

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

EFEITO DAS MELANOIDINAS SINTÉTICAS NA PRODUÇÃO DE
ÁCIDOS VOLÁTEIS E ÁLCOOIS POR FERMENTAÇÃO ESCURA

Aluna: Carolina Nemeth Comparato

Orientador: Ariovaldo José da Silva

CAROLINA NEMETH COMPARATO

EFEITO DAS MELANOIDINAS SINTÉTICAS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS
VOLÁTEIS E ÁLCOOIS POR FERMENTAÇÃO ESCURA

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRONICO, 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).

C736e Comparato, Carolina
Efeito das melanoidinas sintéticas na produção
de ácidos voláteis e álcoois por fermentação escura /
Carolina Comparato; orientador Ariovaldo José da
Silva. São Carlos, 2023.

Dissertação (Mestrado) - Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e
Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2023.

1. Melanoidinas. 2. Comunidade microbiana. 3.
Inibição. 4. Tratamento biológico de efluentes. I.
Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **CAROLINA NEMETH COMPARATO**.

Título da dissertação: "Efeito das melanoidinas sintéticas na produção de ácidos voláteis e álcoois por fermentação escura".

Data da defesa: 19/05/2023.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Dr. **Ariovaldo Jose da Silva (Orientador)**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

APROVADA

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Profª. Dra. **Sandra Imaculada Maiflinguer**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Rio Claro)

APROVADA

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

Prof. Associado **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

Ao meu pai (in memoriam), que me ensinou que o tempo é escasso e que o amor nunca deve ficar para depois.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Ariovaldo José da Silva, que desde o princípio confiou em mim e me acompanhou ao longo deste trabalho.

Ao professores Marcelo Zaiat e Sandra Imaculada Maintinguer pela imensa gentileza e disposição, às correções discussões e ensinamentos que muito agregaram a este trabalho.

À Isabel, Carol e Janja que me auxiliaram nas fases experimentais deste trabalho com muita disposição e paciência.

Aos meus amigos, em especial, Lucas Souza, Adison Silva, Nicolly Ceschin, Thami Miranda, Arth por todo carinho e companheirismo durante a minha caminhada. A vida é mais leve e divertida com vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos que tornaram esta trajetória possível.

“Há um tempo em que é preciso
abandonar as roupas usadas
Que já tem a forma do nosso corpo
E esquecer os nossos caminhos que
nos levam sempre aos mesmos lugares
É o tempo da travessia
E se não ousarmos fazê-la
Teremos ficado para sempre
À margem de nós mesmos”

Fernando Pessoa

RESUMO

COMPARATO, C. N. **Efeito das melanoidinas sintéticas na produção de ácidos voláteis e álcoois por fermentação escura.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A fermentação é uma tecnologia em que vários gêneros de bactérias fermentativas, por exemplo, *Clostridium* e *Enterobacter*, podem utilizar carboidratos, proteínas e lípidos como fontes de carbono para produzir H₂, CO₂, ácidos orgânicos (AOs) e álcoois através da via acidogênica. A acidogênese é uma etapa importante no tratamento biológico de efluentes, pois permite a recuperação de AOs e álcoois, que podem ser utilizados como fonte de energia ou como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e produtos químicos. No entanto, a presença de compostos como melanoidinas pode afetar negativamente esse processo. As melanoidinas são polímeros heterogêneos de alto peso molecular, coloração marrom, formados pela combinação de açúcares e aminoácidos a altas temperaturas. Atuam como inibidores da comunidade microbiana, tornando possível a alteração de rotas metabólicas ou ainda a inibição completa do processo de fermentação. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar a influência das melanoidinas na acidogênese, utilizando melanoidinas sintetizadas a partir de glicose e glicina. A fermentação foi realizada em dez reatores, nomeados de R1 a R10, com variação de concentrações iniciais de glicose (3 a 10 g L⁻¹) e melanoidinas (2 a 6 g L⁻¹), em três fases e um reator controle (RC) no qual não houve adição de melanoidinas. Os resultados mostraram que a presença de melanoidinas teve um efeito negativo na acidogênese, com destaque para a redução na produção de ácido butírico e acético. No entanto, a produção de ácido láctico (HLA) foi beneficiada, visto que a concentração de HLa em R4, por exemplo, foi de 920 mg L⁻¹ na fase III do experimento, enquanto em RC HLa esteve ausente. O sequenciamento massivo do gene RNAr 16S dos reatores controle (RC), R4 e R8 revelou que houve alteração na comunidade microbiana presente nos experimentos, com um impacto mais significativo observado em reatores com maior concentração de melanoidina, evidenciado pela diminuição do índice de diversidade de Shannon-Wiener, de 1,62 em RC para 1,31 e 1,28 em R4 e R8, respectivamente. A presença de melanoidinas nos experimentos apontou significativa interferência na produção de AOs e álcoois e na proporção de espécies presentes na comunidade.

Palavras-chave: Melanoidinas, Comunidade microbiana, Inibição, Tratamento biológico de efluentes

ABSTRACT

COMPARATO, C. N. **Effect of synthetic melanoidins on the volatile acids and solvents production by dark fermentation**. 2023. Dissertation (Master) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Dark fermentation is a technology that utilizes various fermentation bacteria such as *Clostridium* and *Enterobacter* to convert carbohydrates, proteins, and lipids into H₂, CO₂, and organic acids via acidogenesis. This stage is important in biological wastewater treatment as it allows for the recovery of organic acids (OAs) and solvents that can be used as an energy source or as raw materials for biofuels and chemicals production. However, the presence of compounds such as melanoidins can negatively affect this process. Melanoidins are heterogeneous polymers with high molecular weight and brown color, formed by the combination of sugars and amino acids at high temperatures. These polymers act as inhibitors of microbial communities and have antioxidant properties, which can alter metabolic pathways or completely inhibit the fermentation process. The aim of this study was to evaluate the influence of melanoidins on acidogenesis. Using synthetic melanoidins produced from glucose and glycine, the study was conducted in reactors named R1 to R10, which had varying concentrations of glucose (3 to 10 g L⁻¹) and melanoidins (2 to 6 g L⁻¹). Additionally, a control reactor (RC) operated without the addition of melanoidins. The experiment was divided into three phases, each involving a new feeding. The results showed that the presence of melanoidin had a negative effect on the production of OAs and solvents, with a significant reduction in the production of butyric and acetic acid. However, lactic acid production was favored, with a lactic acid concentration of 920 mg L⁻¹, as well as bacteria of the *Lactobacillus* genus. Massive sequencing of the 16S rRNA gene of the control reactors (RC), R4, and R8 revealed that there was a change in the microbial community present in the experiments, more significant impact observed in reactors with a higher concentration of melanoidin, as evidenced by the decrease in the Shannon-Wiener diversity index from 1.62 in RC to 1.31 and 1.28 in R4 and R8, respectively. The presence of melanoidins in the experiments significantly interfered with the production of OAs and alcohol, as well as the gender composition of the microbial community

Key-words: Melanoidins, Microbial community, Inhibition, Biological wastewater treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado das reações de conversão de glicose na acidogênese com ênfase na formação de ácidos orgânicos.....	31
Figura 2 - Esquema da reação de Maillard	39
Figura 3 - Estrutura básica da melanoidina formada a partir de carboidratos e aminoácidos	40
Figura 4 - Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana da melanoidina.....	47
Figura 5 - Biomassa imobilizada em espuma cúbica de poliuretano com 1,0 cm de aresta.	49
Figura 6 - Variação temporal da concentração de glicose durante o período de experimento nas condições: a) R1, b) R2, c) R3, d) R4, e)R5 e f) R7 - (■) glicose; () alimentação de novo meio; () 5% do valor de glicose inicial em cada alimentação. ...	55
Figura 7 - Variação temporal da concentração de glicose durante o período de experimento nas condições: g) R7, h) R8, i) R9 e j) R10 - (■) glicose; () alimentação de novo meio; () 5% do valor de glicose inicial em cada alimentação.	56
Figura 8 - Concentração de AOs e solventes, na qual a) Fase I, b) Fase II e, c) Fase III. HCa: ácido caprótico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.....	57
Figura 9 - Concentração de AOs e solventes em porcentagem em cada reator, na qual a) Fase I, b) Fase II e, c) Fase III. HCa: ácido caprótico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.	59
Figura 10 - Diagrama de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95% para as respostas a) HAc, b) HBu, c) HLa e d) Ácidos totais	60
Figura 11 – Análise de Componente Principal (PCA) dos metabólitos produzidos na fase III. A componente 1 (eixo x; 62,07%) e a componente 2 (eixo y; 14,40%) totalizam 74,47% da variância das análises. HCa: ácido caprótico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; EtOH: et etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.	61
Figura 12 - Mapa de calor da abundância relativa (%) das diferentes ordens, famílias e gêneros detectadas nas amostras do reator controle, reator 4 e reator 8, com base no	

sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA. Abundância relativa $\geq 0,1\%$ é mostrada em pelo menos uma amostra. Tons de vermelho e verde indicam maior e menor abundância, respectivamente. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade microbiana de melanoidinas	48
Tabela 2 - Composição do meio de fermentação	50
Tabela 3 - Concentrações de melanoidinas, ureia, glicose e inóculo adicionadas em cada reator.....	51
Tabela 4 - Matriz de Variância e Covariância das concentrações dos metabólitos medidos na fase III.....	61
Tabela 5 - Índices ecológicos das sequências obtidas a partir do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA para o RC, R4 e R8.	62
Tabela 6 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase I. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.	69
Tabela 7 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase I. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.....	70
Tabela 8 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase II. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.	71
Tabela 9 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase II. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.....	72
Tabela 10 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase III. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.	73
Tabela 11 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase III. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.....	74

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ac - Acetona

Acetil CoA – Acetilcoenzima A

ADP – Adenosina Difosfato

AOs – Ácidos Orgânicos

ATP – Adenosina Trifosfato

AVS - Amplicon Sequencing Variants

BRN – Bactérias Redutoras de Nitrato

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

CMI – Concentração Mínima de Inibição

COT – Carbono Orgânico Total

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DSS - Dodecil Sulfato de Sódio

EtOH - Etanol

HAc – Ácido Acético

HBu – Ácido Butírico

HCa – Ácido Capróico

HFo – Ácido Fórmico

HLa – Ácido Láctico

HPr – Ácido Propiônico

HSu – Ácido Succínico

HVa – Ácido Valérico

iso-HBu – Ácido Isobutírico

iso-HVa – Ácido Isovalérico

MAPM - Melanoidinas de Alto Peso Molecular

MBPM – Melanoidinas de Baixo Peso Molecular

MeOH – Metanol

NAD e NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

n-BuOH – n-Butanol

NODR - Nitrogênio Orgânico Dissolvido Recalcitrante

PCA – Principal Component Analysis

SDBS - Dodecilbenzeno Sulfonato de Sódio

TCO – Taxa de Carregamento Orgânico

TDH – Tempo de detenção Hidráulica

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket

ΔG° - Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivo específico.....	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1 Digestão anaeróbia	29
3.2 Acidogênese	30
3.3 Aplicações de subprodutos da acidogênese	32
3.4 Fatores que afetam a acidogênese	33
3.4.1 Taxa de carregamento orgânico	33
3.4.2 pH.....	35
3.4.3 Aditivos e inibidores	35
3.5 Melanoidinas	37
3.5.1 Formação e estrutura das melanoidinas	38
3.5.2 Impacto das melanoidinas no meio ambiente	44
3.5.3 Tratamento biológico de efluentes contendo melanoidinas	44
3.5.4 Propriedade antimicrobiana	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Inóculo.....	49
4.2 Água residuária sintética	50
4.3 Preparação da solução de melanoidinas	50
4.4 Ensaios em reator em batelada alimentada	50
4.5 Métodos analíticos	52
4.5.1 Metabólitos solúveis	52
4.5.2 Glicose.....	52
4.5.3 Sequenciamento e bioinformática	52
4.5.4 Outras	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Análise das concentrações de glicose nos ensaios em batelada alimentada	54
5.2 Análise de AOs e solventes nos ensaios em batelada	56
5.3 Análise da comunidade microbiana	62

6. CONCLUSÃO	67
6.1 Sugestão de trabalhos futuros.....	67
APÊNDICE	68
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional e da atividade econômica, a geração de resíduos antropogênicos provenientes de atividades domésticas e industriais, incluindo resíduos agroindustriais, tem aumentado. Além disso, há uma crescente necessidade de se reaproveitar compostos presentes em efluentes, a fim de reduzir o impacto ambiental decorrente de sua produção. Uma abordagem em destaque é a obtenção de produtos de interesse biotecnológico combinada ao tratamento eficiente de efluentes agroindustriais, que minimiza os impactos ambientais resultantes do descarte direto no ambiente.

Os efluentes agroindustriais são uma importante fonte de poluição ambiental devido à alta carga orgânica presente em sua composição. Dentre os compostos orgânicos presentes nesses efluentes, pode-se destacar as melanoidinas, polímeros de cor escura produzidos durante a interação de açúcares redutores com aminas, sob aquecimento, no estágio final da reação de Maillard (ARIMI *et al.*, 2015) apontadas como os principais contaminantes orgânicos responsáveis por conferir cor a diversos efluentes gerados na produção de etanol, café, produtos da panificação, cerveja, cacau, mel, entre outros (BRUDZYNSKI *et al.*, 2017 e (ORACZ; ŻYŻELEWICZ, 2020; WALKER *et al.*, 2020; YANG; GAO, 2021).

Um exemplo de efluente rico em melanoidina é a vinhaça, que é um subproduto gerado pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. A vinhaça é um efluente altamente poluente, rico em nutrientes e compostos orgânicos, como a melanoidina (SATYAWALI; BALAKRISHNAN, 2008). Outro exemplo é o efluente gerado pela indústria de processamento de café, sobretudo na fabricação de café solúvel, que é rico em compostos fenólicos e melanoidinas. Essas indústrias geram uma enorme quantidade de águas residuais que se destacam principalmente pela cor marrom, alta demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio orgânico dissolvido, compostos fenólicos, sólidos totais dissolvidos, fosfatos e sulfatos (VINOTH KUMAR *et al.*, 2020).

A presença de melanoidinas nos efluentes industriais tem um impacto significativo no meio ambiente, já que esses compostos são recalcitrantes e podem causar efeitos negativos na qualidade da água e solo. Na água, as melanoidinas cessam a disseminação de luz solar, diminuindo a concentração de oxigênio dissolvido disponível, levando à morte da vida aquática. Além disso, os íons metálicos interagem com a melanoidina e formam complexos estáveis, contribuindo para a poluição ambiental (CHANDRA *et al.*, 2008; TRIPATHI, S. *et al.*, 2021). Quando disposta no solo, as

melanoidinas reduzem a alcalinidade e disponibilidade de manganês, impedindo a propagação de sementes, comprometendo a produtividade do solo (RIZVI; GOSWAMI; GUPTA, 2020). As melanoidinas ainda apresentam propriedades antimicrobiana e antioxidante, que podem afetar tanto o ambiente no qual são descartadas quanto sistemas biológicos de tratamento de efluentes, prejudicando a eficiência de remoção da matéria orgânica, uma vez que a presença de compostos inibidores e recalcitrantes podem alterar rotas metabólicas ou ainda inibir completamente o processo (ARIMI *et al.*, 2014).

Na digestão anaeróbia, por exemplo, que tem sido uma excelente opção para diminuição da carga orgânica, resultando em remoções de DQO acima de 80% e convertendo a matéria orgânica em gás metano, hidrogênio, ácidos orgânicos (AOs) e solventes, a presença de melanoidina diminui significativamente a produção de metano e não é totalmente degradada durante o processo (WANG, S. *et al.*, 2022).

Já a acidogênese, etapa da digestão anaeróbia na qual são formados AOs, como ácido acético (HAc), propiônico (HPr), butírico (HBu) e láctico (HLa), além de álcoois, aldeídos, hidrogênio, entre outros subprodutos, apresenta maior estabilidade e tolerância a cargas orgânicas mais altas quando comparada à digestão anaeróbia completa, se tornando uma forma viável de pré-tratar efluentes com altas concentrações de melanoidina. Além disso, representa uma importante fonte de matéria prima para a indústria química, farmacêutica e alimentícia (LIU; YANG, 2006; POUILLART, 1998), para a produção de metano em sistemas de duas fases, com o objetivo de diminuir a instabilidade no sistema (LULLIO *et al.*, 2014), para a produção de hidrogênio em reatores fotossintéticos (FASCETTI *et al.*, 1998; MEKY *et al.*, 2021) e como fonte de carbono para a remoção de nitrogênio e fósforo (ALI *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2019).

Dessa forma, o estudo de como as melanoidinas podem afetar os microrganismos envolvidos na fermentação e seu impacto na formação de AOs e solventes pode elucidar o comportamento da comunidade microbiana na presença desses compostos, auxiliando na elaboração de futuras estratégias para a melhoria de sistemas de tratamento, cujas matrizes energéticas possuam melanoidinas em sua composição.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a influência das melanoidinas na produção de ácidos voláteis e álcoois por fermentação em reator de batelada alimentada.

2.2 Objetivo específico

Avaliar o efeito das melanoidinas sobre a comunidade microbiana envolvida no processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo que ocorre naturalmente em ambientes com baixa ou nenhuma concentração de oxigênio. O desenvolvimento de reatores para tratamento de águas residuárias, visando a otimização desse processo, tem se mostrado uma alternativa eficaz para conversão da matéria orgânica a uma mistura de dióxido de carbono, metano e subprodutos.

Segundo Harper e Pohland (1986), a digestão anaeróbia pode ser separada em nove fases: a) hidrólise de polímeros orgânicos, como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, a monômeros orgânicos através de exoenzimas excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas; b) conversão dos monômeros orgânicos a hidrogênio, bicarbonato, ácidos acético, butírico, propiônico e lático e etanol; c) oxidação de produtos reduzidos a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético por bactérias acetogênicas obrigatórias; d) respiração de bicarbonato por bactérias homoacetogênicas; e) oxidação de produtos reduzidos a bicarbonato e acetato pelas bactérias redutoras de nitrato (BRN) e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS); f) oxidação de acetato a bicarbonato pelas BRN e BRS; g) oxidação de hidrogênio pelas BRN e BRS; h) fermentação de acetato a metano e dióxido de carbono pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas e; i) respiração metanogênica de bicarbonato.

Os variados microrganismos que participam da complexa rede de reações, ligadas por seus substratos e produtos específicos, estabelecem entre si condições propícias para degradação da matéria orgânica. Entretanto, devido às diferenças relacionadas à fisiologia, requerimento nutricional e cinética de crescimento microbiano, o equilíbrio entre os grupos envolvidos na acidogênese e metanogênese é complexo e representa a principal fonte de instabilidade em sistemas de tratamento anaeróbios (ALGAPANI *et al.*, 2019; MARI *et al.*, 2020). A separação do processos em duas etapas, com a utilização de reatores diferentes para a acidogênese e metanogênese, podem melhorar o desempenho da digestão anaeróbia, promovendo a seleção de microrganismos em cada reator, o que permite controlar os parâmetros de forma independente, possibilitando a aplicação de cargas orgânicas mais altas sem o risco de sobrecarregar o sistema (JÜRGENSEN *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Outra vantagem que a separação em duas fases pode proporcionar é a recuperação de metabólitos de interesse, como o biohidrogênio e ácidos

orgânicos, tornando o efluente fonte de matéria prima para diversos processos (XU *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2018).

3.2 Acidogênese

As bactérias acidogênicas são responsáveis pela conversão da matéria orgânica hidrolisada, em forma de glicose, a ácidos acético, butírico e propiônico, conforme as reações 1, 2 e 3, respectivamente. Nesta rede de vias metabólicas o piruvato é o ponto central, o qual pode ser convertido a uma ampla gama de produtos. As proporções de piruvato direcionadas à cada via dependem do substrato, condições ambientais e propriedades dos microrganismos. Os átomos de hidrogênio removidos do piruvato são transferidos para moléculas transportadoras, como a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), reduzindo-as em NADH. O balanço de elétrons é realizado com a produção de H₂, que é secretado pelos microrganismos. A conversão ácido acético se mostra como a rota metabólica preferencial, uma vez que o rendimento energético é superior. Quando há cargas de pico no sistema as reações 2 e 3 ocorrem, como resposta dos microrganismos para a acumulação de hidrogênio (MOSEY, 1983). As principais rotas metabólicas acidogênicas estão ilustradas na Figura 1.

