

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

**VALORIZAÇÃO DA CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE
RESÍDUOS SÓLIDOS E ÁGUAS RESIDUÁRIAS DO
PROCESSAMENTO DE CITROS: PERSPECTIVAS PARA
OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E COMPOSTOS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

DANILO HENRIQUE DONATO ROCHA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Bernadete A. Varesche

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E
SANEAMENTO (PPGSHS)**

DANILO HENRIQUE DONATO ROCHA

**VALORIZAÇÃO DA CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS
E ÁGUAS RESIDUÁRIAS DO PROCESSAMENTO DE CITROS:
PERSPECTIVAS PARA OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E
COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

SÃO CARLOS, SP

2023

DANILO HENRIQUE DONATO ROCHA

**VALORIZAÇÃO DA CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS
E ÁGUAS RESIDUÁRIAS DO PROCESSAMENTO DE CITROS:
PERSPECTIVAS PARA OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E
COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Bernadete A. Varesche

Versão corrigida

SÃO CARLOS, SP

2023

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

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

R672v Rocha, Danilo Henrique Donato
Valorização da co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos e águas residuárias do processamento de citros: perspectivas para obtenção de biocombustíveis e compostos de interesse biotecnológico / Danilo Henrique Donato Rocha; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2023.

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

1. ácidos orgânicos. 2. biocombustíveis. 3. economia circular. 4. hidrogênio. 5. co-digestão anaeróbia. 6. metano. 7. reator leito lixiviado. 8. separação de fases. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **DANILO HENRIQUE DONATO ROCHA**.

Título da tese: "Valorização da co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos e águas residuárias do processamento de citros: perspectivas para obtenção de biocombustíveis e compostos de interesse biotecnológico".

Data da defesa: 04/08/2023.

Comissão Julgadora

Resultado

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

Aprovado

Prof. Dr. **Michel Brienzo**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Rio Claro)

Aprovado

Profa. Dra. **Giovanna Lovato**
(Instituto Mauá de Tecnologia/IMT)

Aprovado

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

Aprovado

Dr. **Lucas Tadeu Fuess**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

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

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

A Deus.

A minha amada companheira, Isabela.

Aos meus pais, Maria e Carlos.

Ao meu irmão, Jean.

*E a todos os professores que impulsionaram
minha caminhada.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, pelas oportunidades que me proporcionou durante toda minha caminhada até aqui, e pelas pessoas que colocou em minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Bernadete A. Varesche, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por toda contribuição, dedicação, disponibilidade, paciência, e confiança.

Ao Prof^o. Dr. Edson (Tininho), pela disponibilidade, e pelas valiosas sugestões e contribuições.

A toda minha família, por toda palavra de apoio, carinho e confiança depositada em mim. Especialmente aos meus pais Maria e Carlos, e ao meu irmão, pelo amor, cuidado, e compreensão, por serem minha referência, e pelo apoio incondicional na minha caminhada até aqui.

À minha amada companheira Isabela, pelo amor, carinho, compreensão, e companheirismo, pela oportunidade de compartilhar muitos momentos felizes, pelo suporte nos momentos difíceis. Sua companhia, com certeza, tornou esta caminhada mais especial.

A todos os colegas do LPB, pela agradável convivência, pelas contribuições, conhecimentos compartilhados, por tornarem a rotina no laboratório um constante aprendizado.

Às técnicas do LPB, Maria Ângela (Janja), Caroline Sabatini (Carol), Isabel Sakamoto (Bel), e Eloísa Pozzi (Elô), pela valiosa ajuda no dia-dia. Ao João, técnico do laboratório do Instituto de Química da UNESP/Araraquara, pelo auxílio nas análises de limoneno.

Aos funcionários das empresas do setor de produção de suco de laranja das cidades de Matão e Araraquara, pela disponibilidade em obter autorização para coleta dos resíduos utilizados no desenvolvimento da pesquisa, e pelo auxílio na realização da coleta.

À Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, pela oportunidade de concretizar mais um sonho.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro via Projeto Temático (2015/06246-7).

Muito Obrigado!

”A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”

Mahatma Gandhi

”Se a ciência é filha da observação e da experiência, estes são em verdade, os processos pelos quais ela deve ser ensinada”

Theodomiro C. Santiago

RESUMO

Rocha, D.H.D. **Valorização da co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos e águas residuárias do processamento de citros: perspectivas para obtenção de biocombustíveis e compostos de interesse biotecnológico.** 2023. 286 p. Tese Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A digestão anaeróbia é uma alternativa promissora para valorização de resíduos sólidos e águas residuárias oriundos da agroindústria de processamento de citros, possibilitando a recuperação energética através da obtenção de biocombustíveis, tais como hidrogênio e metano. A estratégia de co-digestão destes substratos é uma proposta para impulsionar a logística sustentável para o tratamento destes resíduos, e ampliar o potencial de viabilidade técnico-econômica. Entretanto, ainda há uma necessidade por alternativas para superar limitações identificadas, e aspectos que precisam ser melhor elucidados, tais como parâmetros operacionais, configurações de sistema, necessidade de suplementação com nutrientes ou alcalinizantes, e outros. Neste estudo, propõe-se a co-digestão de resíduos sólidos (casca e bagaço) e águas residuárias da agroindústria de citros em uma abordagem de separação de fases, e por meio de ensaios em reatores em batelada obter e avaliar a efetividade de inóculo autóctone fermentativo, identificar variáveis mais significativas para o processo, avaliar estratégias para conduzir a fermentação e a metanogênese de forma eficiente e estável, e otimizar condições operacionais que potencializem a produção de hidrogênio e metano. A perspectiva de um sistema contínuo é proposto com a aplicação da configuração de reator de leito lixiviado, sendo investigados parâmetros operacionais que possibilitem maximizar a degradação dos resíduos sólidos e a recuperação energética. Foi obtido inóculo autóctone pela autofermentação dos resíduos, sendo sua comunidade microbiana caracterizada pela abundância dos gêneros *Olsenella*, *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, entretanto sua aplicação nos ensaios não possibilitou atingir elevada produção de H₂, sendo o maior potencial de produção de 142.5 mL.L⁻¹ e taxa máxima de produção de 29.8 mL.h⁻¹. Avaliando a suplementação do processo com 2,0 g.L⁻¹ de alcalinizantes observou-se aumento no potencial de produção de hidrogênio de 30,2% com a utilização de bicarbonato de sódio e 176,8% com carbonato de cálcio, em comparação ao ensaio controle. A condição otimizada de produção de H₂ obtida foi de 21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL (resíduos sólidos de citros), 3,4 gDQO.L⁻¹ de ARL (água residuária processamento de citros), e 4,5 g.L⁻¹ de CaCO₃, decorrendo em um valor de 0,53 para razão gCaCO₃/gCarboidratos, resultando na produção de 1249,0 mL H₂.L⁻¹. Para o ensaio da condição otimizada de H₂ observou-se abundância relativa de 95% para *Clostridium Sensu Stricto 1* sendo inferida que a via metabólica Clostridial foi predominante, com produção máxima de 2230,8 mg.L⁻¹ de H₂ e 1213,6 mg.L⁻¹ de HAc. Para o segundo estágio do processo não foi identificada inibição pela alta concentração de substrato, nem pela presença de limoneno (1,5 a 5,0 mg.L⁻¹), de forma que menor diluição do conteúdo do reator fermentativo resultou em maior produção acumulada de metano. A condição otimizada para produção de metano foi com 99,3% de CRF (conteúdo do reator fermentativo) e 0,58 gNaCHO₃.g⁻¹DQO, atingindo 6549,7 mLCH₄.L⁻¹, possibilitando remoção de matéria orgânica de 87,1%. Na avaliação do reator de leito lixiviado observou-se redução significativa do conteúdo de RSL do leito fixo do reator, com 79,3% de remoção de sólidos. Máxima produção volumétrica de hidrogênio foi observada em TDH de 12h na fase IV (1609,9 mLH₂.d⁻¹), todavia máximo rendimento de hidrogênio foi obtido em TDH de 24h (104,9 mLH₂.g⁻¹CHO). Os principais metabólitos solúveis observados foram os ácidos caprótico, butírico e acético, e etanol, sendo *Lactobacillus*, *Caproiciproducens*, *Bifidobacterium*, *Olsenella* e *Solobacterium* os microrganismos identificados em maior abundância. Verificou-se portanto que as perspectivas para a valorização dos resíduos da

agroindústria de processamento de citros por meio da co-digestão anaeróbia são positivas, de forma que os resultados obtidos contribuem no desenvolvimento de um modelo de economia circular para a cadeia produtiva de processamento de citros.

Palavras-chave: ácidos orgânicos; biocombustíveis; economia circular; hidrogênio; co-digestão anaeróbia; metano; reator de leito lixiviado; separação de fases.

ABSTRACT

Rocha, D.H.D. **Valorization of Anaerobic Co-Digestion of Solid Waste and Wastewater from Citrus Processing: Perspectives for Biofuel Production and Biotechnological Interest Compounds.** 2023. 286 p. Doctoral Thesis. Hydraulics Engineering and Sanitation – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Anaerobic digestion is a promising alternative for the valorization of solid waste and wastewater from the citrus processing agroindustry, enabling energy recovery by obtaining biofuels, such as hydrogen and methane. The co-digestion of these substrates is a proposal to boost sustainable logistics for waste treatment and to expand the potential of technical-economic feasibility. There is a need for alternatives to overcome identified limitations and aspects that need to be better elucidated, such as operational parameters, system configurations, the need for supplementation, and others. In this study, it is proposed the co-digestion of solid and liquid waste from the citrus agroindustry in a two-phase approach, and through assays in batch reactors to obtain and evaluate the effectiveness of fermentative autochthonous inoculum, identify more significative variables for the process, evaluate strategies for efficient and stable fermentation and methanogenesis, and optimize operational conditions that enhance the production of hydrogen and methane. The perspective of a continuous system is proposed with the application of the leach bed reactor configuration, being investigated operational parameters that allow maximizing the degradation of the solid waste and the energy recovery. The autochthonous inoculum was obtained by the self-fermentation of the waste, and its microbial community was characterized by the abundance of the genera *Olsenella*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium*; its application in the assays did not allow to reach high H₂ production, being the highest P of 142.5 mL.L⁻¹, and R_m of 29.8 mL.L⁻¹.h⁻¹. Evaluating the process supplementation with 2.0 g.L⁻¹ of buffering agents, an increase in hydrogen production of 30.2% was observed with sodium bicarbonate, and 176.8% with calcium carbonate, compared to the control assay. The optimized H₂ production condition obtained was 21.4 gTVS.L⁻¹ of CPW, 3.4 gCOD.L⁻¹ of CPWW, and 4.5 g.L⁻¹ of CaCO₃, resulting in a value of 0.53 for gCaCO₃/gCHO ratio, resulting in the production of 1249.0 mLH₂.L⁻¹. For the assay of the optimized condition of H₂, a relative abundance of 95% was observed for *Clostridium Sensu Stricto 1*, being inferred that the Clostridial metabolic pathway was predominant, with a maximum production of 2230.8 mg.L⁻¹ of H₂Bu and 1213.6 mg.L⁻¹ from HAc. For the second stage of the process, no inhibition was identified by the high substrate concentration, nor by the limonene (1.5 to 5.0 mg.L⁻¹), so that lower dilution of the fermentation reactor content resulted in higher accumulated methane production. The optimized condition for methane production was 99.3% FRC and 0.58 gNaCHO₃.g⁻¹ COD, reaching a production of 6549.7 mLCH₄.L⁻¹, allowing 87.1% of organic matter removal. In the evaluation of the leach bed reactor, a significant reduction in the CPW content of the fixed bed of the reactor was observed, with the removal of up to 79.3%. Furthermore, maximum volumetric hydrogen production was observed in HRT of 12h in phase IV (1609.9 mLH₂.d⁻¹); however, maximum hydrogen yield was obtained in HRT of 24h (104.9 mLH₂.g⁻¹CHO). The main soluble metabolites produced were caproic, butyric, and acetic acids, and ethanol, with *Lactobacillus*, *Caproiciproducens*, *Bifidobacterium*, *Olsenella*, and *Solobacterium* being the microorganisms identified in higher abundance. Therefore, it was found that the prospects for valuing waste from the citrus processing agroindustry through anaerobic co-digestion are positive, and the results obtained contribute to the development of a circular economy model for the citrus processing production chain.

Keywords: anaerobic co-digestion; biofuels; circular economy; hydrogen; leach bed reactor; methane; organic acids; phase separation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Produção acumulada de H ₂ com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios fermentativos do planejamento experimental de Plackett-Burman.	44
Figura 4.2. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção percentual de carboidratos de cada ensaio batelada do planejamento experimental de Plackett-Burman.	49
Figura 4.3. Ácidos orgânicos no início e final de cada ensaio em batelada do planejamento experimental Plackett-Burman.	54
Figura 4.4. Abundância relativa das (a) Famílias and (b) Gêneros, para o inóculo autóctone e ensaio C-7.	59
Figura 4.5. Prováveis vias de conversão dos substratos orgânicos dos resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros em AOVs e H ₂ no reator do ensaio C-7. As abundâncias relativas dos principais gêneros de microrganismos identificados no inóculo autóctone e na amostra do reator C-7 estão representadas pelas setas.	64
Figura 5.1. Ajuste de Gompertz modificado da produção acumulada de H ₂ dos ensaios com diferentes alcalinizantes.	77
Figura 5.2. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos dos ensaios preliminares de avaliação da alcalinização.	80
Figura 5.3. Ajuste de Gompertz modificado da produção acumulada de H ₂ dos ensaios do planejamento experimental.	87
Figura 5.4. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos nos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado.	90
Figura 5.5. Composição percentual dos ácidos orgânicos ao final dos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado.	93
Figura 5.6. Abundância relativa dos gêneros de bactérias para o inóculo, e ensaios A-7 e A-9.	99
Figura 5.7. Possíveis rotas metabólicas e enzimas (circulo oval- EC = Enzyme Commission Numbers) na conversão dos resíduos de citros em H ₂ e ácidos orgânicos e os possíveis microrganismo envolvidos nessas reações, nos ensaios A-7 e A-9. Os valores em mg.L ⁻¹ acima dos metabólitos indicam a sua concentração ao final de cada um dos ensaios.	105
Figura 5.8. Estimativa do potencial de produção de eletricidade a partir da disponibilidade de resíduos sólidos de citros.	107
Figura 6.1. Produção acumulada de H ₂ com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios do DCCR.	120
Figura 6.2. Superfícies de resposta e de contorno do modelo de produção de H ₂ (a) e (b) concentração de CaCO ₃ fixada em 3,8 g.L ⁻¹ ; (c) e (d) concentração de ARL fixada em 4,5 gDQO.L ⁻¹ ; (e) e (f) concentração de RSL fixada em 22,5 gSTV.L ⁻¹	123
Figura 6.3. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos dos ensaios do planejamento experimental.	131
Figura 6.4. Concentração de limoneno para início e final do processo de fermentação em reatores batelada, e remoção de limoneno observada.	132
Figura 6.5. Composição percentual de ácidos orgânicos ao final dos ensaios do planejamento experimental.	133

Figura 6.6. Produção acumulada de H ₂ com ajuste de Gompertz modificado, e perfil de pH, para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H ₂ .	136
Figura 6.7. Perfil temporal da composição dos ácidos orgânicos para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H ₂ .	138
Figura 6.8. Abundância relative dos gêneros de bactérias para os ensaios da condição otimizada de produção de H ₂ (OC-H) e E-10.	142
Figura 6.9. Mapa metabólico simplificado, com as prováveis enzimas (EC) na conversão de resíduos de citros em H ₂ e ácidos orgânicos para a condição otimizada (OC-H) e ensaio E-10 de produção de H ₂ .	146
Figura 7.1. Fluxograma da co-digestão anaerobia em dois estágios de resíduos da agroindústria de citros, para produção de hidrogênio e metano.	154
Figura 7.2. Produção acumulada de CH ₄ com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios do planejamento experimental dos reatores metanogênicos.	163
Figura 7.3. (a) Superfície de resposta e (b) superfície de contorno, para o modelo de produção de CH ₄ ; (c) Superfície de resposta e (d) superfície de contorno, para o modelo de velocidade máxima de produção (R _m); (e) Superfície de resposta e (f) superfície de contorno para remoção de matéria orgânica (rDQO).	166
Figura 7.4. Variação temporal do pH operacional dos ensaios do planejamento experimental.	169
Figura 7.5. Variação temporal da concentração de matéria orgânica nos ensaios do planejamento experimental.	170
Figura 7.6. Alcalinidade intermediária, parcial e total, e relação AI/AP para início e final dos ensaios do planejamento experimental de produção de metano.	176
Figura 7.7. Variação dos metabólitos solúveis ao longo dos ensaios metanogênicos do planejamento experimental.	179
Figura 7.8. Produção acumulada de CH ₄ com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios de validação das condições de otimização.	181
Figura 7.9. Variação temporal para pH operacional e concentração de matéria orgânica para os ensaios de validação das condições otimizadas.	182
Figura 7.10. Perfil de metabólitos solúveis ao longo dos ensaios de validação das condições otimizadas.	183
Figura 7.11. Abundância relative dos gêneros para os Domínios (a) Archaea, e (b) Bacteria, para os ensaios V-1, V-2, e V-3.	188
Figura 7.12. Principais KO inferidas relacionadas a produção de metano, para os ensaios V-1, V-2, e V-3.	195
Figura 7.13. Vias de conversão de resíduos de citros em subprodutos (H ₂ , AOVs e CH ₄) para as condições otimizadas V-1, V-2 e V-3. A cor das setas indicam as etapas de conversão do substrato, e os microrganismos associados a cada etapa estão identificados pelos símbolos (▲■●★).	196
Figura 7.14. Potencial Energético (PE _{CH₄}), Potencial de Geração de Eletricidade (PGE _{CH₄}), e Potencial de Geração de Calor (PGC _{CH₄}) para as condições experimentais dos ensaios V-1, V-2 e V-3.	197
Figura 7.15. Balanço econômico relativo a recuperação energética nos ensaios V-1, V-2 e V-3, incluindo ganhos relativos ao PGE _{CH₄} e PGC _{CH₄} , e custos associados a alcalinização.	199

Figura 8.1. Aparato experimental do RLL acidogênico, operado em modo contínuo.	206
Figura 8.2. Performance do RLL nas diferentes fases operacionais: (a) eficiência da remoção de carboidratos (EC_{CHO} , %), (b) pH operacional.....	214
Figura 8.3. Variação temporal do monitoramento do RLL para (a) eficiência de remoção de carboidratos (EC_{CHO} ,%), (b) pH operacional, (c) Eficiência de remoção de ácido láctico (EC_{HLA} , %).	217
Figura 8.4. Variação temporal do monitoramento do RLL para (a) produção volumétrica ($VPRH$, $mLH_2 \cdot d^{-1} \cdot L^{-1}$), e rendimento de hidrogênio (HY , $mLH_2 \cdot g^{-1} CHO$), (b) composição do biogás (%).	221
Figura 8.5. Performance do RLL de acordo com as diferentes fases operacionais: (a) produção volumétrica ($VPRH$, $mLH_2 \cdot d^{-1} \cdot L^{-1}$), (b) rendimento de hidrogênio (HY , $mLH_2 \cdot g^{-1} CHO$).	222
Figura 8.6. Variação temporal de concentração de AOVs e solventes ao longo da operação do RLL.....	224
Figura 8.7. Composição percentual dos metabólitos solúveis nas fases de operação do RLL.	225
Figura 8.8. Matriz de correlação de Pearson obtida pelo pacote “ <i>corrplot</i> ” no ambiente da linguagem R.....	229
Figura 8.9. Abundância relativa para os gêneros de bactérias, para as amostras LF-II, TL-II, LF-IV, e TL-IV.....	232
Figura 8.10. Vias de conversão dos resíduos sólidos, água residuária de processamento de licor de prensagem de cascas de citros, em H_2 , AOVs e solventes.	237
Figura 8.11. Análise de sensibilidade para PPE_{H_2} em relação a variação do HY	240
Figura A.1. Perfil de pH de ensaios do planejamento experimental de Plackett-Burman com pH inicial 5,0.	280
Figura A.2. Perfil de pH de ensaios do planejamento experimental de Plackett-Burman com pH inicial 8,0.	281
Figura A.3. Curvas de rarefação das sequências do RNAr 16S para as amostras do inóculo autóctone (DR-1) e ensaio C-7 (DR-2).....	281
Figura B.1. Reatores batelada equipados com conjunto de válvulas acopladas.....	283
Figura B.2. Curvas de rarefação das sequências do gene RNAr 16S para as amostras dos ensaios A-7 (FF7) e ensaio A-9 (FF9).....	284
Figura C.1. Curvas de rarefação das sequências do RNAr 16S para as amostras do lodo granular (LD) e ensaios E-10 (DH1), e OC-H (DH0).	285

