAc a partir do resíduo sólido de citros e, conseqüentemente, a obtenção de H₂.

Apesar da produção de HPr não ser favorável à obtenção de H₂, destaca-se que a produção de HAc foi superior no ensaio de bioaugmentação (886 mg.L⁻¹) quando comparado à glicose (303 mg.L⁻¹), o que justifica a maior obtenção de H₂ a partir da bioaugmentação, uma vez que a via acetogênica é favorável à produção deste composto (ŁUKAJTIS et al., 2018). Da mesma forma, Su et al. (2016) observaram que após 30 dias de fermentação em reatores em batelada operados com esterco suíno como inóculo, os principais AOV produzidos a partir de resíduo de citros foram HAc (2610,7 mg.L⁻¹), HPr (56,2 mg.L⁻¹) e HBU (27,5 mg.L⁻¹).

Wang et al. (2009) relataram o potencial de *E. gallinarum* para obtenção de H₂ a partir de celulose (Avicel; 5 g.L⁻¹), obtendo 2,38 mmol de H₂.g⁻¹ de substrato, com co-produção HAc, HPr e HBU ao final do período de incubação. Yin e Wang (2016) obtiveram 1,69 mol de H₂.mol⁻¹ de glicose utilizando *E. faecium* como inóculo, com prevalência da via acetogênica ao longo do processo. Desta forma, é possível inferir que a degradação de substratos complexos pode favorecer a produção de HPr, ao contrário dos substratos simples, tais como os monômeros.

Encontram-se resumidas na Figura 5.54 as possíveis vias de conversão dos resíduos sólidos de citros e diferentes carboidratos (poli, di e monossacarídeos) em H₂, bem como os principais compostos orgânicos acumulados durante a fermentação pela cepa isolada de *E. casseliflavus* (IS_2). É importante salientar que diferentes compostos podem ser produzidos de acordo com cada substrato utilizado, devido às suas características e às etapas necessárias à sua fermentação (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; SINHA; PANDEY, 2014; ŁUKAJTIS et al., 2018; MAZARELI et al., 2019). Outro fator importante é o pH, uma vez que o piruvato pode ser convertido em HLac em pH entre 5,0-6,0, mas em pH neutro ou ligeiramente alcalino os principais metabólitos são EtOH e HAc, como pode ser observado no presente estudo a partir de glicose a pH 7,0, sendo obtidos 345 e 243 mg.L⁻¹ de EtOH e HAc, respectivamente. O esquema foi proposto de acordo com Vos et al. (2009) e os resultados a partir de diferentes substratos descritos no presente estudo.

Figura 5.54. Possíveis vias de conversão de resíduo sólido de citros (RSC), polissacarídeos e monossacarídeos aos principais metabólitos observados na fermentação de *E. casseliflavus*. HAc = ácido acético; HBu = ácido butírico; HPr = ácido propiônico; HLac = ácido lático; EtOH = etanol.



Fonte: Elaboração própria.

5.7 POTENCIAL METANOGÊNICO

5.7.1 Obtenção de biogás e AOV

Após o período de incubação de aproximadamente 22 h, foram obtidos P de 13,29 $\text{mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, Rm de 2,46 $\text{mmol H}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ e λ de 8,76 h na Fase I, nas condições de 30 °C, pH 8,5, 2,25 $\text{gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ de inóculo autóctone, 3 $\text{gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ de inóculo alóctone, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de resíduo sólido de citros, 40% de *headspace* e 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl. Neste estágio, não foi possível detectar produção de metano ($\leq 1,17 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$).

Após descarte da fração sólida, a fração líquida do reator fermentativo obtido na Fase I (reator acidogênico) foi utilizado como substrato da Fase II (reator metanogênico), que teve como principal objetivo a obtenção de CH_4 , a fim de simular um sistema de duas fases (fase acidogênica a partir de resíduos sólidos de citros e fase metanogênica a partir da fração líquida do primeiro reator).

Os reatores foram monitorados por período de aproximadamente 700 h (Figura 5.55). De acordo com os dados obtidos (Tabela 5.27), estima-se que o P calculado para

concentração de CH_4 foi de $50,2 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, a velocidade máxima da reação foi de $0,2 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{h}^{-1}$ e o tempo de início da obtenção de CH_4 foi de $281,4 \text{ h}$. Além disso, é possível observar que o aumento da velocidade teve início em aproximadamente 240 h de incubação, coincidindo com o momento no qual a produção de hidrogênio cessou, possivelmente devido à atividade de bactérias homoacetogênicas e/ou arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Figura 5.55. Concentração de H_2 na Fase I e obtenção de H_2 e CH_4 na Fase II.

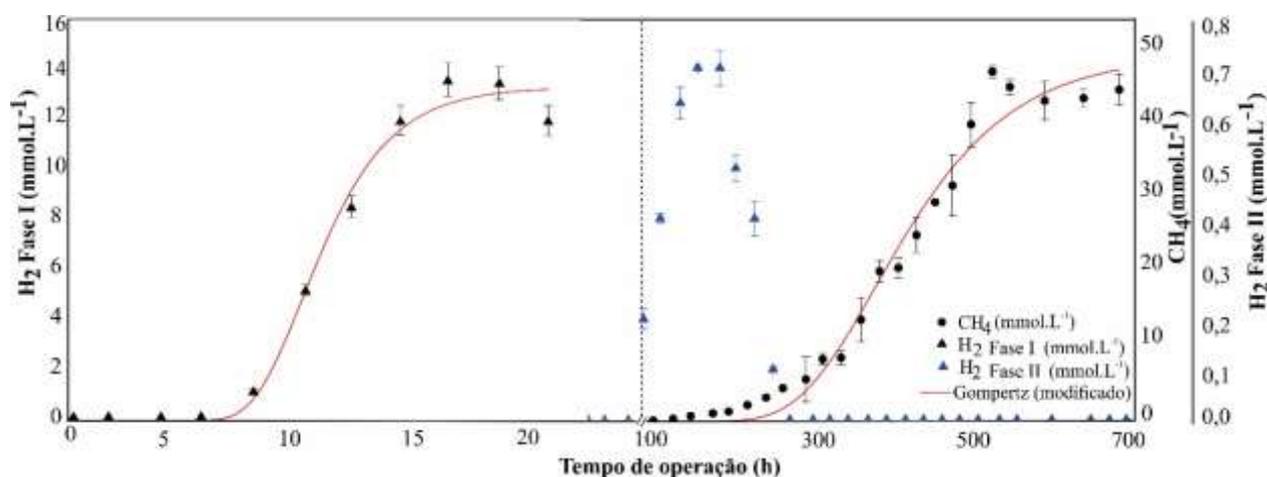


Tabela 5.27. Parâmetros cinéticos de obtenção de H_2 e CH_4 nas fases I e II, respectivamente.

Parâmetros	Fase I (H_2)	Fase II (CH_4)
P ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$13,29 \pm 0,48$	$50,2 \pm 2,3$
Rm ($\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1}$)	$2,46 \pm 0,35$	$0,2 \pm 0,01$
λ (h)	$8,73 \pm 0,40$	$281,4 \pm 10,42$
R^2	0,99	0,98
Produção específica	39.7	187.4

Nota: (-) Não detectado. Produção específica = $\text{mL} \cdot \text{gTVS}_{\text{RSC}} \cdot \text{L}^{-1}$. Potencial máximo de concentração de H_2 (P), velocidade específica máxima de obtenção de H_2 (Rm), tempo de início da obtenção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.

Forgàs et al. (2012) obtiveram concentração máxima de $247,7 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando resíduo de citros tratado por explosão a vapor com inóculo de reator de planta de produção de biogás. Calabrò et al. (2016) utilizaram diversos inóculos para a obtenção de metano a partir de resíduos de citros, tais como resíduos industriais e resíduos

agroindustriais, sendo obtidos os melhores resultados em experimentos em condição mesófila em reatores em batelada, com concentração de $33 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$. Destaca-se ainda a obtenção de $0,01 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando resíduo pré-tratado de citros com inóculo de estrume suíno e lodo de esgoto (SU; TAN; XU, 2016). Quando comparados aos trabalhos mencionados, é possível concluir que a obtenção de metano observada na presente pesquisa foi satisfatória ($50,2 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$), especialmente considerando-se que não foi necessário pré-tratamento inicial dos resíduos sólidos de citros, uma das etapas mais onerosas do processo.

Tendo em vista que altas concentrações de compostos orgânicos são inibitórias aos microrganismos metanogênicos, a faixa ideal para processos metanogênicos é entre 6,5-7,5, tem-se investido em sistemas de duas fases, a fim de favorecer os microrganismos específicos de cada etapa do processo fermentativo a partir do ajuste das variáveis operacionais ótimas para cada estágio – hidrólise/acidogênese (Fase I) e metanogênese (Fase II). Liu et al. (2006) apontam que a obtenção de metano a partir de resíduos sólidos chega a ser até 21% maior em processos de duas fases quando comparado a uma única fase, provavelmente devido à hidrólise avançada do substrato durante a primeira etapa, na qual há obtenção de hidrogênio e ácidos orgânicos, enquanto a obtenção de hidrogênio pode aumentar em até 88%.

Na presente pesquisa, o acúmulo de AOV ao final da fase acidogênica, especialmente HAc, favoreceu a obtenção de H_2 na Fase II devido a presença de arqueias metanogênicas acetoclásticas. Neste estudo, os valores de P para H_2 na Fase I e metano na Fase 2 foram de $13,29 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ e $50,2 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, Braga et al. (2018) avaliaram o potencial do efluente do processo fermentativo em batelada de bagaço de cana-de-açúcar, a partir de lodo de reator UASB como inóculo, utilizando bateladas em duas fases. Os autores obtiveram concentração máxima de $7,6 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ na Fase II.

Cremones et al. (2020) avaliaram a separação das fases acidogênica e metanogênica em reatores alimentados com polímero à base de amido de mandioca em reatores semi-contínuos de fluxo ascendente, e obtiveram $26,69 \text{ mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}$ and $528,2 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$. Provavelmente, os maiores valores obtidos por Cremones et al. (2020) estejam relacionados a configuração reacional e características do resíduo usado como substrato, bastante diferente dos valores obtidos na presente pesquisa.

Os resultados referentes às análises físico-químicas dos reatores do ensaio de potencial metanogênico encontram-se resumidos na Tabela 5.28. A partir das análises estatísticas para o intervalo de confiança de 95%, foi possível observar diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados os dados de SST ($p=0,01067$), SSV ($p=0,1199$), carboidratos totais ($p=0,01547$), DQO_{filtrada} ($p=0,04405$) e concentração de fenóis totais ($p=0,006931$) das fases I e II. Da mesma forma, a variação do pH foi considerada como estatisticamente não significativa ($p=0,05614$).

A concentração inicial de limoneno no resíduo sólido de citros bruto foi de 14.700 mg.kg⁻¹. Sendo assim, entende-se que a concentração inicial desse composto na Etapa I foi de aproximadamente 220,5 mg.kg⁻¹. Uma vez que Calabrò et al. (2016) estabeleceram que valores acima de 200 mg.kg⁻¹ de limoneno são inibitórias à metanogênese, é possível inferir que a presença desse composto foi um dos motivos para a ausência de concentrações significativas de CH₄ no biogás no Estágio I.

Neste estudo, o pH inicial na Fase I foi ajustado para 8,5, atingindo 6,7 após a fermentação, enquanto na Fase II o pH inicial foi ajustado para 7,0, com pH final de 7,4, o que pode ter potencializado o efeito inibitório do limoneno na Fase I. Sabe-se que o pH ideal para acidogênese e metanogênese são distintos, ou seja, ácido e neutro, respectivamente. Provavelmente, na condição da Fase I (reator acidogênico) a ação antimicrobiana do limoneno pode ter sido potencializada inviabilizando a obtenção de metano, uma vez que sua concentração inicial na Fase I foi de 220,5 mg.L⁻¹, ou seja, acima do limite inibitório de 200 mg.L⁻¹ estabelecido por Calabrò et al. (2016). Burt (2004) descreveu que vários parâmetros podem afetar a toxicidade do limoneno e outros óleos essenciais, sendo o pH um deles, que em condições ácidas pode aumentar sua toxicidade.

A concentração inicial de limoneno na Fase II foi de 0,58 mg.kg⁻¹. Uma vez que a concentração inibitória mínima de limoneno é estimada em aproximadamente 200 mg.kg⁻¹ (CALABRÒ et al., 2016; RUIZ; FLOTATS, 2016). Sob tais condições, é possível inferir que não houve inibição da metanogênese na Fase II em função da concentração de limoneno. Entretanto, este composto não foi observado ao final do período de operação da Fase II, que pode indicar sua volatilização para o *headspace* ou degradação em *p*-cimeno, um composto menos tóxico comumente gerado a partir da degradação do limoneno em anaerobiose.

Tabela 5.28. Parâmetros físico-químicos dos reatores do ensaio de potencial metanogênico ao final do período de operação da Fase I e Fase II.

Sólidos (g.L⁻¹)	Fase I	Fase II
SST	1,71±0,2	0,58±0,1
SSV	1,11±0,1	0,40±0,1
DQO_{filtrada} (g.L⁻¹)	18,85±0,2	9,38±0,4
Carboidratos totais (g.L⁻¹)	1,09±0,1	0,30±0,1
Fenóis totais (mg.L⁻¹)	20,09±0,5	19,43±0,3
Limoneno (mg.L⁻¹)	0,58	-
Lignina (%)	25,27	-
pH (inicial)	8,5	7,0
pH (final)	6,86±0,0	7,37±0,0

Nota: (-) Não detectado.

Foi possível observar maior concentração de matéria orgânica e acúmulo de ácidos orgânicos ao final da fase acidogênica (Fase I). A partir destes resultados, é possível inferir que a combinação da obtenção de H₂ com a obtenção de metano acaba por favorecer a recuperação de energia (LU et al., 2009; BRAGA et al., 2018).

Apesar da importância da produção de AOV como intermediários para o processo de digestão anaeróbia, o acúmulo destes compostos pode levar à inibição do processo. Esta inibição pode ocorrer devido à competição por substrato em vias nas quais não há produção de biogás e quando estas moléculas penetram pela membrana celular e ocorre sua dissociação no interior da célula, levando à acidificação do citoplasma devido ao acúmulo de ânions e redução da força próton motiva, do potencial de crescimento e metabolismo celular (JIANG et al., 2018).

De acordo com Yusof et al., (2019), estima-se que concentrações acima de 900 mg.L⁻¹ de AOV podem ser inibitórias para a metanogênese, uma vez que podem acarretar em acidificação do meio. Na Fase I, foram obtidos 1.498 mg.L⁻¹ de AOV ao final do período de operação, além de valores ≥ 900 mg.L⁻¹ ao longo de todo o processo fermentativo. Na Fase II, apesar de 1.439 mg.L⁻¹ de AOV iniciais ocorreu o seu consumo ao longo do processo, consequentemente refletindo em maior período de adaptação da biomassa ($\lambda = 281,4$ h) para a obtenção de CH₄.

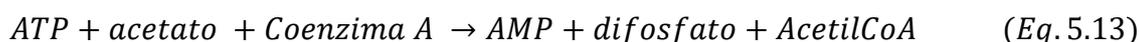
Foram observadas concentrações crescentes de HAc ao longo do período de operação da Fase I, sendo de 63 mg.L⁻¹ no início da incubação e 1340 mg.L⁻¹ ao final do processo (Figura 5.56). Além disso, 907 mg.L⁻¹ de H₂Bu foram produzidos no início da operação da Fase I, 723 mg.L⁻¹ durante o processo e 31 mg.L⁻¹ ao final do processo, sendo

possível inferir que houve conversão do HBU em HAC ao longo do período de incubação (Equação 5.12).



A predominância da via acetoclástica pode ter contribuído para a concentração elevada de H₂ na Fase I, uma vez que há rendimento de 4 mols de H₂ para cada mol de glicose consumidos nesta via (Equação 3.3), enquanto na produção de HBU há rendimento de apenas 2 mols de H₂ para cada mol de glicose (Equação 3.4) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; ŁUKAJTIS et al., 2018). Além disso, o HBU não pode ser utilizado como substrato direto para a metanogênese, sendo necessária, portanto, a sua conversão à HAC, que por sua vez pode ser consumido como substrato na metanogênese acetoclástica. Na Fase II, houve redução da concentração de HAC (1317 a ≤10 mg.L⁻¹), que pode ser atribuída ao seu consumo na via acetoclástica (Equação 3.7) (NESHAT et al., 2017).

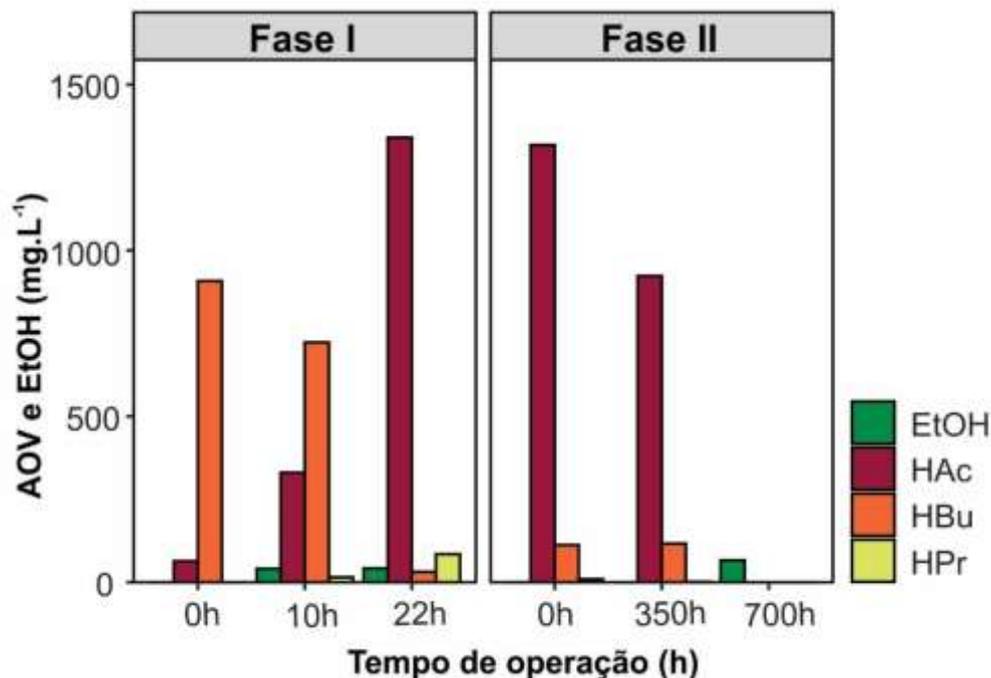
Ao final da Fase I, foram obtidos 85 mg.L⁻¹ de HPr e 40 mg.L⁻¹ de EtOH. Uma vez que na via metabólica de produção de HPr, há consumo de 2 mols de H₂ para cada mol de glicose oxidado (Equação 3.5) (LI; FANG, 2007; GHIMIRE et al., 2015), sabe-se que concentração elevada deste ácido é desvantajosa para o processo. Da mesma forma, na via solvetogênica há consumo de HAC para a produção de EtOH (Equação 5.13). Assim como o HBU, o HPr não pode ser diretamente consumido por arqueias metanogênicas, sendo necessária sua conversão à HAC (Equação 5.8).