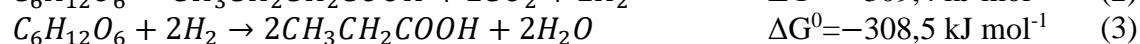
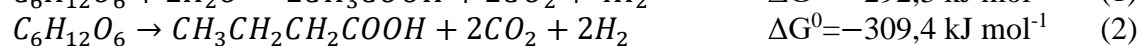
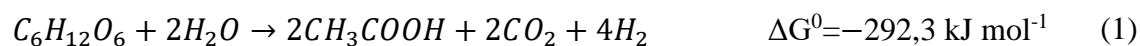
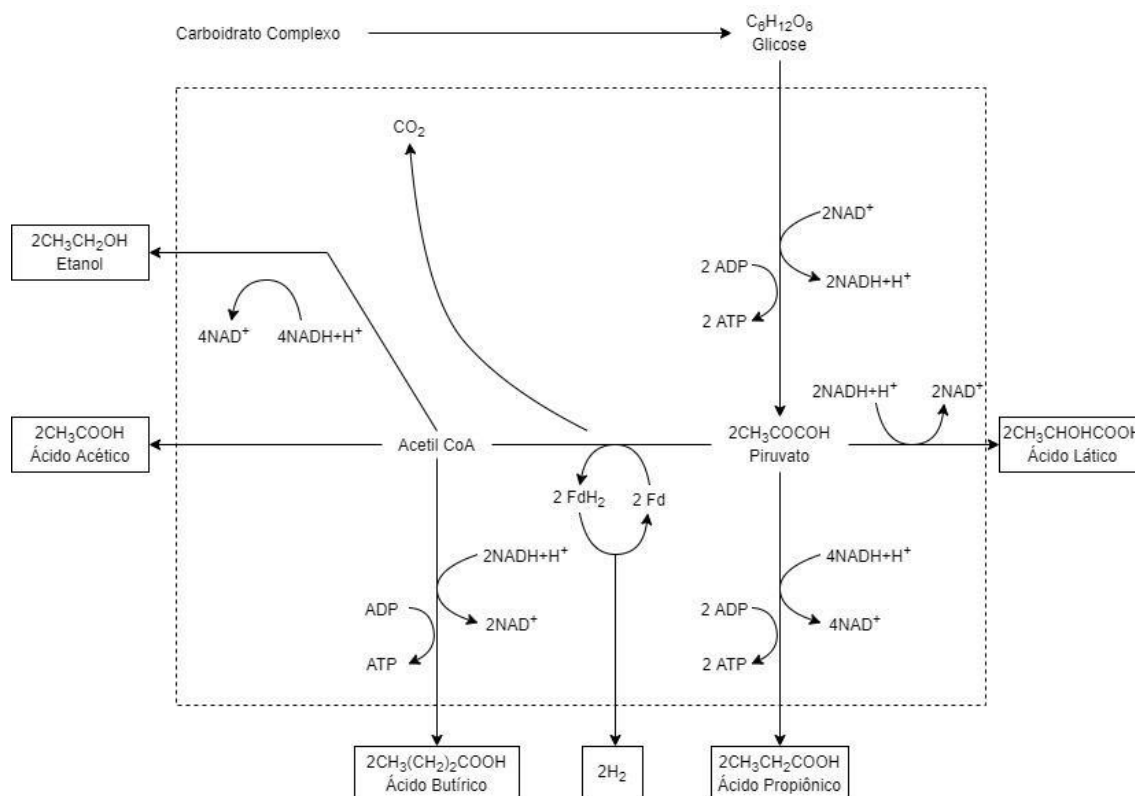
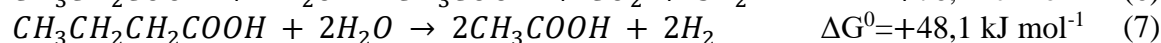
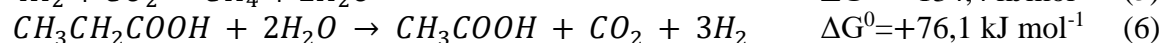


Figura 1- Esquema simplificado das reações de conversão de glicose na acidogênese com ênfase na formação de ácidos orgânicos



Fonte: Adaptado de Wang, Mu e Yu (2007)

Para a produção de AOs é necessário evitar que a metanogênese ocorra, suprimindo as reações (4) e (5), nas quais ocorre conversão de acetato e hidrogênio a metano. Sem a remoção de hidrogênio pelas arqueas hidrogenotróficas, ocorre o deslocamento das reações (6) e (7), tornando-se termodinamicamente desfavorável a conversão de propionato e butirato a acetato, o que leva ao acúmulo de ácidos butírico e propiônico (HARPER; POHLAND, 1986; MICELI *et al.*, 2016; MOSEY, 1983). O aumento da pressão parcial de hidrogênio ainda gera uma abundância de NADH, acelerando a formação de butirato e propionato, conforme as reações 2 e 3 (MOSEY, 1983).



Estratégias de operação dos reatores também podem favorecer outras rotas metabólicas, promovendo a formação de solventes como o etanol. Segundo Van Ginkel e Logan (2005) a produção de acetato permite a regeneração de NAD^+ apenas pela produção de

hidrogênio, enquanto na produção de ácido butírico o NAD^+ é regenerado tanto pela produção de H_2 quanto pela redução de fosfato de butila. Se essa via se tornar restrita devido ao excesso de butirato no meio e as concentrações de hidrogênio se mantiverem altas, o único reservatório de elétrons restante para a regeneração de NAD^+ é por meio da produção de solventes.

3.3 Aplicações de subprodutos da acidogênese

Os AOs tem sido alvo de pesquisas devido a possibilidade de sua utilização como fonte de carbono renovável em diversas aplicações, como na produção de bioplásticos (AMULYA *et al.*, 2014; PAGLIANO *et al.*, 2020), bioenergia (GRESES; TOMÁS-PEJÓ; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2021; POSTAWA; SZCZYGIEL; KUŁAŻYŃSKI, 2021; VILLA MONTOYA *et al.*, 2020) e remoção de nutrientes (FENG, X. C. *et al.*, 2021; KIM, H. *et al.*, 2016). Atualmente nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica, de couro e plásticos, a utilização de AOs e seus derivados já é amplamente realizada (DEN BOER *et al.*, 2016). Ainda que a produção de AOs a partir de processos químicos, utilizando petroquímicos como insumo, seja atualmente a maior fonte de ácidos orgânicos comerciais, sua obtenção a partir de processos fermentativos representa possibilidades em redução de custos e utilização de uma fonte renovável de matéria prima (BOTTA, 2016).

A produção de bioplásticos por meio da conversão de AOs a polihidroxialcanoatos (PHA) por microrganismos tem se mostrado efetiva na redução de custos na geração de PHA (AMULYA; VENKATESWAR REDDY; VENKATA MOHAN, 2014). Esses polímeros biodegradáveis podem ser produzidos a partir de HAc, HBU e HPr (PAGLIANO *et al.*, 2020) e aplicados em diversos ramos, incluindo industrial, apresentando uma alternativa a utilização de plásticos convencionais, cuja fonte são combustíveis fósseis.

Bioenergia pode ser produzida através da oxidação de AOs gerando energia elétrica diretamente com o uso de células de combustível microbianas (WANG, H.; REN, 2013), ou ainda pela geração de biogás como o metano e hidrogênio. A geração de metano em sistemas de duas fases, na qual bactérias acidogênicas são separadas das arqueas metanogênicas em reatores distintos, tem obtido sucesso, apresentando sistemas mais estáveis e com maior geração de CH_4 (LULLIO *et al.*, 2014). Esse sistema ainda permite a recuperação de hidrogênio e metano simultaneamente, o que torna o processo ainda mais vantajoso (PEIXOTO *et al.*, 2012).

Os produtos da fermentação também podem ser utilizados na remoção de nutrientes em pós tratamento de efluentes. Devido às baixas concentrações de carbono presentes no efluente após o tratamento biológico, a adição de fontes externas de carbono orgânico é uma estratégia comum para promover a remoção de nitrogênio e fósforo, o que acarreta maiores gastos ao tratamento. A utilização de AOs como fonte de matéria orgânica apresenta como vantagem a redução desses custos, além da utilização de resíduos da própria fermentação (FENG, X. C. *et al.*, 2021).

Portanto, a produção de efluentes com alto teor de ácidos orgânicos passíveis de recuperação a partir de sistemas de tratamentos biológicos se apresenta como uma estratégia promissora no desenvolvimento de processos biotecnológicos, seja para a produção de novos compostos e energia ou ainda como forma de adequação de tratamentos. Contudo, a obtenção de produtos químicos de valor agregado por meio da síntese a partir da produção e purificação de AOs em um processo econômico viável não é uma tarefa simples. Um obstáculo significativo é a baixa concentração de AOs encontrada nos caldos de fermentação, o que dificulta a separação e purificação desses compostos (REYHANITASH *et al.*, 2016).

3.4 Fatores que afetam a acidogênese

O metabolismo das bactérias acidogênicas pode ser afetado pela taxa de carregamento orgânico (TCO) (SPEECE, 1983; YUAN; ZHU, 2016), variações no pH (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001), tempo de detenção hidráulica (TDH) (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001), temperatura (RAWOOF *et al.*, 2020), concentração de amônia livre (YUAN; ZHU, 2016) ou ainda por características do inóculo (LAY; LEE; NOIKE, 1999). Esses parâmetros afetam diretamente a produção de AOs e álcoois podendo promover a inibição da atividade microbiana além da alteração de rotas metabólicas de bactérias fermentativas.

3.4.1 Taxa de carregamento orgânico

A TCO representa a carga orgânica volumétrica aplicada no reator e pode ser expressa em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos voláteis (SV), sólidos suspensos voláteis (SSV) ou carbono orgânico total (COT). Existem diversos trabalhos na literatura que analisaram o efeito da variação de TCO sobre a conversão de substrato e produção de ácidos.

Rincón *et al.* (2008) realizaram oito experimentos com TCO de 3,2, 5,6, 7,4, 9,6, 11,0, 12,9, 14,0 e 15,1 g DQO L⁻¹ dia⁻¹ em frascos de vidro agitados com volume de 1,5 L e temperatura de 35 °C, utilizando como inóculo lodo de um reator UASB utilizado para o tratamento de água residuária de cervejaria e como resíduo sólido de moinho de azeite de duas fases. Os autores observaram um aumento na concentração de carbono orgânico dissolvido com o aumento de TCO de 9,6 a 12,9 g DQO L⁻¹ dia⁻¹. Com TCO de 12,9 g DQO L⁻¹ dia⁻¹ foi obtido o ponto máximo de produção de ácido acético, entretanto em TCO maiores houve uma diminuição significativa do mesmo assim como de outros ácidos identificados. O HAc foi o principal produto da acidogênese em todos as TCO aplicadas, exceto em 3,2 g DQO L⁻¹ dia⁻¹, devido ao rápido consumo de ácido acético pelos microrganismos nessas condições. Foram produzidos ainda ácido butírico, que apresentou pico de produção em TCO de 9,6 g DQO L⁻¹ dia⁻¹, ácidos isovalérico e isobutírico, cujas concentrações apresentaram um aumento contínuo com o aumento da TCO, e ácido valérico em baixas concentrações. Com o aumento da TCO acima de 9,6 g DQO L⁻¹ dia⁻¹ os autores ainda identificaram a inibição completa da metanogênese.

Lim *et al.* (2008) analisaram o efeito da TCO na acidogênese em reator semi-contínuo com volume de 2,0 L, utilizando inóculo de uma estação de tratamento de esgoto sanitário para o tratamento de efluente de uma cafeteria, em pH 5,5, TDH de 8 dias e TCO de 5,0, 9,0 e 13,0 g DQO L⁻¹ dia⁻¹. Os autores identificaram que em TCO de 13,0 g DQO L⁻¹ dia⁻¹ foi a condição em que houve a maior produção total de AOs, além de apresentar a maior produção de ácido acético (36,1 a 38,8%), ácido capróico (7,6 a 13,3%), ácido succínico (12,7 a 22,8%) e ácido láctico (14,3 a 20,6%) indicando que o aumento da TCO favoreceu a produção destes ácidos. Já a TCO de 5,0 g DQO L⁻¹ dia⁻¹ favoreceu a produção de ácido propiônico (27,0 a 29,0%), butírico (20 a 23%) e valérico (20,7 a 21,9%). Os autores ainda relataram que a condição mais favorável para produção de ácidos acético e butírico foi de pH 6,0, TCO de 9,0 g DQO L⁻¹ dia⁻¹, temperatura de 35 °C e TDH de 8 dias.

Kaid Al-Shorgani *et al.* (2014) observaram que a variação da concentração de glicose de 20 a 100 g L⁻¹ afetou a produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum* em reator em batelada alimentado com meio sintético para fermentação. A produção máxima de butanol foi atingida quando a concentração de glicose foi de 50 g L⁻¹. Ao aumentar a concentração de glicose no meio foi relatada a diminuição na produção de butanol. O aumento de glicose acima da concentração ótima é responsável pela

diminuição da atividade nos sistemas de transporte de glicose devido ao acúmulo de produtos da fermentação, como o butanol (OUNINE *et al.*, 1985).

3.4.2 pH

Em reatores anaeróbios o AOs predominante é fortemente afetado pelo pH no meio (LIU *et al.*, 2012). Além disso é um fator fundamental para obtenção de AOs, uma vez que a maioria das bactérias acidogênicas não sobrevive em ambientes com pH extremamente ácido ($\text{pH} \leq 3,0$) ou alcalino ($\text{pH} \geq 12$) (LIU, H. *et al.*, 2012).

Segundo Temudo, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2007) o pH pode alterar a via metabólica da fermentação. Em pH baixo o consumo de NADH é mais favorável devido ao aumento da razão NADH/NAD^+ , levando à geração de butirato, acetato e hidrogênio. Em pH mais alto (6,5 a 8,5) os principais produtos da fermentação foram acetato, etanol e formato. Os autores utilizaram um meio sintético com glicose como substrato em um reator com volume de 3 L, mantido em temperatura mesofílica. Kaid Al-Shorgani *et al.* (2014) também identificaram alterações nas vias metabólicas de *Clostridium acetobutylicum* devido ao pH inicial utilizado em reatores em batelada e alimentado com meio sintético. Ao variarem o pH inicial de 5,0 a 7,0, os autores identificaram maior produção de butanol e acetona em pH 6,0 e 6,2.

O trabalho desenvolvido por Zhang *et al.* (2005) investigou a influência do pH (5, 6, 7, 9 e 11) na produção de AOs em reator em batelada, com volume de 3,0 L e alimentado com água residuária de cozinha de um restaurante universitário. As maiores concentrações de COT e DQO solúveis foi em pH 7,0, conseqüentemente obteve-se a maior produção de AOs, atingindo concentrações de 36 g L^{-1} , sendo o ácido butírico o subproduto mais presente (73,9%) seguido pelos ácidos acético (21,9%), láctico (8,7%), fórmico (2,4%) e propiônico (2,3%).

3.4.3 Aditivos e inibidores

O uso de aditivos, como surfactantes e enzimas, pode auxiliar na produção de ácidos e solventes, devido, sobretudo, à sua capacidade de solubilização da matéria orgânica. Os surfactantes aumentam a solubilização de substâncias poliméricas extracelulares, como carboidratos e lipídios.

Jiang, Chen e Zhou (2007) analisaram o efeito de dodecil sulfato de sódio (DSS) em 16 reatores idênticos com volume de 2,0 L tratando resíduos de lodo ativado. Os autores observaram que o aumento de DSS de 0,02 a $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ promoveu um aumento na

concentração de proteína e carboidratos solúveis. Após seis dias de fermentação a concentração de proteína e carboidratos solúveis aumentou de 341,81 e 51,59 mg L⁻¹ no reator sem adição de DSS para 1.372,91 e 220,98 mg L⁻¹, respectivamente. A produção de AOs também obteve aumento expressivo com adição de DSS, sendo que após seis dias de fermentação a concentração de AOs no ensaio branco foi de 191,10 mg DQO L⁻¹, 2.243,04 mg DQO L⁻¹ com 0,1 g.g⁻¹ de DSS e de 3.066,23 mg DQO L⁻¹ com 0,25 g.g⁻¹ de DSS após 18 dias de ensaio. Os autores ressaltaram que em altas concentrações de DSS a produção de AOs no início dos ensaios foi menor provavelmente ao efeito tóxico de surfactantes sobre as bactérias acidogênicas. Os principais ácidos produzidos foram acético, isovalérico e propiônico, totalizando mais de 80% do total de ácidos produzidos. Além disso o incremento de DSS promoveu a inibição da metanogênese.

O trabalho realizado por Jiang, Chen e Zhou (2007) analisaram o efeito de sulfonato de dodecilbenzeno de sódio (SDBS) na produção de AOs em reatores em batelada alimentados com aminoácidos e glicose com biomassa de um sistema de lodos ativados utilizado para o tratamento de efluente municipal. Os autores relataram o aumento do total de AOs produzido com o incremento de SDBS, entretanto foi necessário um longo tempo de fermentação para que o máximo de ácidos produzidos fosse alcançado em cada condição. Quando utilizado 0,02 g.g⁻¹ de SDBS foram necessários 6 dias para que fosse atingido o máximo de AOs (2.599,1 mg DQO L⁻¹), sendo que para 0,1 g.g⁻¹ de SDBS foram necessários 12 dias (3.285,2 mg DQO L⁻¹), para 0,2 g.g⁻¹ de SDBS foram necessários 15 dias (2.674,5 mg DQO L⁻¹), enquanto que sem a adição de SDBS em 6 dias foi atingida a produção máxima de AOs com concentração de 339,1 mg DQO L⁻¹. Os autores consideraram, portanto, que a utilização de 0,02 g.g⁻¹ de SDBS foi a condição ótima, sendo que no sexto dia foram identificados como produtos da fermentação os ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico e valérico, em ordem decrescente. Após seis dias a concentração total de AOs diminuiu, todavia a taxa de decaimento do ácido isovalérico foi menor do que do acético e butírico, tornando-o o ácido no meio após 12 dias de ensaio. Os autores ainda identificaram que com concentrações de SDBS acima de 0,15 g.g⁻¹ não houve consumo de ácidos devido a metanogênese.

Além dos surfactantes a adição de macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, e baixas concentrações de metais auxiliam no crescimento bacteriano e, conseqüentemente, na conversão de matéria orgânica (JARVIS *et al.*, 1997; KIM, M.; AHN; SPEECE, 2002; ZHANG, Y. *et al.*, 2003). Entretanto, a concentração e forma como esses elementos estão disponíveis no meio podem causar a inibição tanto específica de arqueas metanogênicas,

favorecendo a produção de AOs quanto não-específica, podendo afetar o crescimento de diversas espécies (LEE *et al.*, 2014). Etileno, acetileno e vários hidrocarbonetos alifáticos halogenados como clorofórmio, fluoroacetato e fluoreto de metila (LEE *et al.*, 2014) e compostos orgânicos como alquil benzenos (RENARD *et al.*, 1993; YANG, J.; SPEECE, 1986). benzenos halogenados (BOLL; ESTELMANN; HEIDER, 2020; VAN BEELEN; VAN VLAARDINGEN, 1994), fenóis (BORJA; ALBA; BANKS, 1997; FANG; CHEN; CHAN, 1995; SHIN; KWON, 1998; SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1991; SOTO; MÉNDEZ; LEMA, 1993; UBEROI; BHATTACHARYA, 1997b, a), cetonas, acrilatos, ácidos carboxílicos, aminas, nitrilas, amidas (BLUM; SPEECE, 1991; STERGAR; ZAGORC-KONČAN; ZGAJNAR-GOTVANJ, 2003) e melanoidinas (ARIMI *et al.*, 2014) são inibidores não-específicos, que podem afetar significativamente a acidogênese.

3.5 Melanoidinas

As melanoidinas são compostos poliméricos nitrogenados de coloração escura produzidos durante o final da reação de Maillard, a qual é responsável pela produção de uma variedade de polímeros com diferentes pesos moleculares e composições dependentes da razão e do tipo de reagentes, tempo de reação, pH, temperatura e solvente utilizado (MARTINS; VAN BOEKEL, 2003; WEDZICHA; KAPUTO, 1992). Sua fórmula empírica é sugerida como $C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$ com peso molecular entre 5000 e 40000 kDa. Consiste em um ácido composto por coloides poliméricos altamente dispersos e cromóforos com absorvância máxima em 420 nm. Devido à dissociação de ácidos carboxílicos e grupos fenólicos, são carregadas negativamente (MANISANKAR; RANI; VISWANATHAN, 2004). Estão presentes em efluentes com altas concentrações de carboidratos e aminoácidos, como resíduos da produção de café, destilarias e indústrias que utilizam o melão como fonte de carbono orgânico, como indústrias farmacêuticas e produtoras de fermento.