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Caracterização dos resíduos de laranja in natura e desidratado.....	36
Tabela 4.2. Caracterização da água residuária do processamento de citros.	36
Tabela 4.3. Matriz do desenho experimental de Plackett-Burman para avaliação das variáveis independentes sobre a produção de hidrogênio.....	38
Tabela 4.4. Parâmetros cinéticos e físico químicos dos ensaios em batelada de avaliação de fatores significativos de produção de H ₂	43
Tabela 4.5. Efeitos dos fatores avaliados sobre os parâmetros de respostas da fermentação...46	
Tabela 5.1. Caracterização da água residuária do processamento de citros.	71
Tabela 5.2. Variáveis independentes avaliadas em dois níveis (+1 e -1) e para o ponto central no planejamento experimental de fatorial fracionado (2 ^{k-1}).....	73
Tabela 5.3. Matriz do desenho experimental fatorial fracionado (2 ^{k-1}) das variáveis independentes na produção de hidrogênio.....	73
Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos de Gompertz dos ensaios em reator em batelada de avaliações alcalinizantes.....	78
Tabela 5.5. Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada com diferentes alcalinizantes.	80
Tabela 5.6. ANOVA para efeitos do carbonato de cálcio, RSL, ARL e Lodo no potencial máximo de produção de H ₂	85
Tabela 5.7. Parâmetros cinéticos e de rendimento dos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado para avaliação do efeito de variáveis na produção de H ₂	86
Tabela 5.8. Parâmetros físico-químicos principais do planejamento experimental fatorial fracionado para avaliação do efeito de variáveis sobre a produção de H ₂	88
Tabela 6.1. Variáveis independentes avaliadas nos níveis fatoriais (+1 e -1), axiais (1,68 e -1,68) e para o ponto central no delineamento composto central rotacional (DCCR).....	115
Tabela 6.2. Matriz do planejamento experimental do delineamento composto central rotacional com os níveis codificados e os respectivos valores para cada variável.....	115
Tabela 6.3. Parâmetros cinéticos, rendimento e pH, para os ensaios do DCCR	121
Tabela 6.4. ANOVA para efeitos do CaCO ₃ , RSL, ARL do potencial máximo de produção P, para um intervalo de confiança de 90%.....	122
Tabela 6.5. Parâmetros físico-químicos dos ensaios do DCCR.	129
Tabela 6.6. Condição experimental e principais respostas para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H ₂	136
Tabela 6.7. Comparação entre a produção otimizada de H ₂ de resíduos de citros com outros substratos lignocelulósicos.	139
Tabela 6.8. Índices de diversidade.....	140
Tabela 6.9. Potencial Energético (PE _{H2}), Potencial de Produção de Eletricidade (PPE _{H2}), e demanda de alcalinizante para diferentes condições experimentais de produção de hidrogênio.	147
Tabela 7.1. Caracterização das condições experimentais, e do conteúdo reacional do reator em batelada ao final do primeiro estágio fermentativo.	155
Tabela 7.2. Variáveis independentes avaliadas nos níveis fatoriais (+1 e -1), axiais (+1,41 e -1,41) e para o ponto central no delineamento composto central rotacional (DCCR).....	156

Tabela 7.3. Matriz do planejamento experimental do DCCR com os níveis codificados e seus respectivos valores para cada variável.....	157
Tabela 7.4. Parâmetros cinéticos e percentual de metano no biogás, para os ensaios do planejamento experimental do reator metanogênico.....	162
Tabela 7.5. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO ₃ /substrato do potencial máximo de produção (P), para intervalo de confiança de 90%.....	164
Tabela 7.6. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO ₃ para substrato na taxa máxima de produção de metano R _m , para um intervalo de confiança de 90%.....	164
Tabela 7.7. Parâmetros físico-químicos e operacionais dos ensaios do planejamento experimental de produção de metano.....	173
Tabela 7.8. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO ₃ /substrato na remoção de matéria orgânica solúvel (rDQO _s), para intervalo de confiança de 90%.....	174
Tabela 7.9. Condições experimentais e principais respostas, para os ensaios de validação das condições otimizadas metanogênicas.....	181
Tabela 7.10. Análise comparativa da produção otimizada de CH ₄ com resíduos da agroindústria de citros.....	184
Tabela 7.11. Índices ecológicos do Domínio Archaea e Bacteria.....	185
Tabela 8.1. Caracterização da água residuária do processamento de citros e do licor de prensagem das cascas e bagaço.....	205
Tabela 8.2. Condições operacionais aplicadas ao reator de leito lixiviado (RLL).....	207
Tabela 8.3. Desempenho geral do RLL nas quatro fases operacionais.....	215
Tabela 8.4. Matriz de representação da avaliação estatística comparativa dos principais parâmetros operacionais entre as fases operacionais do RLL.....	226
Tabela 8.5. Índices de diversidade para as amostras analisadas.....	230
Tabela 8.6. Análise energética e econômica para as diferentes fases operacionais avaliadas para o RLL.....	238

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACP – Análise de Componentes Principais
- DA – Digestão Anaeróbia
- AI – Alcalinidade Intermediária
- ANOVA – Análise de Variância
- AOV – Ácidos Orgânicos Voláteis
- AP – Alcalinidade Parcial
- APHA – *American Public Health Association*
- ARL – Água Residuária do Processamento de Laranja
- ASV – Amplicon Sequence Variant
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CC – Remoção de Carboidratos
- CHO – Carboidratos
- CHP – *Combined Heat and Power*
- CoA – Coenzima A
- COV – Carga Orgânica Volumétrica
- CRF – Conteúdo do Reator Fermentativo
- CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor* (Reator de Tanque com agitação contínua)
- DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- DPA – Ácido Dipicolínico
- DQO – Demanda Química de Oxigênio
- EC – *Enzyme Commission Number*
- EESC – Escola de Engenharia de São Carlos
- EIA – Energy Information Administration
- EL – Extrato de Levedura

EPE – Empresa de Pesquisa Energética

ES – Estatisticamente Significativo

EtOH – Etanol

FAB – *Fatty Acid Biosynthesis* (Biossíntese de Ácidos Graxos)

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fd – Ferredoxina

GC - Cromatografia Gasosa

GL – Graus de liberdade

GWP – *Global Warming Potential* (Potencial de aquecimento global)

HAc - Ácido acético

HBu - Ácido butírico

HCp - Ácido capróico

HCt – Ácido Cítrico

HFo – Ácido Fórmico

HIsobu – Ácido Isobutírico

HLac - Ácido láctico

HPr – Ácido Propiônico

HPLC - Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência

HVa – Ácido Valérico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISR – *Inoculum Substrate Ratio* (Razão Inóculo para Substrato)

KO – KEGG Orthology

LAB - Bactérias Ácido Lácticas

LF – Leito Fixo

LPB - Laboratório de Processos Biológicos

LUB - Bactérias utilizadoras de Lactato

MME – Ministério de Minas e Energia

MO – Matéria Orgânica

MSR – Metodologia de Superfície de Respostas

MtOH – Metanol

NADH – Nicotiamida Adenina Dinucleotídeo

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NES – Não estatisticamente Significativo

OCDE - Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico

OFMSW – *Organic Fraction of Municipal Solid Waste* (Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Municipais)

OTU - Unidades Taxonômicas Funcionais

PB – Plackett-Burman

PC – Pontos Centrais

PCI – Poder Calorífico Inferior

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PE – Potencial Energético

PFOR - Piruvato-Ferredoxina Oxidorredutase

PGC – Potencial de Geração de Calor

PGE – Potencial Geração de Eletricidade

PPE – Potencial Produção Eletricidade

QM – Quadrado Médio

RCM – *Reinforced Clostridium Medium* (Meio Clostridial Reforçado)

RLL – Reator de Leito Lixiviado

RNA - Ácido Ribonucleico

RSL - Resíduos Sólidos do Processamento da Laranja

SQ – Soma dos Quadrados

SSF – Sólidos Suspensos Fixos

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

ST – Sólidos Totais

STF – Sólidos Totais Fixos

STR – *Stirred Tank Reactor* (Reator de Tanque Agitado)

STV – Sólidos Totais Voláteis

SV – Sólidos Voláteis

TCD - Detector de Condutividade Térmica

TDH – Tempo de Detenção Hidráulica

TL – Tanque de Lixiviado

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo)

WTE - *Waste-to-energy*

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔG - Energia livre de Gibbs

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

atm - atmosfera (unidade de pressão)

bar - unidade de pressão

g – Gramas

h - Hora

kg - Quilograma

kJ - Quilojoule

MJ – Megajoule

GJ - Gigajoule

kWh - Quilowatt-hora

L - Litro

M - Molar

mg - miligramas

min - Minutos

mL - mililitros

mmol - milomol

R^2 - Coeficiente de determinação

rpm - Revoluções Por Minuto

α - Alfa

β – Coeficiente regressão

λ - Tempo de início da produção de hidrogênio/metano

μ - Crescimento específico

μL - Microlitro

μmax - Velocidade máxima

P - Potencial de produção de hidrogênio/metano

pH - Potencial Hidrogeniônico

Rm - Velocidade máxima de produção de hidrogênio/metano

°Brix - graus Brix

p - Probabilidade de significância

V - Volume

n - número de mols

T - Temperatura

R - Constante universal dos gases

H - Produção acumulada de hidrogênio/metano

Y - Rendimento da produção de hidrogênio

% m/m – Percentagem em massa

e.p – Erro padrão

nm - Nanômetros

H₀ – Hipótese Nula

ng - nanogramas

μL - microlitros

t - toneladas

ΔP – Variação de Pressão

η – Eficiência de Conversão

pKa – Constante de dissociação

US\$ - Dólar Americano

MWh - Megawatt-hora

D – Desejabilidade

d_n – Desejabilidades individuais

fd – fator de diluição

ks – Constante de solubilidade

EC_{CHO} - Eficiência de remoção de carboidratos

EC_{HLa} – Eficiência de remoção de ácido láctico

r – coeficiente de correlação de Pearson

Sumário

RESUMO	9
Sumário.....	24
CAPÍTULO 1	26
Introdução	26
CAPÍTULO 2	29
Objetivos e Hipóteses	29
CAPÍTULO 3	31
Considerações Iniciais	31
.....	32
CAPÍTULO 4	32
Avaliação de fatores significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-fermentação de resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros.....	32
CAPÍTULO 5	67
Efeito da alcalinização para o aumento da produção de hidrogênio sob diferentes concentrações de substrato na co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros	67
CAPÍTULO 6	109
Otimização de parâmetros fermentativos para aumento da produção de hidrogênio: A co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros é uma alternativa interessante para recuperação energética?	109
CAPÍTULO 7	150
Otimização da produção de metano a partir da co-digestão de resíduos da agroindústria de citros em um sistema de dois estágios: Investigação dos efeitos da concentração de matéria orgânica e alcalinização	150
CAPÍTULO 8	201
Co-digestão de resíduos sólidos e líquidos da agroindústria de citros: Efeito do tempo de detenção hidráulica e carga orgânica volumétrica sobre a produção de H ₂ em reator de leito lixiviado em operação contínua	201
CAPÍTULO 9	242
Conclusões Gerais.....	242
CAPÍTULO 10	245
Considerações Finais e Recomendações.....	245
Referências.....	247
Apêndice A.....	280

Apêndice B	283
Apêndice C	285

CAPÍTULO 1

Introdução

Os processos históricos de urbanização e industrialização resultaram em acelerado aumento da demanda por energia, ademais, o contemporâneo desenvolvimento tecnológico tem resultado em projeções de manutenção desta tendência para as próximas décadas. Fontes fósseis de energia como carvão, petróleo, gás natural foram e ainda são a base da matriz energética global, devido a fatores como disponibilidade, custo, segurança energética, e domínio tecnológico. Entretanto, a constatação da necessidade de ações para desacelerar e minimizar as mudanças climáticas tem resultado em políticas e acordos para estabelecimento de metas de redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE), tornando inviável a manutenção deste cenário de intensa utilização de combustíveis fósseis.

Para equacionar a crescente demanda por energia com a necessidade de redução de emissões de GEE a alternativa é o aumento da oferta por fontes renováveis, tais como solar, eólica, hídrica, e também a biomassa. O interesse pela utilização da biomassa tem se tornado maior em razão da ampla diversidade de matérias-primas que incluem cascas, sementes, caroços, polpas, tortas de prensagem, folhas, caules, entre outros. Neste mesmo contexto da biomassa, águas residuárias domésticas e ampla variedade de águas residuárias industriais vêm sendo reconhecidas como valiosos recursos para recuperação de energia em razão de seu conteúdo de matéria orgânica.

Através de tecnologias *Waste-to-energy* (WTE) diferentes resíduos sólidos orgânicos e águas residuárias podem ser convertidos em diversos tipos de produtos bioenergéticos como etanol, metano, e hidrogênio, sendo uma alternativa para alcançar um modelo de economia circular. A digestão anaeróbia (DA) e a fermentação são propostas de tecnologias WTE que vêm sendo utilizadas para promover a recuperação energética a partir da obtenção de biohidrogênio e biometano. Diversos resíduos de matriz lignocelulósica gerados em elevada quantidade no setor agroindustrial têm sido empregados no processo, tais como bagaço de cana-de-açúcar, casca e polpa de café, resíduos de banana, palha de milho, casca de arroz, entre outros, além de águas residuárias de diversos setores industriais como de processamento de alimentos, sucroalcooleiro, petroquímico, e outros.

Inclusos nesta grande diversidade de resíduos com potencial de recuperação energética via processos biológicos de DA e fermentação estão aqueles provenientes de indústrias de processamento de citros. A produção global de frutas do gênero citros é de aproximadamente 150 milhões de toneladas, com a laranja representando cerca de 50% desta produção (FAO, 2019), sendo o Brasil o principal produtor e exportador de produtos oriundos do processamento das laranjas. Cerca de 70% da produção de laranjas é direcionada a indústrias de processamento para produção de sucos, geléias, óleos essenciais, e outros produtos, havendo elevada geração de resíduos sólidos visto que cascas, bagaço, membranas, sementes, correspondem a mais da metade do peso da fruta *in natura* (Calabrò and Panzera, 2018). Destaca-se também que tais indústrias possuem elevada demanda de água em seus diversos processos, além de realizarem a prensagem das cascas visando a redução do volume dos resíduos, resultando na geração de um grande volume de águas residuárias, caracterizadas pelo alto teor de matéria orgânica.

A literatura de referência abordando a obtenção de hidrogênio e metano a partir dos resíduos do processamento de citros pode ser considerada ainda escassa; inúmeras variáveis importantes no desempenho do processo e a experimentação de diferentes configurações de reatores foram até então pouco avaliadas. Nos estudos têm sido focado a avaliação da monodigestão de resíduos sólidos de citros, ou da água residuária, e alguns na co-digestão dos resíduos sólidos de citros com sub-produtos de outras cadeias produtivas como dejetos suínos, ou resíduos de alimentos. Entretanto, a co-digestão dos resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros não tem sido explorada, e portanto maiores informações sobre as potencialidades e limitações em relação à produção de hidrogênio e metano a partir da digestão conjunta destes substratos são necessárias. Destaca-se que promover uma eficiente co-digestão de resíduos provenientes da mesma cadeia produtiva é uma alternativa interessante para atingir uma logística sustentável para o tratamento destes subprodutos, com maior potencial de viabilidade econômica.

Há portanto a necessidade de informações mais consolidadas a respeito do processo de co-digestão anaeróbia destes resíduos, como a delimitação de condições operacionais (pH, concentração de substrato, inóculo, proporção entre substratos, etc), configurações de sistema que maximizem o aproveitamento dos substratos sem separação das etapas fermentativa e metanogênica (único estágio) ou com separação das etapas (dois estágios), e a necessidade de suplementação (alcalinizantes, nutrientes, etc), possibilitando subsidiar a inserção futura desta

alternativa biotecnológica de obtenção de bicompostíveis nas indústrias do setor de processamento de citros. Neste sentido, no presente estudo é proposta a investigação de variáveis significativas da co-digestão destes substratos, baseando-se na avaliação do processo em uma abordagem de dois estágios, visando à otimização destas variáveis operacionais das fases fermentativa e metanogênica de maneira isolada, no intuito de maximizar o rendimento de hidrogênio e metano, proporcionar a manutenção dos processos com adequada estabilidade operacional, e eficiente remoção de matéria orgânica. Ainda, na perspectiva da proposição da separação de fases do processo, avaliar a redução conteúdo de D-limoneno durante o primeiro estágio como estratégia para redução de possíveis efeitos inibitórios para metanogênese. Visando ao ganho de escala propõe-se a aplicação de uma configuração de reator para operação contínua cujas características possibilitam a digestão conjunta de resíduos sólidos e líquidos superando algumas limitações observadas para outras configurações de reatores, obtendo assim uma elevada recuperação energética a partir do biogás, e promovendo uma eficiente degradação do conteúdo de resíduos sólidos de citros.

Sendo assim, busca-se avaliar a co-digestão de resíduos sólidos e águas residuárias da cadeia produtiva de produção de suco de laranja, em uma abordagem de separação de fases em dois estágios i.e., fermentativo e metanogênico, visando elucidar condições operacionais e superar inconvenientes relatados na literatura para o aproveitamento destes resíduos, e estimar o potencial de recuperação energética. Além disso, por meio da identificação da estrutura das comunidades microbianas, compreender o papel das diversas populações de microrganismos no processo, caracterizando as rotas metabólicas predominantes, e correlaciona-las com os rendimentos de hidrogênio e metano.

CAPÍTULO 2

Objetivos e Hipóteses

A hipótese geral do presente estudo é de que a co-digestão dos resíduos da agroindústria de processamento de citros, em um sistema com separação de fases, é uma alternativa tecnicamente viável e adequada para o estabelecimento de um modelo de economia circular nesta cadeia produtiva, considerando um aumento no potencial de produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse biotecnológico.

O objetivo geral é elucidar condições para promover uma eficiente co-digestão anaeróbia dos resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros por meio da otimização de variáveis significativas para os processos fermentativo e metanogênico, caracterizar a comunidade microbiana estabelecida nos reatores, e avaliar o potencial de valorização destes resíduos com base na análise de balanço energético.

Hipóteses e objetivos específicos

Hipótese I: Os resíduos sólidos compostos por casca e bagaço e a água residuária de citros são fonte de microrganismos anaeróbios fermentativos.

Objetivo específico I: Avaliar a obtenção de um consórcio fermentativo autóctone por meio da autofermentação dos substratos.

Hipótese II: Nem todas as variáveis do processo tem efeitos significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-digestão de resíduos de citros.

Objetivo específico II: Obter por meio de um *screening* de variáveis independentes, quais são estatisticamente significativas nas respostas cinéticas de produção de hidrogênio.

Hipótese III: A suplementação com agentes alcalinizantes proporciona maior estabilidade para o processo de fermentação, possibilitando aumento do rendimento de hidrogênio.

Objetivo específico III: Avaliar a utilização de diferentes agentes alcalinizantes, e explorar de forma mais minuciosa o ajuste entre concentrações de alcalinizante e substrato na fermentação.

Hipótese IV: A otimização nas condições operacionais da co-digestão dos resíduos permite obter produção de hidrogênio significativamente superior a condições não-otimizadas.

Objetivo específico IV: Obter condição experimental otimizada para produção de hidrogênio considerando as variáveis identificadas como mais significativas no processo.

Hipótese V: A diluição do conteúdo do reator fermentativo operado em condição otimizada para produção de hidrogênio utilizado como substrato para metanogênese possibilita estabelecer condições para uma eficiente produção de metano.

Objetivo específico V: Avaliar se a diluição do conteúdo do reator fermentativo resulta em condições que proporcionam maior produção de metano e remoção de matéria orgânica na etapa metanogênica.