Nota-se que na conversão dos compostos mencionados em HAC há concomitante obtenção de H₂, que por sua vez pode ser consumido por arqueias hidrogenotróficas para a redução do CO₂ a CH₄ (Equação 3.8).

Dentre os metabólitos observados, o HPr vem sendo reportado como o mais tóxico para o processo de digestão anaeróbia devido a sua dificuldade de assimilação (NESHAT et al., 2017; XING et al., 2020). De acordo com Shen et al. (2018), o HPr pode ser inibitório para a metanogênese acima de 1.000 mg.L⁻¹. Desta forma, considerou-se que a concentração de HPr observada ao final da Fase I (85 mg.L⁻¹) não foi inibitória para a metanogênese na Fase II.

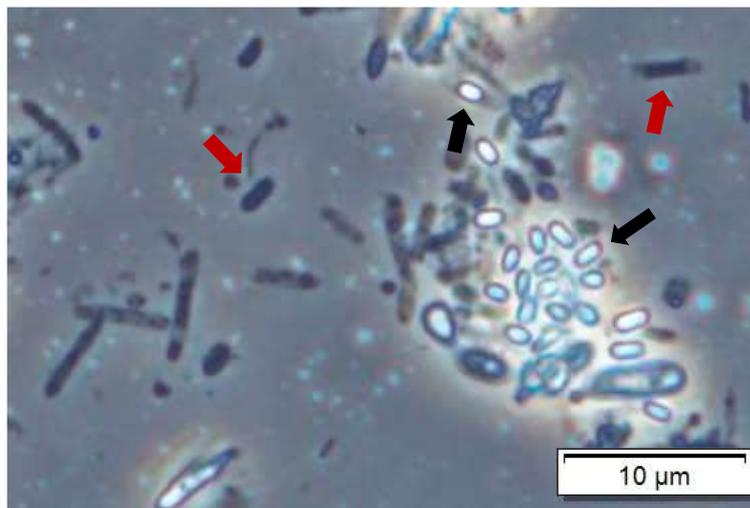
Figura 5.56. Ácidos orgânicos e etanol ao longo do período de incubação na Fase I (A) e Fase II (B) em diferentes amostrais temporais (CP1-3). Para as condições otimizadas, os pontos amostrais foram coletados no período entre 0-22 h, enquanto para as condições não otimizadas as amostras foram coletadas entre 0-700 h. Ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiônico (HPr) e etanol (EtOH).



5.7.2 Caracterização da comunidade microbiana

As análises micromorfológicas da biomassa após o término da operação dos reatores acidogênicos (Fase I) e metanogênicos (Fase II) foram avaliados, sendo verificado no primeiro caso bacilos e endósporos (Figura 5.57). Além disso, foi possível observar sarcinas e bacilos fluorescentes, característica comum em arqueias metanogênicas semelhantes a *Methanosarcina* e *Methanobacterium*, devido à presença da coenzima carreadora de elétrons F₄₂₀, que absorve luz na faixa de 420 nm e fluoresce na forma verde-azulada (MADIGAN, 2016).

Figura 5.57. Características micromorfológicas da biomassa da Fase II ao final do período de incubação. As setas vermelhas indicam os bacilos e as setas pretas indicam os endósporos. Aumento total de 1600X.



Após as análises de *metabarcoding* da biomassa do ensaio de potencial metanogênico do efluente foi possível comparar os resultados desta etapa (Fase II) com os resultados obtidos para a Fase I. Foram obtidas 35.485 sequências de genes do RNAr 16S para a amostra da Fase I e 33.761 para a Fase II. As Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) obtidas foram agrupadas considerando similaridade superior a 97% e, após a remoção de *singletons* foram obtidas 600 OTU para a Fase I e 646 OTU para a Fase II. Em relação aos valores de cobertura ($\geq 99\%$), referentes à proporção de sequências representativas, foi possível notar que a maior parte das populações foram acessadas, indicando boa cobertura das amostras analisadas (Figura 5.58).

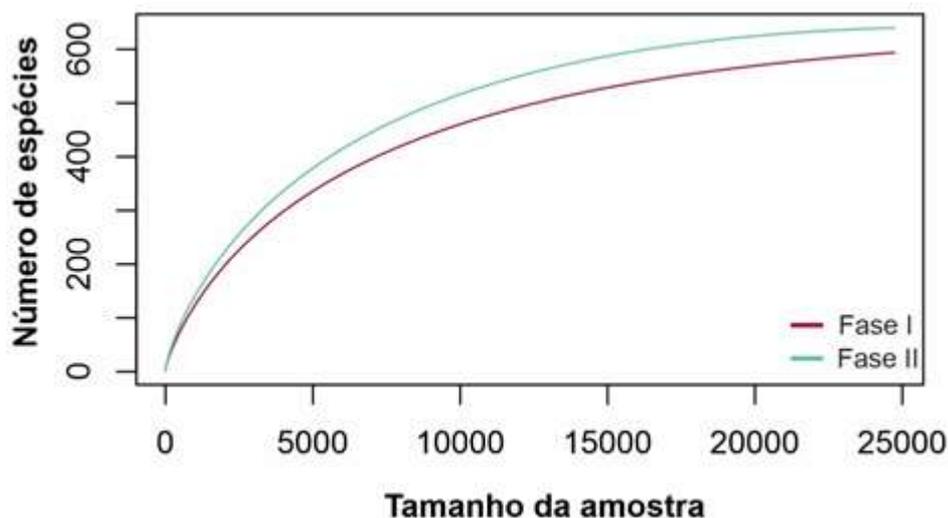
Os índices ecológicos avaliados encontram-se resumidos na Tabela 5.29. Os valores obtidos para a amostra da biomassa da Fase I e Fase II foram comparados, sendo que houve maior diversidade na Fase I (3,9), em relação à Fase II (2,9). Esta diversidade foi inferida por meio do índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), que leva em consideração o número de taxons e sua dominância na amostra. Entretanto, com base no índice de Simpson, estimou-se dominância similar em ambas as amostras (0,8). Uma possível explicação para estes valores similares, em contraste aos valores distintos de diversidade, é que a separação dos reatores em fases distintas favoreceu as condições ótimas para os organismos envolvidos tanto na etapa acidogênica (Fase I), quanto na etapa metanogênica (Fase II) (BRAGA et al., 2018; CREMONEZ et al., 2020).

A riqueza das amostras foi comparada por meio do índice Chao-1, sendo possível observar maior riqueza, relativa ao maior número de OTUs observado, na amostra da Fase II (643,4) em relação à Fase I (643,1). Vale ressaltar que os valores obtidos para o índice de Chao-1 são ligeiramente maiores que o número real de OTUs observado, uma vez que este índice assume que o número de observações para um táxon tem uma distribuição de Poisson (distribuição de probabilidade de variável aleatória discreta) e corrige sua variância por meio da soma de um valor a_0 , referente ao número desconhecido de táxons presente na comunidade, mas que não foi observado nas amostras (HUGHES et al., 2001). Os valores próximos observados podem estar relacionados à utilização da mesma fonte de inóculo em ambas as fases (lodo UASB oriundo do tratamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar), bem como ao ajuste das condições mais favoráveis a cada etapa.

Tabela 5.29. Índices ecológicos do gene RNAr 16S para as fases I e II do ensaio acidogênico e metanogênico de resíduo sólido de citros.

	Amostras	
	FASE I	FASE II
Parâmetros sequenciamento (16S RNAr)		
Cobertura (%)	99,6	99,9
Número total de sequências	35.485	33.761
Comprimento médio	418	422
GC (%)	55,12	54,42
Total de OTUs	600	646
Índices ecológicos		
Shannon-Wiener (H')	3,9	2,9
Simpson	0,8	0,8
Chao-1	643,1	643,4

Figura 5.58. Curvas de rarefação obtidas para as sequencias obtidas após sequenciamento massivo do gene RNAr 16S via plataforma *Illumina* HiSeq para as amostras das fases I e II.



Os filos identificados em maior abundância relativa, tanto na Fase I, quanto na Fase II para o Domínio Bacteria foram Proteobacteria (47,83 e 42,34%) Firmicutes (40,55 e 48,32%), Thermotogae (3,04 e 0,72%) e Acidobacteria (2,45 e 2,15%), respectivamente. Outros filos observados em menores proporções ($\leq 1,5\%$) foram Bacteroidetes, Nitrospirae, Chloroflexi, Spirochaetes, Tenericutes, entre outros. A maior abundância de Proteobacteria e Firmicutes pode ser relacionada aos principais metabólitos observados na Fase I, na qual houve acúmulo de HAc (1340 mg.L^{-1}) e H₂ (723 mg.L^{-1}), os principais metabólitos produzidos por bactérias pertencentes a estes filos (VOS et al., 2009).

Os principais gêneros identificados na Fase I (Figura 5.59), etapa na qual ocorreu a fermentação dos resíduos sólidos de citros e consequente produção de compostos orgânicos e H₂, foram *Escherichia* (34,39%), *Clostridium* (29,83%), *Enterobacter* (8,52%), *Trichococcus* (4,18%) e *Coprothermobacter* (1,89%). Entre os gêneros mencionados, vale ressaltar a importância de *Clostridium* nas diferentes etapas que envolvem a obtenção de hidrogênio a partir da biodegradação de resíduos sólidos de citros, uma vez que diversas espécies deste gênero são conhecidamente celulolíticas, além de produtoras de compostos orgânicos e H₂ via acetogênese. Rabelo et al. (2018a) e Villa-Montoya et al. (2019) observaram maior abundância relativa de *Clostridium* em reatores anaeróbios aplicados a fermentação mesofílica de bagaço de cana-de-açúcar e resíduos do processamento de café, respectivamente.

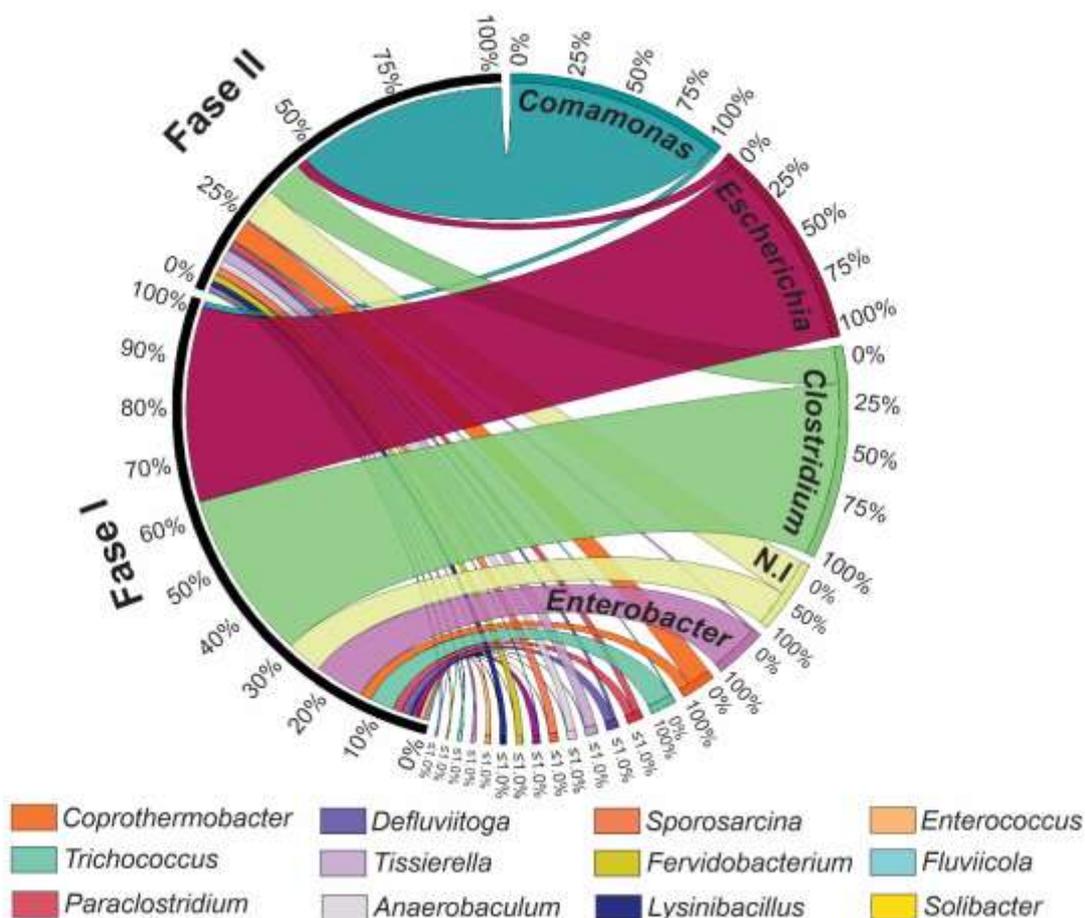
A identificação de *Escherichia* e *Enterobacter* na Fase I pode ser justificada devido a sua afinidade com temperaturas mesofílicas e pH neutro (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005), além da resistência ao limoneno, um dos principais inibidores dos resíduos de citros (CALABRÒ et al., 2016). Estas bactérias do filo Proteobacteria podem ter contribuído para o acúmulo de HAc na Fase I, uma vez que este ácido é o principal metabólito produzido por estes organismos (VOS et al., 2009).

O gênero *Coprothermobacter* está relacionado com a origem do inóculo utilizado, uma vez que possuem afinidade com temperaturas termofílicas (GAGLIANO et al., 2015) utilizadas na operação do reator UASB aplicado ao processamento de vinhaça de cana-de-açúcar (55 °C). Além disso, o gênero mencionado foi identificado por Soares et al. (2017) com abundância relativa de 41,73% em inóculo de mesma origem. *Trichococcus* são comuns em lodos de esgoto, sendo que sua temperatura ótima é entre 25-30 °C (PARSHINA et al., 2019), temperatura de operação da Fase I.

Na Fase II, os principais gêneros do domínio Bacteria identificados foram *Comamonas* (36,54%), *Clostridium* (6,30%), *Coprothermobacter* (4,0%), *Tissierella* (1,89%), *Escherichia* (1,81%), *Sporosarcina* (1,40%), *Anaerobaculum* (1,36%), *Lysinibacillus* (1,18%) *Paraclostridium* (1,14%) e *Enterococcus* (0,93%). Os organismos do gênero *Comamonas* são aeróbios e já foram relatados em reatores anaeróbios (DELFORNO et al., 2017, 2019). Além disso, *Comamonas* pode estar relacionado à hidrólise de HAc (WILLEMS; GILLIS, 2015).

Entre os gêneros de bactérias identificado na Fase II, destaca-se *Clostridium* (6,30%), *Eubacterium* (0,00089%) e *Thermoanaerobacter* (0,000162%), que podem ser associados à homoacetogênese, processo no qual o H₂ é consumido e convertido em ácido acético. Uma vez que não houve aumento na concentração deste ácido ao longo do período de operação, é possível inferir que este processo não foi predominante nos ensaios realizados. Além disso, a cinética de crescimento dos organismos homoacetogênicos é inferior a das arqueias hidrogenotróficas (BRAGA et al., 2018).

Figura 5.59. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros de bactérias identificados nas fases I e II.



Não se observou produção de metano ao longo do período de operação da Fase I, entretanto, arqueias metanogênicas dos gêneros *Methanosarcina*, *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* foram identificadas com abundância relativa de 0,16%, 0,08% e 0,02%, respectivamente. A inibição da metanogênese na Fase I pode estar relacionada com a concentração de limoneno, um dos principais inibidores presentes em resíduos sólidos de citros, uma vez que sua concentração observada foi de 0,58 mg.kg⁻¹, enquanto na Fase II este composto não foi observado.

Maior abundância relativa de arqueias foi observada na Fase II (Figura 5.60), uma vez que nesta etapa objetivou-se à obtenção de CH₄ a partir do fração líquida acidificada da Fase I. Os gêneros metanogênicos (filo Euryarchaeota) identificados foram *Methanoplasma* (0,26%), *Methanoculleus* (0,25%), *Methanosarcina* (0,20%), *Methanomassiliicoccus* (0,15%) e *Methanothermobacter* (0,083%).

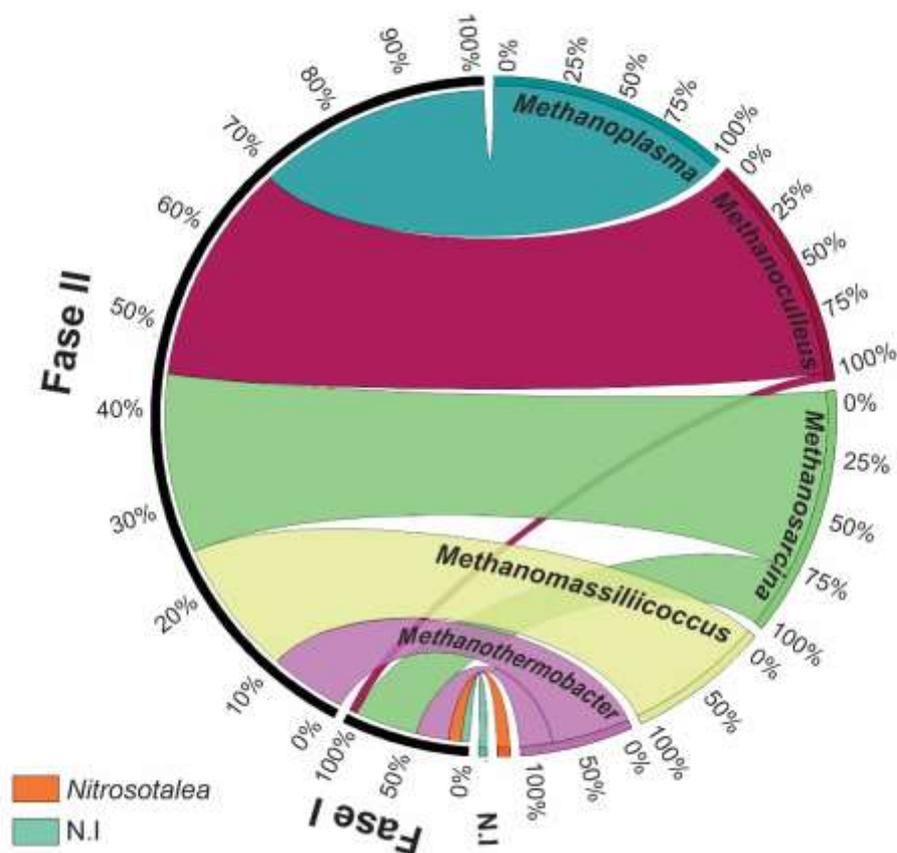
Arqueias do gênero *Methanoculleus* podem produzir CH₄ a partir de CO₂ e H₂. Apesar de não serem capazes de utilizar ácido acético, estes organismos são mais tolerantes às elevadas concentrações de compostos orgânicos, como HAc e HPr, quando comparadas às outras arqueias metanogênicas (JIANG et al., 2019). De acordo com Zhang et al. (2017), aproximadamente 30% do metano formado em reatores anaeróbios provém da via hidrogenotrófica, o que contribui para a manutenção da pressão parcial do reator e estabelecimento de bactérias sintróficas.