Além dos processos industriais que empregam elevadas temperaturas em efluentes com altas concentrações de açúcares redutores e proteínas, as melanoidinas podem ser formadas durante o pré-tratamento térmico (ZHANG, D. *et al.*, 2020). Este tem como objetivo a solubilização de componentes orgânicos e emprega comumente temperaturas na faixas de 160 a 190 °C, podendo atingir temperaturas acima de 250 °C. Apresenta como desvantagem a produção de substâncias com cor e compostos recalcitrantes, entre eles destaca-se a geração de nitrogênio orgânico dissolvido recalcitrante (NODR), sendo as melanoidinas um tipo primário de NODR (ZHANG, D. *et al.*, 2020). Entretanto, em

condições alcalinas, a formação de melanoidinas durante a hidrólise térmica pode ocorrer abaixo de 100 °C (SONG, X. *et al.*, 2019).

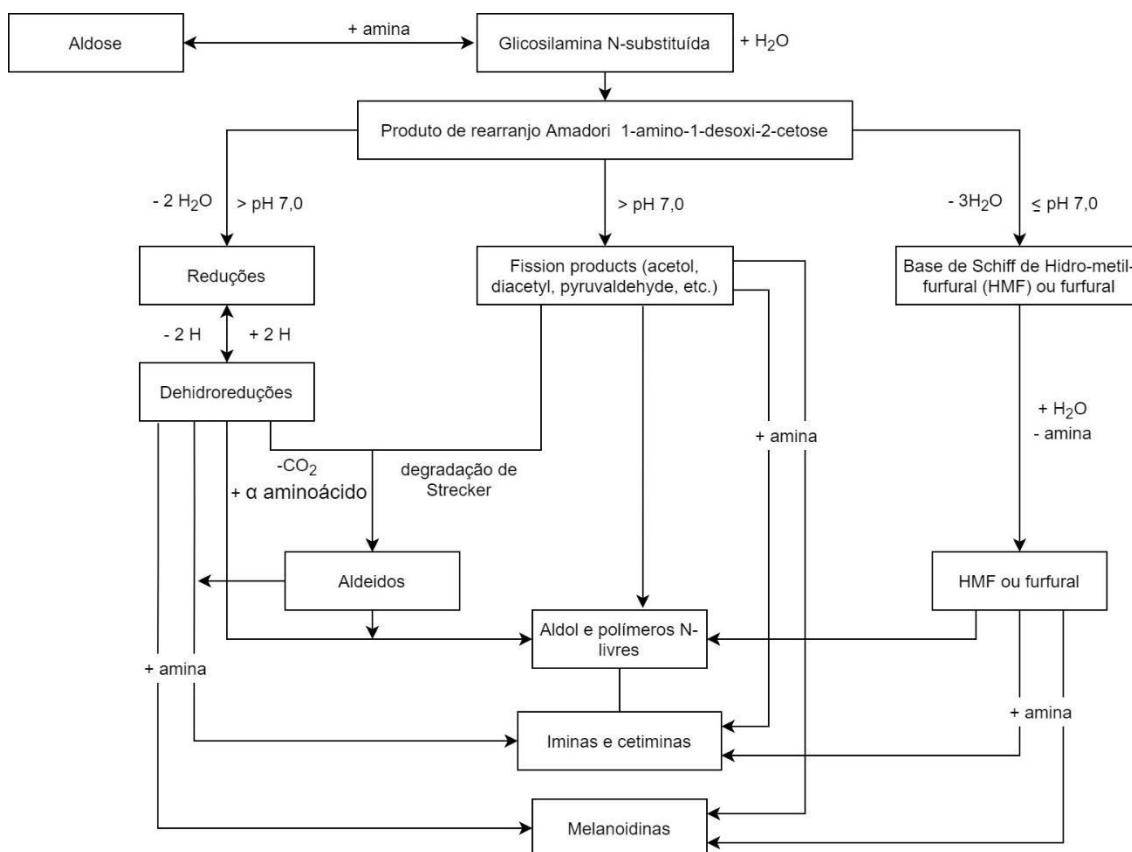
3.5.1 Formação e estrutura das melanoidinas

Segundo Coca *et al.* (2004) o mecanismo reacional da reação de Maillard pode ser dividido em três fases:

1) Na primeira fase ocorre uma reação de condensação entre um composto que possui um grupo de amina livre e a porção α -hidroxilcarbonila de um açúcar redutor, sob altas temperatura e baixo teor de água. Devido a sua instabilidade, alminoaldoses reagem rapidamente formando produtos de Amadori. Essa etapa, geralmente, é considerada a etapa limitante para a produção de melanoidinas (ZHANG, D. *et al.*, 2020).

2) Numa segunda fase, os produtos de Amadori são degradados a bases de Schiff e a uma variedade de produtos de fissão altamente reativos, ocorrendo novas reações de condensação, resultando na incorporação de nitrogênio na estrutura das melanoidinas. Compostos de dicarbonila reagem com aminoácidos formando aldeídos e aminocetonas, pela degradação de Strecker, caracterizada pela liberação de dióxido de carbono.

3) Em sua fase III final ocorrem diversas reações, incluindo ciclizações, desidratações, retroaldolizações, rearranjos, isomerizações e outras condensações, levando a formação de polímeros e copolímeros nitrogenados marrons, denominados melanoidinas. Com tempos de reação mais longos o escurecimento se intensifica devido ao aumento do teor de carbono total e, conseqüentemente, do grau de polimerização e seu peso molecular. Um esquema da reação de Maillard é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema da reação de Maillard

Fonte: Adaptado de Feng *et al.* (2022)

Embora a estrutura das melanoidinas seja uma propriedade que ainda não foi bem elucidada, existem diversas teorias para a estruturação química dessas moléculas. Cämmerer, Jalyschk e Kroh (2002) consideraram que o esqueleto principal que formam as melanoidinas em sistemas contendo apenas um monossacarídeo e um aminoácido é um polímero de produtos da degradação do açúcar, todavia essa estrutura principal não possui cor. Portanto, segundo os autores, melanoidinas devem possuir cadeias laterais com diversos cromóforos. A partir dessa teoria, os autores propuseram uma estrutura geral apresentada na Figura 3.

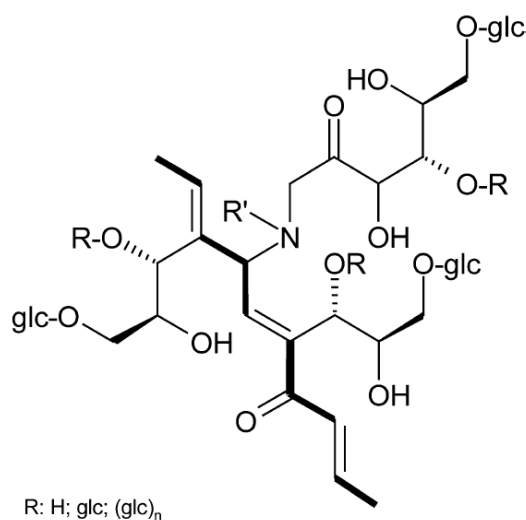
Outra teoria relacionada à estrutura das melanoidinas propõe a formação de vários pigmentos com atividades polimerizantes, os quais são intermediários na geração de melanoidinas. Hayase, Usui e Watanabe (2006) demonstraram que polímeros de cor azul e vermelho gerados a partir de um sistema de reação entre xilose e glicina tornaram-se marrom após sofrer polimerização.

Mais recentemente Kanzler e Haase (2020) relataram que uma combinação de reação aldólica e adição de Michael leva à formação de melanoidinas com base em

intermediários heterocíclicos da reação de Maillard. Ambas as reações aumentam sistemas de ligação dupla, responsáveis pela cor tipicamente marrom associada às melanoidinas.

Quanto a composição molecular, Yaylayan e Kaminsky (1998) isolaram e fizeram uma análise estrutural dos polímeros de Maillard e classificaram em três grupos A, B1 e B2 com pesos moleculares entre 10000 e 20000. O grupo A corresponde às melanoidinas, enquanto que os grupos B1 e B2 são classificados como caramelos, pois não incorporam nitrogênio em suas moléculas. Os autores realizaram uma análise elementar do polímero A que resultou em C(46%), H(6,43%), N(8,08%) e O(37,43%), a fórmula empírica para este polímero é $C_7H_{11}NO_4$.

Figura 3 - Estrutura básica da melanoidina formada a partir de carboidratos e aminoácidos



Fonte: Cämmerer, Jalyschkov e Kroh (2002)

As condições durante a reação de formação das melanoidinas afetam diretamente sua composição, sem, entretanto, alterar sua estrutura básica (CÄMMERER, B.; KROH, 1995). Foram identificadas variações baseadas em unidades estruturais identificadas como furanos e aminoácidos (BRUHNS *et al.*, 2019; KANZLER; HAASE, 2020), ácido glioxílico e glioxal (MOHSIN *et al.*, 2018), desoxihexosuloses intermediárias e aminoácidos (CÄMMERER, B.; KROH, 1995).

São quatro os fatores predominantes que afetam as reações de formação de melanoidinas: composição dos reagentes e suas concentrações, pH, temperatura e tempo de aquecimento e presença de íons metálicos (CÄMMERER, B.; KROH, 1995;

MARTINS; JONGEN; VAN BOEKEL, 2000; MARTINS; VAN BOEKEL, 2003; ZHANG, D. *et al.*, 2020).

3.5.1.1 Efeito dos reagentes

A taxa de escurecimento dos produtos da reação de Maillard é influenciada pelo tipo de açúcar redutor e aminoácido envolvidos. Melanoidinas de fontes diferentes apresentam escurecimento diferente (ZHANG, D. *et al.*, 2020). As melanoidinas obtidas a partir de diferentes reagentes apresentaram peso molecular aparente semelhante, entretanto diferentes razões carga/massa, indicando diferentes graus de insaturação (MORALES, 2002).

Aminoácidos de cadeia curta apresentam maior reatividade do que um único aminoácido em termos de desenvolvimento de cor e taxas de utilização de amina. Já em melanoidinas provenientes de biomassa real, cujas características e composições são mais complexas do que as preparadas em sistemas modelo, os compostos específicos de cada alimento podem desempenhar diferentes funções na formação de melanoidinas. A presença de grupos fenólicos no café e polifenóis na uva, por exemplo, contribuem de forma diferente na formulação de melanoidinas do café e nas melanoidinas do xarope de uva (MOREIRA *et al.*, 2012; ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2009).

3.5.1.2 Efeito do pH

O pH é um fator que possui influência na reatividade dos reagentes e nas rotas de degradação subsequente dos produtos de Amadori, o que pode ocasionar alterações na estrutura das melanoidinas ao final da reação de Maillard.

Em pH mais elevado, as formas mais reativas dos reagentes são favorecidas. Conforme o pH diminui os grupos aminos são protonados, perdendo sua reatividade com o açúcar redutor, de acordo com a reação (8) (MARTINS; JONGEN; VAN BOEKEL, 2000).



Já o açúcar redutor geralmente encontra-se sob a forma cíclica, devido a sua estabilidade, entretanto em meio alcalino seu anel é rompido, tornando-o mais reativo (CASTRO; ANDRADE, 2007). Essa alteração em sua configuração química possibilita a sua participação em reações de escurecimento não enzimáticas.

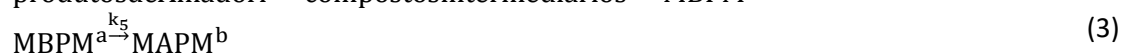
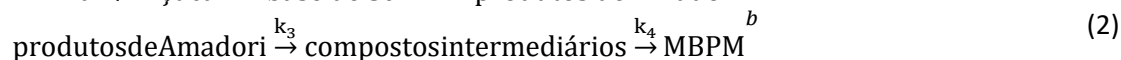
A rota preferida para a formação de melanoidinas também é afetada pelo pH. A conversão de produtos de Amadori e seus derivados de dicarbonila em fragmentos de

açúcares mais reativos e em uma variedade de produtos de fissão, incluindo acetol, piruvaldeído e diacetil, ocorrem de forma mais expressiva em valores de pH elevados. Em pH ácido, a degradação subsequente dos produtos de Amadori tendem à formação de bases de Schiff, furfural e hidroximetilfurfural (TRESSL *et al.*, 1994).

O pH ainda altera a solubilidade e cor das melanoidinas. Em reações cujo meio apresenta pH elevado são produzidas melanoidinas solúveis em água e de cor marrom intensa (BORRELLI *et al.*, 2002; IMASATO, 1979; MIGO *et al.*, 1993).

3.5.1.3 Efeito da temperatura e tempo de aquecimento

A temperatura possui um importante papel na determinação da taxa de reação, nas vias dominantes da reação e na polimerização dos compostos (GE; LEE, 1997; LEONG; WEDZICHA, 2000; ZHANG, D. *et al.*, 2020). A cinética da reação de Maillard pode ser dividida em três etapas, descritas nas reações (9), (10) e (11), as quais são favorecidas em temperaturas elevadas, geralmente acima de 70 °C (DAVIES; WEDZICHA; GILLARD, 1997; LEONG; WEDZICHA, 2000; ZHANG, D. *et al.*, 2020). A velocidade de formação da base de Schiff (k_1), representada na reação (9), geralmente é considerada a etapa limitante para a produção de melanoidinas.



a: Melanoidinas de baixo peso molecular; b: Melanoidinas de alto peso molecular

As constantes de velocidade de reação podem ser descritas utilizando a equação de Arrhenius (ZHANG, D. *et al.*, 2020). Portanto em temperaturas mais altas espera-se constantes cinéticas significativamente maiores. Entretanto, em temperaturas acima de 200 °C é possível a conversão de melanoidinas em biocarvão, bio-óleo, dióxido de carbono, amônia e outros produtos decompostos em solução aquosa (MINOWA *et al.*, 2004).

A temperatura influencia ainda as condições elementares das melanoidinas ao alterar suas propriedades aromáticas, afetando, conseqüentemente, seu peso molecular, sua biodegradabilidade, cor e composição das moléculas formadas (MORALES, 2002; ZHANG, D. *et al.*, 2020). Maiores temperaturas e tempos de aquecimento implicam em maior formação de melanoidinas de alto peso molecular (MAPM) com coloração mais escura (ECHAVARRÍA; PAGÁN; IBARZ, 2014). Esse fenômeno deve-se a maior

polimerização de melanoidinas de baixo peso molecular (MBPM), formando MAPM durante o estágio final da reação de Maillard, representado pela reação (11). As melanoidinas formadas nessas condições apresentam um caráter mais insaturado, com maior presença de carbono e menos átomos de hidrogênio e nitrogênio (BENZING-PURDIE; RIPMEESTER; RATCLIFFE, 1985).

A preparação de melanoidinas em temperaturas inferiores a 50 °C por períodos de tempo superiores a 30 dias resulta na produção de MBPM. Essas condições são comuns durante a fermentação e armazenamento de alimentos com elevado teor de umidade como cerveja, vinho e xarope de uva. Em contrapartida, em temperatura superior a 150 °C e por períodos inferiores a 2 h, a produção de MAPM é favorecida. Nessas condições são produzidos pão, café, malte torrado, cacau e biscoitos, por exemplo (CÄMMERER, BETTINA; JALYSCHKOV; KROH, 2002; WANG, H. Y.; QIAN; YAO, 2011).

3.5.1.4 Efeito dos íons metálicos

Íons metálicos como magnésio, cálcio, alumínio e ferro são comumente adicionados aos sistemas de tratamento de esgoto sanitário para promover o controle de pH, precipitação de fósforo e mitigação de odor (DANG *et al.*, 2014; NOVAK; PARK, 2010; ZHAO, J. *et al.*, 2018). As melanoidinas, assim como outros compostos formados durante a reação de Maillard, são capazes de quelar íons metálicos. Entretanto, o mecanismo de interação entre as melanoidinas e os íons metálicos, assim como seu efeito sobre o desenvolvimento de cor das melanoidinas, não é plenamente elucidado.

Vários mecanismos, incluindo quelação, catalisação e coagulação estão envolvidos na interação entre melanoidinas e íons metálicos (ZHANG, D. *et al.*, 2020). (Gomyo e Horikoshi (1976) relataram que melanoidinas possuem a capacidade de coagulação na presença de diversos íons metálicos, incluindo Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} e a adição de íons metálicos diminuiu o escurecimento das melanoidinas. Entretanto a quelação de ferro (II) por melanoidinas analisada por Morales. Fernández-Fraguas e Jiménez-Pérez (2005) não demonstrou relação com o seu escurecimento.

Por outro lado, Morita e Kashimura (1991) observaram que Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} são capazes de catalisar a reação de Maillard e promovem a formação de cromóforos por meio de vias oxidativas. No estudo desenvolvido por Kwak e Lim (2004) a presença de Fe^{2+} e Cu^{2+} acelerou o processo de escurecimento das melanoidinas, entretanto o tipo de aminoácido e tempo de aquecimento utilizado afetou a cor ao final das reações de formação das melanoidinas. Além de afetar o escurecimento das melanoidinas a quelação

de íons metálicos, como Mg^{2+} e Fe^{3+} , é associada às suas propriedades bactericidas (RUFÍAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008; WANG, H. Y.; QIAN; YAO, 2011).

3.5.2 Impacto das melanoidinas no meio ambiente

As melanoidinas têm sido associadas à poluição devido à sua capacidade de complexação com outros poluentes ambientais, como metais pesados, compostos mutanogênicos, carcinogênicos e compostos fenólicos (CHANDRA; BHARAGAVA; RAI, 2008; CHOWDHARY; RAJ; BHARAGAVA, 2018; TRIPATHI, S. *et al.*, 2021; TRIPATHI, SONAM *et al.*, 2021; WANG, H. Y.; QIAN; YAO, 2011). Em altas concentrações, as melanoidinas são capazes de causar efeitos adversos diretamente em ecossistemas aquáticos e no solo, em razão de sua natureza aniônica, odor e cor escura, além de apresentar elevada DQO e pH ácido (SINGH; TRIPATHI; CHANDRA, 2021)

No ambiente aquático as melanoidinas impedem a penetração de luz solar devido à sua coloração escura, afetando a atividade fotossintética, além de aumentar a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e DQO (CHOWDHARY; RAJ; BHARAGAVA, 2018; TRIPATHI, S. *et al.*, 2021). Nessas condições é criado um ambiente anaeróbio, no qual a flora e fauna são afetados. Além disso, as melanoidinas possuem a tendência em realizar reações de complexação quando em meio aquoso, o que pode levar ao desequilíbrio de ciclos geoquímicos (SINGH; TRIPATHI; CHANDRA, 2021). Dessa forma, é necessário o emprego de tecnologias capazes de promover a remoção de melanoidinas em efluentes, uma vez que são produzidas em elevadas quantidades e apresentam um elevado potencial de poluição ao meio ambiente.

3.5.3 Tratamento biológico de efluentes contendo melanoidinas

Apesar da acidogênese apresentar um boa alternativa para o pré-tratamento de efluentes agroindustriais e oferecer a possibilidade de recuperação de subprodutos, o tratamento de águas residuárias com compostos antimicrobianos representa uma limitação dessa tecnologia, uma vez que são necessárias altas taxas de diluição para o seu tratamento (ARIMI *et al.*, 2014) apresenta ineficácia na remoção de cor e poluentes recalcitrantes (KUMAR *et al.*, 2020), além de intensificar a cor do efluente, devido à repolimerização de compostos orgânicos coloridos (KAUSHIK, A. *et al.*, 2017; PANT; ADHOLEYA, 2007). Portanto, são necessários tratamentos posteriores para a remoção de melanoidinas e contaminantes remanescentes.

A descolorização e desintoxicação biológica de melanoidinas deve-se à capacidade de alguns microrganismos possuírem um sistema enzimático lignolítico extracelular produtor de manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase (KUMAR; SHAH, 2021). Essas enzimas são capazes de romper ligações dupla entre carbonos ($C = C$), entre carbono e oxigênio ($C = O$) e ligações triplas entre carbono e nitrogênio ($C \equiv N$), presentes nas melanoidinas. O emprego de fungos capazes de produzir enzimas lignolíticas e bactérias aeróbias tem sido relatado com sucesso na descolorização de melanoidinas. Diversos fungos como *Cladosporium cladosporioides* (RAVIKUMAR; VASANTHI; SARAVANAN, 2011), *Aspergillus oryzae* (CHAVAN *et al.*, 2013), *Neurospora intermedia* (KAUSHIK, G.; THAKUR, 2013), *Candida tropicalis* (TIWARI; GAUR; SINGH, 2012), *Candida glabrata* (MAHGOUB; TSIOPTSIAS; SAMARAS, 2016) e *Aspergillus species* (WAGH; NEMADE, 2018) apresentaram capacidade de degradação de melanoidinas em efluentes contendo cor após tratamento anaeróbio.