Hipótese VI: A co-digestão de resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros possibilita a recuperação de uma parcela importante do conteúdo energético contido nestes substratos.

Objetivo específico VI: Avaliar o potencial energético recuperado através da produção de hidrogênio e metano em diferentes condições experimentais.

Hipótese VII: O Reator de Leito Lixiviado operado em modo contínuo é uma alternativa eficiente para a co-digestão de resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros.

Objetivo específico VII: Avaliar a produção de hidrogênio e a eficiência na degradação dos resíduos sólidos do leito fixo do reator, sob diferentes condições operacionais durante as fases de operação.

Hipótese VIII: A alteração das condições operacionais nas quais as etapas fermentativa e metanogênica são conduzidas resulta em alteração significativa das rotas metabólicas predominantes como uma resposta a mudança na estrutura da comunidade microbiana.

Objetivo específico VIII: Caracterizar as comunidades microbianas dos inóculos, de amostras dos reatores em batelada de diferentes condições experimentais fermentativas e metanogênicas, e de distintas fases operacionais e compartimentos do reator contínuo.

CAPÍTULO 3

Considerações Iniciais

O presente trabalho foi estruturado de forma a apresentar seus resultados na forma de cinco artigos científicos independentes, nos quais são abordados aspectos específicos da área de estudo.

Cada artigo científico corresponde a um capítulo principal da tese, e estão organizados da seguinte forma:

Capítulo 4: Primeiro artigo, “Avaliação de fatores significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-fermentação de resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros”.

Capítulo 5: Segundo artigo, “Efeito da alcalinização para o aumento da produção de hidrogênio sob diferentes concentrações de substrato na co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros”.

Capítulo 6: Terceiro artigo, “Otimização de parâmetros fermentativos para aumento da produção de hidrogênio: A co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros é uma alternativa interessante para recuperação energética?”.

Capítulo 7: Quarto artigo, “Otimização da produção de metano a partir da co-digestão de resíduos da agroindústria de citros em um sistema de dois estágios: Investigação dos efeitos da concentração de matéria orgânica e da alcalinização”.

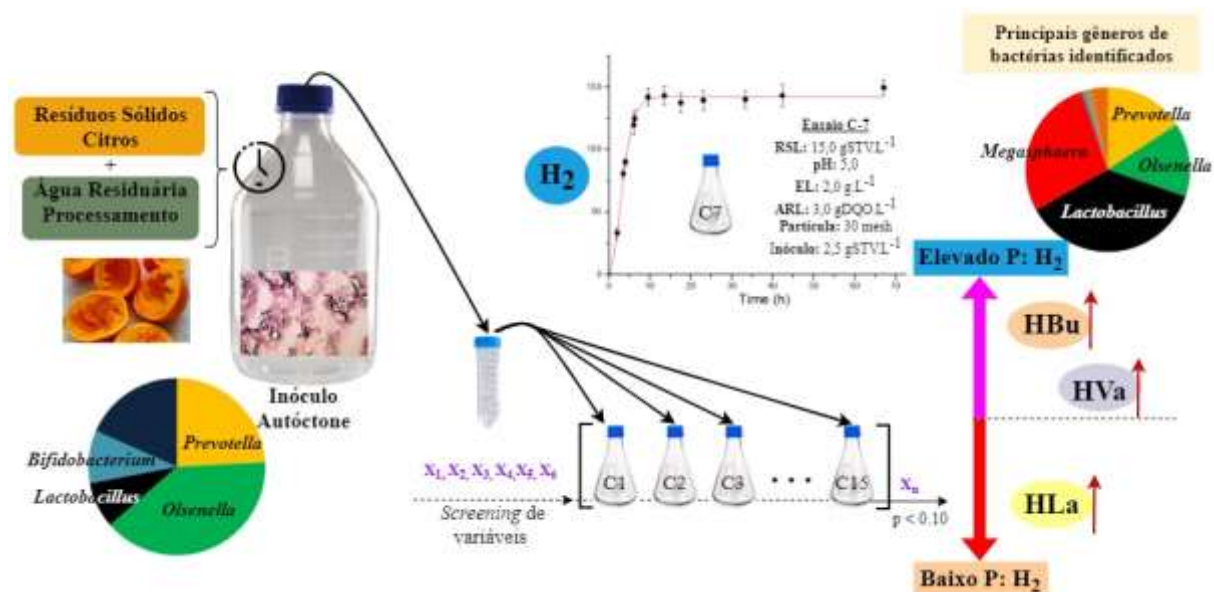
Capítulo 8: Quinto artigo, “Co-digestão de resíduos sólidos e líquidos da agroindústria de citros: Efeito do tempo de detenção hidráulica e carga orgânica volumétrica sobre a produção de H₂ em reator de leito lixiviado em operação contínua”.

O presente trabalho também contempla um capítulo de Introdução para contextualização e justificativas para o desenvolvimento da pesquisa (**Capítulo 1**), a apresentação das hipóteses e objetivos, tanto gerais, como específicos (**Capítulo 2**), a formalização de conclusões gerais acerca dos resultados obtidos (**Capítulo 9**), e considerações finais, recomendações e sugestões para trabalhos futuros (**Capítulo 10**).

CAPÍTULO 4

Avaliação de fatores significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-fermentação de resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros

Resumo: Buscou-se avaliar as variáveis independentes na produção de hidrogênio em co-digestão de resíduos sólidos e água residuária do processamento de laranja com aplicação de inóculo autóctone. Foi empregado o desenho experimental de Plackett-Burman para avaliar o efeito das variáveis pH (5.0 – 8.0), concentração de resíduos sólidos de laranja (5 – 15 gSTV.L⁻¹), concentração de água residuária (1 – 3 gDQO.L⁻¹), extrato de levedura (0 – 2 g.L⁻¹), tamanho da partícula (mesh 10 – 30), e bioaugmentação de inóculo autóctone (0.5 – 2.5 gSTV.L⁻¹). O maior potencial de produção de hidrogênio de 142.5 mL.L⁻¹ e maior taxa máxima de produção de 29.8 mL.h⁻¹ foram obtidos sob as condições de pH 5.0, 15 gTVS.L⁻¹ de resíduos sólidos de laranja, 3 gDQO.L⁻¹ de água residuária, 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura, tamanho de partícula 30 mesh, e bioaugmentação de 2.5 gSTV.L⁻¹. Sob tais condições foram observados os ácidos acético (368.6 mg.L⁻¹), butírico (1181.09 mg.L⁻¹) e valérico (696.4 mg.L⁻¹) como os principais metabólitos ao final da operação dos reatores em batelada. Identificou-se mudança importante na estrutura da comunidade microbiana em termos de abundância relativa entre a biomassa do inóculo autóctone e aquela do final do ensaio de maior produção de hidrogênio, com predominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Olsenella*, e *Prevotella*, sendo a interação metabólica entre bactérias produtoras e consumidoras de ácido láctico identificada como via principal de produção de hidrogênio.



4.1.Introdução

Em função da densidade energética (120,0 MJ/kg), da ordem de duas a três vezes maior que combustíveis de hidrocarbonetos, o gás hidrogênio pode ser utilizado em motores térmicos, em células combustíveis, ou ainda ser aplicado como matéria prima para a síntese de amônia, álcool, aldeídos, e para a hidrogenação de vários produtos de petróleo (Guo et al., 2010; Hu et al., 2013). O hidrogênio de forma geral é produzido 40% através de gás natural, 30% por óleos pesados e nafta, 18% por carvão mineral, e 4% por eletrólise (Das and Veziroglu, 2008); tais processos termoquímicos para produção de hidrogênio utilizando fontes fósseis de energia agregam elevado impacto ambiental ao ciclo de vida do hidrogênio produzido (Boyano et al., 2011; Rocha et al., 2021; Souza et al., 2021).

A alternativa de obtenção de H₂ por meio da fermentação é promissora visto que tal processo é alternativa no que se refere às matérias primas utilizadas, sendo possível empregar águas residuárias, resíduos alimentares, resíduos de animais, além de biomassas lignocelulósicas provenientes de diferentes atividades agroindustriais, cuja utilização depende de sua disponibilidade e abundância local (Akhlaghi et al., 2019; Atelge et al., 2020; Han et al., 2016; Nguyen et al., 2019; Zhou et al., 2013).

Diferentes substratos lignocelulósicos têm sido avaliados para obtenção de biocombustíveis, assim como de outros produtos de interesse biotecnológico, resíduos gerados em elevada quantidade no setor agroindustrial, tais como bagaço de cana-de-açúcar (Rabelo et al., 2018; Soares et al., 2018a), casca e água residuária do processamento de café via úmida (Villa Montoya et al., 2020a), resíduos de banana (Mazareli et al., 2020), palha de milho (Fu et al., 2020; Li et al., 2016), casca de arroz (Sattar et al., 2016), dentre outros, têm despertado interesse em relação à recuperação de energia associada à minimização da magnitude dos problemas relacionados ao estabelecimento de uma logística de descarte sustentável.

Dentre estes substratos estão incluídos aqueles gerados nas indústrias de processamento de laranja para produção de suco. A produção global de frutas, que compreende laranja, limão, laranja lima, tangerina e toranja, é de aproximadamente 150 milhões de toneladas segundo dados da FAO de 2020, e deste total cerca de 75 milhões de toneladas (49,5% do total) correspondem à produção de laranjas. O Brasil é o país mais importante no mercado global da laranja e seus derivados com produção de cerca de 17

milhões de toneladas do fruto, o que representa quase um quarto de toda produção mundial, da qual também fazem parte a China, Índia e EUA (FAO, 2019).

Tem-se considerável produção de resíduos sólidos agroindustriais de laranja, visto que correspondem a mais da metade (50 – 60%) do peso da fruta processada (Calabrò e Panzera, 2018; Zema et al., 2018), e são divididos entre casca (40 – 55%), membranas internas comumente chamadas de bagaço (30 – 35%) e sementes com participação inferior a 10% (Zema et al., 2018). Estima-se que sejam produzidos anualmente 20 – 30 milhões de toneladas destes resíduos (casca e bagaço) (Calabrò et al., 2016; Rosas-Mendoza et al., 2020); uma vez que entre 30 a 50% da produção de laranjas são consumidas frescas, sendo a outra parcela destinada ao processamento.

Além dos resíduos sólidos gerados diretamente da fruta após a extração do suco, há também outro importante e problemático fluxo no processo, que consiste na água residuária gerada em grande quantidade em diversas etapas do processamento, como aquelas referentes às operações de limpeza de máquinas e demais instalações da indústria, do sistema de refrigeração, da etapa de recuperação de óleos essenciais, assim como do processo de prensagem e secagem dos resíduos sólidos (Calabro et al., 2017; Guzmán et al., 2015; Zema et al., 2012). Por meio da caracterização físico-química desses efluentes tem-se significativo teor de matéria orgânica que varia bastante de uma indústria para outra, com demanda química de oxigênio (DQO total) que pode chegar a mais de 40,0 g.L⁻¹; pH ácido (< 6,0); sólidos coloidais em suspensão (hesperidina, pectina) e sedimentáveis (resíduos de polpa e casca) e outros compostos solúveis (açúcares e ácidos) ou insolúveis (óleos essenciais); contendo também químicos alcalinos usados na limpeza de máquinas (Calabro et al., 2017; Guzmán et al., 2015; Karaouzas et al., 2010; Koppa e Pullammanappallil, 2013; Rosas-Mendoza et al., 2020).

A obtenção de hidrogênio a partir dos resíduos do processamento de citros vem sendo avaliada em estudos que empregaram casca e bagaço (Abd-Alla et al., 2018; Camargo et al., 2021a; Camargo et al., 2020a; Mohan et al., 2009), assim como outros com foco na água residuária do processamento (Torquato et al., 2016). Todavia, faltam informações em relação à co-digestão destes resíduos no sentido de avaliar as potencialidades e limitações no que se refere a obtenção de gás hidrogênio. Devido à falta de informação relacionada a utilização conjunta destes substratos, a aplicação de um planejamento experimental para investigar variáveis significativas sobre o processo é interessante para o direcionamento sobre quais

variáveis operacionais, tais como pH, concentração de substrato, inóculo, suplementação de nutrientes, devem ser priorizadas no intuito de otimizar a obtenção de hidrogênio a partir da co-digestão destes substratos. Por exemplo, Villa-Montoya et al. (2019) aplicaram metodologia de design multifatorial para avaliar os parâmetros físico-químicos e biológicos da co-digestão de casca e polpa de café com a água residuária do processamento de café. Sob tal possibilidade, foram identificados o pH, temperatura e headspace como as principais variáveis que afetam o potencial máximo de produção de H_2 (P), assim como para a taxa máxima de produção (Rm). Mazareli et al. (2020) aplicaram o planejamento experimental de Plackett-Burman para avaliar fatores significativos na produção de hidrogênio empregando resíduos de banana, sendo identificados o pH, temperatura e headspace como variáveis que afetaram P de forma estatisticamente significativa.

Neste contexto, foi avaliado neste trabalho o efeito do pH (5,0 – 8,0), concentrações de resíduos sólidos de laranja (5 – 15 gSTV.L⁻¹), água residuária do processamento de laranjas (1 – 3 gDQO.L⁻¹), extrato de levedura (0 – 2 g.L⁻¹), tamanho da partícula (10 – 30 mesh), e bioaugmentação de biomassa autóctone (0,5 – 2,5 gSTV.L⁻¹) em relação aos parâmetros cinéticos de produção de hidrogênio, pela aplicação do desenho experimental de Plackett-Burman, utilizando resíduos sólidos e água residuária do processamento de laranjas como substratos, com o intuito de obter conhecimento sobre o potencial de co-digestão destes resíduos integrantes da mesma cadeia produtiva agroindustrial. Além disso, a estrutura da comunidade microbiana foi caracterizada por meio do sequenciamento dos genes 16S rRNA, sendo também avaliada a predição metabólica predominante na condição de maior produção de hidrogênio.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1 Substratos

Os resíduos sólidos (RSL), cascas e bagaço da laranja *in natura*, foram obtidos a partir da remoção manual do suco e sementes de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio) frescas e maduras. O resíduo seco foi obtido a partir da desidratação do conteúdo *in natura* durante 48h em estufa a 50°C, e posteriormente moído em diferentes granulometrias de partículas (10, 20 e 30 mesh) utilizando moinho de facas tipo Willye (*Modelo SL 32, 1750 rpm – Solab*), sendo posteriormente acondicionados de forma fracionada em frascos plásticos e mantidos a -10°C, devidamente identificados até o momento de sua utilização, conforme

descrito em Calabrò et al. (2016). A caracterização dos resíduos *in natura* e desidratado, em termos de sólidos, umidade e pH, pode ser verificada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização dos resíduos de laranja *in natura* e desidratado.

Parâmetro	In natura	Desidratado
Umidade (% w/w)	76,51	13,41
TS (% w/w)	23,49	86,59
TVS (% TS)	96,26	95,85
TVS (% w/w)	22,61	83,00
Cinzas - TFS (% w/w)	0,88	3,59
pH	-	4,18

TS: Sólidos Totais; TVS: Sólidos Totais Voláteis; TFS: Sólidos Totais Fixos.

A água residuária do processamento de citros (ARL) foi obtida de indústria do setor citrícola, sendo a coleta realizada no período da safra de laranja. A água residuária coletada foi transportada até o Laboratório de Processos Biológicos – LPB EESC/USP acondicionada em frascos plásticos de 20L e imediatamente após a coleta armazenada conforme descrito por Torquato et al. (2016) e mantida a -20°C . A caracterização da água residuária, em termos de sólidos, DQO, carboidratos, fenóis, ácidos e pH, pode ser verificada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Caracterização da água residuária do processamento de citros.

Parâmetro	Valores (mg.L^{-1})^a
pH	6,12
TS	5666,7
TVS	4000,0
SST	913,3
SSV	740,0
DQO bruta	3421,7
DQO Filtrada	2705,0
Carboidratos Bruta	178,3
Carboidratos Filtrada	110,0
Fenóis Totais	240,4
HAc	600,9
HPr	66,9
HBu	169,0
HVa	127,2

^aunidade para todos os parâmetros exceto pH.

4.2.2 Inóculo Autóctone

O consórcio microbiano acidogênico autóctone foi obtido pela autofermentação dos resíduos do processamento da laranja. Foram realizadas montagens de reatores em batelada em Frascos Duran[®] com adição de 5 gSTV.L⁻¹ RSL *in natura*; 2,5 g DQO.L⁻¹ ARL; e 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura; o pH inicial foi ajustado em 6,0 utilizando solução de NaOH 1M. Foram usados frascos de borossilicato de 1,0 L, sendo 500 mL de meio reacional e 500 mL de *headspace* com N₂ (100%). Os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca plástica, e incubados em condições estáticas à 37 °C.

O acompanhamento da produção de hidrogênio foi realizado de forma que o meio reacional fermentado foi substituído sucessivamente quando ocorria a estabilização da produção, de acordo com metodologia de Camargo et al. (2020). O procedimento foi realizado sucessivas vezes até obter elevada densidade de biomassa fermentativa.

A bioaugmentação com inóculo autóctone foi realizada com base nos sólidos totais voláteis (gSTV.L⁻¹), desta forma a alíquota de inóculo que foi tomada para cada ensaio, calculada com base na Eq.1, foi obtida pela relação entre os sólidos totais voláteis e o valor de bioaugmentação desejado em cada ensaio.

$$A_{B,k} = \frac{V_{MR,k} \cdot B_k}{STV_{matriz}} \quad (1)$$

Sendo, $A_{B,k}$ a alíquota (mL) de inóculo utilizada para bioaugmentação de um ensaio k; B_k refere-se a bioaugmentação em gSTV.L⁻¹ estabelecida para o ensaio k; $V_{MR,k}$ é o volume do meio reacional do reator batelada; e STV_{matriz} corresponde aos sólidos totais voláteis (gSTV.L⁻¹) do reator de obtenção do inóculo.

4.2.3 Planejamento Experimental: Ensaios em batelada

Planejamento experimental de Plackett-Burman realizado com 12 ensaios para seis variáveis independentes avaliadas em dois níveis, com adição de três pontos centrais, conforme metodologia apresentada por Rodrigues e Iemma (2014) foi realizado com o intuito de investigar quais fatores são significativos para os parâmetros cinéticos de produção biológica de hidrogênio, assim como, para produção de ácidos orgânicos e parâmetros físico-químicos como consumo de carboidratos e aumento da concentração de fenóis. Os seguintes fatores foram avaliados: pH inicial (5,0 – 8,0), concentrações de resíduos de laranja RSL (casca e bagaço) (5 – 15 gTVS.L⁻¹), concentração de extrato de levedura (sem – até 2 g.L⁻¹),

concentração de água residuária ($1 - 3 \text{ gDQO.L}^{-1}$), tamanho das partículas de resíduos sólidos ($10 - 30 \text{ mesh}$), e bioaugmentação ($0,5 - 2,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$).

O estabelecimento dos valores fixados para cada uma das variáveis nos níveis superior e inferior foi realizado com referência em estudos nos quais foram investigados a produção de hidrogênio via processos fermentativos empregando diferentes substratos lignocelulósicos (Camargo et al., 2019; Chen et al., 2017; Cheng et al., 2019; Fernandes et al., 2010; Mazareli et al., 2020; Soares et al., 2018a; Torquato et al., 2016; Villa Montoya et al., 2020a, 2019). Na Tabela 4.3 está apresentada a matriz do planejamento experimental PB12 usada para avaliar as variáveis independentes.

Tabela 4.3. Matriz do desenho experimental de Plackett-Burman para avaliação das variáveis independentes sobre a produção de hidrogênio.