Exceto pelo gênero *Methanosarcina*, que pode ser versátil e apresentar metabolismo acetoclástico, os demais gêneros identificados podem ser considerados hidrogenotróficos (LANG et al., 2015). Desta forma, a identificação destas arqueias hidrogenotróficas pode estar relacionada ao consumo de H₂ no início do período de operação da Fase II. Apesar de apresentar metabolismo preferencialmente metilotrófico, *Methanoplasma* e *Methanomassiliicoccus* são associados à metanogênese hidrogenotrófica (KOO; YULISA; HWANG, 2019), possivelmente devido à sua dependência de H₂ para regeneração da coenzima M no metabolismo metilotrófico, por meio da redução do CO₂ (OZBAYRAM et al., 2018).

Koo, Yulisa e Hwang (2019) relataram favorecimento da via hidrogenotrófica em reatores anaeróbios operados com resíduos de alimentos como substrato e resíduo animal como inóculo. O gênero identificado em maior abundância relativa foi *Methanoculleus*, além de *Methanoplasma* e *Methanomassiliicoccus*. Em Ghosh et al. (2020), os autores realizaram a caracterização metataxonômica do consórcio microbiano envolvido na biodegradação de resíduo sólido municipal e lodo de esgoto. Os autores verificaram que *Methanosarcina* foi o gênero mais abundante, provavelmente devido à sua maior tolerância às elevadas concentrações de HAc produzidas na fase acidogênica e variações no pH. Na presente pesquisa, o pH foi mantido próximo à neutralidade na Fase II (~7,0) e as concentrações iniciais de HAc foram de (1.340 mg.L⁻¹).

Methanosarcina é um gênero multifuncional, capaz de produzir metano a partir de diferentes vias metabólicas (acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica). Desta forma, a identificação dessas arqueias em reatores anaeróbios pode favorecer a obtenção de H₂ devido ao consumo de metabólitos intermediários da digestão anaeróbia, como os ácidos acético e butírico, e contribuindo para a manutenção do pH do reator (NESHAT et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Figura 5.60. Ideograma circular “Circos” representando os gêneros de arqueias nas fases I e II.



5.7.3 Caracterização funcional

Por meio da predição dos perfis funcionais dos dados de *metabarcoding* (16S RNAr), foi possível obter o total de 7.035 diferentes objetos KO para a Fase I e 6.917 KO para a Fase II. A quantificação de cada KO por amostra foi realizada conforme descrito em Iwai et al. (2016), totalizando 6.844.289 na Fase I e 22.234.364 na Fase II. A partir da observação entre o número de correspondências entre os KO obtidos foi possível prever as principais vias metabólicas descritas na plataforma *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) para a categoria “Metabolismo” (24,75 e 22,59%, respectivamente). As vias de Processamento de Informação Genética, Processamento de informações ambientais, Processos Celulares, Sistemas Organizacionais e Doenças Humanas não foram consideradas, uma vez que não são diretamente relevantes para o tema de estudo.

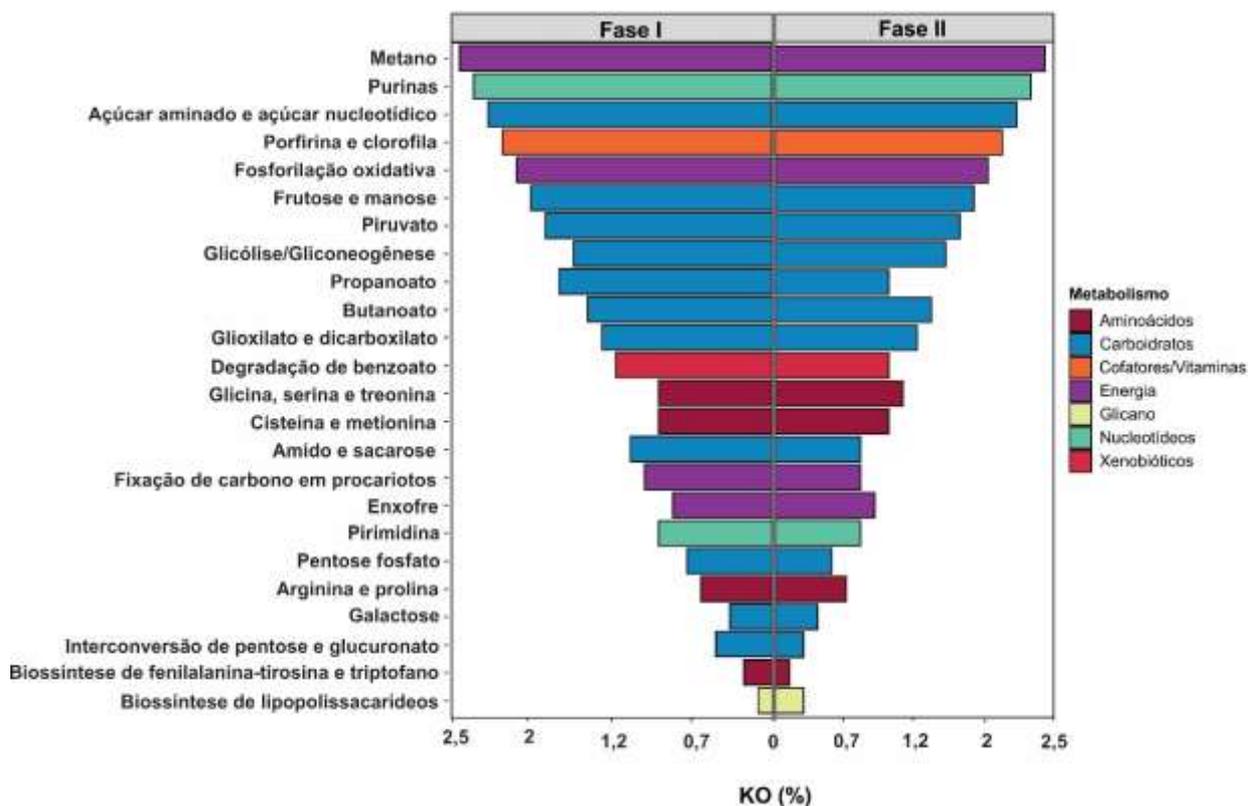
De acordo com a Figura 5.61, nota-se que as principais correspondências se referem às vias de metabolismo de carboidratos (12,70 e 11,48%) e energia (4,66 e 4,71%). Em relação ao metabolismo de carboidratos, as principais subcategorias observadas foram

metabolismo de frutose e manose (1,61 e 1,59%), metabolismo de piruvato (1,60 e 1,58%), glicólise/gliconeogênese (1,57%), metabolismo de propanoato (1,59 e 0,47%) e butanoato (1,52 e 1,51%) e metabolismo de amido e sacarose (0,49 e 0,45%), para Fase I e Fase II, respectivamente. Para o metabolismo energético, destaca-se como principal subcategoria o metabolismo de metano, no qual foram observadas 2,10% das correspondências para a Fase I e 2,20% para a Fase II.

Na Figura 5.62 é possível observar os KO mais abundantes que puderam ser inferidos para as amostras analisadas (Fase I e Fase II). Na Fase I, os KO mais abundantes foram K14230 (0,06%), K14230 (0,06%) e K14225, referentes à Biossíntese de aminoacil-RNAt (0,05%), K14255- 4-amino-anidrotetraciclina N4-metiltransferase (0,06%) e K03088- Fator de RNA polimerase sigma-70 (0,05%).

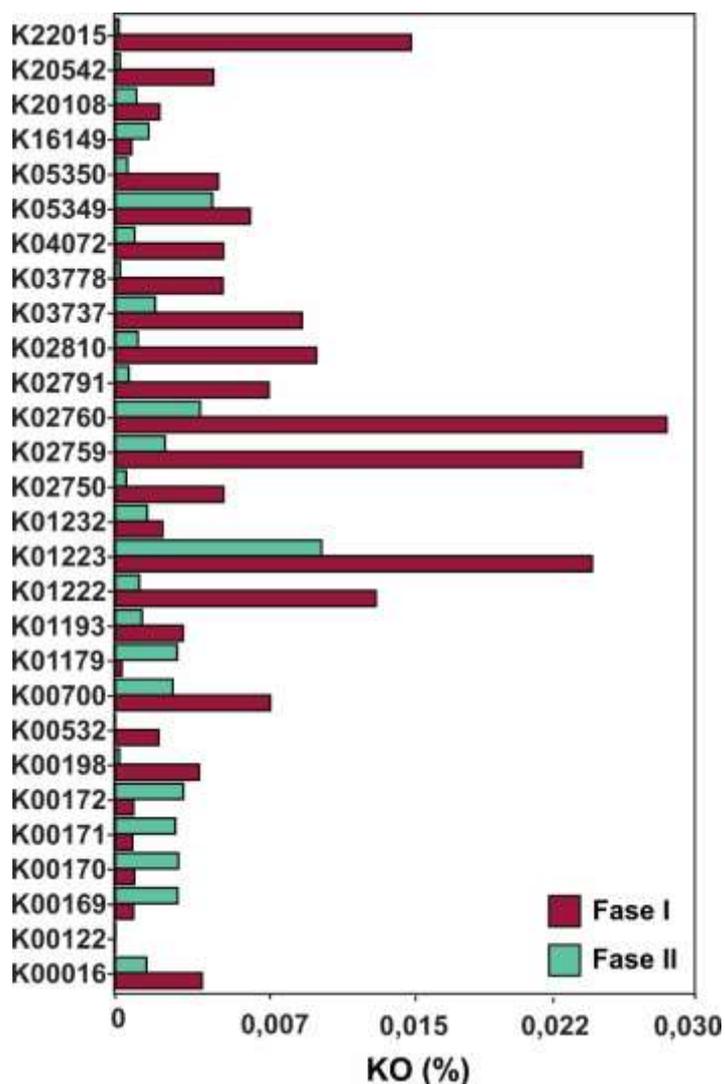
Os KO mais abundantes na Fase II foram K03088- Fator de RNA polimerase sigma-70 (0,44%), K01999- proteína de ligação ao substrato do sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada (0,39%), K02014- proteína receptora da membrana externa do complexo de ferro (0,34%), K01997 e K01998- proteína do sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada permease (0,26%). Tanto, os KO mencionados, quanto os demais KO observados em maior abundância nas Fases I e II estão majoritariamente relacionados às subcategorias do Processamento de Informação Genética, como tradução e transcrição e transporte de membrana.

Figura 5.61. Principais vias metabólicas inferidas para os diferentes níveis KEGG. Os percentuais apresentados foram calculados com base no número de correspondências para cada objeto KO observados para cada amostra (Fase I e Fase II).



Encontram-se resumidas na Figura 5.63 os principais KO envolvidos na Fase I, especialmente nas etapas de hidrólise, glicólise, acidogênese e acetogênese. Nota-se que maiores proporções destes KO foram relacionados à Fase I, quando comparados à Fase II, especialmente para componente EIIB e EIIA do sistema PTS de celobiose K02760 (0,03%) e K02759 (0,02%) [EC:2.7.1.196 2.7.1.205], envolvidos no metabolismo de amido e sacarose, na conversão de celobiose em celobiose 6-fosfato. Entre os principais microrganismos relacionados à síntese desta enzima estão as bactérias do gênero *Escherichia* (KEYHANI et al., 2000), observadas em abundância relativa de 34,39% na Fase I. Da mesma forma, a 6-fosfo- β -glicosidase K01223 [EC:3.2.1.86] também está relacionada ao metabolismo de amido e sacarose, além da glicólise. Esta hidrolase é responsável pela conversão da celobiose 6-fosfato em D-glicose. *Escherichia* é o principal gênero observado na Fase I e relacionado à síntese desta enzima.

Figura 5.62. KO mais abundantes inferidos para as amostras da Fase I e Fase II, relacionadas às etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e concomitante obtenção de H₂. Os percentuais foram calculados com base no número total de KO em cada amostra.

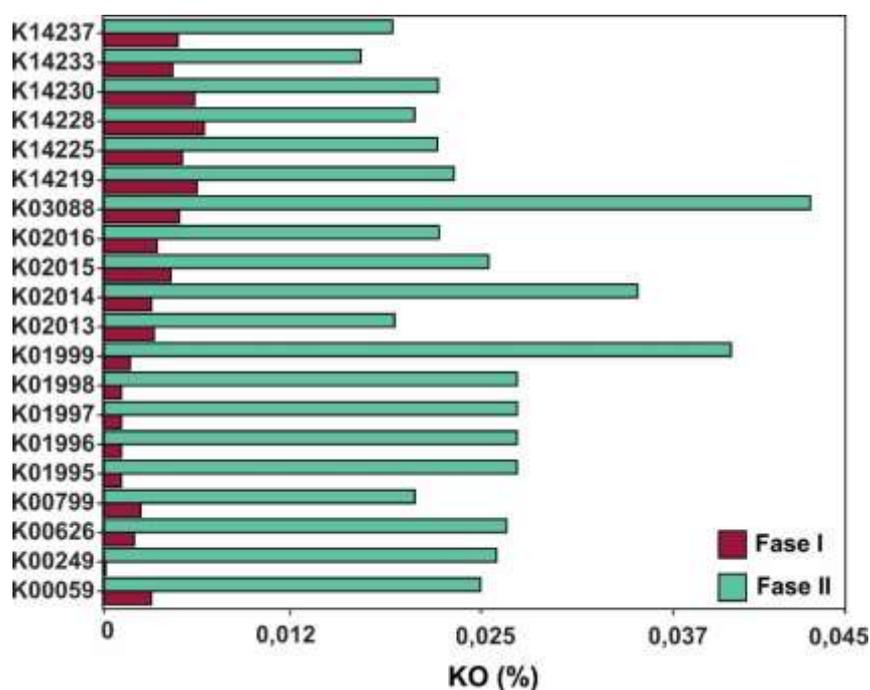


Foram observadas em menores proporções KO relacionados à hidrólise (endoglicanase, K01179 [EC:3.2.1.4] e componente EIIA e EIIB do sistema PTS de celobiose, K02759 e K02760 [EC: 2.7.1.205]), glicólise (fosfoglicomutase, K01835 [EC: 5.4.2.2], componentes do sistema PTS de glicose, K02778 [EC: 2.7.1.199]), acidogênese e acetogênese (acetil-CoA sintetase e acetato/butirato ligase, K01895 e K01913 [EC: 6.2.1.1]). Entre as principais vias nas quais estas enzimas estão envolvidas, estão o metabolismo de carboidratos, metabolismo de piruvato e glicólise. Além disso, vale ressaltar a presença de KO relacionados à obtenção de hidrogênio, como piruvato sintase (K00169, K00170, K00171 [EC: 1.2.7.1]) e álcool desidrogenase (K04072, K13954, K00001 [EC: 1.1.1.1]).

Estima-se que os gêneros *Clostridium*, *Escherichia* (34,5%) e *Paraclostridium* (1,52%) estejam intimamente relacionados às etapas de hidrólise e glicólise na Fase I, enquanto na acidogênese, além dos gêneros mencionados também estariam envolvidos os gêneros *Enterobacter* (8,55%) e *Deftluvitoga* (1,57%).

Foram observadas KO relacionados à degradação de lignina e limoneno, ambos presentes no resíduo sólido de citros. A hidrolase de limoneno-1,2-epóxido K10533 [EC: 3.3.2.8] e a limoneno 1,2- monoxigenase K14733 foram observadas na Fase I (0,000012 e 0,00004%, respectivamente). A vanilil-álcool oxidase (K20153, [EC 1.1.3.38]) está relacionada às atividades auxiliares para degradação da lignina, sendo que este grupo de enzimas pode catalisar a conversão de compostos fenólicos com cadeias laterais do anel aromático, e foram observados em proporções de 0,00005% na Fase I.

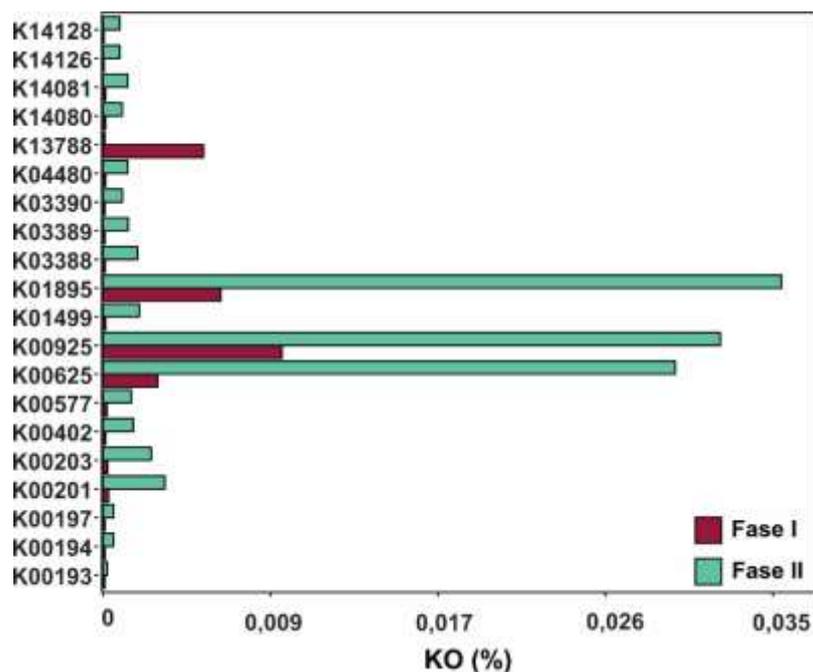
Figura 5.63. Principais KO inferidos e relacionados à metanogênese. Os percentuais foram calculados com base no número total de KO em cada amostra (Fase I e Fase II).



Os principais KO relacionados à metanogênese foram filtrados de acordo com Macedo et al. (2020), e encontram-se resumidos na Figura 5.64. Como esperado, maiores proporções de todos os KO envolvidos em diferentes etapas da obtenção de metano foram observados em maiores proporções na Fase II quando comparadas à Fase I. O KO observado em maior proporção foi ligase K01895 (0,04%) acetil-CoA sintetase [EC:6.2.1.1], enzima envolvida na conversão de acetato em acetil-CoA (Equação 5.13) na

via acetogênica, sendo o gênero *Methanosarcina* a principal arqueia associada à esta reação (BARNHART et al., 2015).

Figura 5.64. Principais KO inferidos e relacionados à hidrólise, glicólise, acidogênese, acetogênese e obtenção de H₂. Os percentuais foram calculados com base no número total de KO em cada amostra.



O segundo KO observado em maior abundância na Fase II (0,03%) foi K00925 [EC: 2.7.2.1], relacionado a uma transferase com atividade acetato quinase. Este KO também foi observado na Fase I (0,01%). A acetato quinase está envolvida na metanogênese devido ao seu papel fundamental na conversão de acetato a acetil-CoA, entretanto, ao contrário da acetil-CoA sintetase, que pode ser sintetizada por diversos organismos, apenas o gênero *Methanosarcina* é capaz de assimilar o acetato a partir da atividade da acetato quinase (BARNHART et al., 2015). A fosfato acetiltransferase K00625 [EC:2.3.1.8] foi observada na Fase II e Fase I na proporção de 0,03% e 0,003%, respectivamente. Esta transferase relacionada à regeneração da coenzima A pode ser relacionada, tanto ao metabolismo de *Clostridium*, quanto *Methanosarcina*, sendo importante para o metabolismo do acetato (NÉMETI; GREGUS, 2009).