Bactérias isoladas como *Paracoccus pastotrophus* (SANTAL; SINGH; SAHARAN, 2016), *Pseudomonas sp.* (SANKARAN *et al.*, 2015) e *Pseudomonas aeruginosa* (DAVID *et al.*, 2015) também degradaram melanoidinas, além de consórcios formados por *Pediococcus acidilactici* e *Candida tropicalis* (TIWARI; GAUR; SINGH, 2014), *B. licheniformis*, *Bacillus sp.* e *Alcaligenes sp* (BHARAGAVA; CHANDRA, 2010). Chandra, Kumar e Tripathi (2018) obtiveram descolorização de 81% ao realizar o tratamento de melanoidinas extraídas de um efluente de destilaria após digestão anaeróbia. Os autores utilizaram um consórcio bacteriano aeróbio composto por *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*. Yadav e Chandra (2012) obtiveram 71% de descolorização de melanoidina extraída de um efluente de destilaria após biometanação. O consórcio bacteriano desenvolvido foi composto por *Proteus mirabilis*, *Bacillus sp.*, *Raoultella planticola* e *Enterobacter sakazakii*, o qual apresentou atividade de manganês peroxidase e lacase durante a descolorização. Cibis *et al.* (2002) realizaram a degradação oxidativa das melanoidinas de resíduos de destilação de batata utilizando uma população mista de bactérias acetogênicas, sob condições termofílicas.

O uso de bactérias para a degradação de melanoidinas se mostra mais promissor do que a utilização de fungos devido ao seu crescimento mais rápido. Entretanto, o uso de cepas isoladas apresenta como desvantagem maior suscetibilidade aos metabólicos

frequentemente mais tóxicos formados, além de inibições causadas pela atividade antimicrobiana das melanoidinas (KUMAR *et al.*, 2020).

3.5.4 Propriedade antimicrobiana

Ainda que não seja possível a identificação da estrutura exata das melanoidinas, suas atividades antibacterianas relacionam-se com o grau de saturação da molécula, seu peso molecular, razão C/N e com a presença de grupos funcionais com atividade bactericida (AMES *et al.*, 1999; EINARSSON; SNYGG; ERIKSSON, 1983; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008; RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2007).

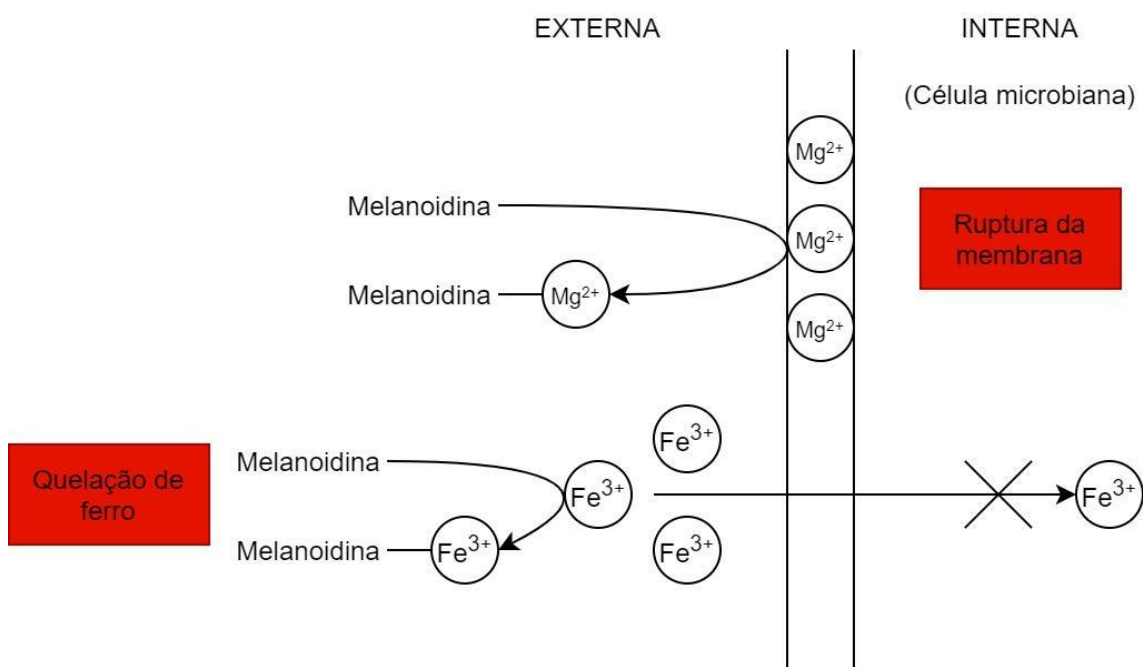
Além de ser a principal responsável por conferir cor à solução, MAPM também possuem efeito inibidor mais significativo, tanto em enzimas (DE MARCO; FISCHER; HENLE, 2011; EINARSSON; EKLUND; NES, 1988; HIRANO; MIURA; GOMYO, 1994; IBARZ; GARZA; PAGÁN, 2008) quanto em microrganismos (EINARSSON; SNYGG; ERIKSSON, 1983; RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008; RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2007). A forma de preparo de melanoidinas ou ainda a fonte de sua extração também pode conferir à solução maior potencial antibacteriano, visto que, em temperaturas mais altas e com maior tempo de aquecimento, há maior geração de compostos potencialmente bactericidas, como aminas heterocíclicas e furanos (CÄMMERER, B.; KROH, 1995; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008).

O efeito bactericida provocado pelas melanoidinas podem ser associados a três diferentes mecanismos: 1) interferência à utilização de substrato devido a inibição de enzimas transportadoras ou ao seu potencial antioxidante (BORRELLI *et al.*, 2002; EINARSSON; EKLUND; NES, 1988; HIRANO; MIURA; GOMYO, 1994; IBARZ; GARZA; PAGÁN, 2008); 2) limitação de íons metálicos devido à ligação (AMES *et al.*, 1999; EINARSSON; EKLUND; NES, 1988; RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009) e 3) devido aos danos causados à membrana celular (RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008).

A Figura 4 ilustra como as melanoidinas podem danificar a membrana celular e impedir a absorção de ferro. Em altas concentrações as melanoidinas podem se ligar à membrana externa por ligações eletrostáticas, devido a sua superfície carregada negativamente, e quelar Mg^{2+} , que possui uma função estrutural de estabilização da membrana celular externa (RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009; RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008). Em concentrações mais baixas, as melanoidinas formam

um complexo com Fe^{3+} diminuindo a concentração de ferro livre disponível (RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009). Dessa forma em pequenas concentrações as melanoidinas podem proporcionar uma ação bacteriostática (RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2008), isto é, inibir o crescimento da biomassa sem entretanto promover sua morte celular.

Figura 4 - Mecanismo proposto para a atividade antimicrobiana da melanoidina



Fonte: Adaptado de Rufián-Henares e De La Cueva (2009)

Além do ferro e magnésio as melanoidinas são capazes de promover a quelação de outros íons como o zinco e cobre (DE MARCO; FISCHER; HENLE, 2011; GOMYO; HORIKOSHI, 1976; RUFÍÁN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009), tornando esses metais indisponíveis, podendo ainda causar a inativação de enzimas que realizam catálise por íons metálicos. A Tabela 1 sumariza as concentrações mínimas de inibição (CMI), nas quais não há crescimento bacteriano, com melanoidinas obtidas a partir de diversas fontes e com peso molecular variado.

Tabela 1 - Atividade microbiana de melanoidinas

Tipo de melanoidina	Microrganismo	CMI ^a (mg L ⁻¹)	Referência
Glicose-glicina		400	(RUFÍAN-HENARES; MORALES, 2007)
Glicose-histidina	<i>Geobacillus</i>	200	
Glicose-alanina	<i>stearothermophilus</i>	200	
Glicose-lisina		100	
Melanoidina do café – MBPM ^b	<i>Erischeria coli</i>	45000	(RUFIAN-HENARES; MORALES, 2008)
Melanoidina do café – MAPM ^c		10000	
Melanoidina do biscoito – MBPM		50000	
Melanoidina do biscoito – MAPM		7500	
Melanoidina do café – MAPM	<i>Bacillus cereus</i>	2500	(RUFÍAN-HENARES; DE LA CUEVA, 2009)
	<i>Staphilococcus aureus</i>	2000	
	<i>Proteus mirabilis</i>	4500	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4000	
	<i>Salmonella tiphimurium</i>	4500	
Arginina-xilose (<1000 Da)	<i>Bacillus subtilis</i>	2000	(EINARSSON; SNYGG; ERIKSSON, 1983)
Arginina-xilose (>1000 Da)		10	
Histidina-glicose (< 1000 Da)		> 8000	
Histidina-glicose (< 1000 Da)		2000	
Glicose-aparagina	Carboxipeptidase A	420	(IBARZ; GARZA; PAGÁN, 2008)
	Carboxipeptidase B	770	

^a CMI = Concentração mínima de inibição. ^b MBPM = Melanoidina de baixo peso molecular (abaixo de 3 kDa).

^c MAPM=Melanoidina de alto peso molecular (acima de 10 kDa).

No estudo conduzido por Diaz-Morales *et al.* (2022), foi investigado o efeito que melanoidinas extraídas de biscoito, pão comum e pão macio em diversos microrganismos. Os autores identificaram que as três melanoidinas apresentaram efeito inibitório significativo quando sua concentração foi de 4%. Especificamente, as melanoidinas provenientes do pão comum apresentaram efeito bactericida contra *Clostridium perfringens* e redução significativa da contagem inicial de *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* *Pseudomonas putida*, além de um efeito bacteriostático contra *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus brevis* quando em uma concentração de 4%.

Portanto, investigar o impacto das melanoidinas nos processos biológico de tratamento de efluentes pode elucidar mecanismos microbiológicos de conversão de

matéria orgânica, bem como a compreensão aprimorada das rotas metabólicas adotadas durante os processos fermentativos em presença de compostos recalcitrantes e potencialmente inibidores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inóculo

O inóculo utilizado constituiu em lodo proveniente de reator anaeróbio utilizado para tratamento de um abatedouro de aves. O lodo foi submetido a pré-tratamento ácido de acordo com Chang, Li e Liu (2011), no qual o pH do lodo foi ajustado para 3,0 utilizando HCl com concentração molar de 1 mol L^{-1} e mantido por 24 h, e então ajustado para pH 6,8 com a adição de NaOH com concentração molar de 1 mol L^{-1} , como forma de inibir a atividade de metanogênese. Com o objetivo de evitar perdas de biomassa durante as trocas de meio sintético em cada uma das fases, conforme descrito na seção 4.4, os microrganismos remanescentes no lodo tratado foram imobilizados em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano, de 1,0 cm de aresta. As matrizes de espuma foram imersas em uma grande quantidade de lodo tratado, pelo período de 2 horas em refrigerador mantido em aproximadamente 4°C , como recomendado por Zaiat, Cabral e Foresti (1994). As matrizes foram então transferidas para uma peneira, com o objetivo de retirar o excesso de lodo. As matrizes de espuma contendo biomassa foram finalmente transferidas aos reatores com o auxílio de uma pinça.

Figura 5 - Biomassa imobilizada em espuma cúbica de poliuretano com 1,0 cm de aresta.



4.2 Água residuária sintética

Para a realização dos ensaios foi utilizado um meio complexo para fermentação de acordo com Del Nery (1987) modificado por Fernandes *et al.* (2013), cuja composição está descrita na Tabela 2 e ao qual foi adicionado, em cada ensaio, concentrações entre 3 e 10 g L⁻¹ de glicose como principal fonte de carbono e as concentrações de melanoidinas variaram entre 2 e 6 g L⁻¹ conforme Tabela 3.

Tabela 2 - Composição do meio de fermentação

Reagente	Concentração (mg L ⁻¹)
Dióxido de selênio (SeO ₂)	0,036
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ 6H ₂ O)	2,06
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	5,36
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,30
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O)	2,70
Sulfato de níquel (NiSO ₄ 6H ₂ O)	0,50
Sulfato ferroso (FeSO ₄ 7H ₂ O)	2,50
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ 6H ₂ O)	0,04
Cloreto férrico (FeCl ₃ 6H ₂ O)	0,25
Ureia	21,4 a 71,4

Fonte: Del Nery (1987) modificado por Fernandes *et al.* (2013)

4.3 Preparação da solução de melanoidinas

A solução de melanoidinas sintéticas foi preparada com base no sistema modelo glicina/glicose, conforme metodologia proposta por Rafigh e Rahimpour Soleymani (2020) que consiste em adicionar 4,55 g de glicose (0,025 mol L⁻¹), 1,88 g de glicina (0,025 mol L⁻¹) e 0,42 g de bicarbonato de sódio (0,005 mol L⁻¹) em 100 mL de água destilada e aquecê-la a 80 °C por 7 h. A solução foi então resfriada em temperatura ambiente e adicionado 100 mL de água destilada, obtendo-se uma solução com concentração de melanoidinas de 28,5 g L⁻¹.

4.4 Ensaios em reator em batelada alimentada

Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos Schott Duran 1000 mL sob agitação a 150 rpm e com controle de temperatura a 37 °C, na presença de diferentes

concentrações de melanoidinas e glicose definidas a partir de planejamento fatorial completo com dois fatores em dois níveis e um ponto central, em duplicata, totalizando 10 experimentos (Tabela 3). Além disso, foi operado o reator controle (RC) no qual não houve adição de melanoidinas. O pH foi ajustado a 6,5 com o uso de NaOH com concentração molar de 1 mol L^{-1} . Em cada frasco foi adicionada biomassa imobilizada em espumas de poliuretano conforme descrito no item 4.1 e meio sintético descrito no item 4.2 com volume final de 300 mL. Para que os microrganismos fossem mantidos em meio anaeróbio, foi injetado nitrogênio gasoso na solução durante 5 minutos e posteriormente os frascos foram fechados hermeticamente com tampas de butila. Os reatores foram realimentados quando constatado que o consumo de glicose era maior do que 95% da sua concentração inicial de glicose. Assim, os reatores foram alimentados em três fases identificadas como I, II e III. O experimento foi conduzido em três fases distintas, permitindo um tempo adequado para a modificação da comunidade microbiana e a identificação de possíveis alterações decorrentes da presença de melanoidinas. A cada troca de água residuária sintética, amostras eram coletadas para determinação das variáveis DQO, pH, AOs, e solventes.

Tabela 3 - Concentrações de melanoidinas, ureia, glicose e inóculo adicionadas em cada reator

Reator	Melanoidinas (g L^{-1})	Glicose (g L^{-1})	Inóculo (g ST L^{-1})	Inóculo (g SV L^{-1})
R1	2,00	3,00	4,00	3,40
R2	6,00	3,00	10,00	8,50
R3	2,00	10,00	7,00	5,95
R4	6,00	10,00	12,50	10,63
R5 (C)*	4,00	6,50	9,00	7,65
R6	2,00	3,00	4,00	3,40
R7	6,00	3,00	10,00	8,50
R8	2,00	10,00	7,00	5,95
R9	6,00	10,00	12,50	10,63
R10 (C)*	4,00	6,50	9,00	7,65
RC	0,00	3,00	1,50	1,28

* (C): ponto central do planejamento fatorial completo

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Metabólitos solúveis

Metabólitos solúveis (ácidos orgânicos e solventes) foram analisados por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu[®]), conforme metodologia desenvolvida por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014). Os compostos foram separados na coluna HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplada a um detector por ionização de chama (FID), hidrogênio como gás de arraste, ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares e injeção automática (COMBI-PAL sampler AOC5000, Shimadzu[®]).

4.5.2 Glicose

Foram realizadas análises periódicas para determinar a concentração de glicose de acordo com Dubois *et al.* (1956) até que o consumo atingisse 95% do valor inicial em cada reator ou até que atingissem um período máximo de ensaio estipulado em 60 dias.

4.5.3 Sequenciamento e bioinformática

As extrações do DNA genômico das amostras de biomassas dos reatores RC, R4 e R8 foram realizadas usando o Kit FastDNA[™] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de biomassa provenientes dos reatores R4 e R8 foram selecionadas devido à quantidade de AOs produzidos, enquanto o reator RC foi utilizado como grupo de comparação, uma vez que não recebeu a adição de melanoidinas ao meio reacional. A qualidade do DNA extraído foi verificada em eletroforese gel de agarose 0,8% e a quantificação (ng µL⁻¹) foi realizada no Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). As amostras foram sequenciadas usando o set primer 341F-785R para amplificação do gene 16S rRNA pela empresa NGS Soluções Genômicas em Piracicaba – SP. O equipamento utilizado foi o sistema Illumina Miseq. Os dados gerados no sequenciamento foram analisados no programa DADA2 (GENTLEMAN *et al.*, 2004). O pacote DADA2 tem um pipeline completo implementado para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas, e sem quimeras. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências dos primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento da qualidade (ng µL⁻¹). Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês

Amplicon Sequencing Variants). O banco de dados SILVA foi utilizado como referência (GLÖCKNER *et al.*, 2017).

4.5.4 Outras

As análises de pH, DQO e sólidos suspensos voláteis foram determinados de acordo com os protocolos descritos em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das concentrações de glicose nos ensaios em batelada alimentada

Nas Figuras 6 e 7 são apresentadas as concentrações de glicose medidas ao longo dos experimentos em batelada nas condições a) R1, b) R2, c) R3, d) R4, e) R5 e f) R6 (Figura 6) e nas condições g) R7, h) R8, i) R9 e j) R10 (Figura 7). As amostras R4 e R9 não atingiram 95% de remoção de glicose após a segunda alimentação, a qual ocorreu no sétimo e terceiro dia de experimento, respectivamente. Dessa forma foi realizada apenas uma alimentação após o início do experimento em um prazo de 60 dias. Os reatores R6 e R7 não atingiram 95% de remoção após a segunda alimentação, realizadas após 12 e 10 dias de experimento, respectivamente, e foram finalizados após 60 dias. A DQO de todas as condições se manteve significativamente superior à concentração de glicose medida, denotando a presença de melanoidina, uma vez que são as únicas fontes de matéria orgânica empregadas nos experimentos. Wang *et al.* (2022) empregaram melanoidinas feitas a partir de glicose e tiptofano e colocadas em banho maria por 80 °C por 7 e 14 dias para analisar seus efeitos sobre a digestão anaeróbia. Foi relatado que as melanoidinas não foram degradadas e que ocasionou o aumento da DQO no efluente. Chen *et al.* (2017) reportaram a presença de cerca de 30% de DQO desconhecida após pré tratamento térmico, o que pode indicar a presença de melanoidinas.

Figura 6 - Variação temporal da concentração de glicose durante o período de experimento nas condições: a) R1, b) R2, c) R3, d) R4, e) R5 e f) R7 - (■) glicose; (-) alimentação de novo meio; (---) 5% do valor de glicose inicial em cada alimentação.