Ensaio	Variáveis Codificadas						pH Inicial	RSL (g STV L^{-1})	EL (g L^{-1})	ARL (g DQO L^{-1})	Tamanho Partícula (mesh*)	Bioaugmentação (gSTV.L^{-1})
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆						
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,0	5,0	2,0	1,0	30	0,5
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	8,0	15,0	0	3,0	30	0,5
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	5,0	15,0	2,0	1,0	10	0,5
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	8,0	5,0	2,0	3,0	30	2,5
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	8,0	15,0	0	3,0	10	0,5
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	8,0	15,0	2,0	1,0	10	2,5
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	5,0	15,0	2,0	3,0	30	2,5
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	5,0	5,0	2,0	3,0	10	0,5
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	5,0	5,0	0	3,0	10	2,5
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	8,0	5,0	0	1,0	10	2,5
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	5,0	15,0	0	1,0	30	2,5
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5,0	5,0	0	1,0	30	0,5
13	0	0	0	0	0	0	6,5	10,0	1,0	2,0	20	1,5
14	0	0	0	0	0	0	6,5	10,0	1,0	2,0	20	1,5
15	0	0	0	0	0	0	6,5	10,0	1,0	2,0	20	1,5

* mesh 10 (2.00 mm); mesh 20 (0.85 mm); mesh 30 (0.60 mm)

Os ensaios em bateladas foram realizados em frascos Erlenmeyers (500 mL) fechados com tampa de butila e rosca plástica e equipado com válvula com agulha para amostragem de

gás, e válvula acoplada à mangueira para coleta de amostra líquida. O volume de meio reacional foi de 250 mL e *headspace* de 250 mL, preenchido com N₂ (100%). Ao longo dos ensaios amostras gasosas do *headspace* foram coletadas para obtenção dos parâmetros cinéticos de produção de hidrogênio, assim como amostras líquidas, em volume total inferior a 10% do conteúdo reacional, foram coletadas em determinados pontos do ensaio para quantificação dos metabólitos solúveis.

Os reatores em batelada foram mantidos a 37°C e mantidos em *shaker Informs HT – Multitron Pro* a 130 rpm. Os ensaios de cada condição experimental foram conduzidos em triplicatas totalizando 45 reatores.

4.2.4 Análises físico-químicas e cromatográficas

Para o monitoramento e coleta de dados durante os ensaios acidogênicos foram realizadas análises da fração líquida dos reatores batelada, carboidratos solúveis totais (Dubois et al., 1956), demanda química de oxigênio – DQO (APHA/AWWA/WEF, 2012), fenóis totais (Buchanan e Nicell, 1997), sólidos totais voláteis (STV), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), ácidos orgânicos voláteis (Lazaro et al., 2012). As análises de carboidratos, fenóis e DQO foram feitas para amostra filtrada em filtro de seringa com 0,45 µm de diâmetro de poro.

Para o monitoramento da fase gasosa do reator, foi realizada a coleta de amostras de 500 µL de gás do *headspace* utilizando seringa equipada com trava de pressão. A análise da composição do biogás foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC- 2010 equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar CarboxenTM 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco), utilizando como gás de arraste argônio (12 mL.min⁻¹), sendo as temperaturas do injetor, coluna e detector, respectivamente de 220°C, 130°C e 230°C. A pressão (mbar) do *headspace* do reator foi aferida por meio de medidor digital de pressão manométrica antes e após a tomada da amostra de gás para monitoramento das diferenças de pressão, sendo os dados utilizados para quantificação do volume de biogás produzido.

4.2.5 Análise dos dados

Os resultados obtidos por meio das análises experimentais foram ajustados e analisados estatisticamente através do software Minitab[®] 19.1. Para avaliação da significância dos fatores estudados durante o planejamento experimental de seleção de variáveis foi utilizado um nível de significância de 10% (p<0,10), seguindo recomendação de Rodrigues e Iemma

(2014), sendo mais prudente estabelecer este nível de significância em vez de 5%, para evitar erro do tipo I, rejeitando de forma errônea a hipótese nula (H_0).

A partir da composição do biogás obtida através de cromatografia gasosa, o número de mols de hidrogênio e metano foi obtido empregando as curvas de calibração feitas para o cromatógrafo Shimadzu GC- 2010, considerando o volume injetado, assim como o volume do headspace. A quantificação de hidrogênio e metano em volume (mL) foi obtida empregando a equação de estado do gás ideal (Equação de Clapeyron), conforme Eq. 2.

$$p.V = n.R.T \quad (2)$$

Sendo:

p = pressão (atm) do headspace

V = Volume do gás no headspace (L)

n = número de mols do gás no headspace (mol)

T = Temperatura do gás no headspace (K)

R = Constante universal dos gases: 0,0820574587 atm.L.K⁻¹.mol⁻¹

Os dados de produção de hidrogênio e metano acumulada ao longo do tempo de ensaio foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (Eq. 3) utilizando o software OriginPro 8.5[®], obtendo os parâmetros cinéticos conforme descritos a seguir.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Sendo:

H = Produção acumulada de hidrogênio (mL.L⁻¹) no tempo (t)

P = Potencial máximo de produção de hidrogênio (mL.L⁻¹)

Rm = Velocidade máxima de produção hidrogênio (mL.L⁻¹. h⁻¹)

e = 2,718281828

λ = Tempo de início da produção de hidrogênio ou metano (h)

4.2.6 Análise da comunidade microbiana

Amostras do inóculo autóctone e do reator correspondente ao ensaio C7 com maior produção de hidrogênio (P) foram coletadas e transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas em velocidade de 8.000 rpm durante 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e

o pellet de biomassa foi lavado com solução PBSX1 (NaCl 8,2 g.L^{-1} , Na_2HPO_4 1,05 g.L^{-1} , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ 0,35 g.L^{-1}), após nova centrifugação o pellet de biomassa foi armazenado a -20°C . O DNA total foi extraído usando o FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals) seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose (0,8%) e a quantificação ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e a pureza (relação 260/280nm) foi realizada em Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). Em seguida o DNA foi entregue para a empresa GenomeDX – Genética Avançada no Rio de Janeiro, RJ, para a realização do sequenciamento. Os Genes 16S rRNA (Região V3+V4) foram amplificados usando o set de primer 341F - 806R (Yu et al., 2005) com o código de barras. Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando NEBNext Ultra DNA Library Pre ® Kit para Illumina, seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit @ 2.0 Fluorômetro (Thermo Scientific) e sistema Agilent Bioanalyzer 2100. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Illumina. A análise das sequências foi realizada via software Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) (Edgar, 2013). Sequências com $\geq 97\%$ de similaridade foram atribuídas à mesma OTU. Para cada sequência representativa, o software Mothur foi usado na comparação com o banco de dados SSUrRNA do banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) (Wang et al., 2007) para anotação de espécies em cada classificação taxonômica (Limite: 0,8 ~ 1) (Quast et al., 2013) (filó, classe, ordem, família e gênero). Para obter a relação filogenética de todas as sequências representativas de OTUs, foi usado o MUSCLE (Edgar, 2004) (Versão 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>). As sequências foram depositadas na base de dados NCBI sob código de acesso PRJNA907021. A predição metabólica do processo foi realizada com base nos grupos de microrganismos identificados pela análise do sequenciamento dos genes 16S rRNA e metabólitos detectados, utilizando como ferramenta os bancos de dados BRENDA (BRENDA Enzyme Database, 2022) e KEGG (KEGG Pathway Database, 2022).

4.3. Resultados e Discussões

4.3.1 Parâmetros cinéticos da produção de hidrogênio

Para obtenção de fatores significativos que influenciam nos parâmetros cinéticos de produção de hidrogênio foram avaliadas seis variáveis independentes, sendo elas pH inicial, concentração de resíduos sólidos de citros, concentração de água residuária da indústria do processamento de citros, concentração de extrato de levedura, bioaugmentação de inóculo autóctone, e tamanho da partícula dos resíduos sólidos de citros, através da aplicação de um planejamento experimental de Plackett-Burman.

No ensaio C-12 não foi observada produção relevante de H_2 que permitisse realizar o ajuste de Gompertz para obter os parâmetros cinéticos. Vale destacar que tal ensaio foi conduzido em condições de nível inferior (-1) para todas as variáveis analisadas (Tabela 4.3), ou seja, trata-se de uma condição extrema onde houve baixa adição de substrato ($5,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL e $1,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL), sem adição de nutrientes advindos do extrato de levedura, bioaugmentação ($0,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$), e pH ácido (5,0). Sob tais condições é possível inferir que o efeito do nível inferior de cada uma das variáveis pode não representar limitação na produção de hidrogênio, mas a combinação das variáveis neste nível torna a condição limitante.

Os parâmetros cinéticos de produção de hidrogênio como potencial máximo de produção (P), velocidade máxima de produção (R_m) e tempo para início da produção (λ), assim como o rendimento (Y), foram obtidos para cada um dos demais ensaios e podem ser verificados na Tabela 4.4. Em relação ao tempo de início de produção de H_2 observou-se entre 0,9 e 31,5 h. No ensaio C-7 (pH inicial 5,0, 15 gSTV.L^{-1} de RSL, 2 gSTV.L^{-1} de EL, 3 gDQO.L^{-1} de água residuária, bioaugmentação de $2,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ e granulometria do RSL 30 mesh) obteve-se o menor tempo para início de produção, cuja estabilização da produção de hidrogênio (Figura 4.1), ocorreu por volta de 10 a 12 h após o início da fermentação.

Tabela 4.4. Parâmetros cinéticos e físico químicos dos ensaios em batelada de avaliação de fatores significativos de produção de H_2 .

Ensaio	P mL.L ⁻¹	Rm mL.L ⁻¹ .h ⁻¹	λ h	Y ₁ mL.g ⁻¹ CHO	Final pH	Carboidratos mg.L ⁻¹			Fenóis mL.g ⁻¹	
						Inicial	Final	Remoção	Inicial	Final
C-1	64,6	2,99	10,1	80,2	4,91	920,0	115	87,5%	194,1	435,5
C-2	84,0	15,48	2,9	25,7	4,86	3633,3	363,3	90,0%	761,1	909,2
C-3	76,0	1,41	2,2	90,9	4,49	1733,3	896,7	48,3%	388,9	976,7
C-4	52,9	16,46	3,3	35,4	5,53	1666,7	170	89,8%	411,1	666,4
C-5	57,9	4,77	8,4	39,8	4,82	1716,7	263,3	84,7%	481,5	1111,2
C-6	81,3	14,03	3,0	51,3	4,59	1770,0	186,7	89,5%	453,9	1557,7
C-7	142,5	29,81	0,9	54,1	4,71	3616,7	980	72,9%	703,1	1073,5
C-8	40,6	7,89	7,5	47,6	4,98	950,0	96,67	89,8%	256,8	498,2
C-9	28,7	8,53	1,5	52,7	4,85	603,3	58,33	90,3%	296,5	628,1
C-10	67,5	1,75	31,5	124,2	4,78	713,3	170	76,2%	213,2	602,1
C-11	85,9	15,4	3,2	37,6	4,42	3066,7	780	74,6%	501,3	890,0
C-12	-	-	-	-	4,01	1153,3	175	84,8%	258,3	583,9
C-13	54,7	2,75	15,2	29,7	4,80	2026,7	183,3	90,9%	437,1	982,0
C-14	64,0	2,66	15,9	41,8	4,79	1706,7	176,8	89,6%	396,2	897,7
C-15	55,7	2,98	15,2	32,9	4,86	1853,3	160	91,4%	398,8	1012,5

Em relação ao ensaio C-10 observou-se o maior valor de λ , sendo de 31,5h e produção máxima acumulada em 70h, quando houve a estabilização. Tal ensaio foi conduzido em pH inicial 8,0, 5 gSTV.L⁻¹ de RSL, sem adição de extrato de levedura, 1 gDQO.L⁻¹ de água residuária e bioaugmentação de 2,5 gSTV.L⁻¹, e granulometria de RSL 10 mesh. Entre os ensaios com extremos de maior e menor tempo para início da produção verifica-se que as condições estabelecidas são contrárias para cinco dos 6 parâmetros avaliados, sendo apenas a bioaugmentação de 2,5 gSTV.L⁻¹ comum entre elas. Entretanto, de forma geral, verificou-se estatisticamente que nenhuma das variáveis analisadas foi significativa para influenciar a variação do tempo de início de produção de H_2 .

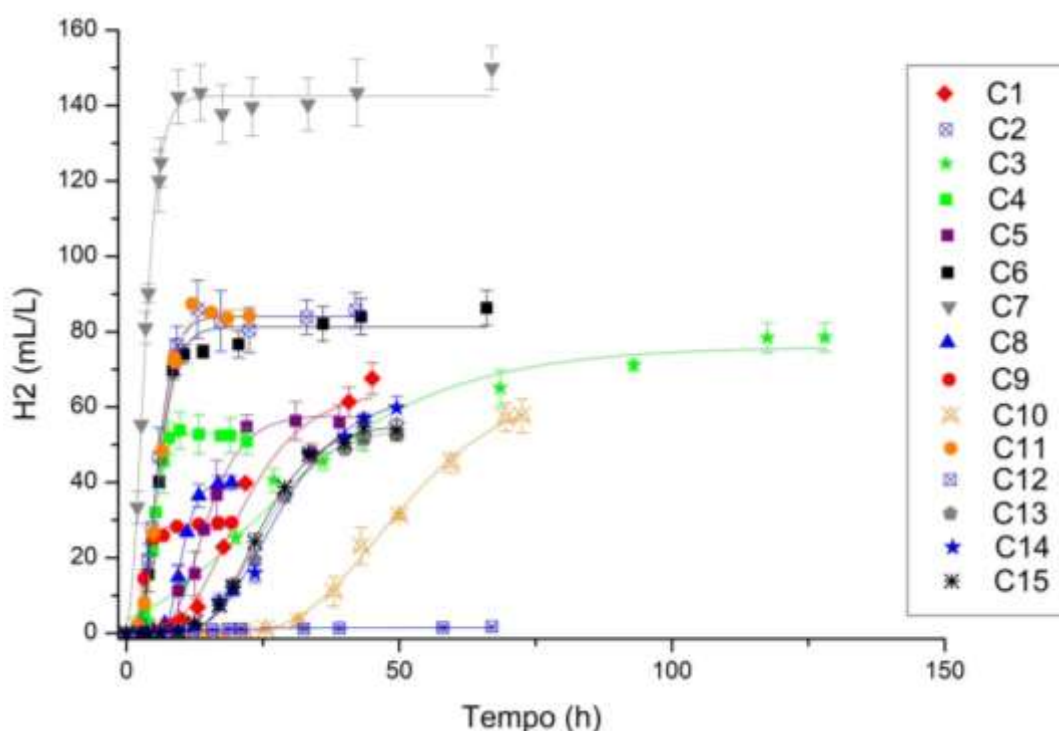


Figura 4.1. Produção acumulada de H_2 com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios fermentativos do planejamento experimental de Plackett-Burman.

Wongthanate et al. (2014) constataram em ensaios com reatores em batelada para produção de hidrogênio com água residuária e resíduos sólidos de indústrias de processamento de alimentos e bebidas com 1,0 a 20,0 g DQO.L⁻¹, que a variação do pH inicial de 4,5 a 7,0 foi significativa para início da produção de hidrogênio, com valor médio de λ de 8h. Mazareli et al. (2020) obtiveram tempo para início de produção de 2,6 a 9,8h para a fermentação de resíduos de banana, sendo que maiores valores de λ foram verificados em reatores com pH 7,5, em comparação aos ensaios com pH 5,5. Kim et al. (2011) verificaram em ensaios fermentativos de resíduos de alimentos em reatores em batelada impacto importante do pH no tempo de início de produção, sendo o menor tempo (4h) observado para valores de pH 7,0 e 8,0, e maior (mais de 10h) para pH 5,0. Nestes diferentes estudos foi verificado um padrão de variação de λ em resposta à modificação do pH. Todavia, para as condições do presente trabalho com resíduos de citros não foi observada uma resposta direta em relação a variável pH e valores de λ , não havendo, portanto, padrão único em relação as repostas, uma vez que as demais variáveis experimentais impostas podem ter exercido maior importância neste sentido.

Camargo et al. (2020a) verificaram que a concentração de substrato foi avaliada como variável significativa em relação ao tempo de início de produção de H_2 em ensaios

fermentativos com resíduos sólidos de laranja, de forma que maior concentração de substrato (15 gSTV.L⁻¹) esteve associada a maior λ , em relação a ensaios com menor concentração de substrato (5 gSTV.L⁻¹). No presente estudo apesar da concentração de substrato não ter sido verificada como uma variável significativa para λ ($p=0,208$ e $p=0,322$, para concentração de RSL e ARL, respectivamente), resposta mais rápida em relação à produção de hidrogênio esteve associada ao nível superior (+1) de concentração de substrato (RSL 15 gSTV.L⁻¹ e ARL 3 gDQO.L⁻¹), provavelmente associado a maior disponibilidade de carboidratos solúveis no meio.

Em relação ao potencial máximo de produção (P) observou-se valores entre 28,7 a 142,5 mL.L⁻¹. No ensaio C-7 foi observada maior produção 142,5 mL.L⁻¹ (Figura 4.1), enquanto nos ensaios C-2, C-6 e C-11 observou-se valores intermediários, com P de aproximadamente 80 mL.L⁻¹. No ensaio C-9 obteve-se o menor valor (28,7 mL.L⁻¹) dentre os ensaios em que houve produção. Para o caso dos ensaios C-2, C-6 e C-11 nos quais verificou-se valores intermediários semelhantes para P , a concentração de resíduos sólidos no nível superior (15 gSTV.L⁻¹) foi a única condição em comum entre estes três ensaios, também comum ao ensaio C-7, no qual obteve-se o maior valor para P . O maior P obtido em C-7 em relação aos ensaios C-2, C-6 e C-11, é provável ser decorrente principalmente da diferença de pH do ensaio C-7 (pH 5,0) para C-2 e C-6 (pH 8,0), e da ausência de adição de EL e menor concentração de ARL (1,0 gDQO.L⁻¹) em C-11, sendo estas as principais diferenças entre as condições experimentais.

A produção média de H_2 nos ensaios dos pontos centrais (C-13, C-14 e C-15) foi de $58,1 \pm 5,1$ mL.L⁻¹. Em relação a resposta P verificou-se que a curvatura no ponto central não foi significativa ($p > 0,10$). Sendo assim, a definição dos níveis estabelecidos para as variáveis no presente estudo foi adequada ao modelo de primeira ordem, conforme descrito por Rodrigues e Iemma (2014), uma vez que a avaliação da resposta no ponto central permite inferir se a definição dos níveis foi adequada através da verificação da existência de curvatura nesta região.

Em relação à resposta P verificou-se que a concentração de RSL foi a única variável independente estatisticamente significativa ($p=0,010$) (Tabela 4.5). Nos ensaios C-2, C-3, C-5, C-6, C-7 e C-11 conduzidos com 15 gSTV.L⁻¹ de resíduos sólidos foi verificada produção de H_2 significativamente superior, em relação aqueles com 5 gSTV.L⁻¹.

Camargo et al. (2020a) também aplicaram resíduos sólidos de citros como substrato e obtiveram maior produção de hidrogênio ($13,29 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, cerca de $297,0 \text{ mL H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) em condição experimental com $15 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração de substrato também foi relevante para produção de hidrogênio em estudos que empregaram outros tipos de substratos lignocelulósicos, como por exemplo, para resíduos de sorgo. Antonopoulou et al. (2011), verificaram para $9,89$ a $20,99 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de carboidratos, máxima produção de H_2 ($2,93 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e $8,81 \text{ LH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{sorgo}$) com $17,50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sorgo. Nos estudos reportados a concentração de resíduos também é observada como estatisticamente significativa, cuja melhor resposta em relação à produção de hidrogênio foi semelhante ao presente estudo, conduzido com $15 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ de RSL. Provavelmente, para as diferentes condições experimentais, a concentração de substrato é variável fundamental na produção de H_2 .

O pH inicial é um fator muito importante na condução do processo fermentativo, de acordo com Lee et al. (2010), embora a faixa desejável de produção de hidrogênio seja entre 4,5 a 6,5, e valores de pH abaixo desta faixa podem originar inibição da atividade das hidrogenases (Mota et al., 2018). O pH avaliado na faixa entre 5,0 a 8,0 não foi significativo na produção de hidrogênio (Tabela 4.5). Todavia, nas condições do ensaio C-7 cuja produção de H_2 ($142,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) foi mais favorecida em relação aos demais ensaios foi conduzida em pH inicial 5,0. Para os demais ensaios foram observados valores similares para P em diferentes valores de pH. Por exemplo, para os ensaios C-2 (pH 8,0) e C-11 (pH 5,0) o valor de P foi de 84,0 e 85,9 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4.5. Efeitos dos fatores avaliados sobre os parâmetros de respostas da fermentação.