Apenas a fosfato acetiltransferase K13788 [EC:2.3.1.8] foi observada em maiores proporções na Fase I em comparação à Fase II (0,01% e 0,0001%, respectivamente). Esta enzima está relacionada com a fermentação de acetato, na reação reversível entre síntese de acetil-CoA e regeneração da coenzima A (Equação 5.14), tanto no metabolismo de metano (acetoclástico), quanto no metabolismo de piruvato. Os principais gêneros associados à síntese desta enzima são *Escherichia* e *Clostridium* (NÉMETI; GREGUS,

2009; CAMPOS-BERMUDEZ et al., 2010), identificados em abundância relativa de 34,39 e 29,83% na Fase I, respectivamente.



Entre os KO relacionados à metanogênese e observados em menores proporções, destaca-se a subunidade gama de metil-coenzima M redutase K00402 [EC: 2.8.4.1], observada em 0,002% na Fase II e 0,0001% na Fase I. Esta transferase é responsável pela catálise da etapa final da metanogênese, na qual ocorre efetivamente a obtenção biológica de metano. Diversos gêneros de arqueias metanogênicas são associados à esta enzima, sendo encontrada em alguns dos gêneros observados na Fase II, como *Methanosarcina* (0,20%) e *Methanothermobacter* (0,083%) (WREDE et al., 2013; GRÄWERT et al., 2014; WAGNER et al., 2016).

O K00193 [EC: 2.3.1.169] está relacionado à síntese de proteína corrinóide Fe-S de metil-Co(III) (CH₃-CO(III)FeSP) a partir da proteína Co(I) corrinóide Fe-S e Acetil-CoA. A CH₃-CO(III)FeSP é convertida a proteína Co(I) corrinóide Fe-S e 5- metil-tetra-hidrossarcinapterina (5-Metil-H4SPT) pelas enzimas relacionadas à acetil-CoA decarbonilase/sintase [K00194 e K00197, EC: 2.1.1.245].

Apesar dos KO observados em maior abundância estarem relacionados ao metabolismo acetoclástico, destaca-se a importância de KO observados em menores proporções e envolvidas na via metanogênica hidrogenotrófica. Entre estes, destaca-se o K14128 [EC:1.12.99.-], referente à atividade oxidorreductase da subunidade de hidrogenase não redutora de F420, que está interligada com a metanogênese hidrogenotrófica na etapa de redução da coenzima F420 utilizando H₂.

Encontra-se resumida na Figura 5.65 possíveis vias metabólicas e gêneros envolvidos no processo. Com base nos resultados apresentados, é possível inferir que a principal via envolvida na obtenção de metano a partir da fração líquida acidificada após a fermentação de resíduos sólidos de citros é a via acetogênica, uma vez que maior proporção de genes que codificam enzimas envolvidas nesta via foram inferidos na Fase II, além de maior abundância relativa de arqueias conhecidamente acetoclásticas, como *Methanosarcina* (0,20%).

5.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIMONENO VIA GC-MS

5.8.1 Equipamentos e condições

O teor de limoneno foi determinado por Cromatografia a Gás modelo 7890B, utilizando o *software* MassHunter acoplado ao Espectrômetro de Massa (GC-MS Agilent), modelo MS 5977A. Foram injetados 250 μL de amostra do *headspace* e utilizando os parâmetros resumidos na Tabela 5.30. A condição cromatográfica foi definida por análise de resolução de pico.

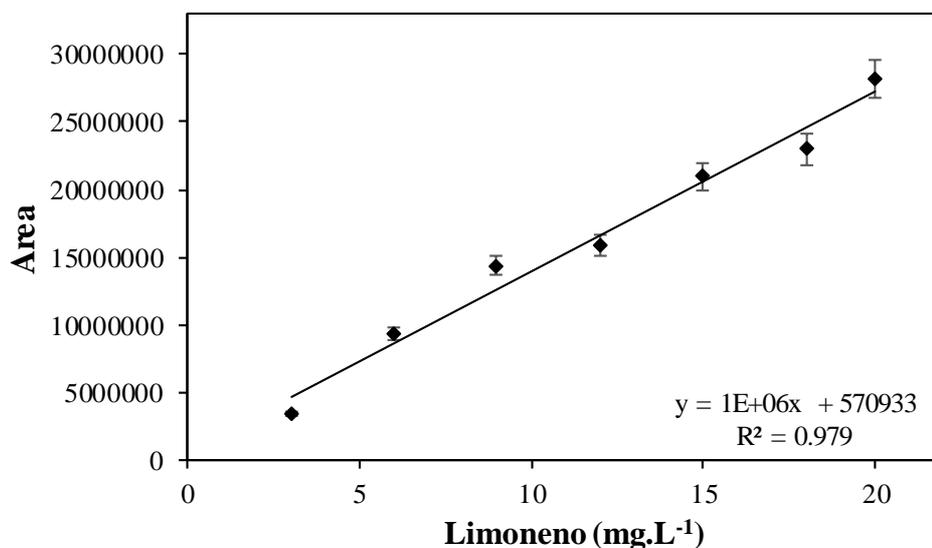
Tabela 5.30. Especificações de operação do GC-MS.

Cromatógrafo de gás	
Coluna analítica	Agilent HP 5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
Injetor	Split: 10:1
Temperatura da entrada	230 $^{\circ}\text{C}$
Gás de arraste	He
Volume de injeção	250 μL
Injetor automático	
Modelo	PAL RSI 85
Temperatura de incubação	100 $^{\circ}\text{C}$
Tempo de incubação	10 min
Programa de Forno	
Temperatura	40 $^{\circ}\text{C}$
Tempo de retenção	3 min
Taxa	10 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura	100 $^{\circ}\text{C}$
Taxa	60 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura	220 $^{\circ}\text{C}$
Espectrômetro de Massa	
Temperatura auxiliar	240 $^{\circ}\text{C}$
Faixa de massa	m/z 50 a 550

Fonte: Elaboração própria.

5.8.2 Curva de calibração e validação de parâmetros

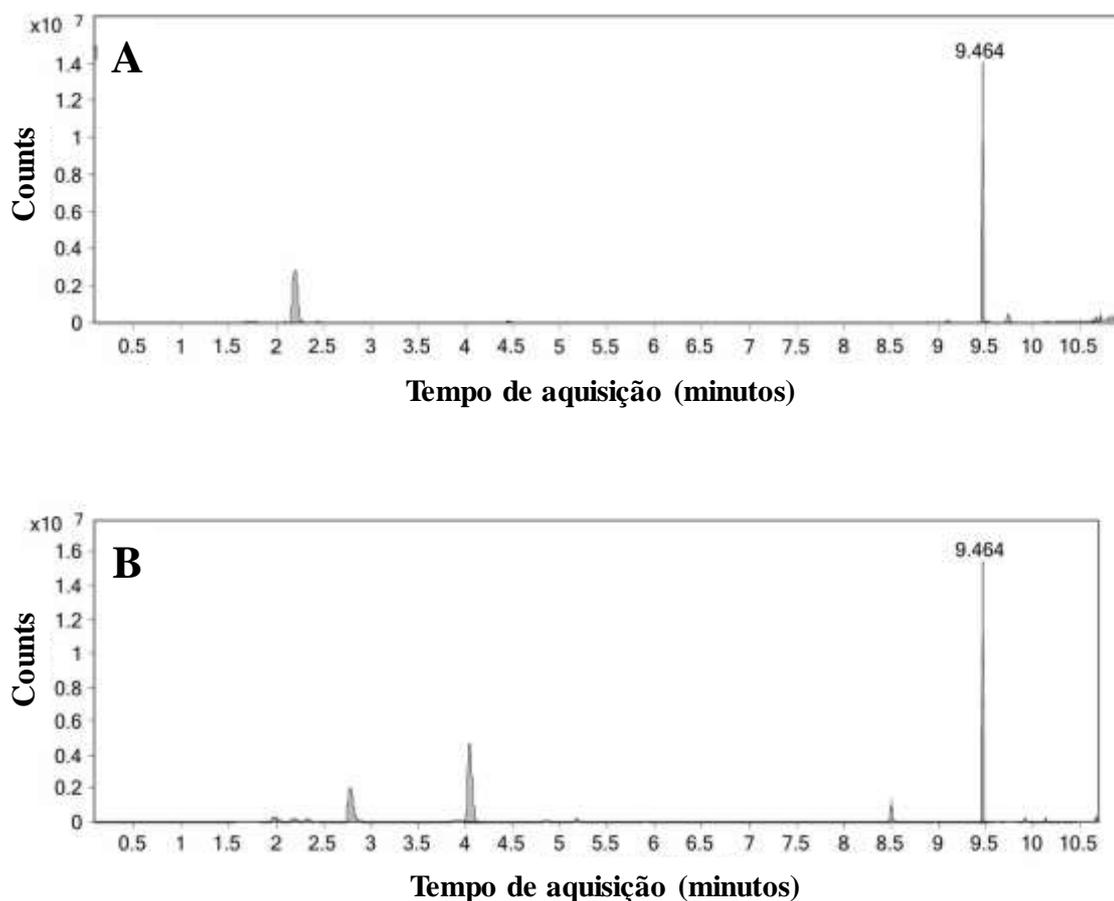
O método foi considerado linear para a faixa de concentração estudada (3 a 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de limoneno). Em relação a curva de calibração, obteve-se boa linearidade, uma vez que o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,979 (Figura 5.66). Os desvios padrão observados para a curva de calibração foram entre 0,5 e 1,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Figura 5.66. Curva de calibração do limoneno para 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de limoneno.

A área do pico correspondente ao limoneno foi determinada por cromatograma e análise em espectrometro de massa de uma solução padrão de concentração conhecida de limoneno. Na Figura 5.67 A, é possível observar o cromatograma obtido para o padrão com 15 mg.L⁻¹ de limoneno, que corresponde a 15,3 mg.L⁻¹ de limoneno de acordo com a curva de calibração. Na Figura 5.67 B, é possível observar o cromatograma para ensaios com 17 mg.L⁻¹ de limoneno. Além disso, o resultado pode ser confirmado por meio de comparações com a base de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST).

Por meio da precisão instrumental estimada em 0,1 (CV%), LD e LQ (1,7 e 4,2 mg.L⁻¹, respectivamente) pode-se inferir sobre a confiabilidade do método desenvolvido. O valor de F tabulado, obtido via ANOVA, foi de 2,6, enquanto o valor de F calculado foi de 233,51. Desta forma, considera-se que os valores calculados superiores aos valores tabelados são evidência da linearidade do método, ao nível de significância de 95%. Os parâmetros de validação avaliados estão de acordo com a Resolução-Re n. 899 (ANVISA, 2003), bem como com o Relatório Técnico da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Figura 5.67. Cromatograma típico de solução padrão de limoneno (15 mg.L^{-1}) (A) e cromatograma obtido para ensaios com 17 mg.L^{-1} de limoneno (B).



Em comparação com Davidowski e DiMarco (2009), o método desenvolvido no presente estudo é vantajoso em relação à temperatura do injetor do cromatógrafo gasoso ($230 \text{ }^\circ\text{C}$) e à temperatura do programa do forno ($40 \text{ }^\circ\text{C}$), enquanto no estudo mencionado, a faixa de temperatura para os mesmos parâmetros foi de 250 e $80 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Além disso, o método apresentado na presente pesquisa permite a análise de amostras líquidas de reatores anaeróbios, inoculadas com materiais impuros, como lodo de esgoto, enquanto em Davidowski e DiMarco (2009), os autores utilizaram GC-MS para quantificação de limoneno em extrato de laranja.

5.8.3 Ensaio de adsorção

A recuperação de limoneno nos ensaios controle (sem lodo de esgoto) foi de $106,1 \pm 13\%$ do valor teórico (2000 mg.L^{-1}), enquanto nos ensaios com lodo de esgoto,

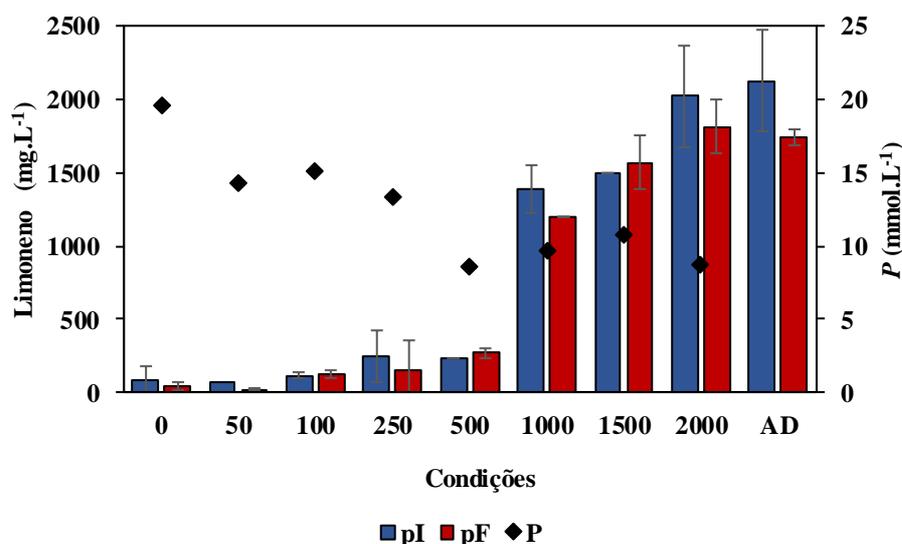
92,3±0,4% foi recuperado. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,179$) para o intervalo de confiança de 95%.

5.8.4 Aplicabilidade

O método GC-MS proposto foi aplicado para determinação da concentração de limoneno no início (pI) e final (pF) do processo de fermentação dos reatores anaeróbios em batelada (Figura 5.68). Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre o conteúdo de limoneno de pI e pF. Pode-se inferir que não houve degradação significativa do limoneno ao longo do processo de fermentação, bem como não houve adsorção significativa de limoneno no lodo de esgoto usado como inóculo, como observado no ensaio de adsorção. Além disso, pode-se concluir que o método desenvolvido foi eficaz para a determinação da análise de conteúdo de limoneno em reatores anaeróbios.

O equilíbrio de sorção/dessorção entre limoneno e matéria orgânica afeta o processo de degradação desta molécula (CALABRÒ et al., 2016). Em Calabrò et al. (2016), os autores observaram que aproximadamente 76% do limoneno adicionado foi adsorvido na fase sólida dos resíduos de citros. No entanto, na presente pesquisa, houve 97% de recuperação do composto adicionado, sem diferença significativa entre o controle (2123 mg.L⁻¹) e os ensaios com lodo de esgoto (1746 mg.L⁻¹). Esta diferença pode ter ocorrido devido à composição do substrato utilizada pelos autores mencionados, uma vez que os resíduos de citros são ricos em lipídeos de cadeia longa, que possuem forte afinidade com o D-limoneno hidrofóbico.

Figura 5.68. Teor de limoneno inicial (pI) e final (pF) do processo de fermentação de reatores anaeróbios em batelada operados com diferentes concentrações de limoneno (sem adição de limoneno a 2000 mg.L⁻¹) por cerca de 160 h. Adsorção (AD) e potencial máximo de concentração de H₂ (P).



O efeito de diferentes concentrações de limoneno (até 2.000 mg.L⁻¹) em ensaios em reatores em batelada e reatores controle sem esse composto foi avaliado em relação ao potencial de concentração de H₂ (P mmol H₂.L⁻¹), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (R_m mmol H₂.h⁻¹) e tempo de início da obtenção de H₂ (λ h) (Figura 5.69). A concentração máxima de H₂ foi de 19,5 mmol H₂.L⁻¹ nos ensaios controle, enquanto a concentração mínima foi de 8,6 mmol H₂.L⁻¹ nos ensaios contendo 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno. Para o intervalo de confiança de 95%, pode-se afirmar que o aumento do limoneno para 50 mg.L⁻¹ e de 50 a 100 mg.L⁻¹ não foi significativo, ou seja, não foi observado efeito inibitório por esse composto. Entretanto, o aumento de 100 para 2.000 mg.L⁻¹ causou efeito inibitório significativo ($p \geq 0,05$) na obtenção de H₂ (Tabela 5.31).

Resultados similares foram observados para a resposta R_m , ou seja, a adição de 50 mg.L⁻¹ de limoneno não foi significativa ($R_m = 0,5$ mmol H₂.h⁻¹), enquanto a adição nos intervalos entre 100 e 2000 mg.L⁻¹ de limoneno ocasionou diminuição de R_m em todos os demais ensaios. O R_m máximo observado foi de 1,6 mmol H₂.h⁻¹ nos ensaios controle, enquanto o R_m mínimo foi de 0,1 mmol H₂.h⁻¹ com 2000 mg.L⁻¹ de limoneno.

Aumento proporcional no tempo de início da obtenção de H₂ (λ) foi observado proporcionalmente ao aumento das concentrações de limoneno, sendo que o mínimo λ foi observado nos ensaios controle (17,1 h) e o máximo λ (37,9 h) para 2000 mg.L⁻¹ de limoneno. Entretanto, apenas nos ensaios em que houve aumento de 50 para 100 mg.L⁻¹ de

limoneno, houve diferença significativa para λ , sendo 11,6 h em 50 mg.L⁻¹ e 10,8h em 100 mg.L⁻¹. Este padrão pode ser explicado com base nos maiores desvios padrão observados para este parâmetro (CALABRÒ et al., 2016).

Figura 5.69. Concentração de H₂ nos reatores anaeróbios controle e com diferentes concentrações de limoneno.

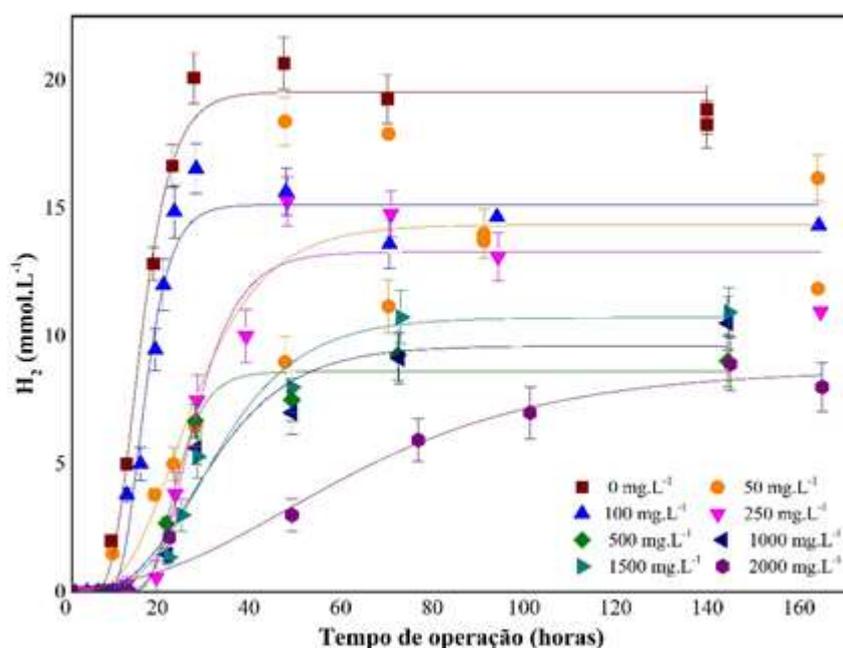


Tabela 5.31. Parâmetros cinéticos de obtenção de H₂ dos reatores anaeróbios controle e com diferentes concentrações de limoneno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si para o intervalo de confiança de 95% no teste de Kruskal-Wallis.