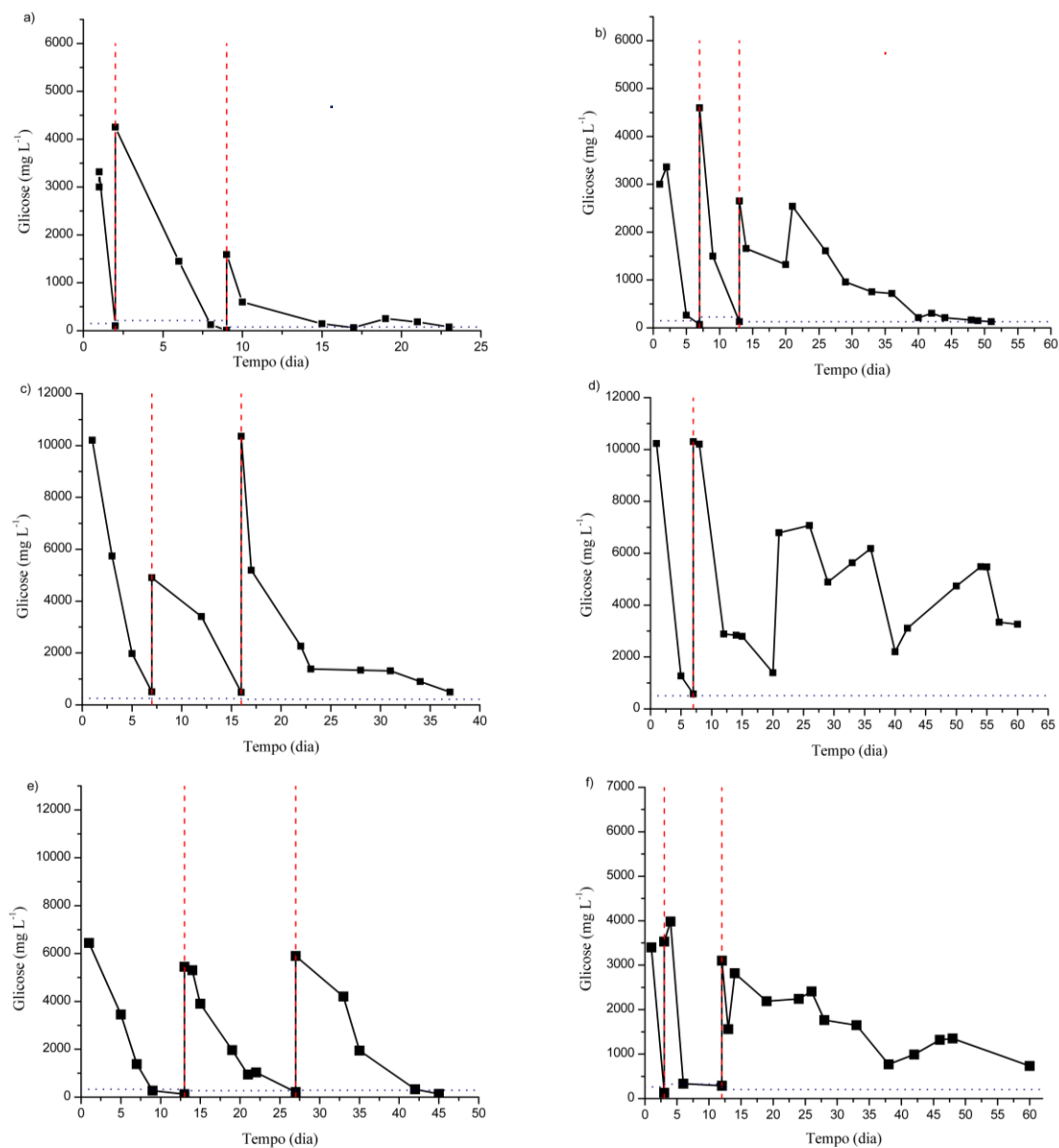
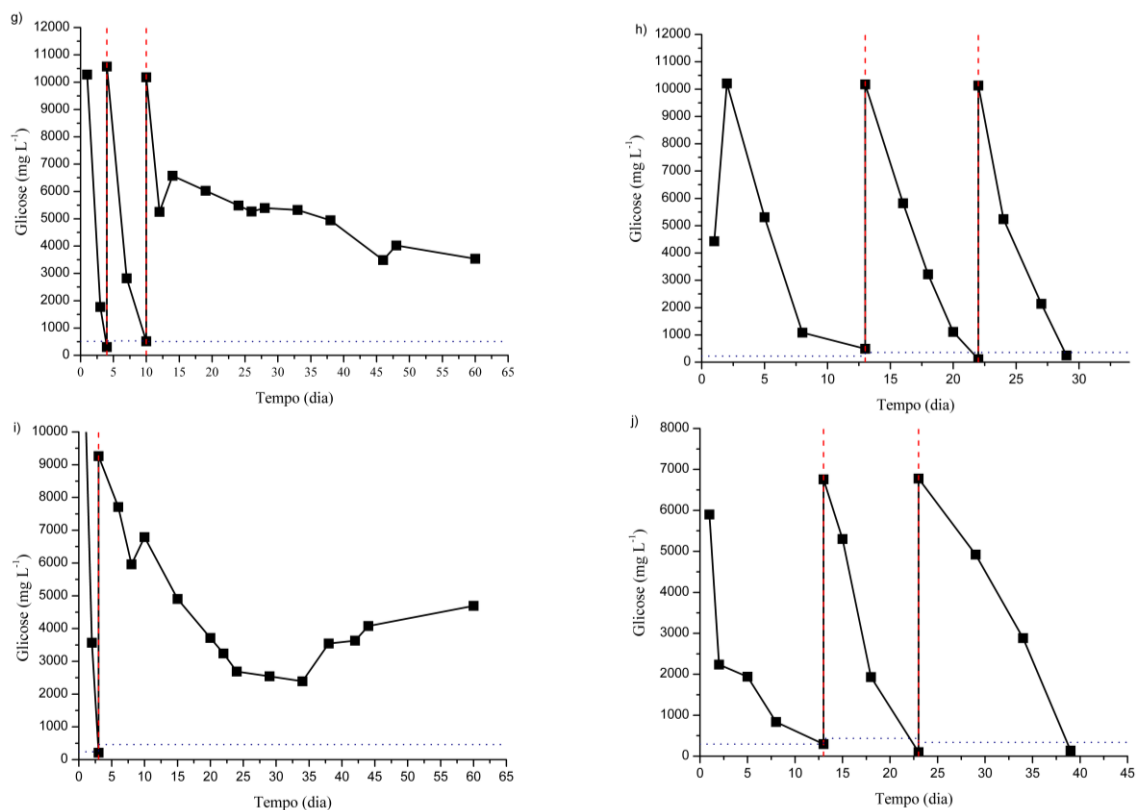


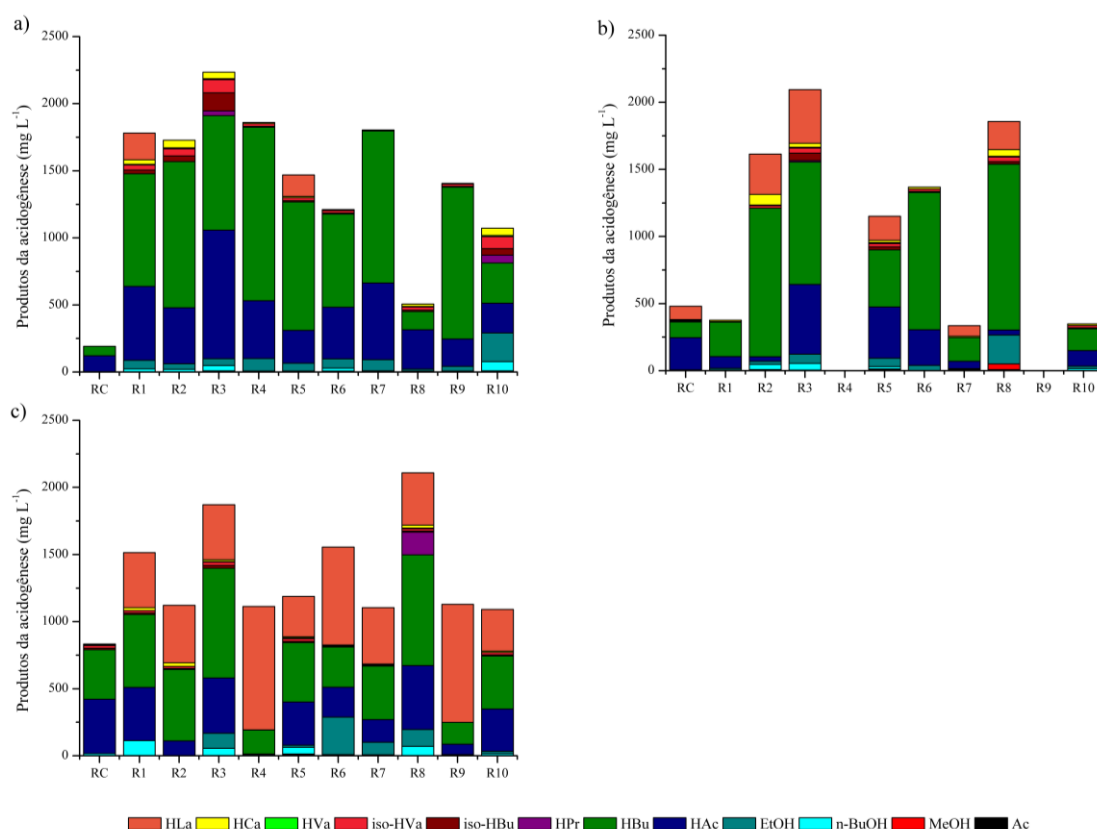
Figura 7 - Variação temporal da concentração de glicose durante o período de experimento nas condições: g) R7, h) R8, i) R9 e j) R10 - (■) glicose; (---) alimentação de novo meio; (-.-) 5% do valor de glicose inicial em cada alimentação.



5.2 Análise de AOs e solventes nos ensaios em batelada

Na Figura 8 são apresentadas as concentrações de ácidos e solventes produzidos em RC e de R1 a R10 nas fases a) I, b) II e c) F. RC foi caracterizado pela produção reduzida de AOs e solventes em comparação com os outros reatores. Uma possível explicação para essa diferença de produção é a disponibilidade de glicose no meio. Enquanto os ensaios de R1 a R10 receberam uma carga inicial de glicose de 3 a 10 g L⁻¹ e de melanoidina de 2 a 6 g L⁻¹, RC teve apenas 3 g L⁻¹ de glicose disponível.

Figura 8 - Concentração de AOs e solventes, na qual a) Fase I, b) Fase II e, c) Fase III. HCa: ácido caprónico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.



A adição de melanoidinas nos ensaios de fermentação anaeróbia levou a uma maior produção de AOs em comparação com RC. Isso pode ser explicado em parte pela similaridade entre as melanoidinas e os ácidos húmicos. Segundo Arfaioli *et al.* (1997), tanto as melanoidinas quanto os ácidos húmicos são compostos orgânicos complexos que podem atuar como aceptores de elétrons durante a fermentação. Eles podem aceitar elétrons dos microrganismos produtores de AOs, o que ajuda a manter o equilíbrio redox da reação de fermentação. Isso, por sua vez, pode permitir que a fermentação ocorra de maneira mais eficiente.

Além disso, tanto as melanoidinas quanto os ácidos húmicos são conhecidos por serem compostos que contêm uma grande quantidade de grupos funcionais que podem

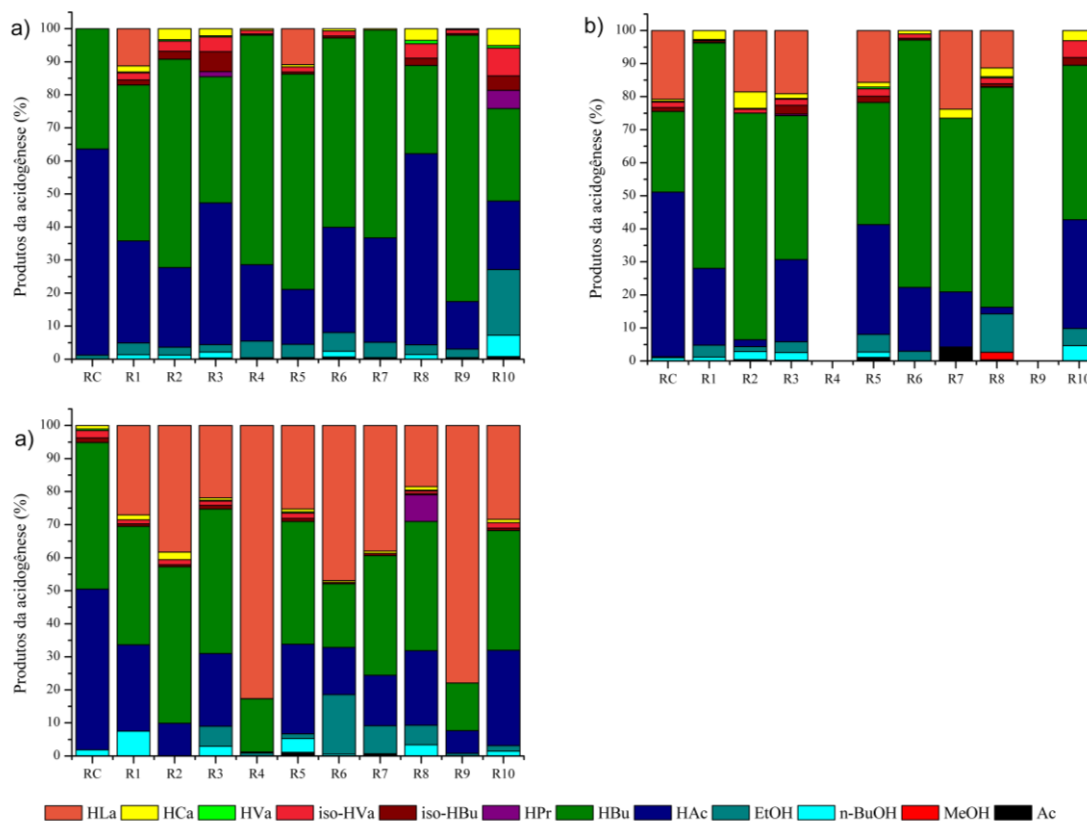
interagir com os microrganismos presentes no reator (YANG, N. *et al.*, 2023) Essas interações podem afetar a atividade metabólica dos microrganismos e aumentar a produção de AOs.

No entanto, é importante observar que a eficácia das melanoidinas como aceptores de elétrons pode variar dependendo da composição específica e da concentração desses compostos no meio, bem como das condições de fermentação, como a concentração de nutrientes, pH, temperatura e tempo de detenção hidráulica.

É possível observar que os ensaios em que a concentração de melanoidinas foi de 6 g L^{-1} (R2, R4, R7 e R9) apresentaram as menores produções de AOs e solventes ao final do experimento, seguidos pelos ensaios R5 e R10, em que foram adicionadas 4 g L^{-1} de melanoidina em cada reator. Wang *et al.* (2022) relataram que as melanoidinas produzidas a partir de glicose e triptofano impactaram negativamente a produção de AOs, além de um atraso na produção de ácidos, uma vez que a produção de acetato foi detectada apenas após 18 dias de ensaio, com concentrações de 340 e 280 mg L^{-1} nas amostras.

Na Figura 9, que apresenta a proporção de ácidos e solventes produzidos em cada reator, é possível observar que nas amostras em que foram adicionadas melanoidinas houve uma significativa alteração entre os compostos produzidos na primeira fase, na qual ocorreu o predomínio de HBU, exceto nas amostras R3 e R8, nos quais o HAc predominou, com concentrações de $957,82$ e $292,88 \text{ mg L}^{-1}$, o que representa $42,8$ e $57,8\%$ do total dos metabólitos produzidos em cada reator, respectivamente, para a fase III, que apresentou uma maior produção de HLa, sendo responsável pela maior quantidade de metabólitos gerados nos reatores R4 e R9, representando $82,7\%$ e $77,9\%$, respectivamente. É importante ressaltar que R8 foi o único produtor de ácido propiônico na última fase de ensaio, com concentração de $169,49 \text{ mg L}^{-1}$ ($8,0\%$), além de apresentar um aumento na produção de AOs e solventes da fase I para a fase III, o que não foi verificado nos demais ensaios em que foi adicionado melanoidinas.

Figura 9 - Concentração de AOs e solventes em porcentagem em cada reator, na qual a) Fase I, b) Fase II e, c) Fase III. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido lático; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

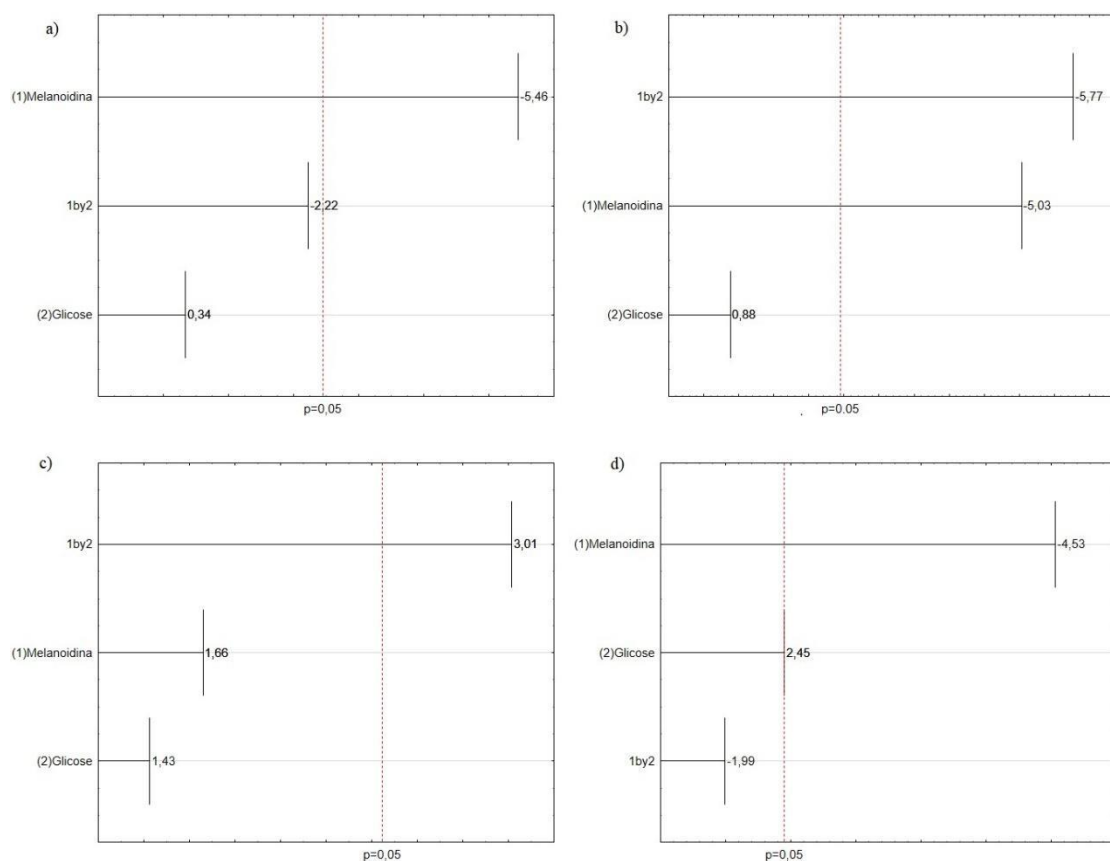


A análise do Diagrama de Pareto (Figura 10) revelou que a presença de melanoidinas teve um efeito negativo significativo na produção de HAc, HBu e ácidos totais. A maior contribuição negativa foi atribuída à melanoidinas (-5,46) na produção de HAc, seguida da interação entre melanoidinas e glicose (1by2) com uma contribuição negativa menor, mas ainda relevante (-2,22). Em contrapartida, a glicose apresentou uma contribuição positiva (0,34) na produção de HAc. Embora as melanoidinas possam agir como uma fonte adicional de carbono, sua presença afetou negativamente a produção desses compostos. Esse efeito também foi observado na produção de HBu e ácidos totais, sendo que a concentração de melanoidinas apresentou contribuições negativas significativas de -5,03 e -4,53, respectivamente. Além disso, a interação entre melanoidinas e glicose mostrou uma contribuição negativa significativa (-5,77) ainda maior na produção de HBu do que apenas a concentração de melanoidinas.

Em contrapartida, tanto as melanoidinas quanto a sua interação com a glicose tiveram efeitos benéficos na produção de HLa, com valores positivos de 3,01 e 1,66, respectivamente. É possível que esse efeito positivo tenha compensado a contribuição negativa das melanoidinas na produção de ácidos totais.

Foi observado que, além dos ácidos acético, butírico e lático, os compostos n-BuOH e iso-HBu também apresentaram significância em relação à variável melanoidinas, com efeitos negativos de -2,72 e -2,77, respectivamente. No entanto, os demais produtos da acidogênese não apresentaram significância em relação às variáveis selecionadas (glicose e melanoidinas). Os dados estão apresentados no Apêndice.

Figura 10 - Diagrama de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95% para as respostas a) HAc, b) HBU, c) HLa e d) Ácidos totais



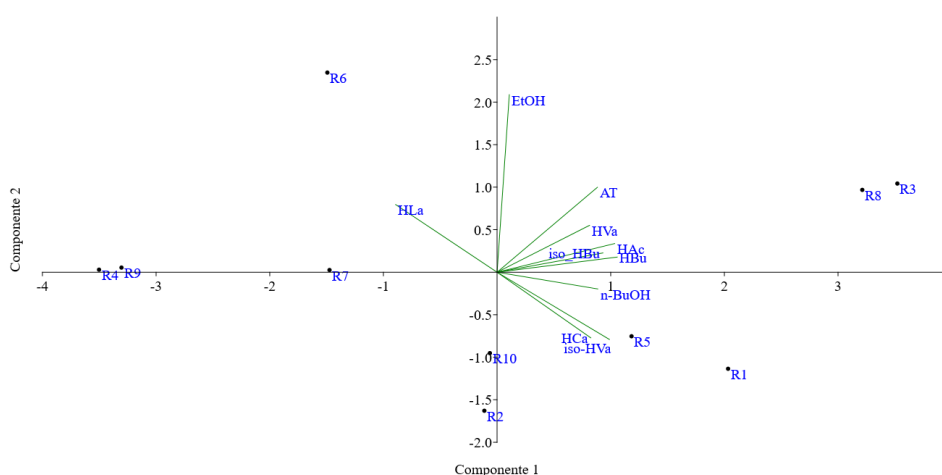
A Tabela 4 indica que as componentes principais 1 e 2 explicam 76,47% da variância das concentrações de metabólitos medidas ao final da fermentação na fase III.