Variáveis	P	Rm	λ	RC	FN	HAc	HBu
pH inicial (X_1)	NES	NES	NES	NES	NES	NES	NES
Concentração RSL (X_2)	$\uparrow X_2$ $\uparrow P$	$\uparrow X_2$ $\uparrow Rm$	NES	NES	NES	NES	$\uparrow X_2$ $\uparrow HBu$
Concentração EL (X_3)	NES	$\uparrow X_3$ $\uparrow Rm$	NES	NES	NES	NES	$\uparrow X_3$ $\downarrow HBu$
Concentração ARL (X_4)	NES	$\uparrow X_4$ $\uparrow Rm$	NES	NES	$\uparrow X_4$ $\downarrow PHI$	$\uparrow X_4$ $\downarrow HAc$	NES
Tamanho Partícula (X_5)	NES	$\uparrow X_5$ $\downarrow Rm$	NES	NES	$\uparrow X_5$ $\uparrow PHI$	$\uparrow X_5$ $\uparrow HAc$	NES
Bioaugmentação (X_6)	NES	$\uparrow X_6$ $\uparrow Rm$	NES	NES	NES	NES	NES

\uparrow Aumento; \downarrow Redução; NES: Estatisticamente não significativo; RC: Remoção de carboidratos; FN: Aumento Fenóis; HAc: Ácido Acético; HBu: Ácido Butírico.

Em contraste com os resultados obtidos neste estudo em relação ao pH, Camargo et al. (2020a), verificaram para resíduos sólidos de citros, que o pH foi fator significativo para P ,

cujos maiores valores foram obtidos em pH 8,5. Além disso, os autores realizaram a condição otimizada em pH 8,98 (Camargo et al., 2021a). Provavelmente, a diferença na faixa de pH observada no presente estudo, sendo observado maior P para pH 5,0, e aquela verificada por Camargo et al. (2021a; 2020a) está relacionada com a utilização de água residuária, diferente suplementação nutricional, e principalmente inóculo distinto no primeiro caso experimental.

Para a velocidade máxima de produção de hidrogênio (R_m) foram obtidos valores entre 1,4 a 29,8 mL.L⁻¹.h⁻¹. Assim como foi observado para P , no ensaio C-7 foi observado o maior valor de R_m (29,8 mL.L⁻¹.h⁻¹), sendo muito superior ao verificado para os demais ensaios. Sob tais condições foi visualizado graficamente uma exponencial de produção de H_2 muito acentuada (Figura 4.1), que conduziu à estabilização da produção apenas 10 horas após o início do ensaio. Para os ensaios C-2, C-4, C-6 e C-11 também se observou maiores valores de R_m de 15 mL.L⁻¹.h⁻¹, todavia, duas vezes inferior àquele valor observado em C-7.

Em relação ao tamanho da partícula do RSL foi verificado efeito significativo em relação a R_m ; o fracionamento das partículas em 30 mesh, menor granulometria de partícula utilizada, induziu significativamente a maiores valores de R_m . Provavelmente, menor tamanho de partícula do resíduo sólido favoreceu metabolização positiva pelos microrganismos propiciando maior R_m . A redução do tamanho das partículas promoveu maior solubilização imediata dos carboidratos solúveis disponíveis, além de proporcionar maior superfície de contato para ataque microbiano hidrolítico disponibilizando mais rapidamente carboidratos inicialmente insolúveis. Izumi et al. (2010) destacam que ao mesmo tempo que a redução do tamanho da partícula é benéfico no sentido de acelerar a etapa de hidrólise e acidogênese, pode ser prejudicial à estabilidade do sistema promovendo rápida e elevada acumulação de ácidos orgânicos. Entretanto, no presente estudo não foram verificados problemas relacionados a acumulação de ácidos orgânicos e inibição do processo em decorrência do menor tamanho de partícula, visto que os ensaios com maior produção de hidrogênio foram conduzidos com partículas 30 mesh. Yuan et al. (2011) também verificaram influência do tamanho da partícula do talo de trigo na produção de hidrogênio e obtiveram maior R_m para menor tamanho de partícula do resíduo sólido.

O menor valor de R_m foi verificado no ensaio C-3, sendo de apenas de 1,4 mL.L⁻¹.h⁻¹, em 120 h de operação. Os maiores valores de R_m foram observados nas condições com menor tamanho da partícula (30 mesh), sendo este o principal fator comum entre eles; além disso, o menor valor de R_m foi observado com maior tamanho de partícula (10 mesh). O valor

de R_m nos ensaios dos pontos centrais (C-13, C-14 e C-15) foi de $2,8 \pm 0,2 \text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, cujo tamanho de partícula foi de 20 mesh.

Dentre as 6 variáveis independentes analisadas, cinco delas foram significativas em relação a R_m , a saber: RSL ($p=0,002$), EL ($p=0,019$), ARL ($p=0,001$), tamanho da partícula ($p=0,002$) e bioaugmentação ($p < 0,001$). Dentre todas estas variáveis, o maior efeito (8,9) sobre R_m , foi verificado para a bioaugmentação. Assim sendo, o valor R_m de $14,3 \pm 9,3 \text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ foi observado com bioaugmentação de $2,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ (nível superior +1), e de forma geral superior àquele observado com bioaugmentação de $0,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ (nível inferior -1), cujo valor foi de $5,4 \pm 5,6 \text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. É provável, portanto, que no presente estudo, os maiores valores para R_m obtidos nos ensaios com maior bioaugmentação estão relacionados à maior disponibilidade de microrganismos associados com a conversão dos resíduos de citros, uma vez que se trata de um consórcio autóctone adaptado. Argun e Dao (2016) também observaram maiores valores de R_m à medida que houve aumento da bioaugmentação, resultado este que associaram a melhora na hidrólise dos resíduos de polpa de pêssego.

Da mesma forma que baixas concentrações de inóculo podem limitar a produção de hidrogênio, maior adição de inóculo pode resultar em redução drástica de pH pela rápida produção de ácidos orgânicos voláteis afetando negativamente a produção de H_2 (Argun e Dao, 2016). Tal limitação do processo devido à maior concentração de biomassa microbiana não foi observada, visto que para a faixa em que a bioaugmentação foi avaliada não se verificou inibição da produção de hidrogênio em decorrência de possível desequilíbrio entre concentração de substrato e microrganismos. A partir desta consideração, para os ensaios conduzidos no nível superior desta variável, com adição de $2,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de inóculo houve produção de hidrogênio de $28,7$ a $142,5 \text{ mL.L}^{-1}$, para C-2 e C-7, respectivamente. Desta forma, pode-se inferir que a bioaugmentação como de fundamental importância para o processo, pode ser investigada para valores além de $2,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ visando promover condições ainda mais favoráveis para obtenção de hidrogênio.

Em relação à concentração de extrato de levedura (X_3) identificou-se efeito positivo significativo em relação a R_m . Moura et al.(2020) identificaram o extrato de levedura como uma variável significativa ao realizaram um *screening* dos componentes no meio de cultura RCM no intuito de obterem condição otimizada para produção de hidrogênio, sendo observado $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura como concentração ótima. Soares et al. (2018a) também observaram que adição de $2,77 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura foi favorável a maior P

(1,50 mmol $H_2.L^{-1}$) a partir de bagaço de cana de açúcar. No presente trabalho, a maior produção de hidrogênio foi obtida com 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, valor este intermediário ao reportado nos estudos mencionados.

4.3.2 Parâmetros físico-químicos

Em relação à concentração inicial de carboidratos solúveis foi possível verificar relação significativa ($p < 0,10$) para as variáveis, concentração RSL (X_2), concentração ARL (X_4) e tamanho da partícula (X_6). A disponibilidade inicial de carboidratos observada foi de 600 mg.L⁻¹ (C9) a 3600 mg.L⁻¹ (C2 e C7) (Figura 4.2). Tanto, a concentração de RSL, como ARL obviamente impactaram no aumento do aporte de substrato.

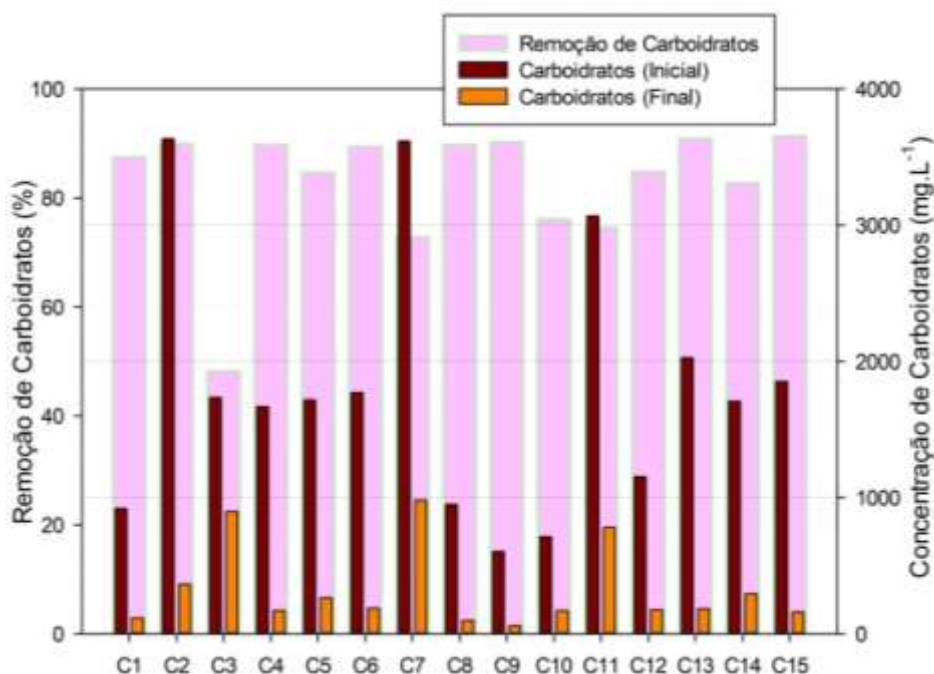


Figura 4.2. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção percentual de carboidratos de cada ensaio batelado do planejamento experimental de Plackett-Burman.

Os ensaios com maior concentração inicial de carboidratos C-2, C-7 e C-11, foram também aqueles com maior P , enquanto o ensaio com menor concentração foi aquele com menor P . Esta tendência também foi observada por Rabelo et al. (2020) em ensaios fermentativos com glicose e celulose. Os autores obtiveram maior P (162,4 mL H_2) em ensaio com maior concentração inicial de açúcares solúveis (7,0 g.L⁻¹).

De forma geral observou-se consumo de carboidratos de $83,3 \pm 11,5\%$, sendo muito próximo ou superior a 90,0% em oito ensaios, sendo eles C-2, C-4, C-6, C-8, C-9, e pontos centrais (C-13, C-14 e C-15), todavia bem inferior a C-3, cuja porcentagem observada foi de apenas 48,3%. Apesar de observada variação importante no consumo de carboidratos para

alguns dos ensaios, nenhuma variável avaliada foi estatisticamente significativa em relação a este parâmetro para significância de 10%, uma vez que condições experimentais antagônicas resultaram em consumo de carboidratos semelhantes, não sendo, portanto, estabelecida uma correlação das variáveis com esta resposta experimental.

Nos ensaios C-8, C-9 e C-12 foi verificado maior consumo de carboidratos, superior a 85%, apesar da observação de baixa ou inexistente produção de hidrogênio, tais informações suportam a ideia de que houve predominância de reações metabólicas de conversão do substrato em vias desfavoráveis àquela de produção de H_2 .

O padrão de consumo dos carboidratos nos ensaios de uma forma geral se caracteriza por atingir uma elevada conversão já nas primeiras 10h, caracterizando um rápido decaimento da concentração do substrato inicialmente disponibilizado. Provavelmente, o processo prévio de reativação da biomassa autóctone adaptada ao substrato e usado na bioaugmentação dos reatores possibilitou rápido *start-up* do processo fermentativo. Exceção foi verificada para o ensaio C-10 no qual houve maior tempo para início da utilização do substrato, próximo de 30h. Akhlaghi et al. (2019) identificaram rápido consumo de carboidratos nas primeiras horas em ensaios em reatores em batelada com resíduos de alimentos. Ao avaliar os perfis temporais de consumo de carboidratos, produção de H_2 e AOVs do presente estudo observou-se correspondência entre eles, sendo de uma forma geral obtidos valores de λ inferiores a 10h, período no qual foi observado rápido consumo de carboidratos. Todavia, no ensaio C-10, não foi observado comportamento padrão de rápida remoção dos carboidratos, sendo identificado o maior tempo para início da produção de H_2 , cerca de 30h.

Baseado na remoção de carboidratos ($g.L^{-1}$) e P foi calculado o rendimento (Y_1 , mL $H_2.g^{-1}CHO$) de utilização do substrato. O rendimento (Y_1) considerando todos os ensaios com produção de hidrogênio foi de $53,1 \pm 29,7$ mL $H_2.g^{-1}CHO$, com valores extremos de 124,2 mL $H_2.g^{-1}CHO$ para o ensaio C-10 e 25,7 mL $H_2.g^{-1}CHO$ para o ensaio C-2. O maior rendimento verificado em C-10 decorre do P ($67,5$ mL.L $^{-1}$), acima da média geral em relação aos demais ensaios ($63,9$ mL.L $^{-1}$), obtido em uma condição experimental de baixa disponibilidade inicial de carboidratos ($713,3$ mg.L $^{-1}$) que resultou no menor consumo absoluto de carboidratos dentre todos os ensaios (540 mg.L $^{-1}$), de forma que para menor concentração de substrato favoreceu a ocorrência de vias metabólicas relacionadas a produção de H_2 , entretanto limitou a maior produção acumulada.

Em contrapartida em C-2 no qual foi identificado P ($84,0 \text{ mL.L}^{-1}$), também acima da média geral dos ensaios, verificou-se o menor Y_1 . Isto decorreu do fato que este foi o ensaio com maior disponibilidade inicial de carboidratos ($3633,3 \text{ mg.L}^{-1}$) e maior consumo absoluto (3270 mg.L^{-1}). Provavelmente, este baixo rendimento está associado a ocorrência em maior importância de outras vias metabólicas fermentativas nas quais não se verifica produção de hidrogênio, ou ainda daquelas em que ocorre o consumo de H_2 . No ensaio C-7 foi observado apenas $54,0 \text{ mL } H_2.g^{-1}CHO$, apesar de ter sido verificado para este ensaio o maior valor de P ($142,5 \text{ mL.L}^{-1}$). Tal fato, decorre da elevada concentração inicial e consumo absoluto de carboidratos (2640 mg.L^{-1}), assim como foi avaliado em C-2, pressupondo-se que ensaios para otimização da produção de H_2 avaliando diferentes concentrações de substrato podem resultar em significativo aumento de P e Rm .

Nenhuma das variáveis avaliadas no presente estudo foi identificada como significativa em relação ao rendimento Y_1 . Entretanto, vale destacar que a concentração de substrato é apontada por Cappai et al. (2015), como fator importante que influencia no rendimento de H_2 , uma vez que a formação de produtos está muito associada a disponibilidade de substrato. Portanto, quando a concentração não é ajustada decorrem problemas de limitação na transferência de massa, acúmulo de ácidos orgânicos, inibição dos microrganismos produtores de hidrogênio, levando ao fato de que a máxima produção de hidrogênio não pode ser atingida, comprometendo o rendimento.

A partir da consideração de que todo conteúdo de carboidratos solúveis disponível no início dos ensaios seja composto de hexoses foi calculado o rendimento da produção de hidrogênio em mol de H_2 por mol de hexoses consumidas ($\text{mol } H_2/\text{mol hexose}$). Para tanto, foi verificado rendimentos de 0,11 a 0,96 mol $H_2/\text{mol hexose}$, sendo observado nos ensaios C-11 e C-3 o menor e maior rendimento, respectivamente. No presente estudo os valores de rendimentos observados foram baixos, tomando como referência o limite teórico de Thauer; ou seja, de 4 mol $H_2/\text{mol hexose}$ (Hallenbeck, 2005). Os rendimentos observados nos ensaios foram de 3% a 24% deste limite teórico. Entretanto, os valores observados são comparáveis a resultados de outros estudos reportados na literatura, como por exemplo, de 0,36 a 1,45 mol $H_2/\text{mol hexose}$ obtido por Akhlaghi et al. (2019) com resíduos de alimentos, De Gioannis et al. (2014) que obtiveram 0,04 a 2,6 mol $H_2/\text{mol lactose}$ utilizando soro de queijo, e Cappai et al. (2015) que obtiveram rendimento máximo de 0,59 mol $H_2/\text{mol hexose}$ com resíduos de alimentos.

Na produção de hidrogênio em reatores em batelada o pH inicial pode ser diferenciado em relação ao pH operacional, que corresponde ao pH verificado ao longo do processo, de forma que o pH inicial tem maior importância sobre fatores que afetam o início de produção, enquanto o pH operacional afeta no direcionamento das vias metabólicas (Kim et al., 2011). No presente estudo o pH inicial foi avaliado como uma variável independente, não sendo identificado como estatisticamente significativo em relação às principais respostas. Vale destacar que o pH não foi controlado durante o processo, de forma que a observação do comportamento deste parâmetro operacional traz informações complementares. De maneira geral, tanto para os ensaios com pH inicial 5,0 (Figura A.1, página 280), como pH inicial 8,0 (Figura A.2, página 281) observou-se acentuada diminuição deste parâmetro, cujos valores foram de 4,5 e 5,0, em período próximo de 10h, após o início da fermentação.

Resultados similares foram observados por Lee et al. (2002) em ensaios em batelada com sacarose. Os autores observaram em diferentes valores de pH inicial (6,0 a 10,0) rápido decréscimo, para valores entre 4,0 e 6,0. Todavia, em pH inicial mais elevado (>7,0) possibilitou reduzir a inibição da produção de hidrogênio, provavelmente devido a mudança metabólica da acidogênese para solventogênese, causada por valores de pH ácidos. Kim et al. (2011) também observaram em ensaios utilizando resíduos de alimentos rápida diminuição do pH inicial de 5,0 a 9,0, atingindo pH operacional próximo a 5,0.

No único ensaio para o qual não houve produção de hidrogênio (C-12) observou-se diminuição do pH mais acentuada em relação às demais condições, cujo valor final foi próximo a 4,0 (Tabela 4.4). Sob tais condições, provavelmente ocorreu inibição do metabolismo microbiano e consequentemente das rotas metabólicas associadas à produção de hidrogênio. Manutenção de valores de pH menores que 4,5 conduzem a vias de produção de compostos mais reduzidos, tais como solventes e ácido láctico (HLa), afeta o crescimento microbiano e ocasiona possível inibição da atividade de hidrogenases (Mota et al., 2018). De fato, foi observado um direcionamento das vias metabólicas para produção de compostos mais reduzidos em C-12 e predominância de HLa, com 1073,0 mg.L⁻¹ ao final do ensaio, representando 58,0% do total de metabólitos solúveis. Além do HLa, foi observado também o ácido acético (485,0 mg.L⁻¹), representando 26,5% do total de metabólitos solúveis. Em relação aos demais ácidos, como por exemplo, HBU, HVa, HPr não foram observados em menor proporção, configurando predominância absoluta da rota de fermentação láctica e coerente com a ausência de produção de H₂ durante tal ensaio. O aumento da concentração de

HAc verificado é provável estar associado a ocorrência da fermentação heterolática, na qual a produção de HLa pode ser acompanhada pela produção de HAc (Pessione et al., 2010).

Park et al. (2016) não observaram produção de hidrogênio em reator alimentado com galactose, quando a concentração deste substrato foi drasticamente reduzida. Os autores associaram esta possibilidade ao acúmulo de ácido láctico em 920 mg.L^{-1} . Ainda, relatam a característica de populações de bactérias ácido lácticas k-estrategistas, as quais possuem maior afinidade para o substrato e, por conseguinte, favorecidas em menor concentração do mesmo. A prevalência do metabolismo láctico está combinada à tolerância de populações de bactérias em pH ácido (Singhvi et al., 2018). Provavelmente, esta possibilidade pode ser um dos fatores principais que contribuiu para prevalência deste metabólito no ensaio C-12, conduzido com baixa concentração de substrato ($1153,3 \text{ mg.L}^{-1}$) e pH ácido de 5,0. Villa-Montoya et al. (2019) também observaram em ensaios fermentativos com resíduos de café maior produção de ácido láctico em pH ácido, reforçando o favorecimento da produção de compostos mais reduzidos e inibição da produção de hidrogênio.