Limoneno (mg.L ⁻¹)	Parâmetros			
	<i>P</i> (mmol H ₂ .L ⁻¹)	<i>Rm</i> (mmol H ₂ .h ⁻¹)	λ (h)	R ²
sem limoneno	19,5±0,4 ^a	1,7±0,2 ^a	8,7±0,7 ^a	0,99
50	14,3±1,1 ^a	0,5±0,2 ^a	11,6±5,9 ^a	0,97
100	15,1±0,5 ^{a b}	1,5±0,2 ^b	10,8±0,9 ^b	0,97
250	13,3±0,7 ^c	0,7±0,2 ^c	17,8±2,1 ^b	0,96
500	8,6±0,3 ^d	0,7±0,2 ^d	17,0±1,3 ^b	0,98
1000	9,6±0,7 ^e	0,3±0,1 ^e	13,1±3,5 ^b	0,95
1500	10,7±0,5 ^c	0,3±0,1 ^f	14,7±2,1 ^b	0,98
2000	8,7±0,5 ^f	0,1±0,1 ^g	15,0±2,3 ^b	0,97

Nota: Potencial máximo de concentração de H₂ (*P*), velocidade específica máxima de obtenção de H₂ (*Rm*), tempo de início da obtenção de H₂ (λ) e R² obtidos da equação de Gompertz modificada.

Calabrò et al. (2016), observaram que concentrações acima de 200 mg.L⁻¹ de limoneno refletiram em efeito inibidor na obtenção de CH₄ a partir de resíduos sólidos de

citros. Estes autores observaram aumento de λ proporcional ao aumento da concentração de limoneno, como observado na presente pesquisa.

Os autores supracitados observaram redução significativa em λ após o período de adaptação da biomassa; no entanto, a concentração de metano final ($33 \text{ mmol CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$) foi semelhante aos ensaios de controle. Maior adaptabilidade dos organismos metanogênicos após certo período pode ter ocorrido devido à sua camada superficial cristalina, que confere maior resistência a compostos lipofílicos, como o limoneno (RUIZ; FLOTATS, 2014). Tal possibilidade pode ter ocorrido devido ao maior tempo de reação para a obtenção de metano (cerca de 4 dias) quando comparado ao H_2 , que na presente pesquisa foi de cerca de 17,1 h nos ensaios controle. No entanto, este composto não foi detectado no final da Fase II, o que pode indicar sua volatilização para o *headspace* ou degradação em *p*-cimeno, um composto menos tóxico comumente gerado a partir da degradação do limoneno em ambientes anaeróbios (CALABRÒ et al., 2016).

Srilatha et al. (1995) estudaram o efeito da concentração de limoneno nos resíduos de citros à temperatura mesofílica ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), concluindo que a dosagem diária máxima de limoneno seria $24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondendo a $2,5 \text{ kgSTV m}^3\text{d}^{-1}$ de resíduo por digestor. A dosagem máxima descrita por estes autores foi menor quando comparada ao presente estudo; no entanto, deve-se notar que os autores usaram resíduo sólido de citros, contendo aproximadamente $8,9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de limoneno, enquanto na presente pesquisa, os reatores foram avaliados pela adição de limoneno (PA) em reatores em batelada. Sendo assim, é importante considerar o efeito inibitório de outros óleos essenciais nos resíduos de citros, não apenas o limoneno (2014).

A produção de ST não foi significativa ($p \geq 0,05$), bem como a variação do conteúdo dos STV. A variação de outros parâmetros (fenóis, pH e carboidratos) foi considerada significativa ($p \leq 0,05$), e houve acúmulo de compostos fenólicos em todos os ensaios, de aproximadamente $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, independentemente da concentração inicial de limoneno. A remoção de carboidratos foi estatisticamente significativa em todos os ensaios, com aproximadamente 80% da concentração inicial de carboidratos (cerca de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), também independente da concentração inicial de limoneno.

A variação do pH em diferentes ensaios foi significativa ($p \leq 0,05$). Além disso, foi observada uma relação inversamente proporcional entre a concentração inicial de limoneno e a redução do pH, uma vez que nos ensaios controle o pH foi 5,9 e nos ensaios com 2.000

mg.L⁻¹ de limoneno, o pH foi 6,3 ao final do período de incubação. Este resultado pode estar relacionado à produção de AOV e H₂, uma vez que em ensaios com menor concentração de limoneno (50 mg.L⁻¹) foi observado maior potencial máximo de concentração de H₂ (14,45 mmol H₂.L⁻¹) quando comparada às concentrações mais altas de limoneno (2.000 mg.L⁻¹ de limoneno; 8,7 mmol H₂.L⁻¹) (Tabela 5.32).

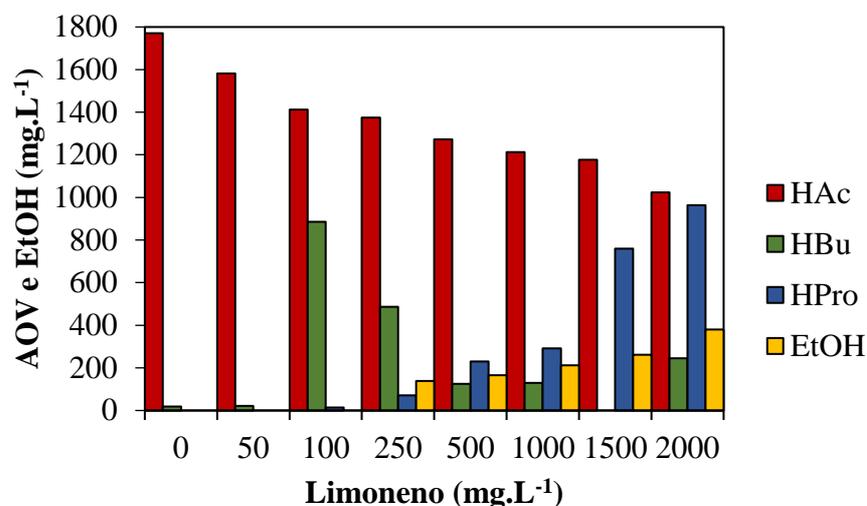
Tabela 5.32. Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada controle e com diferentes concentrações de limoneno no início (pI) e final (pF).

Limoneno (mg.L ⁻¹)	Carboidratos (g.L ⁻¹)		Fenóis (mg.L ⁻¹)		pH		STV (mg.L ⁻¹)	
	pI	pF	pI	pF	pI	pF	pI	pF
0	4,9±0,4	0,3±0,0	8,0±0,0	9,1±0,1	7,2±0,1	5,9±0,2	33±7	42±5
50	5,2±0,1	0,2±0,0	8,0±0,0	8,9±0,1	7,4±0,1	5,8±0,3	35±2	34±5
100	5,2±0,1	0,2±0,0	8,1±0,1	9,6±0,2	7,4±0,2	6,3±0,1	49±13	28±12
250	3,2±0,3	0,1±0,0	8,3±0,1	9,8±0,0	7,1±0,1	6,1±0,1	11±8	23±15
500	4,9±0,6	0,2±0,0	8,9±0,1	9,4±0,0	7,0±0,1	6,0±0,2	54±6	35±7
1000	3,5±0,2	0,1±0,0	7,8±0,0	9,3±0,1	7,3±0,3	6,4±0,2	56±6	47±11
1500	3,8±0,1	0,2±0,0	7,8±0,0	9,1±0,0	7,3±0,1	6,3±0,1	42±6	37±7
2000	3,5±0,1	0,1±0,0	7,8±0,0	9,5±0,3	7,2±0,1	6,3±0,1	95±2	49±22

A partir do monitoramento de AOV e álcoois no final do período de incubação, foi possível observar diferenças entre os metabólitos produzidos em diferentes concentrações de limoneno (Figura 5.70). Não foi observada produção de H₂Bu nos ensaios controle e em ensaios contendo 50 mg.L⁻¹ de limoneno. No entanto, a diferença na concentração de H₂ entre esses ensaios não foi significativa. A produção máxima de H₂Bu foi de 886 mg.L⁻¹ em ensaios com 100 mg.L⁻¹ de limoneno.

A HAc foi o principal metabólito observado em todas as condições, com maior produção no ensaio controle (1.771 mg.L⁻¹) e menor produção no ensaio a 2000 mg.L⁻¹ de limoneno (1.024 mg.L⁻¹). A produção de HAc foi proporcional à concentração de H₂, uma vez que nos ensaios controle foram obtidos 19,5 mmol H₂.L⁻¹ e nos ensaios com 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno, 8,68 mmol H₂.L⁻¹.

Figura 5.70. Ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada controle e com diferentes concentrações de limoneno. Ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiônico (HPr) e etanol (EtOH).



Sabe-se que a via acetogênica é mais vantajosa para a obtenção de H₂ em relação à via de produção de HBu, pois no primeiro caso, o rendimento de H₂ é de cerca de 4 mols por mol de glicose (Equação 3.3), enquanto no segundo caso, o rendimento de H₂ é de cerca de 2 mols de H₂ por mol de glicose (Equação 3.4) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; ŁUKAJTIS et al., 2018). Neste estudo, foram obtidos 0,70 mol de H₂ por mol de glicose nos ensaios controle, enquanto nos ensaios com 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno avaliada o rendimento foi de apenas 0,3 mol de H₂ por mol de glicose.

Da mesma forma, foi possível notar aumento proporcional na produção de HPr ao aumento da concentração de limoneno, sendo de 14 mg HPr.L⁻¹ observados nos ensaios com 100 mg.L⁻¹ de limoneno e 964 mg HPr.L⁻¹ nos ensaios com 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno. Na via metabólica de produção de HPr, há consumo de 2 mols de H₂ para cada mol de glicose oxidado (Equação 3.5) (LI; FANG, 2007; GHIMIRE et al., 2015).

Ruiz e Flotats (2016) apontam uma relação proporcional entre a concentração de limoneno e a produção de HPr. Estes autores obtiveram 284 mg HPr.L⁻¹ após a autofermentação de resíduos de citros, além de 805 mg HAc.L⁻¹ e 909 mg HBu.L⁻¹. Resultados similares foram obtidos por Su et al. (2016), sendo que em 30 dias de fermentação com bateladas operadas com esterco de suíno como inóculo, os principais AOV produzidos a partir de resíduos sólidos de citros foram HAc (2.610 mg.L⁻¹), HPr (56 mg.L⁻¹) e HBu (27,5 mg.L⁻¹). Neste estudo, embora a acetogênese tenha sido a principal

via, foi possível observar uma relação proporcional entre a concentração de limoneno e a produção de HPr, com redução concomitante da concentração de H₂.

O mesmo padrão foi observado para a produção de EtOH, uma vez que 139 mg EtOH.L⁻¹ foram obtidos em ensaios com 250 mg.L⁻¹ de limoneno e 380 mg.L⁻¹ de EtOH em ensaios com 2.000 mg.L⁻¹ de limoneno. A via solvetogênica não é desejável em processos cujo objetivo principal é a obtenção de H₂, pois existe produção de EtOH a partir de HAc, em vez de H₂ (Equação 5.13) (MÄKINEN; NISSILÄ; PUHAKKA, 2012; ŁUKAJTIS et al., 2018).

Em relação aos resultados da obtenção de H₂ e AOV, pode-se inferir que a presença de limoneno causou alterações substanciais nas vias metabólicas predominantes durante a fermentação em reatores anaeróbios.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese de que os resíduos de citros *in natura* são fonte de microrganismos autóctones celulolíticos e fermentativos (Hipótese 1) foi aceita, uma vez que foi possível obter, tanto um consórcio fermentativo autóctone a partir de cascas e bagaço *in natura*, quanto isolar bactérias anaeróbias celulolíticas a partir deste consórcio. É possível considerar que o consórcio autóctone obtido após autofermentação do resíduo de citros possui atividade celulolítica, uma vez que o resultado obtido para o teste de degradação de fibra de papel filtro (13,44%) foi considerado significativo ($p \geq 0,05$). Além disso, foi possível isolar e caracterizar uma bactéria autóctone de resíduos de citros (*in natura*) similar à *Enterococcus casseliflavus* (98% similar), sendo que a aplicação da cepa isolada favoreceu a obtenção de H_2 ($10,32 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$) a partir de resíduos de citros.

Considerou-se aceita a hipótese de que os grânulos de reator UASB podem ser considerados fonte de microrganismos fermentativos para obtenção de H_2 a partir da fermentação de resíduo de citros (Hipótese 2). Nos ensaios contendo Lodo UASB/vinhaça, a concentração de H_2 foi significativamente maior em relação ao Lodo UASB/avícola ($12,54$ e $8,46 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$, respectivamente), assim como R_m ($1,07$ e $2,64 \text{ mmol } H_2.h^{-1}$, respectivamente). Além disso, considerou-se que a faixa ideal para dar continuidade aos ensaios seria a faixa mesofílica, uma vez que a concentração de H_2 foi superior aos ensaios conduzidos na faixa termofílica (P Lodo UASB/vinhaça = $12,54 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e $5,19 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$).

Em relação à avaliação do efeito de diferentes pré-tratamentos, buscou-se compreender em que medida o aumento da concentração de H_2 foi possível por meio da aplicação dos pré-tratamentos de hidrotérmólise e deslignificação alcalina com a finalidade de romper a estrutura lignocelulósica dos resíduos de citros (Hipótese 3). Entretanto, esta hipótese não foi aceita, uma vez que apesar de haver produção de H_2 nos ensaios contendo resíduo de citros após hidrotérmólise ($P = 8,19 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$) e deslignificação alcalina ($P = 7,27 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$), sua concentração foi significativamente inferior quando comparados aos ensaios sem pré-tratamento ($P = 13,55 \text{ mmol } H_2.L^{-1}$). Uma das causas para a diminuição da concentração de H_2 pode ser atribuída à formação de subprodutos potencialmente tóxicos após o pré-tratamento, como compostos fenólicos. Entretanto, a partir da caracterização destes resíduos, notou-se que houve alteração em sua composição físico-química e morfológica, observadas, tanto após a análise em FT-IR, quanto em MEV. A

despeito de a hipótese inicial ter sido rejeitada, vale salientar que este resultado foi considerado positivo para o processo geral, uma vez que a etapa de pré-tratamento é considerada a mais onerosa do processo de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios referentes às hipóteses 1-3 foram estabelecidas as faixas de estudo do planejamento sequencial, para o qual buscou-se otimizar a obtenção de biogás e outros produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros por meio do método estatístico de Planejamento Experimental (Hipótese 4). O *screening design* via delineamento de Plackett-Burman foi útil na seleção de variáveis significativas para continuidade dos ensaios de otimização da obtenção de biogás a partir de resíduos de citros. As variáveis consideradas para as etapas subseqüentes foram o pH inicial do meio, com efeito positivo de 2,09 mmol H₂.L⁻¹, concentração de inóculo, com efeito positivo de 2,24 mmol H₂.L⁻¹ e concentração de substrato, também com efeito positivo, de 4,65 mmol H₂.L⁻¹. A obtenção de H₂ foi otimizada a partir do método de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo que as condições consideradas ótimas para o processo foram de 4 gSTV.L⁻¹ de inóculo (lodo de reator UASB/vinhaça), 29,8 g.L⁻¹ de resíduo sólido de citros e pH inicial do meio reacional de 8,98. A concentração máxima obtida (48,47 mmol H₂.L⁻¹) foi 3,87 vezes superior ao valor de *P* obtido antes de sua otimização (12,54 mmol H₂.L⁻¹). Desta forma, a hipótese foi aceita.

Uma vez que não foi possível observar produção de CH₄ nos ensaios em que utilizou-se resíduo sólido de citros como substrato, utilizou-se o efluente acidificado obtido após a fermentação do ensaio R5 (15 g.L⁻¹ de substrato, 2,25 gSTV.L⁻¹ de consórcio autóctone 3 gSTV.L⁻¹ de lodo, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 40% de *headspace* e pH 8,5), no qual houve maior *P* (13,29 mmol H₂.L⁻¹) como substrato para metanogênese, a fim de simular um sistema de duas fases (Hipótese 5). A hipótese foi aceita, uma vez que os metabólitos produzidos na Fase I, especialmente HAc (1.340 mg.L⁻¹), contribuíram para a obtenção de CH₄ na Fase II, uma vez que foram produzidos 50,2 mmol CH₄.L⁻¹.

Tendo em vista que o limoneno é um dos principais limitantes da reutilização de resíduos sólidos de citros em reatores anaeróbios para recuperação de produtos de interesse biotecnológico (Hipótese 6), buscou-se desenvolver e validar um método de determinação do teor de limoneno em amostras líquidas via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS), além de aplicar o método desenvolvido no monitoramento de reatores do tipo batelada operados em temperatura mesofílica (30 °C)

para obtenção de H₂. Em relação à aplicação do método para monitoramento de reatores anaeróbios, foi possível notar efeito inibitório na produção de H₂ e HAc após a adição de limoneno nos reatores. Este efeito inibitório foi significativamente proporcional ao aumento das concentrações de limoneno, possivelmente devido às alterações na via metabólica, estimulando a produção de EtOH e HPr. A presença de limoneno afetou significativamente o tempo de início da obtenção de H₂, uma vez que nos ensaios controle $\lambda = 8,7$ h foram observados e nos ensaios com 2.000 mg. L⁻¹ de limoneno, λ foi de 15,0 h. Por fim, a hipótese foi aceita, uma vez que por meio do desenvolvimento do método foi possível a determinação de limoneno em amostras líquidas de reatores em batelada, com potencial de aplicação na caracterização e controle de reatores anaeróbios e águas residuárias.

Na Hipótese 7, presumiu-se que as diferentes condições operacionais aplicadas em diferentes etapas da presente pesquisa influenciam diretamente a comunidade microbiana envolvida no processo, bem como as vias metabólicas predominantes. A hipótese foi considerada como verdadeira, uma vez que a partir da aplicação de técnicas de biologia molecular (16S *metabarcoding* e metagenômica *shotgun*) via Plataforma *Illumina*, foi possível observar a predominância de diferentes populações nas diferentes etapas descritas do presente estudo, de acordo com as variáveis operacionais utilizadas. Destaca-se que *Clostridium* foi o principal gênero identificado e relacionado à obtenção de H₂ nas diferentes etapas, além de *Ruminiclostridium*, *Paraclostridium* e *Enterococcus*., enquanto na fase metanogênica foram observadas arqueias dos gêneros *Methanoplasma*, *Methanothermobacter*, *Methanomassiliicoccus* e *Methanosarcina*.