Tabela 4 - Matriz de Variância e Covariância das concentrações dos metabólitos medidos na fase III

PC	autovalor	% variância
1	620,71	62,07
2	143,95	14,40
3	0,72	71,81
4	0,67	66,78
5	0,44	43,70
6	0,31	31,37
7	0,12	11,66
8	0,10	0,98
9	0,00	0,02

Na Figura 11 verifica-se que há correlação positiva entre os metabólitos: ácido isobutírico, ácido butírico, ácido acético e ácido valérico e esses metabólicos estão correlacionados com a concentração de ácidos voláteis totais (AT). No quadrante oposto observa-se também correlação positiva entre os metabólitos n-butanol, ácido caprónico e ácido isovalérico. Os ensaios em R5 e R10 apresentam a melhor correlação com os metabólitos, pois, na Figura 11 o ponto que o representa está localizado mais próximo dos metabólitos do que R1, R3 e R8.

Figura 11 – Análise de Componente Principal (PCA) dos metabólitos produzidos na fase III. A componente 1 (eixo x; 62,07%) e a componente 2 (eixo y; 14,40%) totalizam 74,47% da variância das análises. HCa: ácido caprónico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; EtOH: et etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.



Os reatores R5 e R10, que são os pontos centrais no planejamento fatorial, foram operados nas mesmas condições de alimentação de glicose ($6,5 \text{ g.L}^{-1}$) e melanoidinas (4 g.L^{-1}), ou seja, com relação glicose/melanoidinas de 1,62. A variável ácido láctico foi a única que apresenta correlação negativa e foi favorecida pelas condições em R6 e R7. Esses reatores foram alimentados com concentrações iniciais de glicose iguais, de 3 g.L^{-1} e concentração inicial de melanoidinas de 2 g.L^{-1} e 6 g.L^{-1} , respectivamente. Esse resultado sugere que em presença de melanoidinas as menores relações iniciais glicose/melanoidinas são desfavoráveis à produção de ácidos voláteis e solventes. Os valores iniciais de glicose/melanoidinas aos reatores R6 e R7 foram 1,5 e 0,5. Por outro lado, a maior concentração inicial de glicose (10 g L^{-1}) também foi desfavorável à produção de metabólitos, afetando a conversão global da glicose. Por exemplo, em R4 e R9, cuja relação glicose/melanoidina = 1,67, a concentração inicial de melanoidinas foi igual à do reator R7 (6 g L^{-1}), porém, a concentração de glicose foi 3,3 vezes maior. No reator R2, outras variáveis podem ter influenciado negativamente a produção de ácidos voláteis.

5.3 Análise da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade microbiana envolvida na acidogênese de esgoto sintético com a presença de melanoidinas foi verificada por meio do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA via plataforma *Illumina* HiSeq. A biomassa das amostras R4 e R8 foram selecionadas para sequenciamento pois os reatores apresentaram, respectivamente, menor e maior produção de ácidos e solventes. RC foi selecionado à fim de comparação, uma vez que não foi adicionado melanoidina. Foram calculados os índices de diversidade ecológica para cada amostra (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices ecológicos das sequências obtidas a partir do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA para o RC, R4 e R8.

	RC	R4	R8
Diversidade de Shannon-Wiener	1,62	1,31	1,28
Dominância de Simpson	0,31	0,44	0,45
Índice de riqueza (Chao-1)	35	28	21

A partir da estimativa dos índices ecológicos foi possível observar diminuição da diversidade bacteriana nos ensaios em que foi adicionado melanoidinas, de 1,62 para a amostra de RC para 1,31 e 1,28 nas amostras de R4 e R8, respectivamente.

O domínio Bacteria representa 99,97, 99,97 e 100% dos microrganismos nas amostras RC, R4 e R8, respectivamente, indicando que o pré tratamento ácido foi eficaz na remoção de Archaea e, conseqüentemente, inibiu o consumo de AOs por metanogênese. A composição da comunidade bacteriana para a ordem, família e gêneros mais abundantes ($\geq 0,1\%$) pode ser observada na Figura 12.

Figura 12 - Mapa de calor da abundância relativa (%) das diferentes ordens, famílias e gêneros detectadas nas amostras do reator controle, reator 4 e reator 8, com base no sequenciamento de amplicon do gene 16S rRNA. Abundância relativa $\geq 0,1\%$ é mostrada em pelo menos uma amostra. Tons de vermelho e verde indicam maior e menor abundância, respectivamente.

Ordem	Família	Gênero	Amostra		
			RC	R4	R8
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_11</i>	49,0	4,7	64,7
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_12</i>	20,6	1,3	1,4
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	15,3	11,8	15,1
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	2,7	0,1	0,0
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	2,4	0,0	0,0
Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	2,1	0,0	0,0
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	2,0	63,8	6,7
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_10</i>	1,6	0,0	0,2
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_5</i>	0,9	0,0	0,0
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_13</i>	0,7	1,1	4,6
Oscillospirales	Ruminococcaceae	<i>Caproiciproducens</i>	0,5	0,0	0,0
Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium_sensu_stricto_8</i>	0,4	0,0	1,4
Clostridiales	Oxobacteraceae	<i>Oxobacter</i>	0,4	0,0	0,0
Veillonellales-Selenomonadales	Sporomusaceae	<i>Propionispora</i>	0,4	0,0	0,0
Bacillales	Sporolactobacillaceae	<i>Sporolactobacillus</i>	0,2	0,3	0,1
Oscillospirales	Ethanoligenenaceae	<i>Incertae_Sedis</i>	0,2	0,0	0,0
Bacillales	Planococcaceae	<i>Rummeliibacillus</i>	0,1	0,5	0,1
Desulfotobacteriales	Desulfotobacteriaceae	<i>Desulfosporosinus</i>	0,1	0,4	0,0
Oscillospirales	Ethanoligenenaceae	<i>Ethanoligenens</i>	0,1	0,0	0,0
Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	0,1	0,3	0,9
Bacillales	Planococcaceae	<i>Sporosarcina</i>	0,0	0,1	0,0
Bacillales	Planococcaceae	<i>Psychrobacillus</i>	0,0	0,1	0,0
Bacillales	Planococcaceae	<i>Lysinibacillus</i>	0,0	0,0	0,1
Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,0	0,3	0,0
Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	0,0	1,3	1,3
Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcaceae	<i>Sporacetigenium</i>	0,0	0,1	0,0
Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcales-Tissierellales_fa	<i>Tissierella</i>	0,0	0,1	0,0
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0,0	12,8	2,9
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0,0	0,1	0,0
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	0,0	0,8	0,2
Outros			0,2	0,2	0,3

Verificou-se que os filos mais abundantes nos reatores controle, 4 e 8, foram Firmicutes (92,6, 84,6 e 95,6% respectivamente) e Proteobacteria (7,3, 15,3 e 4,4%, respectivamente). Microrganismos do filo Firmicutes são amplamente reconhecidos por suas relações sintróficas em reatores anaeróbios, assim como com a produção e degradação de diversos AOs (DE VOS *et al.*, 2009). A dominância do filo Firmicutes nas comunidades bacterianas era uma condição esperada, visto que este filo geralmente prevalece em reatores acidogênicos (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016), enquanto o filo Proteobacteria é outro importante filo encontrado em reatores anaeróbios (CHEN, YING *et al.*, 2016).

Resultados semelhantes foram obtidos por Wang *et al.* (2022) que identificaram o aumento de domínio de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes nas quatro amostras analisadas ao dosar: 1) glicose; 2) triptofano e dois tipos de preparo de melanoidinas a partir de glicose e triptofano: 3) aquecida a 80 °C por 7 dias; e 4) aquecida a 80 °C por 14 dias.

Bactérias semelhantes ao gênero *Clostridium*, pertencente ao filo Firmicutes, foram identificadas nas três amostras analisadas, com 89,7% de abundância relativa no reator controle, 19,6% no reator 4 e 88,3% no reator 8. O gênero *Clostridium* é formado por bacilos Gram-positivos capazes de produzir ácido butírico, acético, fórmico, láctico e succínico e etanol a partir de carboidratos e outros compostos orgânicos (DE VOS *et al.*, 2009). A ausência de uma barreira externa de baixa permeabilidade, como a membrana externa, em microrganismos Gram-positivos pode os tornar mais suscetíveis ao efeito antimicrobiano apresentado pelas melanoidinas, o qual pode estar relacionado à sua propriedade quelante.

Vale ressaltar que o reator 4 apresentou uma queda significativa em abundância relativa do gênero *Clostridium sensu stricto 11* quando comparado com o reator controle e 8 (4,7, 49,0 e 64,7%, respectivamente). Em geral, espécies do gênero *Clostridium* são capazes de produzir ácido butírico como seu principal produto da fermentação, como *Clostridium acetobutyricum* (*Clostridium sensu stricto 11*) (ZHAO, W. *et al.*, 2022), indicando uma forte correlação entre a diminuição da presença desse gênero no reator 4 e sua diminuição na produção de ácido butírico.

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Clostridium* estão envolvidas no processo de homoacetogênese, produzindo ácido acético a partir de H₂ / CO₂ e pertencem em sua maioria ao gênero *Clostridium sensu stricto 12* (PAN *et al.*, 2021). A presença desse gênero também diminuiu nos reatores em que a solução de melanoidinas foi adicionada, apresentando uma abundância relativa de 20,6% no reator controle e de 1,3 e 1,4% nos reatores 4 e 8, respectivamente.

O gênero *Lactobacillus* apresentou significativa abundância relativa no reator 4, com 63,6%, enquanto que no reator controle e reator 8 apresentou abundância relativa de 2,0 e 6,7%, respectivamente. O gênero *Lactobacillus* compreende bactérias produtoras de lactato não formadoras de esporos que utilizam uma ampla variedade de açúcares como substrato para a produção de lactato (homofermentação) ou lactato, acetato e etanol (heterofermentação) (HATTI-KAUL *et al.*, 2018; WIEGEL; TANNER; RAINEY, 2006) e conhecido pela sua tolerância a baixo pH (COSTA *et al.*, 2015).

No estudo realizado por Kukuminato, Koyama e Koseki (2021) bactérias do gênero *Lactobacillus* não sofreram inibição com a adição de melanoidinas preparadas a partir de d-xilose e l-fenilalanina ou l-prolina. Resultados semelhantes foram relatados ao testar glicoconjugados digeridos produzidos pela reação de Maillard, os quais estimularam o crescimento de algumas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Além disso, segundo Pérez-Burillo *et al.* (2020) as melanoidinas podem atuar como prebiótico, que são tipos de fibras alimentares que servem de alimento para bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Dessa forma é possível inferir que o aumento da abundância relativa de *Lactobacillus* nas amostras R4 e R8, quando comparadas ao reator controle, está relacionado à presença de melanoidinas no meio.

Pseudomonas do filo Proteobacteria foi o terceiro gênero identificado mais abundante no reator 4, apresentando abundância relativa de 12,8%, todavia, no reator 8 sua abundância foi de 2,9% enquanto que no reator controle esteve ausente. Espécies de *Pseudomonas* são conhecidas por exibir mecanismos que permitem sua adaptação a condições ambientalmente tóxicas, utilizando diversas vias de degradação de compostos orgânicos aromáticos (HEIPIEPER *et al.*, 2007; POBLETE-CASTRO *et al.*, 2012).

Assim como os microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, as bactérias pertencentes ao gênero *Ralstonia*, cuja abundância relativa nos reatores 4 e 8 foram de 1,3% e esteve ausente no reator controle, possuem capacidade para a desnitrificação. Além disso, organismos desse gênero podem utilizar alternativamente compostos orgânicos e inorgânicos, definidos, portanto, como quimiolitotróficos facultativos. Dessa forma, as bactérias do gênero *Ralstonia* são fortemente influenciadas pela disponibilidade do tipo de substrato presente (SCHMIDELL *et al.*, 2007). É possível inferir, portanto, que a diminuição da competitividade nos reatores 4 e 8, evidenciadas tanto pela diminuição do índice de diversidade de Shannon-Wiener quanto pelo aumento do índice de dominância nesses reatores (tabela 4), favoreceu o crescimento de microrganismos desse gênero.

Novosphingobium apresentou uma abundância relativa de 2,6% no reator controle, a qual diminuiu para 0,08% no reator 4 e esteve ausente no reator 8. Bactérias pertencentes ao gênero *Novosphingobium* provaram ser capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como fonte de carbono (CHEN, A.; HUANG, 2020), dessa forma são apontadas como potenciais decompositoras de contaminantes. Entretanto, esses organismos são sensíveis a compostos com ação antimicrobiana. He *et al.* (2021) estudou

o impacto do antibiótico tetraciclina na fermentação e relatou a diminuição de *Novosphingobium*.

Enterobacter e *Caulobacter* apresentaram abundância relativa 2,4 e 2,1% no reator controle, respectivamente, entretanto estiveram ausentes nos reatores 4 e 8. Bactérias do gênero *Enterobacter* são capazes de fermentar carboidratos à AOs, estando presentes em amostras de água, solo, lodo de esgoto, vegetais e frutas (CARBONE *et al.*, 2002). Summa *et al.* (2008) investigaram o efeito antibacteriano das melanoidinas em *Enterobacter cloacae*. Concentrações de 100-12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram testadas, resultando em uma redução significativa do crescimento bacteriano em todas as cepas de *Enterobacter cloacae* expostas a uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de melanoidinas, independentemente da fração ou do processo de torrefação. O gênero *Caulobacter* compreende bactérias mesofílicas aeróbias ou anaeróbias facultativas. São responsáveis por parte da mineralização da matéria orgânica em ambientes com altas ou baixas concentrações de nutrientes (SONG, N. *et al.*, 2013)

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a presença de melanoidinas resultou em efeito significativo na fermentação escura, uma vez que foi observada uma redução na produção de ácidos e álcoois, com exceção do ácido láctico, que apresentou um efeito positivo na sua produção. Isso pode ser explicado pela capacidade da melanoidinas de atuar como um substrato alternativo para os microrganismos presentes no meio, favorecendo a produção de ácido láctico em detrimento dos outros ácidos e solventes. No entanto, é importante destacar que outros fatores, como as relações glicose/melanoidinas, exerceram influência na produção de metabólitos nos diferentes reatores. Relações iniciais menores de glicose/melanoidinas foram desfavoráveis para a produção de ácidos voláteis e solventes.

A adição de melanoidina também teve impacto na composição da comunidade microbiana nos experimentos, sendo mais pronunciada no R4, onde uma concentração maior de melanoidinas foi adicionada. Observou-se um aumento significativo no gênero *Lactobacillus* nessa condição, sugerindo que a presença de melanoidinas beneficia esses microrganismos em detrimento do gênero *Clostridium*, mais abundante em RC e R8. Essas alterações podem estar relacionadas às diferentes capacidades metabólicas dos microrganismos para utilizar as melanoidinas como fonte de energia e carbono. Além disso, as melanoidinas podem ter apresentado propriedades antimicrobianas que afetaram os gêneros bacterianos de forma distinta, resultando em mudanças na proporção dos gêneros presentes na comunidade.

6.1 Sugestão de trabalhos futuros

Recomenda-se a realização de testes com outros tipos de melanoidinas, tanto aquelas extraídas de efluentes, como da vinhaça e da produção de café, quanto melanoidinas sintéticas produzidas a partir de outros açúcares redutores e aminoácidos. Dessa forma, seria possível explorar mais profundamente os efeitos das melanoidinas na acidogênese e na comunidade microbiana levando em consideração o tipo de efluente empregado, bem como identificar quais as limitações do processo anaeróbio de acordo com o tipo de melanoidinas presentes no efluente, visando aprimorar os processos biotecnológicos e maximizar a produção de ácidos e solventes de interesse.

APÊNDICE

Diagrama de Pareto e significância das variáveis estudadas para o intervalo de confiança de 95% para as respostas a) acetona; b) n-butanol; c) etanol; d) ácido propiônico; e) ácido iso-butírico; f) ácido iso-valérico; g) ácido valérico e h) ácido capróico

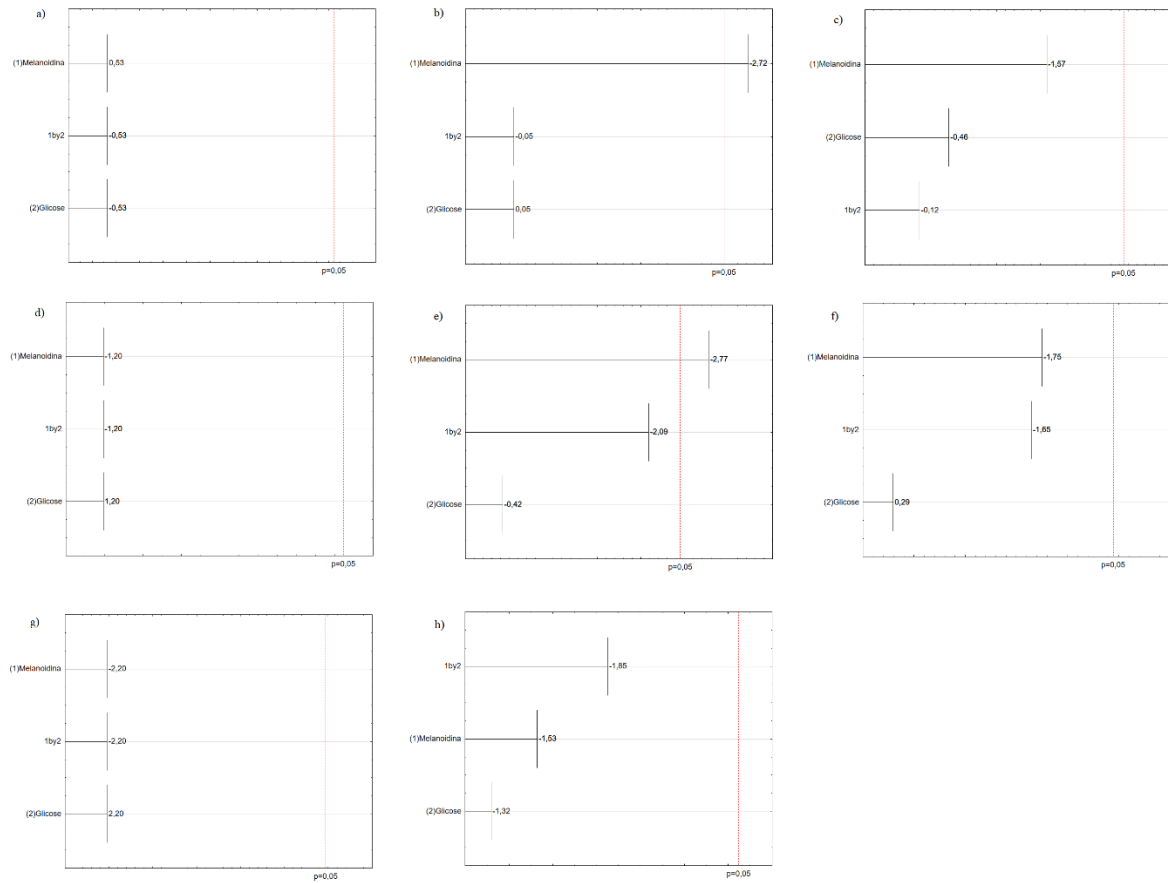


Tabela 6 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase I. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

	Fase I											
	Ac (mg L ⁻¹)	MeOH (mg L ⁻¹)	n-BuOH (mg L ⁻¹)	EtOH (mg L ⁻¹)	HAc (mg L ⁻¹)	HBu (mg L ⁻¹)	HPr (mg L ⁻¹)	iso-HBu (mg L ⁻¹)	iso-HVa (mg L ⁻¹)	HVa (mg L ⁻¹)	HCa (mg L ⁻¹)	HLa (mg L ⁻¹)
RC	0,00	0,00	0,00	2,34	119,63	69,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R1	0,00	0,00	23,70	63,48	550,95	839,64	0,00	28,01	37,80	5,11	32,77	200,00
R2	0,00	0,00	20,87	41,33	417,26	1089,06	0,00	41,91	53,36	6,97	57,39	0,00
R3	8,12	0,00	39,84	51,65	957,82	854,23	34,54	134,56	98,82	7,56	48,24	0,00
R4	7,92	0,00	0,00	93,36	431,03	1292,27	0,00	6,75	19,75	0,00	9,33	0,00
R5	7,16	0,00	0,00	58,91	244,09	957,85	0,00	9,24	22,45	0,00	9,48	160,00
R6	8,05	0,00	21,34	68,20	386,40	693,56	0,00	7,61	18,23	0,00	8,30	0,00
R7	8,42	0,00	0,00	83,49	571,09	1134,29	0,00	0,00	0,00	0,00	7,68	0,00
R8	0,00	0,00	7,27	15,02	292,88	135,50	0,00	11,15	22,22	5,29	17,66	0,00
R9	6,88	0,00	0,00	36,02	202,72	1132,22	0,00	6,75	16,55	4,27	0,00	0,00
R10	8,42	0,00	69,47	212,89	222,31	299,65	59,39	46,91	90,55	7,77	54,55	0,00