Os ácidos cítrico, fórmico, levulínico e capróico foram observados em alguns ensaios, entretanto, em baixas concentrações, quando comparadas aos principais metabólitos observados, tais como, o ácido láctico (HLa), acético (HAc), propiônico (HPr), butírico (HBu), isobutírico (HIsobu), e valérico (HVa), os quais representaram 95% dos ácidos orgânicos (Figura 4.3). Os efeitos da concentração de RSL, pH, matéria orgânica da ARL, extrato de levedura, tamanho da partícula e bioaugmentação, foram avaliados estatisticamente em relação a produção dos ácidos acético e butírico, os quais foram os principais metabólitos associados à produção de hidrogênio.

O ácido acético foi o principal ácido orgânico identificado ao final de 8 ensaios (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9 e C-10) e também para os pontos centrais (C-13, C-14 e C-15). Sob tais condições foi observado percentual de ácido acético entre 31,1 a 48,0% do total de ácidos orgânicos. Nos ensaios C-2, C-7 e C-11 foi observado ao final da fermentação predomínio de ácido butírico em 37,1%, 42,4% e 41,3%, respectivamente; enquanto em C-12 houve ampla prevalência de ácido láctico (58,0%) do total de ácidos orgânicos.

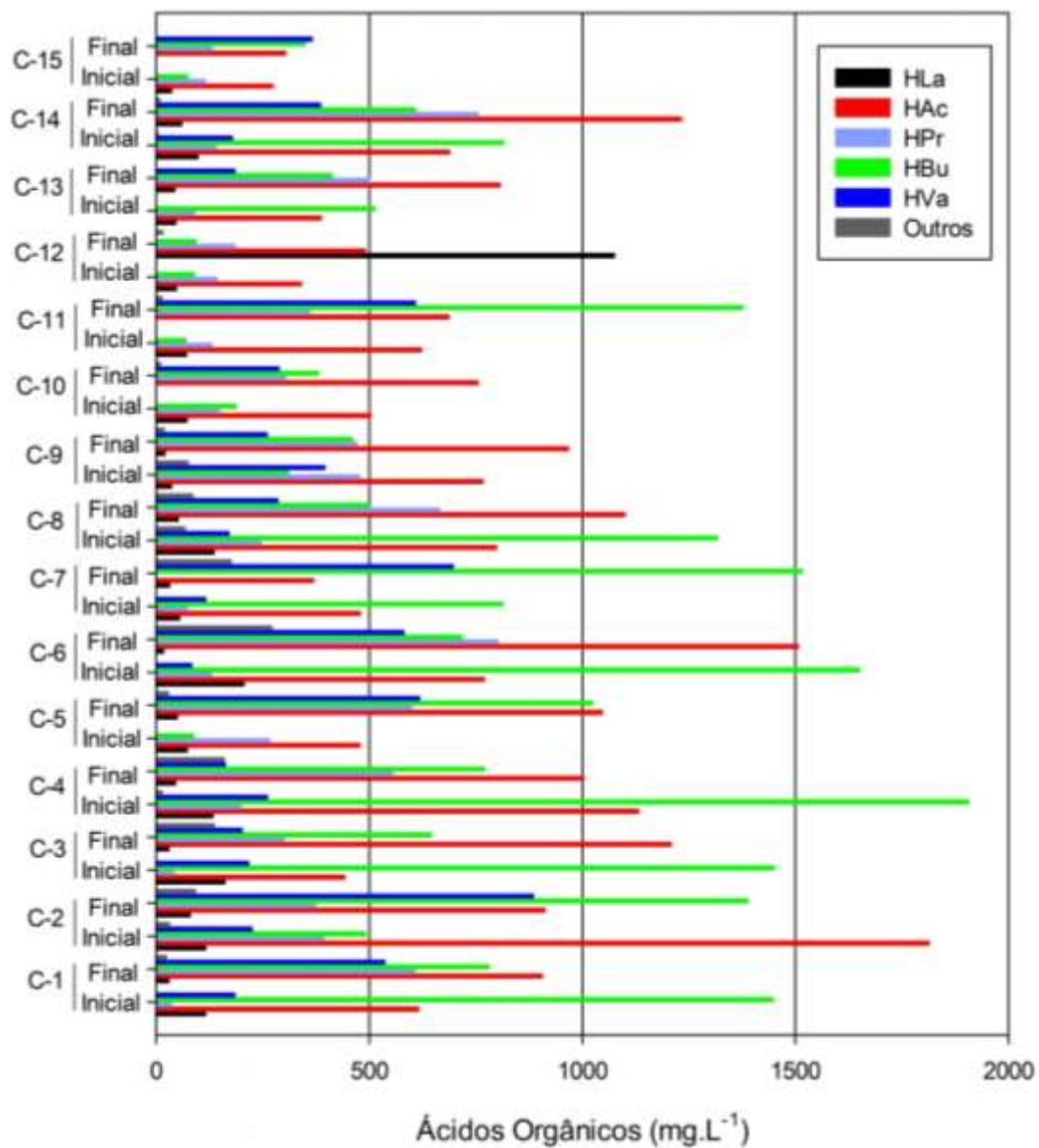


Figura 4.3. Ácidos orgânicos no início e final de cada ensaio em batelada do planejamento experimental Plackett-Burman.

Entre as variáveis analisadas apenas a concentração de ARL ($p=0,067$) e tamanho das partículas ($p=0,015$) foram significativas no que se refere à produção de HAc. Foi verificado efeito negativo para a variável x_4 , de forma que o aumento de matéria orgânica inicial proveniente da ARL ocasionou redução da produção de ácido acético. Os ensaios C-3, C-5 e C-6, por exemplo, foram aqueles com maior produção de HAc em condições experimentais com 1 gDQO.L^{-1} de água residuária, enquanto em ensaios com 3 gDQO.L^{-1} de ARL foi verificado menor concentração deste ácido orgânico.

Identificou-se o tamanho das partículas com efeito positivo na produção de ácido acético, sendo esta mais acentuada nos ensaios com maior tamanho de partícula (10 mesh). Já

as variáveis significativas para produção de ácido butírico foram a concentração de RSL ($p=0,019$) e concentração de EL ($p=0,001$), de forma que a variável x_2 (concentração RSL) resultou em efeito positivo, com maior produção de H_{Bu} para 15 gSTV.L⁻¹; enquanto, para a variável x_3 (concentração EL) o efeito observado foi negativo, indicando tendência para menor produção de ácido butírico para os ensaios com adição de extrato de levedura.

A menor produção de ácido acético nos ensaios de forma geral combinada aos baixos rendimentos de H₂ é uma evidência de que não houve importante ocorrência da fermentação clostridial de produção de HAc, uma vez que tal via metabólica está associada ao máximo rendimento de hidrogênio (Lin et al., 2007). Além disso, a menor produção de HAc indica que reações de homoacetogênese não foram relevantes, de forma que o baixo rendimento de H₂ não pode ser atribuído ao consumo de hidrogênio em razão da ocorrência de homoacetogênese, e sim pelo desvio no fluxo de equivalentes redutores (NADH₂) para formação de outros sub-produtos metabólicos. Saady (2013) destacam que a produção de sub-produtos fermentativos como os ácidos láctico, propiônico, valérico e caprótico, assim como álcoois, representam outras vias, além da homoacetogênese, que resultam na redução do rendimento de H₂.

Os três ensaios no qual o ácido butírico foi observado como o metabólito em maior concentração percentual ao final do ensaio foram também aqueles nos quais se verificou os melhores resultados em relação a P (C-7, C-11 e C-2, em ordem decrescente), sendo também os ensaios com maior concentração inicial de carboidratos, justificando o fato da variável concentração de RSL resultar em efeito positivo significativo em relação à produção de H_{Bu}. Mazareli et al. (2020) não verificaram efeito estatisticamente significativo da concentração de substrato em relação a produção de H_{Bu}, em ensaios em batelada com resíduos de banana. Camargo et al. (2020a) avaliaram a produção de H₂ a partir da fermentação de resíduos sólidos de citros em reatores batelada, sendo a maior produção de H_{Bu} observada com 15,0 gSTV.L⁻¹, e coincidentes com maior P , observações estas muito alinhadas ao que foi verificado no presente estudo.

De modo geral ao final dos ensaios verificou-se entre 0,19 e 3,20 para razão H_{Bu}/HAc, sendo observado para os ensaios C-7, C-11 e C-2, os seguintes valores de 3,20, 1,83 e 1,52, respectivamente, sendo um parâmetro de interesse na avaliação de ensaios de produção de H₂ (Akhlaghi et al., 2019). Estes ensaios foram justamente aqueles nos quais se verificou também nessa ordem o maior P . Lin et al. (2006) obtiveram valores entre 0,2 e 4,0

para razão H_{Bu}/H_{Ac} em ensaios em reatores batelada com xilose de produção de hidrogênio. Wicher et al. (2013) obtiveram valores de 1,1 a 8,7 para H_{Bu}/H_{Ac} na fermentação de água residuária de destilaria, com maior rendimento específico de hidrogênio para valores maiores de H_{Bu}/H_{Ac}. Menor rendimento de H₂ foi observado para razões H_{Bu}/H_{Ac} mais baixas e associadas a produção de H_{Ac} por vias metabólicas adicionais que sobrepõem-se a rota principal de fermentação de ácido acético, tais como, reações homoacetogênicas autotróficas e heterotróficas, produção de H_{La} e H_{Ac} por bactérias ácido lácticas; ou ainda produção de H_{Ac} juntamente ao H_{Pr} a partir do H_{La} (Akhlaghi et al., 2017).

Nos ensaios C-1, C-6, e C-8 verificou-se maior produção de ácido propiônico em comparação aos demais ensaios, 606,9 mg.L⁻¹, 801,3 mg.L⁻¹, e 663,1 mg.L⁻¹, respectivamente, ao final destes ensaios, e representando 20 a 25% do total de ácidos orgânicos. O fato de que a produção de H_{Pr} impede a formação de Fd_{red} e formiato, e também há consumo de NADH₂, conduz à diminuição da geração de H₂ no processo de fermentação (Lee et al., 2008), sendo uma das causas da reduzida produção acumulada e rendimento de H₂ nos referidos ensaios.

Em relação à produção de ácido valérico verificou-se maior concentração ao final dos ensaios C-2, C-5, C-7 e C-11 (Figura 4.3), de 884,6 mg.L⁻¹, 617,4 mg.L⁻¹, 696,4 mg.L⁻¹, e 607,7 mg.L⁻¹, respectivamente, de forma que as proporções de H_{Va} em relação ao total de metabólitos foram de 23,7%, 18,4%, 25,0% e 20,0%, respectivamente para estes ensaios. A rota metabólica de produção de ácido valérico, assim como destacado para o ácido propiônico é importante na redução do rendimento de hidrogênio. A reação bioquímica de produção do ácido valérico a partir da glicose envolve o consumo de 7 mols de H₂/mol de H_{Va}, sendo termodinamicamente muito favorável ($\Delta G^0 = -563,7$ kJ) (Xia et al., 2016). Portanto, este é provavelmente um dos motivos para os baixos rendimentos de H₂ obtidos em C-2, C-5 e C-11, sendo inferiores a 0,37 mols de H₂/mol de hexose.

A produção de ácido valérico pode ocorrer pela via bioquímica associada com o consumo de moléculas de ácido propiônico, na qual há o consumo de 3 mols de H₂ por mol de H_{Va} produzido (Saady, 2013); ou ainda por meio do alongamento de cadeia do ácido propiônico, via esta que não envolve o consumo de H₂ (Spirito et al., 2014). No ensaio C-7 provavelmente ocorreu reações de consumo de H_{Pr}, visto que em 20h observou-se 400 mg.L⁻¹ e ao final do ensaio este ácido orgânico não foi mais observado, todavia, foi verificado acréscimo significativo de ácido valérico em até 696,0 mg.L⁻¹. A destacada produção de hidrogênio no ensaio C-7, quando comparada aos demais ensaios sugere que a reação de

alongamento de cadeia de HPr foi predominante, visto que para esta via de produção de HVa não há consumo de H_2 . Assim como observado para o ensaio C-7 do presente estudo, Moura et al. (2020) também verificaram que a produção de ácido valérico esteve relacionada aos ensaios com maior produção de hidrogênio, destacando provável favorecimento ao processo de alongamento de cadeia de HPr e HAc.

Vias fermentativas que utilizam ácido láctico como substrato provavelmente ocorreram nos ensaios C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, C-8, C-10 e naqueles dos pontos centrais (C-13, C-14 e C-15). Nestes ensaios observou-se o aumento da concentração desse metabólito nas primeiras 10 horas de fermentação. Por exemplo, em C-5 foi observado 1500 mg.L^{-1} de HLa, após 9h do início do processo e apenas 50 mg.L^{-1} ao final do processo. Em C-2 foi observado 764 mg.L^{-1} de HLa nas primeiras horas e 80 mg.L^{-1} no final do ensaio. Neste mesmo intervalo de tempo observou-se aumento da concentração de ácido acético e butírico.

Este processo de consumo de ácido láctico no processo fermentativo tem sido frequentemente reportado na literatura. Baghchehsaraee et al. (2009) investigaram a ocorrência das vias de consumo de HLa e observaram que ao induzirem condições com diferentes concentrações de HLa (entre $0,25$ e 2 g.L^{-1}) este foi totalmente consumido ao fim da fermentação acompanhado pela formação de elevadas quantidades de HBU e aumento da produção acumulativa de H_2 . Vasmara e Marchetti (2017) verificaram em reatores em batelada com soro de queijo produção de HLa quase instantaneamente após o início do ensaio, sendo quase totalmente consumido no intervalo entre 16h e 36h, este padrão se repetiu em ampla faixa de pH avaliado (4 – 10). A partir dessas considerações ressalta-se que a via metabólica de utilização de HLa ocorreu de forma significativa nos ensaios com resíduos de citros.

4.3.4 Análise da comunidade microbiana

A caracterização taxonômica da comunidade microbiana do inóculo autóctone e do ensaio com maior produção de hidrogênio (C-7) foi realizada. Platô nas curvas de rarefação (Figura A.3) foi observado para as amostras, sendo possível inferir, que a diversidade taxonômica analisada foi representativa.

Para a amostra do ensaio C-7 e inóculo autóctone obteve-se 124.657 e 117.797 sequências do gene RNAr 16S, as quais foram agrupadas em 224 OTUs (Unidades Taxonômicas Funcionais) e 322 OTUs, respectivamente. A similaridade da estrutura da

comunidade microbiana com base nas OTUs identificadas nas duas amostras analisadas foi de aproximadamente 52%. Esta baixa similaridade observada entre as populações microbianas decorre das diferentes condições impostas, de pH inicial 5,0, RSL 15 gSTV.L⁻¹, EL 2 gSTV.L⁻¹, ARL 3 gDQO.L⁻¹, bioaugmentação 2,5 gSTV.L⁻¹, e tamanho de partícula RSL em 30 mesh, que conduziram à prevalência de grupos envolvidos em diferentes rotas metabólicas em relação àquelas de obtenção do inóculo. Camargo et al. (2019) também obtiveram baixa similaridade, cerca de 50%, entre as populações do inóculo e àquelas dos ensaios fermentativos. Os autores atribuíram a baixa similaridade à seleção exercida sobre as populações de bactérias durante o processo fermentativo de resíduos de citros em reator batelada.

Três filos de bactérias foram identificados no inóculo autóctone utilizado na bioaugmentação dos ensaios de planejamento experimental Plackett-Burman: Actinobacteria (50,79%), Bacteroidetes (25,51%) e Firmicutes (22,39%). Em relação ao ensaio C-7, também foram identificadas bactérias pertencentes a estes 3 filos, todavia em proporções diferentes; ou seja, 16,24%, 16,51% e 65,93%, respectivamente. Soares et al. (2018b) também identificaram bactérias pertencentes a estes filos em consórcio endógeno proveniente do bagaço de cana de açúcar. Microrganismos do filo Firmicutes são comumente abundantes em reatores anaeróbios e estão associados à produção de ácidos orgânicos como ácido butírico e acético (Vos et al., 2009). Etchebere et al. (2016) avaliaram 29 amostras de biorreatores em escala de laboratório aplicados na fermentação de meios sintéticos com glicose e sacarose, e também com glicerol, resíduos sólidos orgânicos e soro de queijo, para produção de hidrogênio. De forma geral, os autores identificaram representantes do filo Firmicutes em 86% das amostras analisadas. Para a amostra do reator C-7, associado a maior produção de hidrogênio no presente estudo, representantes do filo Firmicutes foram identificados com abundância maior que 65,0%, e semelhante àquilo observado em outros estudos de produção de hidrogênio, como mencionado anteriormente.

Em relação às famílias da amostra do inóculo foram identificadas aquelas mais representativas (abundância relativa maior que 1%): Atopobiaceae (39,56%), Prevotellaceae (24,80%), Bifidobacteriaceae (9,65%), Lactobacillaceae (8,41%), Lachnospiraceae (8,38%), Ruminococcaceae (1,09%) e Eggerthellaceae (1,05%). Para C-7 as famílias com maior abundância relativa foram Lactobacillaceae (36,46%), Veillonellaceae (28,59%), Prevotellaceae (16,15%), Atopobiaceae (14,64%), e Bifidobacteriaceae (1,35%) (Figura 4.4a).

Representantes das quatro famílias identificadas em maior abundância no inóculo autóctone (Atopobiaceae, Prevotellaceae, Bifidobacteriaceae e Lactobacillaceae) foram também identificadas na amostra do reator C-7, entretanto com destaque para diferenças em termos de abundâncias relativas destas famílias.

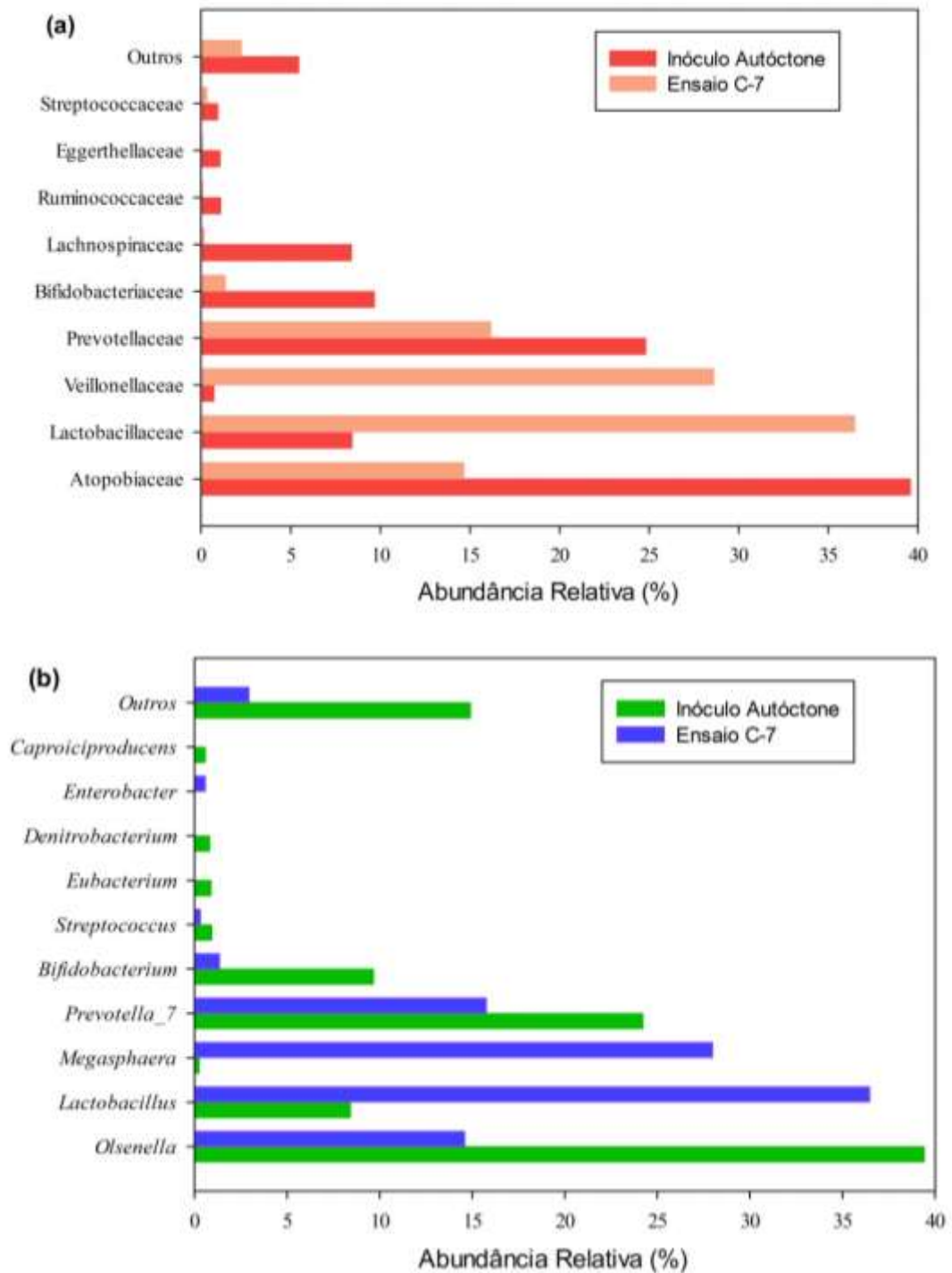


Figura 4.4. Abundância relativa das (a) Famílias and (b) Gêneros, para o inóculo autóctone e ensaio C-7.