Após a caracterização funcional da validação das condições otimizadas via DCCR, foi possível identificar diversos genes relacionados à obtenção de H₂, como piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase, formiato de piruvato-liase, formiato desidrogenase, acetaldeído desidrogenase, álcool desidrogenase e L-lactato desidrogenase. Além disso, os gêneros mais relacionados à produção destes genes foram *Clostridium* e *Paraclostridium*. Além disso, foi possível confirmar por análise diferencial da expressão gênica que, entre outras, as vias de degradação da celulose e produção de HAc foram significativamente mais abundantes nas condições otimizadas, *e.g.*, endo- β -1,4-glicanase/celulase, endo- β -1,4-xilanase, β -glicosidase, β -manosidase, celulose β -1,4-

celobiosidase, celobio-hidrolase, entre outras funções que podem ser relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica.

Por fim, foi possível concluir que os resíduos sólidos de citros (cascas e bagaço *in natura*) podem ser considerados como potencial substrato na digestão anaeróbia em batelada, especialmente para obtenção de H₂ e AOV, como HAc e H₂U. A comparação entre os resultados obtidos nas diferentes etapas realizadas e os objetivos e hipóteses iniciais da presente pesquisa encontra-se resumida na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Conclusões sobre as hipóteses iniciais da pesquisa e resumo sobre as principais condições operacionais e resultados de cada etapa.

Objetivo	Condições experimentais	P (mmol H ₂ .L ⁻¹)	Principais microrganismos	Técnica	Aceitação da hipótese
1- Avaliar consórcio fermentativo de bactérias anaeróbias celulolíticas a partir de resíduos de citros <i>in natura</i> em relação à obtenção de produtos de interesse biotecnológico	meio PCS + RSC 15 g.L ⁻¹ pH 7,0; 37 °C Headspace 50%	7,78	-	-	✓
2- Caracterizar bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas a partir do consórcio do resíduo de citros	meio PCS + xilose 5 g.L ⁻¹ pH 7,0; 37 °C Headspace 50%	10,32	<i>Enterococcus</i> , <i>Clostridium</i>	Sanger	✓
3- Comparar o efeito da adição de lodo termófilico e mesofílico de reator UASB como fonte de biomassa anaeróbia na obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros	lodo UASB 2 gSTV.L ⁻¹ meio PCS + RSC 15 g.L ⁻¹ pH 7,0; 37 °C Headspace 50%	12,54	<i>Coprothermobacter</i> , <i>Defluviitoga</i> , <i>Sulfirimonas</i>	shotgun	✓
4- Comparar e caracterizar os resíduos de citros após diferentes pré-tratamentos	lodo UASB 2 gSTV.L ⁻¹ meio PCS + RSC 15 g.L ⁻¹ pH 7,0; 37 °C Headspace 50%	13,31	<i>Clostridium</i> , <i>Ruminiclostridium</i>	metabarcoding, DGGE	✗
5- Avaliar as melhores condições para obtenção de produtos de interesse biotecnológico a partir de resíduos de citros via Plackett & Burman	lodo UASB 3 gSTV.L ⁻¹ RSC 15 g.L ⁻¹ pH 8,5; 30 °C Headspace 40%	13,29	<i>Escherichia</i> , <i>Clostridium</i>	metabarcoding	✓
5- Otimizar a obtenção de H ₂ por meio de DCCR e superfície de resposta	lodo UASB 4 gSTV.L ⁻¹ RSC 29,8 g.L ⁻¹ pH 8,98; 30 °C; Pep. 5 g.L ⁻¹ Headspace 60%	48,47	<i>Clostridium</i> <i>Paraclostridium</i>	shotgun	✓
6- Avaliar o potencial metanogênico de fração líquida após a fermentação dos resídeos de citros em batelada	efluente acidificado* pH 7,0; 30 °C Headspace 50%	50,2**	<i>Methanoplasma</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i>	metabarcoding	✓
7- Desenvolver um método de determinação de limoneno em amostras líquidas via GC-MS, e aplicar o método desenvolvido no monitoramento de reatores em batelada	limoneno 100 mg.L ⁻¹ lodo UASB 3 gSTV.L ⁻¹ meio PCS + glicose 5 g.L ⁻¹ pH 7,0; 30 °C Headspace 50%	15,10	-	-	✓

Nota: (-) Não se aplica, ✓= hipótese aceita, ✗= hipótese não aceita, PCS= *Peptone Cellulose Solution* (peptona 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹, CaCO₃ 5 g.L⁻¹), RSC= resíduo sólido de citros, (*) efluente acidificado resultante da de otimização da obtenção de H₂ + meio Zinder, (**) CH₄ (mmol CH₄.L⁻¹). Pep= peptona.

7. CONCLUSÕES

- A partir do consórcio fermentativo autóctone obtido a partir de resíduos de citros *in natura*, foi possível isolar e caracterizar uma bactéria anaeróbia celulolítica produtora de H₂, similar a *Enterococcus casseliflavus* (98%);

- A mistura do consórcio autóctone e inóculo alóctone foi favorável à obtenção de H₂ a partir de resíduos sólidos de citros, sendo a maior concentração de H₂ observada a partir de lodo de reator UASB aplicado ao processamento termofílico de vinhaça de cana-de-açúcar (12,54 mmol H₂.L⁻¹) em condições mesofílicas (30 °C);

- A utilização de resíduos de citros *in natura* foi mais vantajosa para obtenção de H₂ em comparação ao resíduo pré-tratado via hidrotermólise ou deslignificação alcalina, uma vez que foram obtidos, respectivamente, 13,55, 8,19 e 7,27 mmol H₂.L⁻¹;

- Foi possível otimizar a obtenção de H₂ a partir de resíduos sólidos de citros em aproximadamente 3,87 vezes por meio da aplicação de planejamento estatístico sequencial (Plackett & Burman + DCCR), sendo que as condições consideradas ótimas para o processo foram de 4 gSTV.L⁻¹ de inóculo (lodo de reator UASB/vinhaça), 29,8 g.L⁻¹ de resíduo sólido de citros e pH inicial do meio reacional de 8,98;

- Confirmou-se por meio de sequenciamento metagenômico *shotgun* e análise diferencial da expressão gênica que, entre outras, as vias de degradação da celulose e produção de HAc foram significativamente mais abundantes nas condições otimizadas, com favorecimento do gênero *Clostridium*;

- A partir do uso da fração líquida do ensaio acidogênico (Fase I) dos resíduos sólidos de citros em reatores em batelada foi possível obter no reator metanogênico (Fase II) 50,2 mmol CH₄.L⁻¹. As arqueias identificadas neste processo foram *Methanoplasma*, *Methanothermobacter*, *Methanomassiliicoccus* e *Methanosarcina*;

- O efeito inibitório do limoneno na metanogênese pode ser superado na abordagem de duas fases, uma vez que concentração acima dos limites inibitórios (200 mg.kg⁻¹) foram observados na Fase I (220,5 mg.kg⁻¹), enquanto na Fase II este composto foi observado abaixo deste limite ($\leq 0,58$ mg.kg⁻¹);

- Efeito inibitório na obtenção de H₂ e HAc foi observado após adição de limoneno nos reatores. Este efeito inibitório foi significativamente proporcional ao aumento das concentrações de limoneno, possivelmente devido às alterações nas vias metabólicas, estimulando a produção de EtOH e HPr.

8 RECOMENDAÇÕES

- Aplicar as condições otimizadas em processos contínuos e reatores em escala ampliada;

- Avaliar a possibilidade de substituição da água potável por água residuária, como água residuária da citricultura, água de prensagem de resíduos sólidos de citros ou esgoto doméstico;

- Avaliar a reproducibilidade das condições otimizadas em outros resíduos sólidos lignocelulósicos;

- Novos experimentos devem ser realizados, por meio de Delineamento Composto Central Rotacional, a fim de estabelecer as condições operacionais mais favoráveis à bactéria isolada a partir de resíduo de citros *in natura* (*E. casseliflavus*), a fim de utilizá-la como inóculo em processos de digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos.

9. REFERÊNCIAS

- ABID, M. et al. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. **Food Chemistry**, v. 215, p. 318–325, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.181>>.
- ABNT, A. B. de N. T. **Classificação De Resíduos Sólidos, Norma ABNT NBR 10.004:2004**, 2004. Disponível em: <www.abnt.org.br>.
- ACD, S. E. **ChemSketch version 2018.1** Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, 2019. Disponível em: <www.acdlabs.com>.
- ÁCS, N. et al. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 286–293, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.098>>.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 07, p. 406–414, 2014. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2014.57049>>.
- AHMAD, F. et al. Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–20, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0452-1>>.
- AHMAD, F. et al. Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 1, p. 31–50, 2020.
- AHMAD, F.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 98, p. 108–124, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.09.008>>.
- AHRO, M. et al. Low-Resolution Gas-Phase FT-IR Method for the Determination of the Limonene/Carvone Ratio in Supercritical CO₂-Extracted Caraway Fruit Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3140–3144, 2001.
- AKITA, H. et al. Identification and characterization of Burkholderia multivorans CCA53. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 249, 6 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2565-1>>.
- AN, D. et al. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated Clostridium beijerinckii YA001 using xylose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 35, p. 19928–19936, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.014>>.

- ANJUM, M. et al. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. **Waste Management and Research**, v. 35, n. 9, p. 967–977, 2017.
- APHA/AWWA/WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. [s.l.: s.n.]
- AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152–161, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522005000200009&lng=pt&tlng=pt>.
- ASPEBORG, H. et al. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct-Crystalline Forms. **Science**, v. 223, n. 4633, p. 283–285, 1984.
- AZMAN, S. et al. Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. **Critical Reviews of Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 23, p. 2523–2564, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BARNHART, E. P. et al. Potential Role of Acetyl-CoA Synthetase (acs) and Malate Dehydrogenase (mae) in the Evolution of the Acetate Switch in Bacteria and Archaea. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12498, 3 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep12498>>.
- BENOMAR, S. et al. Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. **Nature Communications**, v. 6, n. 6883, p. 1–10, 2015.
- BICAS, J. L. et al. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1991–2001, 2008.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 563–567, 2007.
- BLANCH, G. P.; NICHOLSON, G. J. Determination of the Enantiomeric Composition of Limonene and Limonene-1, 2-epoxide in Lemon Peel by Multidimensional Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection and Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 36, p. 19–22, 1998.
- BLUNDI, C.; GARDÊLHA, R. Método para determinação de matéria orgânica específica em águas

- residuárias. In: CHERNICHARO, C. A. L. (COORD. (Ed.)). **Pós tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos**. PROSAB. p. 9–17.
- BORGES, A. C. G.; COSTA, V. M. H. D. M. A evolução do agronegócio citrícola paulista e o perfil da intervenção do estado. **Revista Uniara**, n. 17/18, p. 101–124, 2006.
- BOTTA, L. S. et al. Bioconversion of waste office paper to hydrogen using pretreated rumen fluid inoculum. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 12, p. 1887–1897, 2016.
- BRAGA, J. K. et al. Hydrogen Production by *Clostridium cellulolyticum* a Cellulolytic and Hydrogen-Producing Bacteria Using Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-017-0105-9>>.
- BRAGA, J. K. et al. Bacterial and archaeal community structure involved in biofuels production using hydrothermal- and enzymatic-pretreated sugarcane bagasse for an improvement in hydrogen and methane production. **Sustainable Energy & Fuels**, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8SE00312B>>.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. The Proteobacteria- Part B: The Gammaproteobacteria. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2005. 2p. 1136.
- BRUCE, T. et al. Bacterial community diversity in the brazilian atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 840–849, 2010.
- BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 3, p. 251–261, 1997.
- BUGG, T. D. H. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 394–400, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.009>>.
- BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9071–9077, dez. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410011302>>.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- CABRERA, E. et al. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.103>>.
- CAHYARI, K. et al. Optimization of hydrogen production from fruit waste through mesophilic and

- thermophilic dark fermentation: Effect of substrate-to-inoculum ratio. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 116–123, 2019.
- CALABRÒ, P. S. et al. Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. **Waste Management**, v. 48, p. 440–447, 2016.
- CAMPOS-BERMUDEZ, V. A. et al. Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. **FEBS Journal**, v. 277, n. 8, p. 1957–1966, abr. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2010.07617.x>>.
- CAO, G. et al. Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 82, p. 1–13, 2014.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335>>.
- CAZIER, E. A. et al. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 106–113, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.055>>.
- CEBREIROS, F.; FERRARI, M. D.; LAREO, C. Cellulose hydrolysis and IBE fermentation of eucalyptus sawdust for enhanced biobutanol production by *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 50–61, ago. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019302250>>.
- CECILIA, J. A. et al. Industrial Food Waste Valorization : A General Overview. In: BASTIDAS-OYANEDEL, J. R.; SCHMIDT, J. (Ed.). **Biorefinery**. Springer, 2019. p. 25 p.
- CEPEA- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **PIB do Agronegócio**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>>.
- CHANDRA, R. et al. Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. **Energy**, v. 43, n. 1, p. 273–282, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2012.04.029>>.
- CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. **Applied Energy**, v. 94, p. 129–140, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.01.027>>.
- CHAPLEUR, O. et al. Asymmetrical response of anaerobic digestion microbiota to temperature changes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1445–1457, 2016.
- CHEN, S. et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 2018.
- CHOI, I. S. et al. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping

- pretreatment. **Applied Energy**, v. 102, p. 204–210, 2013.
- CHOI, I. S. et al. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 140, p. 65–74, 2015.
- CHUENCHART, W. et al. Enhancement of food waste thermophilic anaerobic digestion through synergistic effect with chicken manure. **Biomass and Bioenergy**, v. 136, n. March, p. 105541, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105541>>.
- CIBIS, K. G.; GNEIPEL, A.; KÖNIG, H. Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. **Journal of Biotechnology**, v. 220, p. 51–63, 2016.
- CITROSUCO. **Relatório de sustentabilidade: Safra 2015-2016**. [s.l.: s.n.].
- COLOMBO, L. T. et al. Applying functional metagenomics to search for novel lignocellulosic enzymes in a microbial consortium derived from a thermophilic composting phase of sugarcane bagasse and cow manure. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, n. 9, p. 1217–1233, 2016.
- CONVERTI, A.; PEREGO, P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2–3, p. 303–309, 2002.
- CORRÊA, A. da S. **Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa***. 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- CREMONEZ, P. A. et al. Effect of substrate concentrations on methane and hydrogen biogas production by anaerobic digestion of a cassava starch-based polymer. **Industrial Crops and Products**, v. 151, p. 112471, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112471>>.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470–478, 2005.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, n. 1, p. 13–28, 2001.
- DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 932–939, 2007.
- DAVIDOWSKI, S.; DIMARCO, B. The Extraction and Quantification of Limonene from Citrus Rinds Using GC/MS. **PerkinElmer Application Note**, p. 1–4, 2009. Disponível em: <<http://perkinelmer.cl/assets/the-extraction-and-quantification-of-limonene-from-citrus-by-gcms.pdf>>.
- DE LA RUBIA, M. A. et al. Influence of particle size and chemical composition on the performance

- and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, n. 1, p. 162–167, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.010>>.
- DELFORNO, T. P. et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 389–398, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.170>>.
- DELFORNO, T. P. et al. Comparative metatranscriptomic analysis of anaerobic digesters treating anionic surfactant contaminated wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 482–494, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.328>>.
- DEMÍRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Source**, v. 27, n. 4, p. 327–237, 2005.
- DEPPENMEIER, U. The unique biochemistry of methanogenesis. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 71, p. 223–283, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660302710453>>.
- DESVAUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: Model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 741–764, 2005.
- DETMAN, A. et al. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 36, 13 dez. 2019. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-019-1085-1>>.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.
- DUARTE, I. C. S. et al. Development of a Method by HPLC to Determine LAS and its Application in Anaerobic Reactors. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1360–1367, 2006.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DUMITRACHE, A. et al. Consolidated bioprocessing of Populus using *Clostridium (Ruminiclostridium) thermocellum*: A case study on the impact of lignin composition and structure. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- DÜRRE, P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 639–648, 1998.
- ESCUDIÉ, F. et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. **Bioinformatics**, v. 34, n. 8, p. 1287–1294, 2018.
- EWELS, P. et al. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single

- report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 2016.
- FAOSTAT. **Statistical Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- FITZGERALD, J. A. et al. Trace element supplementation is associated with increases in fermenting bacteria in biogas mono-digestion of grass silage. **Renewable Energy**, v. 138, p. 980–986, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.051>>.
- FONSECA, B. C. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de Clostridium beijerinckii**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.
- FONSECA, B. C. et al. Genome sequence of the H₂-producing *Clostridium beijerinckii* strain Br21 isolated from a sugarcane vinasse treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 139–144, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572019000100139&tlng=en>.
- FONSECA, B. C.; SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. Impact of Glucose Concentration on Productivity and Yield of Hydrogen Production by the New Isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 9999, p. 1–8, 2018.
- FORGÁCS, G. et al. Methane production from citrus wastes: Process development and cost estimation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 250–255, 2012.
- FORSTER-CARNEIRO, T.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I. Influence of total solid and inoculum contents on performance of anaerobic reactors treating food waste. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6994–7002, 2008.
- FRUNZO, L. P. G. d'Antonio G. E. M. F. L.; PIROZZI, F. Thermal pretreatment of olive mill wastewater for efficient methane production: control of aromatic substances degradation by monitoring cyclohexane carboxylic acid. **Environmental Technology**, v. 36, n. 14, p. 1785–1794, 2015.
- GAGLIANO, M. C. et al. Ecology and biotechnological potential of the thermophilic fermentative *Coprothermobacter* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 5, p. 1–12, 2015.
- GALPERIN, M. Y. Genome Diversity of Spore-Forming *Firmicutes*. **Microbiology spectrum**, v. 1, n. 2, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4306282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- GEETHA, M. et al. Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes. **International Journal of Biochemistry & Biotech Science**, v. 1, p. 30–42, 2012.

- GHIMIRE, A. et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>>.
- GHOSH, P. et al. Enhanced biogas production from municipal solid waste via co-digestion with sewage sludge and metabolic pathway analysis. **Bioresource Technology**, v. 296, p. 122275, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419315056>>.
- GOMEZ-FLORES, M.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H. Hydrogen production and microbial kinetics of *Clostridium termitidis* in mono-culture and co-culture with *Clostridium beijerinckii* on cellulose. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 84, 20 dez. 2017. Disponível em: <<http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0256-2>>.
- GONZALES, R. R. et al. Enhancement of hydrogen production by optimization of pH adjustment and separation conditions following dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27502–27511, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.021>>.
- GOODLOVE, P. E. et al. Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 85, n. 1, p. 209–214, 1989.
- GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 820–831, 2005.
- GRÄWERT, T. et al. Inhibition of Methyl-CoM Reductase from *Methanobrevibacter ruminantium* by 2-Bromoethanesulfonate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12487–12490, 31 dez. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf505056g>>.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. v. 1
- GROOTSCHOLTEN, T. I. M. et al. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 440–445, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.165>>.
- GUEDON, E.; PETITDEMANGE, H.; POINCARE, H. Improvement of Cellulolytic Properties of *Clostridium cellulolyticum* by Metabolic Engineering. v. 68, n. 1, p. 53–58, 2002.
- GUO, J. et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.
- GUO, X. M. et al. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7476–7485, 2014.