Tabela 7 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase I. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

	Fase I											
	Ac	MeOH	n-BuOH	EtOH	HAc	HBu	HPr	iso-HBu	iso-HVa	HVa	HCa	HLa
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
RC	0,0	0,0	0,0	1,2	62,4	36,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R1	0,0	0,0	1,3	3,6	30,9	47,1	0,0	1,6	2,1	0,3	1,8	11,2
R2	0,0	0,0	1,2	2,4	24,1	63,0	0,0	2,4	3,1	0,4	3,3	0,0
R3	0,4	0,0	1,8	2,3	42,8	38,2	1,5	6,0	4,4	0,3	2,2	0,0
R4	0,4	0,0	0,0	5,0	23,2	69,5	0,0	0,4	1,1	0,0	0,5	0,0
R5	0,5	0,0	0,0	4,0	16,6	65,2	0,0	0,6	1,5	0,0	0,6	10,9
R6	0,7	0,0	1,8	5,6	31,9	57,2	0,0	0,6	1,5	0,0	0,7	0,0
R7	0,5	0,0	0,0	4,6	31,6	62,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
R8	0,0	0,0	1,4	3,0	57,8	26,7	0,0	2,2	4,4	1,0	3,5	0,0
R9	0,5	0,0	0,0	2,6	14,4	80,6	0,0	0,5	1,2	0,3	0,0	0,0
R10	0,8	0,0	6,5	19,9	20,7	28,0	5,5	4,4	8,4	0,7	5,1	0,0

Tabela 8 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase II. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

Fase II												
	Ac (mg L ⁻¹)	MeOH (mg L ⁻¹)	n-BuOH (mg L ⁻¹)	EtOH (mg L ⁻¹)	HAc (mg L ⁻¹)	HBu (mg L ⁻¹)	HPr (mg L ⁻¹)	iso-HBu (mg L ⁻¹)	iso-HVa (mg L ⁻¹)	HVa (mg L ⁻¹)	HCa (mg L ⁻¹)	HLa (mg L ⁻¹)
RC	0,00	0,00	4,80	1,38	239,66	117,28	0,00	5,62	8,12	1,04	2,89	100,00
R1	0,00	0,00	4,43	13,67	87,51	256,70	0,40	2,21	0,68	0,67	10,09	0,00
R2	6,88	0,00	39,97	23,97	33,68	1107,32	0,00	0,00	18,12	4,83	79,61	300,00
R3	5,10	0,00	49,63	68,12	520,32	912,53	9,45	56,12	38,57	5,52	29,63	400,00
R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R5	12,76	0,00	18,57	61,41	382,37	425,72	0,00	21,50	25,71	6,69	16,28	180,00
R6	0,00	0,00	0,00	40,21	264,66	1023,00	0,00	7,31	17,86	0,00	14,26	0,00
R7	14,28	0,00	0,00	0,00	55,96	176,77	0,00	0,00	0,00	0,00	8,94	80,00
R8	6,71	42,90	0,00	215,41	37,56	1236,82	1,76	17,37	33,62	6,25	49,19	210,00
R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R10	0,00	0,00	16,28	17,97	114,60	162,54	0,00	8,06	17,88	0,00	10,62	0,00

Tabela 9 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase II. HCa: ácido caprónico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

Fase II												
	Ac	MeOH	n-BuOH	EtOH	HAc	HBu	HPr	iso-HBu	iso-HVa	HVa	HCa	HLa
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
RC	0,0	0,0	1,0	0,3	49,8	24,4	0,0	1,2	1,7	0,2	0,6	20,8
R1	0,0	0,0	1,2	3,6	23,3	68,2	0,1	0,6	0,2	0,2	2,7	0,0
R2	0,4	0,0	2,5	1,5	2,1	68,6	0,0	0,0	1,1	0,3	4,9	18,6
R3	0,2	0,0	2,4	3,3	24,8	43,6	0,5	2,7	1,8	0,3	1,4	19,1
R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R5	1,1	0,0	1,6	5,3	33,2	37,0	0,0	1,9	2,2	0,6	1,4	15,6
R6	0,0	0,0	0,0	2,9	19,4	74,8	0,0	0,5	1,3	0,0	1,0	0,0
R7	4,3	0,0	0,0	0,0	16,7	52,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	23,8
R8	0,4	2,3	0,0	11,6	2,0	66,6	0,1	0,9	1,8	0,3	2,6	11,3
R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10	0,0	0,0	4,7	5,2	32,9	46,7	0,0	2,3	5,1	0,0	3,1	0,0

Tabela 10 - Concentração de AOs e solvente produzidos na fase III. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

Fase III												
	Ac (mg L ⁻¹)	MeOH (mg L ⁻¹)	n-BuOH (mg L ⁻¹)	EtOH (mg L ⁻¹)	HAc (mg L ⁻¹)	HBu (mg L ⁻¹)	HPr (mg L ⁻¹)	iso-HBu (mg L ⁻¹)	iso-HVa (mg L ⁻¹)	HVa (mg L ⁻¹)	HCa (mg L ⁻¹)	HLa (mg L ⁻¹)
RC	0,00	0,00	15,64	0,00	405,70	369,54	0,00	11,73	18,43	4,40	8,47	0,00
R1	0,00	0,00	113,47	0,00	396,44	542,96	0,00	11,35	18,04	0,00	22,49	410,00
R2	0,00	0,00	0,00	0,00	111,06	531,35	0,00	7,36	16,76	0,00	25,68	430,00
R3	0,00	0,00	55,55	112,38	412,57	818,44	0,00	20,76	24,36	4,57	13,39	410,00
R4	0,00	0,00	0,00	10,27	3,54	178,42	0,00	0,25	0,11	0,00	0,32	920,00
R5	12,82	0,00	50,21	16,74	322,12	441,70	0,00	10,59	19,12	4,77	10,07	300,00
R6	0,00	0,00	8,28	280,51	222,31	299,65	0,00	7,42	0,00	0,00	7,38	730,00
R7	7,74	0,00	0,00	93,73	168,22	399,94	0,00	7,45	0,00	0,00	7,51	420,00
R8	0,00	0,00	70,98	125,03	475,52	826,15	169,49	7,65	17,58	4,84	21,98	390,00
R9	0,00	0,00	0,00	8,99	77,80	162,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	880,00
R10	0,00	0,00	16,28	17,97	314,59	395,25	0,00	8,06	17,88	0,00	10,62	310,00

Tabela 11 - Concentração de AOs e solvente em porcentagem produzidos na fase III. HCa: ácido capróico; HVa: ácido valérico; iso-HVa: ácido isovalérico; iso-HBu: ácido isobutírico; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; n-BuOH: n-butanol; MeOH: metanol e Ac: acetona.

Fase III												
	Ac	MeOH	n-BuOH	EtOH	HAc	HBu	HPr	iso-HBu	iso-HVa	HVa	HCa	HLa
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
RC	0,0	0,0	1,9	0,0	48,7	44,3	0,0	1,4	2,2	0,5	1,0	0,0
R1	0,0	0,0	7,5	0,0	26,2	35,8	0,0	0,7	1,2	0,0	1,5	27,1
R2	0,0	0,0	0,0	0,0	9,9	47,3	0,0	0,7	1,5	0,0	2,3	38,3
R3	0,0	0,0	3,0	6,0	22,0	43,7	0,0	1,1	1,3	0,2	0,7	21,9
R4	0,0	0,0	0,0	0,9	0,3	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	82,7
R5	1,1	0,0	4,2	1,4	27,1	37,2	0,0	0,9	1,6	0,4	0,8	25,2
R6	0,0	0,0	0,5	18,0	14,3	19,3	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5	46,9
R7	0,7	0,0	0,0	8,5	15,2	36,2	0,0	0,7	0,0	0,0	0,7	38,0
R8	0,0	0,0	3,4	5,9	22,5	39,2	8,0	0,4	0,8	0,2	1,0	18,5
R9	0,0	0,0	0,0	0,8	6,9	14,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	77,9
R10	0,0	0,0	1,5	1,6	28,8	36,2	0,0	0,7	1,6	0,0	1,0	28,4

REFERÊNCIAS

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.

ALGAPANI, D. E.; QIAO, W.; RICCI, M.; BIANCHI, D.; M. WANDERA, S.; ADANI, F.; DONG, R. Bio-hydrogen and bio-methane production from food waste in a two-stage anaerobic digestion process with digestate recirculation. **Renewable Energy**, v. 130, p. 1108–1115, 1 jan. 2019.

ALI, P.; ZALIVINA, N.; LE, T.; RIFFAT, R.; ERGAS, S.; WETT, B.; MURTHY, S.; AL-OMARI, A.; DEBARBADILLO, C.; BOTT, C.; DE CLIPPELEIR, H. Primary sludge fermentate as carbon source for mainstream partial denitrification–anammox (PdNA). **Water Environment Research**, p. 1–16, 2021.

AMES, J. M.; WYNNE, A.; HOFMANN, A.; PLOS, S.; GIBSON, G. R. The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro . **British Journal of Nutrition**, v. 82, n. 6, p. 489–495, dez. 1999.

AMULYA, K.; VENKATESWAR REDDY, M.; VENKATA MOHAN, S. Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 336–342, 2014.

APHA. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. [S.l: s.n.], 2017. v. 23th ed. W.

ARFAIOLI, P.; RISTORI, G. G.; BOSETTO, M.; FUSI, P. Humic-like compounds formed from l-tryptophan and d-glucose in the presence of CU (II). **Chemosphere**, v. 35, n. 3, p. 575–584, 1 ago. 1997.

ARIMI, M. M.; ZHANG, Y.; GÖTZ, G.; KIRIAMITI, K.; GEISSEN, S. U. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 87, p. 34–43, 2014.

ARIMI, M. M.; ZHANG, Y.; GÖTZ, G.; GEISSEN, S. U. Treatment of melanoidin wastewater by anaerobic digestion and coagulation. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 36, n. 19, p. 2410–2418, 2 out. 2015.

BENZING-PURDIE, L. M.; RIPMEESTER, J. A.; RATCLIFFE, C. I. Effects of Temperature on Maillard Reaction Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 31–33, 1985.

BHARAGAVA, R. N.; CHANDRA, R. Effect of bacteria treated and untreated post-methanated distillery effluent (PMDE) on seed germination, seedling growth and amylase activity in *Phaseolus mungo* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 730–734, 2010.

BLUM, D. J. W.; SPEECE, R. A Database of Chemical Toxicity to Environmental Bacteria and Its Use in Interspecies Comparisons and Correlations. **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 63, 1 abr. 1991.

BOLL, M.; ESTELMANN, S.; HEIDER, J. Catabolic Pathways and Enzymes Involved in the Anaerobic Degradation of Monocyclic Aromatic Compounds. **Anaerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids**, p. 85–133, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-50391-2_6>. Acesso em: 9 abr. 2023.

BORJA, R.; ALBA, J.; BANKS, C. J. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 121–133, 1 fev. 1997.

BORRELLI, R. C.; FOGLIANO, V.; MONTI, S. M.; AMES, J. M. Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. **EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY**, v. 215, n. 3, p. 210–215, set. 2002.

BOTTA, L. S. Hidrólise e fermentação de papel em lisímetro para recuperação de composto de interesse biotecnológico. **Tese (doutorado)**, p. 198, 2016.

BRUDZYNSKI, K.; MIOTTO, D.; KIM, L.; SJAARDA, C.; MALDONADO-ALVAREZ, L.; FUKS, H. Active macromolecules of honey form colloidal particles essential for honey antibacterial activity and hydrogen peroxide production. **Scientific**

Reports, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.

BRUHNS, P.; KANZLER, C.; DEGENHARDT, A. G.; KOCH, T. J.; KROH, L. W. Basic Structure of Melanoidins Formed in the Maillard Reaction of 3-Deoxyglucosone and γ -Aminobutyric Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 18, p. 5197–5203, 2019.

CÄMMERER, B.; KROH, L. W. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. **Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 55–59, 1995.

CÄMMERER, BETTINA; JALYSCHKOV, V.; KROH, L. W. Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. **International Congress Series**, v. 1245, p. 269–273, nov. 2002.

CARBONE, S. R.; DA SILVA, F. M.; TAVARES, C. R. G.; DIAS FILHO, B. P. Bacterial population of a two-phase anaerobic digestion process treating effluent of cassava starch factory. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 23, n. 5, p. 591–597, 1 maio 2002. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tent20>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

CASTRO, S. B. DE; ANDRADE, S. A. C. *Tecnologia do açúcar*. 1^o ed. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2007.

CHANDRA, R.; BHARAGAVA, R. N.; RAI, V. *Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation*. **Bioresource Technology**. [S.l.]: Elsevier. , 1 jul. 2008

CHANDRA, R.; KUMAR, V.; TRIPATHI, S. Evaluation of molasses-melanoidin decolourisation by potential bacterial consortium discharged in distillery effluent. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, 2018.

CHANG, S.; LI, J.-Z.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1517–1522, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148110005367>>.

CHAVAN, M. N.; DANDI, N. D.; KULKARNI, M. V.; CHAUDHARI, A. B. Biotreatment of melanoidin-containing distillery spent wash effluent by free and immobilized *Aspergillus oryzae* MTCC 7691. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 11, p. 1–10, 2013.

CHEN, A.; HUANG, Y. Acyl homoserine lactone based quorum sensing affects phenanthrene removal by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 through altering cell surface properties. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104841, 1 fev. 2020.

CHEN, YING; YU, B.; YIN, C.; ZHANG, C.; DAI, X.; YUAN, H.; ZHU, N. Biostimulation by direct voltage to enhance anaerobic digestion of waste activated sludge. **RSC Advances**, v. 6, n. 2, p. 1581–1588, 2016.

CHEN, YUN; JIANG, X.; XIAO, K.; SHEN, N.; ZENG, R. J.; ZHOU, Y. Enhanced volatile fatty acids (VFAs) production in a thermophilic fermenter with stepwise pH increase – Investigation on dissolved organic matter transformation and microbial community shift. **Water Research**, v. 112, p. 261–268, 1 abr. 2017.

CHOWDHARY, P.; RAJ, A.; BHARAGAVA, R. N. Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. **Chemosphere**, v. 194, p. 229–246, 1 mar. 2018.

CIBIS, E.; KENT, C. A.; KRZYWONOS, M.; GARNCAREK, Z.; GARNCAREK, B.; MIKIEWICZ, T. Biodegradation of potato slops from a rural distillery by thermophilic aerobic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 1, p. 57–61, 1 out. 2002.

COCA, M.; GARCÍA, M. T.; GONZÁLEZ, G.; PEÑA, M.; GARCÍA, J. A. Study of coloured components formed in sugar beet processing. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 421–433, jul. 2004.

COSTA, O. Y. A.; SOUTO, B. M.; TUPINAMBÁ, D. D.; BERGMANN, J. C.; KYAW, C. M.; KRUGER, R. H.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 73–84, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/42/1/73/5995472>>.

Acesso em: 16 fev. 2023.

DANG, Y.; ZHANG, R.; WU, S.; LIU, Z.; QIU, B.; FANG, Y.; SUN, D. Calcium effect on anaerobic biological treatment of fresh leachate with extreme high calcium concentration. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 76–83, 1 nov. 2014.

DAVID, C.; ARIVAZHAGAN, M.; BALAMURALI, M. N.; SHANMUGARAJAN, D. Decolorization of Distillery Spent Wash Using Biopolymer Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Tannery Effluent. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DAVIES, C. G. A.; WEDZICHA, B. L.; GILLARD, C. Kinetic model of the glucose-glycine reaction. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 323–329, 1 nov. 1997.

DE MARCO, L. M.; FISCHER, S.; HENLE, T. High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11417–11423, 2011.

DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; WHITMAN BERGEY', W. B.; TRUST, M. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes WITH CONTRIBUTIONS FROM 165 COLLEAGUES. **Whitman, W. B.**, p. 1450, 2009.

DEL NERY, V. *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. 1987. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 1987.

DEN BOER, E.; ŁUKASZEWSKA, A.; KLUCZKIEWICZ, W.; LEWANDOWSKA, D.; KING, K.; REIJONEN, T.; KUHMENEN, T.; SUHONEN, A.; JÄÄSKELÄINEN, A.; HEITTO, A.; LAATIKAINEN, R.; HAKALEHTO, E. Volatile fatty acids as an added value from biowaste. **Waste Management**, v. 58, p. 62–69, 1 dez. 2016.

DIAZ-MORALES, N.; ORTEGA-HERAS, M.; DIEZ-MATÉ, A. M.; GONZALEZ-SANJOSE, M. L.; MUÑIZ, P. Antimicrobial properties and volatile profile

of bread and biscuits melanoidins. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131648, 30 mar. 2022.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ECHAVARRÍA, A. P.; PAGÁN, J.; IBARZ, A. Kinetics of color development of melanoidins formed from fructose/amino acid model systems. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 2, p. 119–126, 2014.

EINARSSON, H.; EKLUND, T.; NES, I. F. Inhibitory mechanisms of maillard reaction-products. **MICROBIOS**, v. 53, n. 214, p. 27–36, 1988.

EINARSSON, H.; SNYGG, B. G.; ERIKSSON, C. Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 1043–1047, 1983.

ETCHEBEHERE, C.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; DEL PILAR ANZOLAR-OJAS, M.; BORZACCONI, L.; BUITRÓN, G.; CABROL, L.; CARMINATO, V. M.; CARRILLO-REYES, J.; CISNEROS-PÉREZ, C.; FUENTES, L.; MORENO-ANDRADE, I.; RAZO-FLORES, E.; FILIPPI, G. R.; TAPIA-VENEGAS, E.; TOLEDO-ALARCÓN, J.; ZAIAT, M. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3371–3384, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7325-y>>. Acesso em: 14 fev. 2023.

FANG, H. H. P.; CHEN, T.; CHAN, O. C. Toxic effects of phenolic pollutants on anaerobic benzoate-degrading granules. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 1, p. 117–120, 1995.

FASCETTI, E.; D'ADDARIO, E.; TODINI, O.; ROBERTIELLO, A. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 23, n. 9, p. 753–760, 1998.

FENG, J.; BERTON-CARABIN, C. C.; FOGLIANO, V.; SCHROËN, K.

Maillard reaction products as functional components in oil-in-water emulsions: A review highlighting interfacial and antioxidant properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 129–141, 1 mar. 2022.

FENG, X. C.; BAO, X.; CHE, L.; WU, Q. L. Enhance biological nitrogen and phosphorus removal in wastewater treatment process by adding food waste fermentation liquid as external carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 165, 2021.

FERNANDES, B. S.; SAAVEDRA, N. K.; MAINTINGUER, S. I.; SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1348–1366, 11 jul. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0262-7>>. Acesso em: 13 jun. 2023.

GE, S. J.; LEE, T. C. Kinetic Significance of the Schiff Base Reversion in the Early-Stage Maillard Reaction of a Phenylalanine-Glucose Aqueous Model System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1619–1623, 1997.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology** 2004 5:10, v. 5, n. 10, p. 1–16, 15 set. 2004. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2004-5-10-r80>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

GLÖCKNER, F. O.; YILMAZ, P.; QUAST, C.; GERKEN, J.; BECCATI, A.; CIUPRINA, A.; BRUNS, G.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; WESTRAM, R.; LUDWIG, W. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 169–176, 10 nov. 2017.

GOMYO, T.; HORIKOSHI, M. On the interaction of melanoidin with metallic ions. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 33–40, 1976.

GRESES, S.; TOMÁS-PEJÓ, E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Short-chain fatty acids and hydrogen production in one single anaerobic fermentation stage using carbohydrate-rich food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, 2021.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.

HATTI-KAUL, R.; CHEN, L.; DISHISHA, T.; ENSHASY, H. EL. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 20, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30169778/>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

HAYASE, F.; USUI, T.; WATANABE, H. Chemistry and some biological effects of model melanoidins and pigments as Maillard intermediates. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1171–1179, 2006.

HE, D.; XIAO, J.; WANG, D.; LIU, X.; LI, Y.; FU, Q.; LI, C.; YANG, Q.; LIU, Y.; NI, B. JIE. Understanding and regulating the impact of tetracycline to the anaerobic fermentation of waste activated sludge. **Journal of Cleaner Production**, v. 313, p. 127929, 1 set. 2021.

HEIPIEPER, H. J.; NEUMANN, G.; CORNELISSEN, S.; MEINHARDT, F. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 961–973, 1 abr. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-006-0833-4>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

HIRANO, M.; MIURA, M.; GOMYO, T. Melanoidin as a novel trypsin-inhibitor. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 940–941, 1994.