Quatro principais gêneros (Figura 4.4b) foram identificados no inóculo autóctone: *Olsenella* (39,40%), *Prevotella* (24,21%), *Bifidobacterium* (9,65%) e *Lactobacillus* (8,41%). Destes gêneros, três deles, *Lactobacillus* (36,46%), *Prevotella* (15,75%) e *Olsenella* (14,58%), também foram identificados na amostra do ensaio C-7, além de *Megasphaera* (27,98%), cuja abundância relativa na amostra do inóculo foi de apenas 0,23% .

O gênero identificado em maior abundância relativa (39,40%) no inóculo autóctone foi *Olsenella*, pertencente ao Filo Actinobacteria e relacionadas ao metabolismo fermentativo, com produção principalmente de ácido láctico, a partir da fermentação de glicose (Dewhirst et al., 2001; Kraatz et al., 2011). Bactérias deste gênero realizam metabolismo amilolítico e de remoção de carboidratos (Li et al., 2011). De acordo com Castelló et al. (2009), o fato de tal gênero frequentemente ser identificado em reatores de produção de hidrogênio e ao mesmo tempo estar predominantemente envolvido em rotas metabólicas, onde não há produção direta de hidrogênio, indica competição com outras bactérias produtoras de hidrogênio em relação aos compostos orgânicos, e provavelmente inviabilizando maior rendimento de H_2 .

As condições experimentais do ensaio C-7 em pH ácido (4,7), maior concentração de matéria orgânica (9,05 gDQO.L⁻¹), assim como, a curta duração do ensaio, com estabilização da produção de H_2 antes de 25h de ensaio, são fatores importantes que podem ter contribuído para maior abundância de *Olsenella*. Provavelmente, *Olsenella* teve participação importante na fermentação primária dos carboidratos (Kraatz et al., 2011). Wang et al. (2020) também identificaram *Olsenella* em ensaios fermentativos de produção de hidrogênio em reator de tanque com agitação contínua (CSTR) utilizando resíduos de alimentos como substrato, em pH 5,0. Santiago et al. (2020) também identificaram *Olsenella* para valores de tempo de detenção hidráulica (TDH) inferiores a 8h em reatores em bateladas sequenciais com resíduos domésticos orgânicos e pH de 5,5. Verificou-se diferença significativa na abundância de *Olsenella* do inóculo e do ensaio C-7, com redução de aproximadamente 25% da abundância relativa para a condição experimental. Tal possibilidade foi resultado da imposição de diferentes valores para as variáveis experimentais do ensaio C-7, quando comparado à condição de enriquecimento do inóculo autóctone, e favorecendo outros gêneros, como *Lactobacillus* e *Megasphaera* pertencentes ao Filo Firmicutes.

Para *Lactobacillus* verificou-se aumento importante em sua abundância relativa no ensaio C-7, cerca de 30% em relação à população inoculada no reator. Tal gênero compreende microrganismos homofermentativos, com produção de 85% de ácido láctico a partir da

glicose, ou pela rota heterofermentativa, com produção equimolar de ácido láctico, CO₂, etanol e ácido acético (Wood e Holzappel, 1995; Zheng et al., 2020). Nas condições do reator C-7, apesar da maior produção acumulada de hidrogênio obteve-se baixo rendimento de hidrogênio (0,58 mol H₂/mol hexose), em relação ao limite máximo teórico. A elevada abundância relativa dos *Lactobacillus* pode ser diretamente associada a esta resposta, uma vez que apesar da baixa concentração de ácido láctico ao final do ensaio, tal metabólito foi predominante nas primeiras horas do processo, sendo o principal sub-produto da fermentação primária dos carboidratos. Tal via metabólica não está associada à produção de H₂. Assim como observado para o ensaio C-7, Kim et al. (2014) ao avaliarem a fermentação de resíduos de alimentos em reatores batelada, também observaram relação entre elevada abundância de *Lactobacillus* (>65,0%) e baixos rendimentos de H₂ (<0,6 molH₂.mol⁻¹hexose), e maior remoção de carboidratos (~90,0%) em ácido láctico.

O gênero *Megasphaera*, identificado com a segunda maior abundância relativa (27,98%) na amostra do ensaio C7, são caracterizados como microrganismos anaeróbios obrigatórios e convertem lactato e glicose em ácidos orgânicos mais reduzidos como acético, propiônico, butírico, valérico, além de produtos gasosos como dióxido de carbono e hidrogênio (Ladd e Walker, 1965; Ohnishi et al., 2010). A produção de ácido propiônico por espécies deste gênero, em específico *M. elsdenii*, ocorre via acrilato, diferentemente do que ocorre com *Propionibacterium* sp., a qual ocorre via succinato (Ladd e Walker, 1965). O valerato particularmente é considerado como um subproduto característico do metabolismo de espécies deste gênero, sendo produzido na presença de propionil-CoA, através do alongamento de cadeia do propionato pela adição de duas unidades de carbono (Kim et al., 2019; Kung e Hession, 1995). Segundo Kung e Hession (1995) em reatores com identificação de *Megasphaera* não ocorre o acúmulo de ácido láctico minimizando problemas com excessiva diminuição do pH. A identificação abundante deste gênero no ensaio C-7, no qual houve elevada produção de ácido valérico e associada ao consumo de HPr, reafirma a hipótese de que a reação bioquímica de alongamento de cadeia a partir do ácido propiônico ocorreu de forma importante no processo.

De acordo com Ohnishi et al. (2010), espécies de *Megasphaera*, como *M. elsdenii* são capazes de produzir hidrogênio a partir da fermentação de açúcares, mas o fazem principalmente pelo consumo do ácido láctico originado da degradação de açúcares por outros microrganismos, tais como *Lactobacillus*. Portanto, a interação entre as bactérias do gênero

Megasphaera, caracterizadas como consumidoras de ácido láctico (LUB), e as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), configuram uma relação importante na produção de hidrogênio em sistemas fermentativos. Para a amostra do reator C-7 do presente estudo, foi identificado em elevada abundância tanto bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* como *Megasphaera*, caracterizadas como produtoras de ácido láctico (LAB) e como utilizadoras de ácido láctico (LUB), respectivamente. A partir disto, é possível inferir que a produção de hidrogênio não tenha ocorrido diretamente via fermentação dos açúcares, mas por vias metabólicas de consumo de HLa pelas LUB, resultando na produção de ácidos como butírico e valérico, e também de hidrogênio.

Prevotella pertence ao Filo Bacteroidetes e tem sido reportada em diversos estudos de produção de hidrogênio. Entretanto, não sendo explorado com grande ênfase, uma vez que sua função fisiológica ainda não está bem definida, mas sugere-se que possa atuar de forma positiva na degradação de substratos complexos (Cabrol et al., 2017). Espécies deste gênero são capazes de atuar na fermentação de diversos carboidratos e podem ter como subprodutos de seu metabolismo ácido acético, succínico, ou em quantidade muito reduzida HLa, e algumas espécies podem produzir pequenas quantidades de hidrogênio (Wu et al., 1992). De acordo com Yang e Song (2019), microrganismos semelhantes a *Prevotella* tem sido comumente relatados em reatores empregados na digestão de resíduos sólidos, como dejetos de animais e resíduos de alimentos, ou seja na fermentação de substratos com matrizes mais complexas, como por exemplo, os resíduos sólidos de citros.

Microrganismos do gênero *Bifidobacterium* pertencentes ao Filo Actinobacteria, também foram identificados (abundância de ~10%) no consórcio autóctone. Entretanto, sua abundância foi significativamente reduzida (~1%) no ensaio C-7. Tais bactérias também são caracterizadas como LAB, com preferência pela utilização de hexoses. *Bifidobacterium* caracterizam-se pela produção de ácido láctico juntamente com ácido acético, estabelecendo uma fermentação heterofermentativa. Entretanto, diferente do metabolismo de outros grupos de bactérias ácido lácticas, os microrganismos deste gênero realizam a rota bifidus (Duangmanee et al., 2007; Pokusaeva et al., 2011). A redução na abundância de *Bifidobacterium* em C-7, em comparação com a verificada no inóculo, e associada ao aumento da abundância do gênero *Lactobacillus*, provavelmente ocorreu em resposta ao estabelecimento de uma competição por substrato entre esses dois grupos, visto que desempenham papel similar no processo fermentativo. Outros gêneros tais como *Enterobacter*

(Filo Proteobacteria), *Eubacterium* e *Streptococcus* (Filo Firmicutes) também foram identificados, entretanto com abundância relativa inferior a 1%.

Uma inferência do conjunto de vias metabólicas principais que se desenvolveram no reator do ensaio C-7 foi realizada com base nas características do metabolismo dos gêneros de bactérias identificadas com maior abundância na amostra do reator do ensaio C-7, como por exemplo, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Olsenella*, *Prevotella*, e *Bifidobacterium*, combinadas com os perfis de metabólitos observados ao longo do ensaio. Na Figura 4. 5 está representado esquematicamente um resumo desta predição. Destaca-se a importância das vias homoláctica, heteroláctica e bifidus a partir da fermentação dos carboidratos dos resíduos de citros. Outros ácidos orgânicos também foram observados a partir de vias que utilizam do HLa, tal como para produção de ácido propiônico, por meio da rota do acrilato, e ácido valérico pela via de beta oxidação reversa com o alongamento de cadeia do ácido propiônico. A produção de H₂ prevaleceu como resultado do metabolismo de bactérias consumidoras de ácido láctico (LUB), via oxidação do lactato, que resulta também na disponibilidade de equivalentes redutores para síntese de outros sub-produtos identificados com importância no ensaio C-7, tais como os ácidos butírico e valérico.

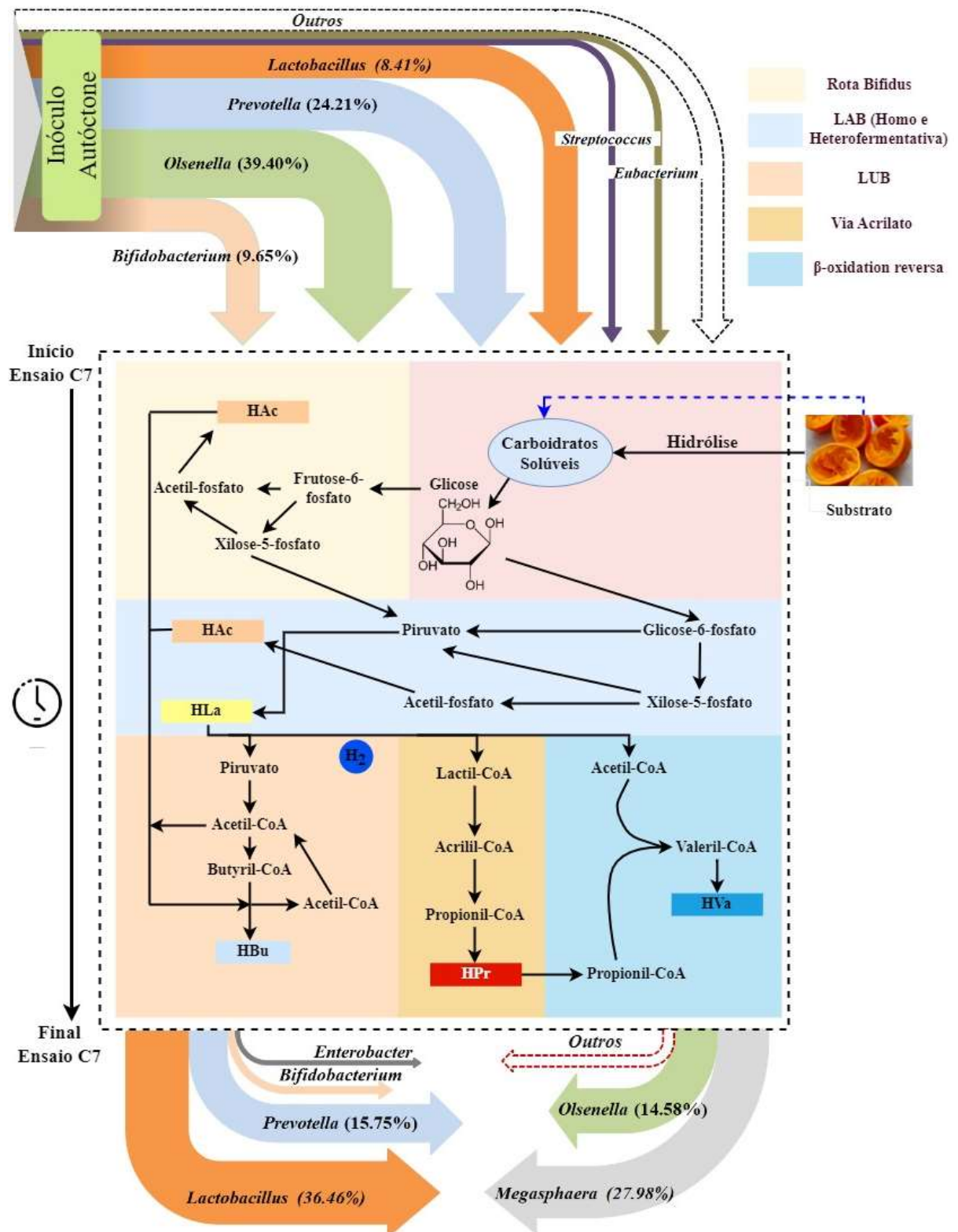


Figura 4. 5. Prováveis vias de conversão dos substratos orgânicos dos resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros em AOVs e H₂ no reator do ensaio C-7. As abundâncias relativas dos principais gêneros de microrganismos identificados no inóculo autóctone e na amostra do reator C-7 estão representadas pelas setas.

4.4. Considerações finais

A obtenção de inóculo autóctone enriquecido a partir dos resíduos de citros foi efetiva na fermentação em reatores em batelada. Os principais gêneros de bactérias identificadas foram os seguintes: *Olsenella*, *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Em relação ao potencial máximo de produção de H₂ da co-digestão dos resíduos de citros, somente a concentração de resíduos sólidos de citros foi estatisticamente significativa, com efeito positivo para a concentração de nível superior avaliada (15,0 gSTV.L⁻¹). O maior valor para potencial de produção de H₂ (142,5 mL.L⁻¹) foi obtido em condição experimental com pH 5,0, 15,0 gSTV.L⁻¹ de resíduos sólidos de laranja, 3,0 gDQO.L⁻¹ de água residuária, 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, tamanho de partícula 30 *mesh*, e bioaugmentação de 2,5 gSTV.L⁻¹, sendo esta também a condição na qual se obteve a maior taxa máxima de produção de H₂ (29,8 mL.h⁻¹).

Menor tamanho de partículas (30 *mesh*) de resíduos sólidos de laranja resultou em efeitos positivos significativos sobre a taxa máxima de produção de H₂, resultado de maior solubilização imediata dos carboidratos solúveis e maior superfície de contato para ataque microbiano hidrolítico.

Os ácidos butírico, valérico e acético foram os principais metabólitos solúveis observados ao final do ensaio na condição experimental de maior produção de H₂, não sendo observados ao final dos ensaios, concentração relevante dos ácidos propiônico e láctico. Já para a condição mais desfavorável em relação à produção de H₂ observou-se predominância do ácido láctico ao final do ensaio, com concentrações muito baixas dos ácidos butírico e valérico.

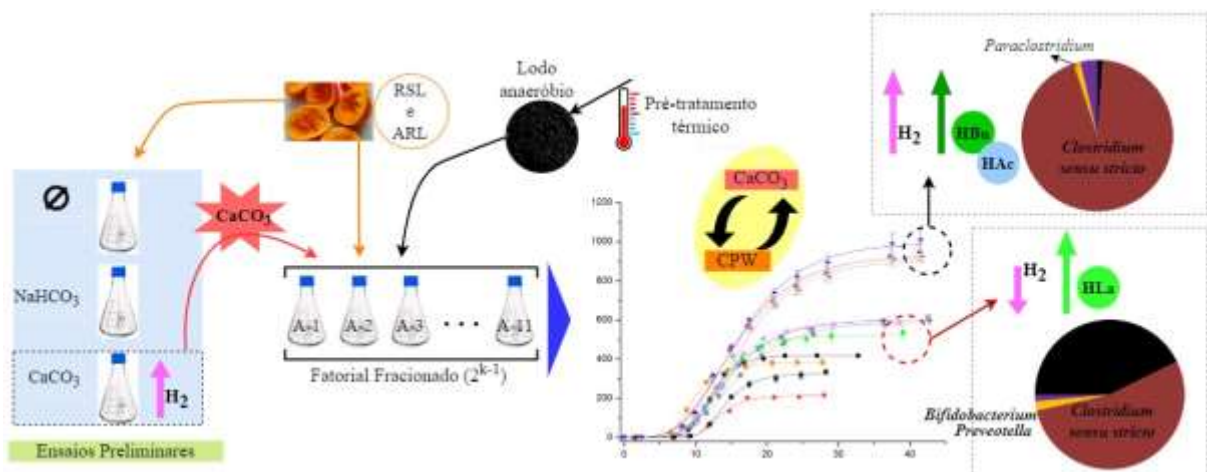
Identificou-se importante modificação na abundância relativa dos microrganismos entre a amostra do reator de maior produção de H₂ e o inóculo autóctone, sendo observado relevante aumento da abundância de *Lactobacillus* e *Megasphaera*, combinada à redução da abundância de *Prevotella*, *Olsenella* e *Bifidobacterium*. Para a condição de maior potencial de produção de H₂ a produção de ácido láctico pelas bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus*) foi fundamental para atividade metabólica de microrganismos que utilizam o ácido láctico como substrato (*Megasphaera*), resultando na produção de outros ácidos orgânicos (butírico e valérico) e hidrogênio.

A seleção de variáveis realizada por meio deste estudo é fundamental para direcionar uma exploração mais detalhada do processo, possibilitando redução de tempo e custos experimentais na otimização da produção de ácidos orgânicos e hidrogênio a partir dos resíduos da agroindústria de citros, visando posterior aplicação da tecnologia em reatores descontínuos e contínuos em escala piloto ou industrial.

CAPÍTULO 5

Efeito da alcalinização para o aumento da produção de hidrogênio sob diferentes concentrações de substrato na co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros

Resumo: O efeito de dois agentes alcalinizantes, bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e carbonato de cálcio (CaCO_3), foi avaliado na produção de hidrogênio (P) a partir de resíduos sólidos (RSL) e água residuária do processamento de citros (ARL). Por meio de ensaios em reatores em batelada com condições fixas de $25,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL; $3,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL; $3,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de lodo; e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, foram realizadas três condições distintas: i) controle, sem adição de alcalinizante e pH inicial de 6,5; ii) $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 ; iii) $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Na condição com CaCO_3 e NaHCO_3 ocorreu aumento de 176,8% e 30,2% na produção de hidrogênio de $1099,7 \text{ mL.L}^{-1}$ e $517,3 \text{ mL.L}^{-1}$, respectivamente, em relação ao ensaio controle ($397,4 \text{ mL.L}^{-1}$). Por meio da aplicação de planejamento experimental fracionado foi verificado o efeito do CaCO_3 ($1,0 - 4,0 \text{ g.L}^{-1}$), na produção de hidrogênio, além de variações nas concentrações de substrato sólido ($7,0 - 25,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL) e líquido ($1,0 - 3,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL). Por meio destes ensaios verificou-se efeito estatisticamente significativo para a concentração de CaCO_3 e de RSL em relação a produção de hidrogênio, indicando a importância do ajuste entre a capacidade de tamponamento do processo e a disponibilidade de substrato. Obteve-se maior produção de H_2 ($940,0 \text{ mL.L}^{-1}$) no ensaio com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 , $16,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $2,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $3,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de lodo de inóculo. Para a condição de maior P de H_2 identificou-se elevada concentração de ácidos butírico ($1752,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e acético ($1768,3 \text{ mg.L}^{-1}$) e abundância relativa superior a 90%, de *Clostridium sensu stricto*, sendo possível inferir sobre a ocorrência da via metabólica de fermentação Clostridial. Obteve-se potencial energético máximo de $634,91 \text{ MJ.t}^{-1}\text{RSL}$, com estimativa de potencial de geração de eletricidade de até 3,2 milhões de MWh por ano.