- GUREVICH, A. et al. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.
- HAMMER; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis**. *Palaeontologia Electronica*, , 2001. .
- HANIA, W. Ben et al. *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1377–1382, 2012.
- HARADA, H. et al. Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 215–221, 1996.
- HARUTA, S. et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 529–534, 2002.
- HAWKES, F. R. et al. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1339–1347, 2002.
- HE, Y. et al. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 4, p. 2775–2781, 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef8000967>>.
- HEERDEN, I. van et al. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 71–76, 2002.
- HERDIAN, H. et al. Isolation of Cellulolytic Lactic-Acid Bacteria from Mentok (*Anas moschata*) Gastro-Intestinal Tract. **Tropical Animal Science Journal**, v. 41, n. 3, p. 200–206, 2018.
- HIRASAWA, J. S. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de biologia molecular**. 2007. Universidade de São Paulo (USP), 2007.
- HJORTH, M. et al. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 4989–4994, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.128>>.
- HUGHES, J. B. et al. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, 2001. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/67/10/4399>>.
- HUYCKE, M. M. Physiology of Enterococci. In: AL., M. S. G. ET (Ed.). **The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resist**. Washington: ASM Press, 2002. p. 133–175.
- HWANG, J. H. et al. Feasibility of hydrogen production from ripened fruits by a combined two-stage (dark/dark) fermentation system. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1051–

- 1058, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.047>>.
- IBEKWE, A. M. et al. Functional relationships between aboveground and belowground spinach (*Spinacia oleracea* L., cv. Racoon) microbiomes impacted by salinity and drought. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 137207, maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720307178>>.
- ILGI KAPDAN, K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006.
- INFANTES, D. et al. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 6, p. 15595–15601, 2011.
- IWAI, S. et al. Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166104, 7 nov. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166104>>.
- JACKOWIAK, D. et al. Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6750–6756, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.107>>.
- JACQUET, N. et al. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 9, p. 1582–1588, 2011.
- JANUSZ, G. et al. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017.
- JIA, X. et al. Metaproteomic analysis of the relationship between microbial community phylogeny, function and metabolic activity during biohydrogen-methane coproduction under short-term hydrothermal pretreatment from food waste. **Bioresource Technology**, v. 245, n. September, p. 1030–1039, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.180>>.
- JIANG, Y. et al. Inhibition of volatile fatty acids on methane production kinetics during dry co-digestion of food waste and pig manure. **Waste Management**, v. 79, p. 302–311, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.049>>.
- JIANG, Y. et al. Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing 06 Biological Sciences 0605 Microbiology 09 Engineering 0907 Environmental Engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1344-0>>.
- JOHN, U. V.; CARVALHO, J. *Enterococcus*: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 5, p. 357–366, 2011.

- JUNG, K. et al. Optimization of combined (acid D thermal) pretreatment for fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* using response surface methodology (RSM). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 16, p. 9626–9631, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.050>>.
- JUSTINO DE ARAÚJO, A. C. et al. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111023, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111023>>.
- KANDASAMY, S.; ARADHYA, S. M. Polyphenolic profile and antioxidant properties of rhizome of commercial banana cultivars grown in India. **Food Bioscience**, v. 8, p. 22–32, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429214000443>>.
- KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/0471250953.bi1107s32>>.
- KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 726–731, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>>.
- KANOKSILAPATHAM, W. et al. Isolation , characterization , and survival strategies of *Thermotoga* sp . strain PD524 , a hyperthermophile from a hot spring in Northern Thailand. **Extremophiles**, 2015.
- KEGGI, C.; DORAN-PETERSON, J. *Paenibacillus amylolyticus* 27C64 has a diverse set of carbohydrate-active enzymes and complete pectin deconstruction system. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-018-2098-1>>.
- KESKIN, T. et al. Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 23, p. 10666–10677, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.028>>.
- KEYHANI, N. O. et al. The Chitin Disaccharide, N , N' -Diacetylchitobiose, Is Catabolized by *Escherichia coli* and Is Transported/Phosphorylated by the Phosphoenolpyruvate:Glucose Phosphotransferase System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33084–33090, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M001043200>>.
- KEYHANI, N. O.; BACIA, K.; ROSEMAN, S. The transport/phosphorylation of N,N'-diacetylchitobiose in *Escherichia coli*: Characterization of phospho-IIB(Chb) and of a potential transition state analogue in the phosphotransfer reaction between the proteins

- IIA(Chb) and IIB(Chb). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33102–33109, 2000.
- KHANNA, N. et al. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 1–2, p. 9–15, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.014>>.
- KIM, I.; HAN, J. I. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 210–217, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.024>>.
- KIRAN, E. U. et al. Bioconversion of food waste to energy: A review. **Fuel**, v. 134, p. 389–399, 2014.
- KIVAISI, A. K.; ELIAPENDA, S. Pretreatment of bagasse and coconut fibres for enhanced anaerobic degradation by rumen microorganisms. **Renewable Energy**, v. 5, n. 5–8, p. 791–795, 1994.
- KOBAYASHI, H. et al. Hydrolysis of woody biomass by a biomass-derived reusable heterogeneous catalyst. **Chemical Science**, v. 7, n. 1, p. 692–696, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SC03377B>>.
- KOO, T.; YULISA, A.; HWANG, S. Microbial community structure in full scale anaerobic mono- and co-digesters treating food waste and animal waste. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 439–446, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419303992>>.
- KOPPAR, A.; PULLAMMANAPPALLIL, P. Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for on site energy generation in a citrus processing facility. **Energy**, v. 60, p. 62–68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2013.08.007>>.
- KOPYLOVA, E.; NOÉ, L.; TOUZET, H. SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3211–3217, 2012.
- KORAYEM, A. S. et al. Optimization of biosurfactant production by *Streptomyces* isolated from Egyptian arid soil using Plackett–Burman design. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 209–217, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aogas.2015.09.001>>.
- KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1183–1190, 2007.
- KOZIANOWSKI, G. et al. Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. **Extremophiles**, v. 1, n. 4, p. 171–182, 1997.
- KRIEG, N. R. et al. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae,

- Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. ed. New York: Springer, 2010. 4p. 976.
- LACAVAL, P. T. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento , PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637–642, 2006.
- LANG, K. et al. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*”. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1338–1352, 15 fev. 2015. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03389-14>>.
- LANGMEAD, B. Aligning Short Sequencing Reads with Bowtie. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 1–24.
- LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, 2014.
- LEE, D. Y. et al. Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 3, p. 1244–1252, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.093>>.
- LEITÃO, R. C. et al. Biodegradabilidade Anaeróbia dos Resíduos Provenientes das Cadeias Produtivas dos Biocombustíveis: Bagaço de Cana-de-açúcar. **Embrapa Agroindústria Tropical**, n. December 2013, p. 1–41, 2013.
- LEVIN, D. B. et al. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 11, p. 1496–1503, 2006.
- LI, C. et al. Recent advancement in lignin biorefinery: With special focus on enzymatic degradation and valorization. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121898, nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419311289>>.
- LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1–39, 2007.
- LI, Q.; SILES, J. A.; THOMPSON, I. P. Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 671–678, 2010.
- LIN, C. et al. Anaerobic hydrogen production from unhydrolyzed mushroom farm waste by indigenous microbiota. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 425–

- 429, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.001>>.
- LIN, C. Y.; SHEI, S. H. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 587–593, 2008.
- LIN, P. Y. et al. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 12, p. 1728–1735, 2007.
- LIU, D. et al. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. **Water Research**, v. 40, n. 11, p. 2230–2236, 2006.
- LIU, Y.; WANG, Y. Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 7, p. 4095–4101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.083>>.
- LÓPEZ, J. Á. S.; LI, Q.; THOMPSON, I. P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 63–69, 2010.
- LOPRESTO. A non-conventional method to extract D- limonene from waste lemon peels and comparison with ... **Separation and Purification Technology**, v. 137, n. February, p. 13–20, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.015>>.
- LOTITO, A. M. et al. Biomethanization of citrus waste: Effect of waste characteristics and of storage on treatability and evaluation of limonene degradation. **Journal of Environmental Management**, v. 215, p. 366–376, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.057>>.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.
- LU, Y. et al. Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two- or three-stage anaerobic fermentation process Yuan. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2889–2895, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.023>>.
- ŁUKAJTIS, R. et al. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, n. April 2017, p. 665–694, 2018.
- LUO, W.; BROUWER, C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1830–1831, 2013.
- MACEDO, T. Z. et al. The influence of upflow velocity and hydraulic retention time changes on taxonomic and functional characterization in Fluidized Bed Reactor treating commercial laundry wastewater in co-digestion with domestic sewage. **Biodegradation**, v. 31, n. 1–2, p. 73–89, 2020.

- MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 1, p. 152–160, 2017.
- MÄKINEN, A. E.; NISSILÄ, M. E.; PUHAKKA, J. A. Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12234–12240, 2012.
- MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 4, p. 529–549, 2014.
- MARINE, S. S.; CLEMONS, J. Determination of Limonene Oxidation Products Using SPME and GC – MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41, p. 31–35, 2003.
- MARQUES, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: The effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1933–1943, 2013.
- MARTÍN, M. A. et al. Biomethanization of orange peel waste. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8993–8999, 2010.
- MARTÍNEZ, S.; LÓPEZ, M.; BERNARDO, A. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 475–481, 2003.
- MASIH-DAS, J.; TAO, W. Anaerobic co-digestion of foodwaste with liquid dairy manure or manure digestate: Co-substrate limitation and inhibition. **Journal of Environmental Management**, v. 223, n. July, p. 917–924, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.016>>.
- MATHUR, G. et al. Enhanced production of laccase from *Coriolus* sp. using Plackett–Burman design. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 1, p. 151–154, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.031>>.
- MAUS, I. et al. Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. **Journal of Biotechnology**, v. 203, p. 17–18, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.006>>.
- MAUS, I. et al. Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 50–60, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165616302565>>.
- MAZARELI, R. C. d. S. et al. Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, n. April, 2020.

- MAZARELI, R. C. da S. et al. *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. **Journal of Environmental Management**, v. 247, n. December 2018, p. 178–186, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.040>>.
- MAZARELI, R. C. da S. **Otimização da produção de hidrogênio a partir de resíduos de banana: avaliação da diversidade de bactérias autóctones e distribuição funcional**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- MELO-NASCIMENTO, A. O. do. S. et al. Functional characterization of ligninolytic *Klebsiella* spp. strains associated with soil and freshwater. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 8, p. 1267–1278, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-018-1532-0>>.
- MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11257>>.
- MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>>.
- MICELI, J. F.; TORRES, C. I.; KRAJMALNIK-BROWN, R. Shifting the balance of fermentation products between hydrogen and volatile fatty acids: microbial community structure and function. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://femsec.oxfordjournals.org/content/91/4/fiv011.abstract>>.
- MICHALSKA, K.; LEDAKOWICZ, S. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of energy crops for biogas production. **Chemical Papers**, v. 68, p. 913–922, 2014.
- MILLATI, R. et al. Anaerobic digestion of citrus waste using two-stage membrane bioreactor. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 316, p. 012063, 2018. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1757-899X/316/i=1/a=012063?key=crossref.77f0ad27c09db5bf062443846b8dacdc>>.
- MILLER, J. A. et al. Determination of d -limonene in adipose tissue by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatographic B**, v. 870, p. 68–73, 2008.
- MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>>.
- MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms

- for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8–9, p. 209–232, 1983.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- MU, Y.; WANG, G.; YU, H. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 905–913, 2006.
- MUBARAK, Z.; SORAYA, C. The acid tolerance response and pH adaptation of *Enterococcus faecalis* in extract of lime *Citrus aurantiifolia* from Aceh Indonesia. **F1000Research**, v. 7, p. 287, 2018.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C. D. E.; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- NAKAYAMA, T. et al. *Escherichia coli* pyruvate: Flavodoxin oxidoreductase, YdbK - Regulation of expression and biological roles in protection against oxidative stress. **Genes and Genetic Systems**, v. 88, n. 3, p. 175–188, 2013.
- NANDA, S. et al. Gasification of fruit wastes and agro-food residues in supercritical water. **Energy Conversion and Management**, v. 110, p. 296–306, 2016.
- NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. **Stain technology**, v. 58., n. 6, p. 347–351, 1983.
- NAVEENA, B. J. et al. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 485–490, 2005.
- NEGRO, V. et al. Life cycle assessment of orange peel waste management. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 127, n. August, p. 148–158, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NÉMETI, B.; GREGUS, Z. Mechanism of Thiol-Supported Arsenate Reduction Mediated by Phosphorolytic-Arsenolytic Enzymes. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 2, p. 270–281, ago. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfp112>>.
- NESHAT, S. A. et al. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy**

- Reviews**, v. 79, p. 308–322, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.137>>.
- NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 597–611, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>>.
- NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298430><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5411777>>.
- ORANDI, S. M. et al. Original article Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Le Lait**, v. 85, n. 3, p. 181–192, 2005.
- OZBAYRAM, E. et al. Comparison of Rumen and Manure Microbiomes and Implications for the Inoculation of Anaerobic Digesters. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 15, 2018.
- PAL, P.; NAYAK, J. Acetic Acid Production and Purification: Critical Review Towards Process Intensification. **Separation and Purification Reviews**, v. 46, n. 1, p. 44–61, 2017.
- PARENTE, E. et al. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 62–67, 1997.
- PARK, Y. J.; KIM, I. C.; CHANG, H. C. Microbial conversion of (+)-Limonene by an *Enterobacter agglomerans* isolate. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 636–639, 2003.
- PARSHINA, S. N. et al. *Trichococcus shcherbakoviae* sp. nov., isolated from a laboratory-scale anaerobic EGSB bioreactor operated at low temperature. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 529–534, 2019.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305–325, 1946.
- POURBAFRANI, M. et al. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4246–4250, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.077>>.
- QUÉMÉNEUR, M. et al. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 4, p. 3150–3159, 2012.
- RABELO, C. A. B. S. et al. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 223, n. July, p. 952–963, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015>>.

- RABELO, C. A. B. S. et al. Bioconversion of cellulose into hydrogen, biogas and organic acids using microbial consortium from pulp and paper mill wastewater treatment plant. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 169–175, 2018b.
- RABELO, C. A. B. S. et al. Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136868, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136868>>.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 576–590, 2008.
- RASPOR, P.; GORANOVIĆ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101–124, 2008.
- RATTANAPAN, C. et al. Biogas production by co-digestion of canteen food waste and domestic wastewater under organic loading rate and temperature optimization. **Environments - MDPI**, v. 6, n. 2, 2019.
- RATTI, R. P. et al. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 19, p. 6296–6306, 2015.
- RAVACHOL, J. et al. Combining free and aggregated cellulolytic systems in the cellulosome-producing bacterium *Ruminiclostridium cellulolyticum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.
- REN, N. Q. et al. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4318–4324, 2008.
- RHO, M.; TANG, H.; YE, Y. FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. 1–12, 2010.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 144–154, 2019.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3. ed. Campinas, São Paulo: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.
- ROSA, P. R. F.; SILVA, E. L. Review of Continuous Fermentative Hydrogen- Producing Bioreactors from Complex Wastewater. **Frontiers in Bioenergy and Biofuels Hydrogen**, p. 257–284, 2017.

- RUGGERI, B.; TOMMASI, T.; SANFILIPPO, S. **BioH₂ & BioCH₄ Through anaerobic digestion**. New York: Springer London, 2015.
- RUIZ, B.; FLOTATS, X. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2063–2079, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.026>>.
- RUIZ, B.; FLOTATS, X. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 9–18, 2016.
- SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase Production by Bacteria : A Review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235–258, 2013. Disponível em: <www.sciencedomain.org>.
- SAIDI, R. et al. Biohydrogen production from hyperthermophilic anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes in seawater: Simplification of the culture medium of *Thermotoga maritima*. **Waste Management**, v. 71, p. 474–484, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.042>>.
- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441–448, 1975.
- SARATALE, G. D. et al. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation - A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 962–979, 2008.
- SATO, K. et al. Effect of yeast extract and vitamin B12 on ethanol production from cellulose by *Clostridium thermocellum* I-1-B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 734–736, 1992.
- SAWATDEENARUNAT, C. et al. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178–186, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>>.
- SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533–542, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>>.
- SCHMIDT, J. E.; AHRING, B. K. Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 229–246, 1996.
- SCHNEIDER, V. E. et al. Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA**, p. 134, 2012.
- SCHROYEN, M. et al. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on

- production of phenolic compounds and biomethane potential. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 696–702, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.051>>.
- SHARMA, S.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Biomethane Production from Fermented Substrates. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 4, p. 296–297, 1989.
- SHEN, F. et al. Effect of organic loading rate on anaerobic co-digestion of rice straw and pig manure with or without biological pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 155–162, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.037>>.
- SHEN, L. et al. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 1358–1367, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.102>>.
- SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 4. ed.
- SINHA, P.; PANDEY, A. Biohydrogen production from various feedstocks by *Bacillus firmus* NMBL-03. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 14, p. 7518–7525, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.134>>.
- SITTHIKITPANYA, S.; REUNGSANG, A.; PRASERTSAN, P. Two-stage thermophilic biohydrogen and methane production from lime-pretreated oil palm trunk by simultaneous saccharification and fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 9, p. 4284–4293, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.063>>.
- SIVAGURUNATHAN, P. et al. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment method, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, n. March 2016, p. 28–42, 2017.
- SOARES, L. A. et al. Design and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse hydrothermally pretreated using response surface methodology. **Water Science & Technology**, v. 76, n. (1-2), p. 95–105, 2017.
- SOARES, L. A. et al. Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 117, p. 78–85, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.07.018>>.
- SOARES, L. A. **Bioconversão anaeróbia do bagaço de cana-de-açúcar em produtos de valor biotecnológico em condição termofílica e mesofílica**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.
- SOARES, L. A. et al. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 10, p. 1899–1912, 2019a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12649-018-0201-5>>.

- SOARES, L. A. et al. Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition. **Renewable Energy**, v. 140, p. 852–861, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.103>>.
- SOARES, L. A. et al. Screening and Bioprospecting of Anaerobic Consortia for Biofuel Production Enhancement from Sugarcane Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 232–251, 2020.
- SOLLI, L. et al. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 146, 2014. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/146>>.
- SONG, H. S. et al. Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 245–250, 2000.
- SONG, S. K.; LEE, Y. Y. Acid hydrolysis of wood cellulose under low water condition. **Biomass**, v. 6, n. 1–2, p. 93–100, 1984.
- SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. **Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria**. [s.l.] Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais - FEFAP, 2007.
- SRI LATHA, H. R. et al. Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 327–331, 1995.
- SRIVASTAVA, S. et al. Intensification of hydrogen production by *B. licheniformis* using kitchen waste as substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 34, p. 21659–21666, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.140>>.
- STEIN, U. H. et al. Maximizing the production of butyric acid from food waste as a precursor for ABE-fermentation. **Science of the Total Environment**, v. 598, n. 2017, p. 993–1000, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.139>>.
- SU, H.; TAN, F.; XU, Y. Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. **Fuel**, v. 181, p. 843–851, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.05.055>>.
- SUNDBERG, M. Pretreatment of Biomass Investigation of suitable pretreatment of Icelandic biomass for biofuel production. n. October, p. 30, 2010.
- TAI, J. et al. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 24, p. 13345–13349, dez. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319909019442>>.
- TANDISHABO, K. et al. Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 5, p. 518–520, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172312002423>>.