IBARZ, A.; GARZA, S.; PAGÁN, J. Inhibitory effect of melanoidins from glucose-asparagine on carboxypeptidases activity. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1277–1282, 2008.

IMASATO, H. Reação de Maillard: propriedades e estrutura das melanoidinas da frutose e glicina. **Tese (doutorado)**, n. Universidade Estadual de Campinas, 1979.

JARVIS, Å.; NORDBERG, Å.; JARLSVIK, T.; MATHISEN, B.; SVENSSON, B. H. Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by the addition of cobalt. **Biomass and Bioenergy**, v. 12, n. 6, p. 453–460, 1997.

JIANG, S.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Effect of sodium dodecyl sulfate on waste activated sludge hydrolysis and acidification. **Chemical Engineering Journal**, v. 132, n. 1–3, p. 311–317, 2007.

JÜRGENSEN, L.; EHIMEN, E. A.; BORN, J.; HOLM-NIELSEN, J. B. A combination anaerobic digestion scheme for biogas production from dairy effluent—CSTR and ABR, and biogas upgrading. **Biomass and Bioenergy**, v. 111, p. 241–247, 1 abr. 2018.

KAID AL-SHORGANI, N.; MUBARAK TIBIN, E.; SAHAID KALIL, M.; MOHTAR WAN YUSOFF, W.; ABDUL HAMID, A. Biobutanol production by a new local isolate of *Clostridium acetobutylicum* YM1 AIP Conference. v. 1614, p. 20011, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4895254>>. Acesso em: 18 maio 2021.

KANZLER, C.; HAASE, P. T. Melanoidins Formed by Heterocyclic Maillard Reaction Intermediates via Aldol Reaction and Michael Addition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 332–339, 2020.

KAUSHIK, A.; BASU, S.; SINGH, K.; BATRA, V. S.; BALAKRISHNAN, M. Activated carbon from sugarcane bagasse ash for melanoidins recovery. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 29–34, 15 set. 2017.

KAUSHIK, G.; THAKUR, I. S. Adsorption of colored pollutants from distillery spent wash by native and treated fungus: *Neurospora intermedia*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 1070–1078, 2013.

KIM, H.; KIM, J.; SHIN, S. G.; HWANG, S.; LEE, C. Continuous fermentation of food waste leachate for the production of volatile fatty acids and potential as a denitrification carbon source. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 440–445, 2016.

KIM, M.; AHN, Y. H.; SPEECE, R. E. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. **Water Research**, v. 36, n. 17, p. 4369–4385, 2002.

KUKUMINATO, S.; KOYAMA, K.; KOSEKI, S. Antibacterial Properties of Melanoidins Produced from Various Combinations of Maillard Reaction against Pathogenic Bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 22 dez. 2021. Disponível em:

<<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.01142-21>>. Acesso em: 21 mar. 2023.

KUMAR, V.; CHANDRA, R.; THAKUR, I. S.; SAXENA, G.; SHAH, M. P. Recent Advances in Physicochemical and Biological Treatment Approaches for Distillery Wastewater. **Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant**, p. 79–118, 2020.

KUMAR, V.; SHAH, M. P. Role of fungi and their enzymes in degradation and decolorization of distillery effluent for environmental safety. **Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology**, v. 2, p. 277–300, 2021.

KWAK, E. J.; LIM, S. I. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. **Amino Acids**, v. 27, n. 1, p. 85–90, ago. 2004.

LAY, J. J.; LEE, Y. J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2579–2586, 1999.

LEE, W. S.; CHUA, A. S. M.; YEOH, H. K.; NGOH, G. C. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 83–99, 2014.

LEONG, L. P.; WEDZICHA, B. L. A critical appraisal of the kinetic model for the Maillard browning of glucose with glycine. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 21–28, 2000.

LIM, S. J.; KIM, B. J.; JEONG, C. M.; CHOI, J. DAL RAE; AHN, Y. H.; CHANG, H. N. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7866–7874, 2008.

LIU, H.; WANG, J.; LIU, X.; FU, B.; CHEN, J.; YU, H. Q. Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 799–807, 2012.

LIU, X.; YANG, S. T. Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 801–808, 2006.

LULLIO, T. G.; SOUZA, L. P.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M. Biomethane Production in an AnSBBR Treating Wastewater from Biohydrogen Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1873–1896, 2014.

MAHGOUB, S.; TSIOPTSIAS, C.; SAMARAS, P. Biodegradation and decolorization of melanoidin solutions by manganese peroxidase yeasts. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 10, p. 2436–2445, 2016.

MANISANKAR, P.; RANI, C.; VISWANATHAN, S. Effect of halides in the electrochemical treatment of distillery effluent. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 961–966, 2004.

MARI, A. G.; ANDREANI, C. L.; TONELLO, T. U.; LEITE, L. C. C.; FERNANDES, J. R.; LOPES, D. D.; RODRIGUES, J. A. D.; GOMES, S. D. Biohydrogen and biomethane production from cassava wastewater in a two-stage anaerobic sequencing batch biofilm reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 8, p. 5165–5174, 14 fev. 2020.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 9–10, p. 364–373, 10 set. 2000.

MARTINS, S. I. F. S.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. **Food Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 135–142, 2003.

MEKY, N.; ELREEDY, A.; IBRAHIM, M. G.; FUJII, M.; TAWFIK, A. Intermittent versus sequential dark-photo fermentative hydrogen production as an alternative for bioenergy recovery from protein-rich effluents. **Energy**, v. 217, p. 119326, 2021.

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, n. 12, p. fiw195, dez. 2016.

MIGO, V. P.; MATSUMURA, M.; DEL ROSARIO, E. J.; KATAOKA, H. The

effect of pH and calcium ions on the destabilization of melanoidin. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 1, p. 29–32, 1993.

MINOWA, T.; INOUE, S.; HANAOKA, T.; MATSUMURA, Y. Hydrothermal reaction of glucose and glycine as model compounds of biomass. **Nihon Enerugi Gakkaishi/Journal of the Japan Institute of Energy**, v. 83, n. 10, p. 794–798, 2004.

MOHSIN, G. F.; SCHMITT, F. J.; KANZLER, C.; DIRK EPPING, J.; FLEMIG, S.; HORNEMANN, A. Structural characterization of melanoidin formed from D-glucose and L-alanine at different temperatures applying FTIR, NMR, EPR, and MALDI-ToF-MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 761–767, 2018.

MORALES, F. J. Application of capillary zone electrophoresis to the study of food and food-model melanoidins. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 363–369, 2002.

MOREIRA, A. S. P.; NUNES, F. M.; DOMINGUES, M. R.; COIMBRA, M. A. Coffee melanoidins: Structures, mechanisms of formation and potential health impacts. 2012, [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2012. p. 903–915.

MORITA, J.; KASHIMURA, N. The maillard reaction of DNA with D-fructose 6-phosphate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1359–1366, 1991.

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.

NOVAK, J. T.; PARK, C. M. The effect of iron and aluminium for phosphorus removal on anaerobic digestion and organic sulfur generation. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 419–426, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://iwaponline.com/wst/article-pdf/62/2/419/446358/419.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

ORACZ, J.; ŻYŻELEWICZ, D. Antioxidants in Cocoa. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1230, 2020.

ORTEGA-HERAS, M.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Binding capacity of brown pigments present in special Spanish sweet wines. **LWT - Food Science and**

Technology, v. 42, n. 10, p. 1729–1737, 2009.

OUNINE, K.; PETITDEMANGE, H.; RAVAL, G.; GAY, R. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 874–878, 1985. Disponível em: </pmc/articles/PMC238462/?report=abstract>. Acesso em: 18 maio 2021.

PAGLIANO, G.; GUGLIUCCI, W.; TORRIERI, E.; PICCOLO, A.; CANGEMI, S.; ANGELO DI GIUSEPPE, F.; ROBERTIELLO, A.; FARACO, V.; PEPE, O.; VENTORINO, V. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from dairy wastewater effluent: bacterial accumulation, structural characterization and physical properties. **Chem. Biol. Technol. Agric**, v. 7, p. 29, 2020.

PAN, X.; ZHAO, L.; LI, C.; ANGELIDAKI, I.; LV, N.; NING, J.; CAI, G.; ZHU, G. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. **Water Research**, v. 190, p. 116774, 15 fev. 2021.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, 1 set. 2007.

PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; AGNELLI, J. A. B.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.

PÉREZ-BURILLO, S.; RAJAKARUNA, S.; PASTORIZA, S.; PALIY, O.; ÁNGEL RUFÍAN-HENARES, J. Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota. **Food Chemistry**, v. 316, p. 126309, 30 jun. 2020.

POBLETE-CASTRO, I.; BECKER, J.; DOHNT, K.; SANTOS, V. M. DOS; WITTMANN, C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2279–2290, 18 mar. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-3928-0>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

POSTAWA, K.; SZCZYGIEŁ, J.; KUŁAŻYŃSKI, M. Innovations in anaerobic

digestion: a model-based study. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, 2021.

POUILLART, P. R. Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and hemoglobinopathies. **Life Sciences**, v. 63, n. 20, p. 1739–1760, 1998.

RAFIGH, S. M.; RAHIMPOUR SOLEYMANI, A. Melanoidin removal from molasses wastewater using graphene oxide nanosheets. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 55, n. 13, p. 2281–2293, 2020.

RAVIKUMAR, R.; VASANTHI, N. S.; SARAVANAN, K. Single factorial experimental design for decolorizing anaerobically treated distillery spent wash using *cladosporium cladosporioides*. **Int. J. Environ. Sci. Tech**, v. 8, n. 1, p. 97–106, 2011.

RAWOOF, S. A. A.; KUMAR, P. S.; VO, D. V. N.; SUBRAMANIAN, S. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 1043–1063, 22 out. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-020-01122-6>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

RENARD, P.; BOUILLON, C.; NAVEAU, H.; NYNS, E. J. Toxicity of a mixture of polychlorinated organic compounds towards an unacclimated methanogenic consortium. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 2, p. 195–200, 1993.

REYHANITASH, E.; ZAALBERG, B.; KERSTEN, S. R. A.; SCHUUR, B. Extraction of volatile fatty acids from fermented wastewater. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 61–68, 17 mar. 2016.

RINCÓN, B.; SÁNCHEZ, E.; RAPOSO, F.; BORJA, R.; TRAVIESO, L.; MARTÍN, M. A.; MARTÍN, A. Effect of the organic loading rate on the performance of anaerobic acidogenic fermentation of two-phase olive mill solid residue. **Waste Management**, v. 28, n. 5, p. 870–877, 2008.

RIZVI, S.; GOSWAMI, L.; GUPTA, S. K. A holistic approach for melanoidin removal via Fe-impregnated activated carbon prepared from *Mangifera indica* leaves biomass. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100591, 1 dez. 2020.

RUFIÁN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Antimicrobial activity of coffee melanoidins - A study of their metal-chelating properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 432–438, 2009.

RUFIAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2357–2362, 2008.

RUFIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 2, p. 160–168, 2007.

SANKARAN, K.; PISHARODY, L.; SURIYA NARAYANAN, G.; PREMALATHA, M. Bacterial assisted treatment of anaerobically digested distillery wastewater. **RSC Advances**, v. 5, n. 87, p. 70977–70984, 2015.

SANTAL, A. R.; SINGH, N. P.; SAHARAN, B. S. A novel application of *Paracoccus pantotrophus* for the decolorization of melanoidins from distillery effluent under static conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 78–83, 2016.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 86, p. 481–497, 2008.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ETCHEBEHERE, C.; JAVIER MENES, R.; BERTOLA, N. C.; MARTÍN CONTRERAS, E. *Tratamento biológico de águas residuárias*. 1. ed. Florianópolis (SC): Gráfica PaperPrint, 2007. v. 1.

SHIN, H. S.; KWON, J. C. Degredation and interaction between organic concentrations and toxicity of 2,4,6-trichlorophenol in anaerobic system. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 1, p. 39–43, 1998.

SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 544–550, 1991.

SILVA, F. M. S.; MAHLER, C. F.; OLIVEIRA, L. B.; BASSIN, J. P. Hydrogen

and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 1 jun. 2018.

SINGH, K.; TRIPATHI, S.; CHANDRA, R. Maillard reaction product and its complexation with environmental pollutants: A comprehensive review of their synthesis and impact. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100779, 1 set. 2021.

SONG, N.; CAI, H. Y.; YAN, Z. S.; JIANG, H. L. Cellulose degradation by one mesophilic strain *Caulobacter* sp. FMC1 under both aerobic and anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 281–287, 1 mar. 2013.

SONG, X.; SHI, Z.; LI, X.; WANG, X.; REN, Y. Fate of proteins of waste activated sludge during thermal alkali pretreatment in terms of sludge protein recovery. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 13, n. 2, p. 1–9, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11783-019-1114-7>>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. **Water Research**, v. 27, n. 8, p. 1361–1376, 1993.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 416A-427A, 1983.

STERGAR, V.; ZAGORC-KONČAN, J.; ZGAJNAR-GOTVANJ, A. Laboratory scale and pilot plant study on treatment of toxic wastewater from the petrochemical industry by UASB reactors. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 97–102, 2003.

SUMMA, C.; MCCOURT, J.; CÄMMERER, B.; FIALA, A.; PROBST, M.; KUN, S.; ANKLAM, E.; WAGNER, K. H. Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of Cocoa bean Maillard Reaction products with degree of roasting. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 3, p. 342–351, 1 mar. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mnfr.200700403>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

TEMUDO, M. F.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study.

Biotechnology and Bioengineering, v. 98, n. 1, p. 69–79, 1 set. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21412>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

TIWARI, S.; GAUR, R.; SINGH, A. Distillery spentwash decolorization by a Noval Consortium of *Pediococcus acidilactici* and *Candida tropicalis* under static condition. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 780–791, 2014.

TIWARI, S.; GAUR, R.; SINGH, R. Decolorization of a recalcitrant organic compound (Melanoidin) by a novel thermotolerant yeast, *Candida tropicalis* RG-9. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2012.

TRESSL, R.; KERSTEN, E.; NITTKA, C.; REWICKI, D. Mechanistic Studies on the Formation of Pyrroles and Pyridines from [1- ¹³C]-D-Glucose and [1- ¹³C]-D-Arabinose. **Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health**, p. 51–60, 1994.

TRIPATHI, S.; SINGH, K.; SINGH, A.; MISHRA, A.; CHANDRA, R. Organometallic pollutants of distillery effluent and their toxicity on freshwater fish and germinating *Zea mays* seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1–14, 13 mar. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13762-021-03233-1>>. Acesso em: 15 set. 2021.

TRIPATHI, SONAM; SHARMA, P.; SINGH, K.; PURCHASE, D.; CHANDRA, R. Translocation of heavy metals in medicinally important herbal plants growing on complex organometallic sludge of sugarcane molasses-based distillery waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 22, p. 101434, 1 maio 2021.

UBEROI, V.; BHATTACHARYA, S. K. Effects of chlorophenols and nitrophenols on the kinetics of propionate degradation in sulfate-reducing anaerobic systems. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 1607–1614, jun. 1997a. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 14 out. 2020.

UBEROI, V.; BHATTACHARYA, S. K. Toxicity and degradability of nitrophenols in anaerobic systems. **Water Environment Research**, v. 69, n. 2, p. 146–156, 1997b.

VAN BEELEN, P.; VAN VLAARDINGEN, P. Toxic effects of pollutants on the

mineralization of 4-chlorophenol and benzoate in methanogenic river sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1051–1060, 1994.

VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 23, p. 9351–9356, 2005.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 24, p. 4726–4730, 2001.

VILLA MONTOYA, A. C.; DA SILVA MAZARELI, R. C.; DELFORNO, T. P.; CENTURION, V. B.; DE OLIVEIRA, V. M.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. 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.

VINOTH KUMAR, R.; GANESH MOORTHY, I.; GOSWAMI, L.; PUGAZHENTHI, G.; PAKSHIRAJAN, K.; SILVA, A. M. T.; MORALES-TORRES, S. Analytical Methods in Biodiesel Production. **Energy, Environment, and Sustainability**, p. 197–219, 2020.

WAGH, M. P.; NEMADE, P. D. Biodegradation of anaerobically treated distillery spent wash by *Aspergillus* species from a distillery effluent contaminated site. **Desalination and Water Treatment**, v. 104, p. 234–240, 2018.

WALKER, J. M.; MENNELLA, I.; FERRACANE, R.; TAGLIAMONTE, S.; HOLIK, A. K.; HÖLZ, K.; SOMOZA, M. M.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P. Melanoidins from coffee and bread differently influence energy intake: A randomized controlled trial of food intake and gut-brain axis response. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104063, 2020.

WANG, H.; REN, Z. J. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1796–1807, 2013.

WANG, H. Y.; QIAN, H.; YAO, W. R. Melanoidins produced by the Maillard

reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 573–584, 2011.

WANG, S.; HU, Z.-Y.; GENG, Z.-Q.; TIAN, Y.-C.; JI, W.-X.; LI, W.-T.; DAI, K.; ZENG, R. J.; ZHANG, F. Elucidating the production and inhibition of melanoidins products on anaerobic digestion after thermal-alkaline pretreatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127377, 15 fev. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389421023451>>. Acesso em: 14 fev. 2023.

WANG, Y.; MU, Y.; YU, H. Q. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 1086–1094, 2007.

WEDZICHA, B. L.; KAPUTO, M. T. Melanoidins from glucose and glycine: composition, characteristics and reactivity towards sulphite ion. **Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 359–367, 1992.

WIEGEL, J.; TANNER, R.; RAINEY, F. A. An Introduction to the Family Clostridiaceae. **The Prokaryotes**, p. 654–678, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30744-3_20>. Acesso em: 16 fev. 2023.

XU, S.; ZHU, J.; MENG, Z.; LI, W.; REN, S.; WANG, T. Hydrogen and methane production by co-digesting liquid swine manure and brewery wastewater in a two-phase system. **Bioresource Technology**, v. 293, p. 122041, 1 dez. 2019.

YADAV, S.; CHANDRA, R. Biodegradation of organic compounds of molasses melanoidin (MM) from biomethanated distillery spent wash (BMDS) during the decolourisation by a potential bacterial consortium. **Biodegradation**, v. 23, n. 4, p. 609–620, 2012.

YANG, D.; GAO, X. *Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications*. **Trends in Food Science and Technology**. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 2021

YANG, H.; LIU, J.; HU, P.; ZOU, L.; LI, Y. Y. Carbon source and phosphorus

recovery from iron-enhanced primary sludge via anaerobic fermentation and sulfate reduction: Performance and future application. **Bioresource Technology**, v. 294, p. 122174, 2019.

YANG, J.; SPEECE, R. E. The effects of chloroform toxicity on methane fermentation. **Water Research**, v. 20, n. 10, p. 1273–1279, 1986.

YANG, N.; YANG, S.; YANG, L.; SONG, Q.; ZHENG, X. Exploration of browning reactions during alkaline thermal hydrolysis of sludge: Maillard reaction, caramelization and humic acid desorption. **Environmental Research**, v. 217, p. 114814, 15 jan. 2023.

YAYLAYAN, V. A.; KAMINSKY, E. Isolation and structural analysis of maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 25–31, 1 set. 1998.

YUAN, H.; ZHU, N. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 429–438, 2016.

ZAIAT, M.; CABRAL, A. K. A.; FORESTI, E. Reator anaeróbico de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. **Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química**, v. 11, p. 33–42, 1994.

ZHANG, B.; ZHANG, L. L.; ZHANG, S. C.; SHI, H. Z.; CAI, W. M. The influence of pH hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. **Environmental Technology**, v. 26, n. 3, p. 329–340, 2005.

ZHANG, D.; FENG, Y.; HUANG, H.; KHUNJAR, W.; WANG, Z. W. Recalcitrant dissolved organic nitrogen formation in thermal hydrolysis pretreatment of municipal sludge. **Environment International**, v. 138, p. 105629, 2020.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; SUZUKI, K.; MAEKAWA, T. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 4, p. 427–433, 2003.

ZHAO, J.; LI, Y.; PAN, S.; TU, Q.; DANG, W.; WANG, Z.; ZHU, H. Effects of magnesium chloride on the anaerobic digestion and the implication on forward osmosis membrane bioreactor for sludge anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 700–707, 1 nov. 2018.

ZHAO, W.; YAN, B.; REN, Z. J.; WANG, S.; ZHANG, Y.; JIANG, H. Highly selective butyric acid production by coupled acidogenesis and ion substitution electro dialysis. **Water Research**, v. 226, p. 119228, 1 nov. 2022.

ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J. W. C.; ZHANG, Y. *Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways*. **Bioresource Technology**. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 jan. 2018



EESC • USP