- TAYLOR, K. A. C. . A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, p. 49–58, 1996.
- USEPA. Method 6010D – Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. In: **Method**. p. 1–35.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I. et al. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. **Fuel**, v. 159, p. 214–222, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>>.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I. et al. Enhanced hydrogen production from lignocellulosic substrates via bioaugmentation with *Clostridium* strains. **Industrial Crops & Products**, v. 137, p. 105–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.023>>.
- VALENTÍN-REYES, J. et al. Mathematical modelling for biohydrogen production by *Clostridium beijerinckii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 37, p. 17602–17610, 2018.
- VAUTZ, W.; SIELEMANN, S.; BAUMBACH, J. I. Determination of terpenes in humid ambient air using ultraviolet ion mobility spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 393–399, 2004.
- VILLA, C. et al. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 755–762, 2007.
- VILLA MONTOYA, A. C. et al. Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 39, p. 21434–21450, 2019.
- VILLA MONTOYA, A. C. et al. Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 4205–4222, 2020.
- VILLA, T. G.; VEIGA-CRESPO, P. **Enzybiotics: Antibiotic enzymes as drugs and therapeutics**.
- VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 311–316, 1996.
- VOS, P. De et al. The Firmicutes. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. Athens: Springer, 2009. p. 1450.
- WAGNER, T. et al. Didehydroaspartate Modification in Methyl-Coenzyme M Reductase Catalyzing Methane Formation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 36, p. 10630–10633, 26 ago. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201603882>>.

- WALTER, A. et al. Biomethane potential of industrial paper wastes and investigation of the methanogenic communities involved. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1–21, 2016.
- WANG, A. et al. Bio-hydrogen production from cellulose by sequential co-culture of cellulolytic hydrogen bacteria of *Enterococcus gallinarum* G1 and *Ethanoigenens harbinense* B49. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1321–1326, 2009.
- WANG, W. et al. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9321–9324, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.065>>.
- WANG, Y. et al. The Influence of Hydrogen Concentration in Sparging Gas on Hydrogen Production and Consumption via Anaerobic Fermentation. **Transactions of the ASABE**, v. 60, n. 3, p. 607–612, 2017.
- WEI, L.; GENG, P. A review on natural gas/diesel dual fuel combustion, emissions and performance. **Fuel Processing Technology**, v. 142, p. 264–278, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.09.018>>.
- WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2009.
- WILKINS, M. R. et al. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1596–1601, 2007.
- WILLEMS, A.; GILLIS, M. Comamonas. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–17.
- WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259–263, 2011.
- WOO, G.; CHARLES, P.; KWONSU, S. A comprehensive study on volatile fatty acids production from rice straw coupled with microbial community analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1157–1166, 2015.
- WREDE, C. et al. Localization of Methyl-Coenzyme M Reductase as Metabolic Marker for Diverse Methanogenic Archaea. **Archaea**, v. 2013, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/archaea/2013/920241/>>.
- WU, J. et al. Enhanced butanol-hydrogen coproduction by *Clostridium beijerinckii* with biochar as cell's carrier. **Bioresource Technology**, v. 294, p. 122141, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419313719>>.
- WU, S. Y.; CHU, C. Y.; SHEN, Y. C. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15496–15502, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.119>>.
- WU, X. et al. Optimization of Fermentation Process Parameters for Ginsenoside Re Bioconversion

- by Plackett-Burman and Box-Behnken Design. **MATEC Web of Conferences**, v. 238, p. 04001, 2018.
- XIA, Y. et al. Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–9, 2014.
- XING, B. S. et al. Stable and high-rate anaerobic co-digestion of food waste and cow manure: Optimisation of start-up conditions. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123195, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123195>>.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244–1251, 1997. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.61.1244>>.
- YANG, G.; YIN, Y.; WANG, J. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 26, p. 13147–13156, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.216>>.
- YIN, Y. et al. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 445–451, 2012.
- YIN, Y.; WANG, J. Characterization and hydrogen production performance of a novel strain *Enterococcus faecium* INET2 isolated from gamma irradiated sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 48, p. 22793–22801, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319916330828>>.
- YUN, J. S.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 4, p. 416–423, 2003.
- YUSOF, T. R. T. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from co-digestion of chicken manure and food waste. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 28, n. 4, p. 3003–3014, 2019.
- YUTIN, N.; GALPERIN, M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. **Environmental Microbiology**, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12173>>.
- ZÁMOCKÝ, M. et al. Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. **Gene**, v. 338, n. 1, p. 1–14, 2004.
- ZHANG, J. et al. Three-stage anaerobic co-digestion of food waste and horse manure. **Scientific**

- Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01408-w>>.
- ZHANG, Q. et al. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8899–8906, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.061>>.
- ZHAO, L. et al. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 365–369, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.076>>.
- ZHENG, X. J.; YU, H. Q. Biological Hydrogen Production by Enriched Anaerobic Cultures in the Presence of Copper and Zinc. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 39, n. 1, p. 89–101, 2004.
- ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>>.
- ZHONG, W. et al. Bioresource Technology Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11177–11182, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.077>>.
- ZINDER, S. H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives of Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 263–272, 1984.
- ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems - *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 298–307, 2008.
- ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 204–213, 1994.

GLOSSÁRIO

16S (16S RNAr) – Subunidade dos ribossomos procarióticos com baixas taxas de evolução, o que a torna adequada para reconstrução filogenética e análise metataxonômica, especialmente no Domínio Bacteria.

Acetogênese – Produção microbiológica de acetato a partir de diferentes substratos.

Alinhamento – Método de bioinformática aplicado à comparação entre duas ou mais seqüências, com a finalidade de estabelecer relações de similaridade.

Alóctone – Em caso de inoculo alóctone, trata-se de um inoculo de origem externa ao processo, adicionado como fonte de microrganismos.

Autóctone – Em caso de inoculo autóctone (ou inoculo indígena), trata-se de inoculo obtido a partir do próprio substrato utilizado no processo, *e.g.*, a partir de autofermentação.

Batelada – Processo descontínuo.

Consórcio – Fonte mista de microrganismos.

Contig – seqüências de DNA montadas por meio de sobreposição de *reads*.

Dendrograma – Representação gráfica de resultados de cluster hierárquico, que pode ser calculado a partir de diferentes distâncias estatísticas para representar a afinidade entre grupos. Um dendrograma filogenético tem como diferencial a apresentação de relações filogenéticas entre diferentes taxons.

Endósporo – estrutura microbiológica comum em bactérias anaeróbias, especialmente do filo Firmicutes, formada geralmente em condições de estresse.

E-value – “Valor Esperado” ou “Aleatoriedade Implícita”, parâmetro de análise da plataforma NCBI referente ao número esperado de seqüências ao acaso em determinado banco de dados. Quanto menor o *E-value*, maior a significância da correspondência.

FASTA – Formato de arquivos baseado em texto (.txt) comum em bioinformática, no qual são representadas seqüências de nucleotídeos por meio de códigos de uma letra (*e.g.*, A, T, C, G).

FASTAQ – Arquivo similar ao formato FASTA, contendo informações sobre seus índices de qualidade, codificados por meio de caracteres ASCII (código binário).

Grupo externo – Grupo filogeneticamente mais distante, geralmente utilizado como referência para o cálculo das relações evolutivas entre os grupos internos.

HiSeq – Técnica de sequenciamento via Plataforma *Illumina*, no qual há menor tamanho de leitura, menor velocidade e maior quantidade de dados em relação à técnica MiSeq, da mesma plataforma.

Identificador KO – “Número KO” ou “Número K”, referente ao Banco de Dados KO de Funções Moleculares, provenientes de genes e proteínas caracterizados experimentalmente em organismos específicos que são usados para encontrar ortólogos em outros organismos.

Illumina – Plataforma de análise genômica, baseada na técnica de sequenciamento por síntese.

Inóculo – Fonte de microrganismos.

Metabarcoding – Sequências curtas de DNA ou RNA que podem ser utilizadas para caracterização microbiana, *e.g.*, 16S.

Metabólitos – Produto do metabolismo de determinada molécula ou substâncias por meio de reações bioquímicas.

Metataxonômica – Técnica de caracterização da comunidade microbiana a partir de sequenciamento massivo de DNA, a partir da qual torna-se possível inferir as relações filogenéticas entre as sequências obtidas.

Nucleotídeo – Unidade mínima do material genético, ácido ribonucleico (RNA) ou desoxirribonucleico (DNA), constituída por uma base nitrogenada, um açúcar (ribose) e um grupo fosfato.

Número de acesso – Identificador das sequências depositadas em determinado banco de dados.

Número E.C – Do inglês “*Enzyme Commission Numbers*”. Sistema de classificação numérica aplicado às enzimas, composto por até cinco números em ordem hierárquica, referentes às reações químicas catalizadas por tais enzimas.

Ortólogo – Genes com funções similares e mesma origem evolutiva, mas que divergiram por especiação.

OTU – Abreviação de Unidade Taxonômica Operacional. Menor unidade taxonômica utilizada em um estudo.

Paired-end – Sequenciamento tanto da região alvo quanto de sua fita correspondente, resultando em duas sequências complementares.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, técnica utilizada para amplificação exponencial de uma região genômica específica.

Pipeline – cadeia de processos.

Ponto central – Replicas verdadeiras utilizadas para estimativa do erro puro.

Pontos axiais – Níveis extremos de um determinado experimento na metodologia de superfície de resposta.

Primer ou Iniciador – Fragmentos curtos de RNA (oligonucleotídeo) utilizados para amplificação de uma região-alvo por meio da técnica de PCR, por meio de uma hidroxila livre em sua extremidade 3'.

Read – Pequena sequência de pares de base, obtida como resultado do sequenciamento do genoma a partir da técnica *shotgun*.

Shotgun – Técnica de sequenciamento aleatório de alto desempenho aplicado à posterior reconstrução do genoma completo de determinado organismo ou amostra.

Single-end – Sequenciamento apenas da região alvo do material genético, não incluindo sua sequência complementar e resultando em apenas uma sequência. Contrário de *paired-end*.

Solvetogênese – Via metabólica de produção microbiológica/fermentativa de etanol.

Táxon – Unidade taxonômica, referente a qualquer nível de classificação filogenético, *e.g.*, gênero.

Químera – Em bioinformática, uma sequência quimérica é o produto da concatenação acidental de duas ou mais sequências de DNA, resultando em uma sequência artificial (químera) que pode levar a erros durante o tratamento e análise das sequências.

Lignocelulose – Biomassa composta principalmente por fibras de celulose e hemicelulose revestidas por lignina.

Bioaugmentação – Aumento da população microbiana em uma determinada amostra por meio da adição de cepas específicas ou fortalecimento da comunidade autóctone da própria amostra.

Hidrotermólise – Pré-tratamento físico baseado na pressurização de água em elevadas temperaturas (~200 °C), seguida de rápida despressurização e resfriamento, a fim de romper as fibras de lignocelulose de diferentes biomassas.

Hidrólise – Reação em que há quebra da ligação química em uma molécula ocasionada por uma molécula de água.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

A presente pesquisa é baseada principalmente nos resultados apresentados nos seguintes artigos:

- I. CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I. K., DUARTE, I. C. S., VARESCHE, M. B. A. Influence of alkaline peroxide assisted and hydrothermal pretreatment on biodegradability and bio-hydrogen formation from citrus peel waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 44, n. 41, p. 22888–22903, 2019. (DOI: [10.1016/j.ijhydene.2019.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.011)).
- II. CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I. K., SILVA, E. L., DUARTE, I. C. S., VARESCHE, M. B. A. Bioaugmentation with *Enterococcus casseliflavus*- a hydrogen-producing strain isolated from Citrus Peel Waste. *Waste and Biomass Valorization*, 2020. (DOI: [10.1007/s12649-020-01049-7](https://doi.org/10.1007/s12649-020-01049-7)).
- III. CAMARGO, F. P., SARTI, A., SABATINI, C., ADORNO; M. A. T., DUARTE, I. C. S., VARESCHE, M. B. A. Development and validation of new method for limonene quantification by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and its application in anaerobic reactor. *Química Nova*, 2020. (DOI: [10.21577/0100-4042.20170557](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170557)).
- IV. CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I. K., BIZE, A., DUARTE, I. C. S., SILVA, E. L., VARESCHE, M. B. A. Screening design of nutritional and physicochemical parameters on bio-hydrogen and volatile fatty acids production from Citrus Peel Waste in batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020. (DOI: [10.1016/j.ijhydene.2020.06.084](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.084)).
- V. CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I. K., DELFORNO, T. P., MARIADASSOU, M., LOUX, V., MIDOUX, C., DUARTE, I. C. S., SILVA, E. L., BIZE, A., VARESCHE, M. B. A. Microbial characterization of a consortium involved in an optimized batch reactor applied to biohydrogen production from Citrus Peel Waste as lignocellulosic substrate. *Journal of Environmental Management*, 2021.
- VI. CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I. K., DUARTE, I. C. S., SILVA, E. L., VARESCHE, M. B. A. Metataxonomic characterization of bacterial and archaeal community involved in hydrogen and methane production from Citrus Peel Waste in batch reactors. *Biomass & Bioenergy*, 2021.

ÍNDICE REMISSIVO

- 16S**, 31, 70, 76, 77, 78, 79, 83, 106, 107, 108, 109, 138, 139, 158, 159, 160, 207, 232, 233, 234, 238, 259, 276, 283, 291, 295, 296
- acetogênese**, 73, 189, 191, 234, 240, 241, 243, 245, 254
- alóctone**, 83, 84, 90, 91, 92, 94, 95, 98, 99, 106, 107, 121, 122, 125, 136, 137, 138, 140, 142, 145, 146, 147, 160, 163, 165, 175, 180, 184, 190, 225, 263, 295
- amido**, 39, 40, 96, 189, 193, 195, 197, 209, 210, 211, 212, 213, 227, 239, 240
- autofermentação**, XV, 88, 89, 90, 95, 107, 117, 118, 119, 120, 121, 205, 206, 220, 221, 222, 223, 254, 257, 295
- bioaumentação**, 30, 219, 220, 221, 222, 223, 224
- C. beijerinckii***, 64, 189, 190, 202
- CAZymes**, 111, 199, 201
- celobiose**, 39, 40, 68, 69, 96, 189, 191, 196, 197, 200, 201, 202, 209, 210, 211, 240, 241
- celulolítico**, 40, 69, 70, 89, 90, 94, 95, 96, 120, 121, 149, 166, 205, 206
- celulose**, 29, 34, 39, 40, 43, 47, 49, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 67, 68, 69, 70, 72, 89, 96, 115, 117, 121, 127, 128, 133, 142, 163, 178, 181, 189, 191, 199, 200, 201, 202, 206, 209, 210, 211, 212, 214, 218, 221, 224, 259, 263
- comunidade microbiana**, 30, 31, 35, 71, 74, 77, 78, 84, 96, 106, 107, 136, 138, 158, 163, 184, 187, 193, 231, 259, 296
- consórcio autóctone**, 91, 120, 166, 206, 257, 258, 263
- deslignificação alcalina**, 34, 50, 58, 62, 74, 86, 87, 91, 106, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 145, 257, 263
- E. casseliflavus***, 208, 209, 212, 220, 224, 225, 265
- endósporos**, 119, 120, 126, 205, 231, 232
- EtOH**, 72, 101, 118, 124, 125, 134, 141, 142, 146, 155, 177, 182, 189, 191, 206, 209, 211, 212, 224, 225, 230, 231, 254, 255, 259, 263
- fenóis**, 79, 84, 97, 101, 123, 124, 134, 135, 136, 144, 152, 154, 158, 177, 179, 215, 220, 228, 252
- frutose**, 96, 117, 191, 196, 209, 210, 211, 213, 214, 239
- glicólise**, 193, 194, 197, 198, 239, 240, 241, 242, 243, 245
- hemicelulose**, 34, 39, 40, 43, 47, 48, 50, 57, 58, 60, 61, 62, 68, 115, 116, 117, 128, 133, 142, 178, 199, 202, 215, 297
- hidrotermólise**, 34, 49, 50, 51, 55, 59, 60, 61, 62, 83, 84, 86, 91, 106, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 155, 257, 263
- HLac**, 72, 118, 125, 134, 141, 142, 146, 155, 189, 190, 206, 209, 212, 213, 224, 225
- HPr**, 101, 124, 155, 177, 182, 209, 210, 212, 213, 214, 222, 223, 224, 225, 230, 231, 237, 254, 259, 263
- Illumina***, 31, 32, 77, 78, 80, 106, 107, 109, 110, 139, 160, 184, 234, 259, 296
- índices ecológicos**, 77, 139, 185, 232
- KEGG**, 81, 109, 111, 192, 193, 238, 240, 277
- lactose**, 96, 209, 211, 214
- lignina**, 29, 39, 41, 43, 47, 48, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 79, 116, 117, 128, 130, 133, 135, 142, 154, 178, 179, 181, 199, 200, 201, 215, 242, 297
- limoneno**, 30, 35, 43, 44, 45, 46, 60, 71, 72, 84, 104, 105, 106, 130, 131, 142, 143, 144, 151, 162, 177, 223, 228, 235, 236, 242, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 258, 261, 263
- metabarcoding**, 31, 32, 77, 80, 81, 82, 83, 107, 138, 158, 232, 238, 259, 261
- metabolismo de carboidratos**, 193, 194, 195, 196, 238, 241
- metagenômica**, 31, 32, 77, 79, 81, 84, 107, 109, 184, 192, 259

- metanogênese**, 64, 68, 72, 73, 74, 135, 227, 228, 229, 230, 231, 236, 237, 242, 243, 244, 245, 258, 263, 275
- metataxonômica**, 237, 295
- peptona**, 83, 92, 147, 151, 152, 156, 165, 166, 175
- Plackett & Burman**, 31, 32, 34, 83, 91, 92, 93, 95, 98, 107, 146, 147, 148, 151, 153, 156, 159, 166, 175, 261, 263
- pré-tratamento**, 41, 47, 48, 50, 51, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 80, 82, 83, 86, 91, 122, 127, 128, 133, 145, 189, 227, 257
- sacarose**, 63, 96, 117, 178, 191, 193, 195, 197, 209, 210, 211, 239, 240
- screening design**, 34, 93, 94, 109, 146, 148, 153, 154, 155, 159, 166, 258
- shotgun**, IX, XV, 31, 32, 77, 78, 80, 81, 82, 84, 107, 110, 184, 259, 261, 263, 297
- superfície de resposta**, 34, 83, 94, 170, 175, 178, 182, 261, 297
- vias metabólicas**, 35, 65, 78, 81, 82, 84, 111, 157, 184, 192, 193, 194, 195, 203, 237, 238, 240, 244, 255, 259, 263
- xilose**, 41, 48, 50, 54, 56, 79, 96, 130, 157, 189, 191, 202, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 261