5.1.INTRODUÇÃO

Resíduos sólidos e águas residuárias são produzidos a partir de indústrias de processamento de frutas. Neste cenário, tem-se a indústria de citros como importante fonte destes resíduos agroindustriais sólidos e líquidos. A produção mundial de citros é superior a 75 milhões de toneladas por ano (ano base 2020), com 70% das frutas sendo destinadas para indústrias de processamento para produção de suco e outros produtos; é estimado que a geração de resíduos pós-processamento corresponda entre 50 a 60% do peso da fruta (Calabrò e Panzera, 2018; FAO, 2019). Estima-se ainda que em média aproximadamente 0.80 – 1.25 m³ de água residuária seja gerada a cada 1 tonelada de frutas processadas provenientes das etapas de extração do suco e também da prensagem das cascas (Mendoza et al., 2018; Rosas-Mendoza et al., 2020).

Características como seu alto teor de açúcares simples como glicose, frutose e sacarose, e também polissacarídeos como pectina, celulose e hemicelulose, conferem aos resíduos de citros grande potencial para valorização em biorefinarias visando à recuperação energética via digestão anaeróbia (Calabró et al., 2018; Forgács et al., 2012). Da mesma forma, a água residuária do processamento de citros contém em sua composição alto teor de matéria orgânica na forma de compostos solúveis como açúcares e ácidos orgânicos (Guzmán et al., 2015; Rosas-Mendoza et al., 2020). A aplicação dos resíduos da agroindústria de citros em reatores acidogênicos visando obtenção de hidrogênio tem sido pouco explorado, apesar de sua rica composição de açúcares. Por exemplo, Abd-Alla et al. (2018) empregaram em reatores em batelada hidrolisado de cascas de laranja pré-tratadas com n-hexano como substrato para obtenção de H₂. Mohan et al. (2009) empregaram extrato obtido das cascas de citros autoclavadas em reatores batelada, enquanto, Camargo et al. (2021a; 2020a) usaram cascas de laranja moídas, como única etapa de pré-tratamento em reatores em batelada para produção de H₂ e ácidos orgânicos. Todavia, em relação à água residuária somente Torquato et al. (2016) investigaram a sua aplicação em reator em batelada para produção de hidrogênio.

A avaliação da co-digestão dos resíduos sólidos e líquidos da atividade agroindustrial de processamento de citros não foi até então avaliada, a alta concentração de açúcares e reduzida capacidade alcalinizante são um desafio para o processo, uma vez que a fermentação ocorre em altas taxas com a produção de metabólitos, como ácidos orgânicos voláteis, propiciando em alguns casos desequilíbrio nas condições de pH operacional a valores que são desfavoráveis a produção de hidrogênio.

As condições de pH do meio são cruciais para a produção de hidrogênio; ou seja, faixas de pH desfavoráveis, geralmente reportadas cujos valores são abaixo de 4,5, propiciam a ocorrência de outras rotas metabólicas com produção de metabólitos mais reduzidos (Mota et al., 2018), além da possível inibição da atividade das hidrogenases (Ghimire et al., 2015). Em geral o pH operacional desejável para potencializar a produção de hidrogênio é reportado estar na faixa de 4,5 a 6,5 (Lee et al., 2010). O tipo e a concentração do substrato são variáveis importantes a serem observadas na definição do pH operacional, uma vez que afetam a produção de ácidos orgânicos que impacta diretamente no pH do meio (Ghimire et al., 2015).

O principal desafio para o controle do pH operacional em reatores acidogênicos é o aumento nos custos do processo devido ao uso dos alcalinizantes, podendo reduzir a viabilidade econômica e a sustentabilidade do processo, além do aumento na concentração de sais no efluente acidogênico (Mota et al., 2018).

Para processos anaeróbios facilmente acidificados, como é o caso de substratos com alto teor de açúcares, os alcalinizantes podem ser adicionados no intuito de manter o pH desejado (Palma et al., 2018). Diversidade de alcalinizantes podem ser usados para o controle do pH, tais como o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3), e carbonato de cálcio (CaCO_3), além de outros agentes alcalinos para correção do pH, como o hidróxido de sódio (NaOH). Desta forma, a definição do alcalinizante ideal está associada às particularidades do substrato e dos parâmetros do processo que será conduzido.

O uso do carbonato de cálcio (CaCO_3) foi avaliado por Deheri e Acharya (2020) como um aditivo para aumentar a produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de alimento e dejetos bovinos em reatores em batelada. Sob tal possibilidade e com adição de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CaCO_3 , os autores observaram produção de $107,38 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1} \text{ ST}$, cerca de 6% superior ao ensaio controle. Zhang e Wang (2013) avaliaram o uso do subproduto da *ammonia-soda process* (WMA) como tamponante na produção de hidrogênio a partir de resíduos de alimento em reator em batelada. Tal composto é rico em carbonato de cálcio o que proporcionou maior estabilidade ao processo, menor variação de pH (entre 4,5 a 6,2), e aumento na produção de hidrogênio de 91,8 para $145,4 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1} \text{ STV}$. O uso do carbonato de cálcio como alcalinizante também foi avaliado por Zhang et al. (2013), como subproduto da indústria de papel, o qual é rico em óxido de cálcio (CaO) e outros minerais. Os autores verificaram maior controle do pH operacional, e aumento significativo da produção de

hidrogênio. O uso do bicarbonato de sódio como alcalinizante no processo fermentativo visando produção e hidrogênio a partir de sacarose e dejetos suínos foi avaliado por Choi e Ahn (2015), para diferentes concentrações de bicarbonato. Sob tais condições foi observado para $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 maior rendimento de hidrogênio, enquanto para maiores concentrações de bicarbonato a rota metabólica foi de consumo de hidrogênio e consequente redução do rendimento.

A suplementação com carbonato de cálcio além de sua notável função de fornecer alcalinidade apropriada a processos de digestão anaeróbia, também possibilita o fornecimento de cálcio para o sistema por meio de sua solubilização no meio líquido (Yang et al., 2021). O cálcio é requerido como um cofator de α -amilases e proteases, pode ter importante papel estrutural nas proteínas celulares, e material polimérico extracelular, assim como na composição dos endósporos (Elbeshbishy et al., 2017). O acúmulo de ácido dipicolínico (DPA) e cálcio no núcleo de endósporos é fundamental no processo de formação desta forma de resistência, o teor de DPA/cálcio nos endósporos de *Clostridium sensu stricto* foi verificada como um fator importante na capacidade de resistência ao calor úmido (Jamroskovic et al., 2016).

Para tanto, no presente estudo objetivou-se investigar o efeito de alcalinizantes (carbonato de cálcio e bicarbonato de sódio), empregando resíduos sólidos e líquidos da agroindústria de citros como substratos, os quais possuem elevada concentração de açúcares e rápida biodegradabilidade, visando maximizar a produção de hidrogênio. São escassos os estudos sobre a influência do pH operacional para maior rendimento de hidrogênio aplicando resíduos sólidos e líquidos de citros. O comportamento do processo com a aplicação de dois diferentes agentes alcalinizantes foi avaliado, de forma que a melhor resposta teve seu efeito melhor explorado via planejamento experimental fracionado, combinando diferentes concentrações de alcalinizante ($1,0 - 4,0 \text{ gCaCO}_3.\text{L}^{-1}$) e concentrações iniciais de substrato (RSL $7,0 - 25,0 \text{ gST.L}^{-1}$ e ARL $1,0 - 3,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$). Buscou-se caracterizar a comunidade microbiana para diferentes ensaios aplicados a fermentação de resíduos de citros, realizando inferência das vias metabólicas predominantes para melhor compreensão do processo. Além disso, avaliação de balanço energético da produção de H_2 foi realizada para estimativa do potencial de recuperação energética alcançado.

5.2.MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Resíduos sólidos e água residuária de citros

Cascas e bagaço da laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio) frescas e maduras *in natura* foram obtidos a partir da remoção manual do suco e sementes de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio) frescas e maduras. Uma etapa de pré-tratamento mecânico foi aplicado aos resíduos sólidos (RSL) utilizando moinho de facas tipo *Willye* (*Modelo SL 32, 1750 rpm – Solab*) reduzindo-o em partículas < 0.60 mm (mesh 30), após desidratação em estufa a 50°C por período de 48 horas. A caracterização dos resíduos pode ser verificada na Tabela 4.1 (página 36).

A água residuária do processamento de laranjas (ARL) foi obtida de agroindústria do setor de produção de sucos localizada na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil, sendo armazenada a -20°C conforme descrito por Torquato et al. (2016). As características composicionais principais da água residuária estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Caracterização da água residuária do processamento de citros.

Parâmetro		mg.L ⁻¹
pH		5,29
Sólidos	ST	5.905,0
	STV	5.132,5
	SST	1.150,0
	SSV	1.055,0
	SDT	4.755,0
DQO (Bruta)		9.766,7
DQO (Filtrada)		8.050,0
Carboidratos Totais (Bruto)		3.933,3
Carboidratos Totais (Solúvel)		3.833,3
Açúcares	Sacarose	1.131,3
	Glicose	890,9
	Frutose	653,9
Fenóis Totais		638,0
Ácidos Orgânicos	HAc	803,7
	HPr	267,4
	HBu	129,2
	HVa	545,4

*unidade para todos os parâmetros, exceto pH.

5.2.2 Inóculo

O inóculo empregado para os ensaios foi lodo granular mesofílico proveniente de reator UASB de tratamento de água residuária de abatedouro de aves da Avícola Dacar (Tietê, São Paulo, Brasil). As características do lodo mesofílico utilizado são 6,87% m/m ST (68,7 gST/kg Lodo) e 5,94% m/m STV (59,4 gSTV/kg Lodo) e pH 7,15.

Previamente a sua utilização nos ensaios acidogênicos, o lodo granular foi triturado utilizando um liquidificador doméstico e posteriormente submetido ao tratamento térmico de acordo com Kim et al. (2006) e Menezes e Silva (2019).

Para inoculação dos reatores em batelada o lodo foi submetido a três rodadas de centrifugação por 10 minutos a 9000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e substituído por água miliQ, para a remoção de material orgânico residual e assim reduzir sua interferência nos ensaios.

5.2.3 Ensaios em reatores em batelada

Os experimentos fermentativos para produção de hidrogênio foram realizados em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de borossilicato de 250 mL fechados com tampa de butila e rosca plástica; além de equipados com conjunto de válvulas acopladas a tampa de butila (Figura B.1, página 283) para coleta de amostras líquidas e de gás. O volume do meio líquido adicionado aos ensaios correspondeu a 50% do volume do reator, sendo o headspace de 50% submetido a gás nitrogênio (N₂, 100%). As condições experimentais fixadas para os ensaios foram agitação de 130 rpm e temperatura mesofílica de 37°C e mantidos incubados em *shaker Informs HT – Multitron Pro*.

5.2.4 Ensaios Preliminares

Ensaios preliminares foram realizados para verificar possíveis diferenças significativas na manutenção do pH operacional e estabilidade de produção de hidrogênio com o uso de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e carbonato de cálcio (CaCO₃). Os ensaios foram conduzidos em triplicata de reatores em condições fixas de 25,0 gSTV.L⁻¹ de resíduos sólidos de citros; 3,0 gDQO.L⁻¹ de água residuária do processamento de citros; 3,0 gSTV.L⁻¹ de lodo; e suplementados com 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Desta forma três condições distintas foram realizadas: i) controle, sem adição de alcalinizante, pH inicial ajustado em 6,5 com NaOH

50%; ii) 2,0 g.L⁻¹ de CaCO₃, e ; iii) 2,0 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (nas condições ii e iii pH inicial foi ajustado em 6,5 após adição dos alcalinizantes).

5.2.5 Planejamento experimental

A partir da definição do melhor agente alcalinizante em relação à produção de hidrogênio procedeu-se a variação de diferentes concentrações de substrato (RSL e ARL), bem como da concentração de microrganismos na avaliação dos parâmetros cinéticos do processo nas condições estabelecidas. Para tanto, um planejamento experimental fatorial em sua forma fracionada (2^{k-1}) foi conduzido, avaliando quatro variáveis em dois níveis (Tabela 5.2), totalizando 8 ensaios em triplicata, somados a 3 ensaios de repetição do ponto central no intuito de avaliar as condições intermediárias dos pontos fatoriais avaliados. A matriz do planejamento fatorial fracionado e as condições de cada um dos ensaios podem ser verificadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.2. Variáveis independentes avaliadas em dois níveis (+1 e -1) e para o ponto central no planejamento experimental de fatorial fracionado (2^{k-1})

Variável		-1	0	1
CaCO ₃ (g.L ⁻¹)	X ₁	1,0	2,5	4,0
RSL (gSTV.L ⁻¹)	X ₂	7,0	16,0	25,0
ARL (gDQO.L ⁻¹)	X ₃	1,0	2,0	3,0
Inóculo Lodo (gSTV.L ⁻¹)	X ₄	2,0	3,5	5,0

Tabela 5.3. Matriz do desenho experimental fatorial fracionado (2^{k-1}) das variáveis independentes na produção de hidrogênio.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	CaCO ₃ (g.L ⁻¹)	RSL (gSTV.L ⁻¹)	ARL (gDQO.L ⁻¹)	Lodo (gSTV.L ⁻¹)
A-1	-1	-1	-1	-1	1,0	7,0	1,0	2,0
A-2	1	-1	-1	1	4,0	7,0	1,0	5,0
A-3	-1	1	-1	1	1,0	25,0	1,0	5,0
A-4	1	1	-1	-1	4,0	25,0	1,0	2,0
A-5	-1	-1	1	1	1,0	7,0	3,0	5,0
A-6	1	-1	1	-1	4,0	7,0	3,0	2,0
A-7	-1	1	1	-1	1,0	25,0	3,0	2,0
A-8	1	1	1	1	4,0	25,0	3,0	5,0
A-9	0	0	0	0	2,5	16,0	2,0	3,5
A-10	0	0	0	0	2,5	16,0	2,0	3,5
A-11	0	0	0	0	2,5	16,0	2,0	3,5

5.2.6 Análises físico-químicas e cromatográficas

O monitoramento dos reatores em batelada foi realizado por meio de análises da fração líquida via determinação de carboidratos solúveis totais (Dubois et al., 1956), demanda química de oxigênio – DQO (APHA/AWWA/WEF, 2012), sólidos totais voláteis (STV), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), ácidos orgânicos voláteis (Lazaro et al., 2012). As análises de carboidratos, fenóis e DQO foram feitas para amostra filtrada em filtro com diâmetro de poro de 0,45 µm. A quantificação de carboidratos solúveis totais, pH e ácidos orgânicos foi realizada para as amostras inicial e final e também para as amostras coletadas no decorrer do ensaio.

Para o monitoramento da fase gasosa do reator, foi realizada a coleta de amostras de 500 µL de gás do *headspace* utilizando seringa equipada com trava de pressão. A análise da composição do biogás foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC- 2010 equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar CarboxenTM 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco), utilizando como gás de arraste argônio (12 mL.min⁻¹), temperatura do injetor de 220°C, 130°C para coluna e 230°C no detector. A pressão (mbar) do headspace do reator foi aferida antes e após a tomada da amostra de gás com a seringa, para monitoramento das diferenças de pressão, dados utilizados para quantificação do volume de biogás produzido.

5.2.7 Análise dos dados

A produção de biogás foi monitorada em intervalos de 2 – 6 horas ao longo do ensaio, e a produção acumulada de hidrogênio foi calculada, conforme Equação 1, com base nas medidas da pressão do headspace dos reatores, e da composição do biogás verificada em cada ponto amostral através de análise por cromatografia gasosa.

$$H_i = \sum_{i=1}^n V_{H,i} \quad (1)$$

Sendo, H_i a produção acumulada de hidrogênio do ensaio no ponto amostral (i); e $V_{H,i}$ o volume de hidrogênio produzido entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i), de acordo com Equação 2 que foi obtida com base nos princípios da equação de Clapeyron.

$$V_{H,i} = \frac{\Delta P_i \cdot V \cdot C_{H,i}}{P_i} \quad (2)$$

Sendo P_i refere-se a pressão no headspace do reator, $C_{H,i}$ ao percentual de hidrogênio na composição do biogás no ponto amostral (i); a variação da pressão do headspace entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i) é dada por ΔP_i ; e V o volume do headspace.

Os valores médios da composição do biogás de cada ensaio foram obtidos pela média aritmética da composição do biogás nos pontos amostrais após estabilização da composição, medida por um coeficiente de variação menor que 5% ($CV < 5\%$).

A produção acumulada de H_2 foi ajustada ao modelo cinético de Gompertz modificado (Eq. 3), obtendo-se os parâmetros cinéticos do processo, utilizando o software OriginPro 8.5[®].

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Sendo, H a produção acumulada de hidrogênio ($mL \cdot L^{-1}$) no tempo (t), P o potencial máximo de produção de hidrogênio ($mL \cdot L^{-1}$), Rm a velocidade máxima de produção de hidrogênio ($mL \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), $e = 2,718281828$, e λ é o tempo de início da produção de hidrogênio (h).

5.2.8 Avaliação de balanço energético e econômico

A avaliação da recuperação energética a partir da produção de hidrogênio obtida foi realizada com base no cálculo do potencial energético - PE_{H_2} ($MJ \cdot kg^{-1}RSL$), e no potencial de produção de eletricidade - PPE_{H_2} (MWh), de acordo com as Eqs. (4) e (5).

$$PE_{H_2} = \frac{P_{H_2} \cdot PCI_{H_2}}{1000 \cdot RSL_C} \quad (4)$$

$$PPE_{H_2} = \frac{PE_{H_2} \cdot RSL_C \cdot \eta}{3600} \quad (5)$$

Os termos P_{H_2} , PCI_{H_2} , RSL_C , e η são o potencial de produção de hidrogênio ($mL \cdot L^{-1}$), poder calorífico inferior do H_2 $10,8 MJ \cdot m^{-3}$ (Goldmeier, 2019), concentração de resíduos sólidos de citros no reator ($g \cdot L^{-1}$), e eficiência de conversão elétrica em células combustível de 60% (DOE Energy Efficiency And Renewable Energy Information Center, 2006; Shabani e Andrews, 2015).

5.2.9 Análise da comunidade microbiana

As amostras coletadas ao final dos ensaios A-7 e A-9 do planejamento experimental fracionado foram usadas para avaliação do gene RNAr 16S de bactérias. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm - 6 minutos), sendo o pellet de biomassa lavado com solução PBSX1 (NaCl 8,2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,05 g.L⁻¹, NaH₂PO₄ + H₂O 0,35 g.L⁻¹), e posteriormente armazenado a -20°C. O DNA genômico das amostras foi extraído usando o FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals). A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 0,8% e a quantificação (ng/μL) e a pureza (relação 260/280nm) foi realizado no Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa NGS genomic solutions (Piracicaba-SP, Brazil), os genes 16S rRNA região V3-V4 foram amplificados por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) usando o set de primer 341F - 806R (Yu et al., 2005), realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) e na ligação dos barcodes foi usado o do kit Nextera XT. O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina Miseq, sendo as leituras produzidas de 2x250 pb. Na análise dos dados foi usado o programa DADA2 (Callahan et al., 2016a), um pacote de código aberto implementado na linguagem R foi utilizado para modelagem e correção de erros de amplicons. 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 (Q<30). 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 138 foi utilizado como referência. As classificações taxonômicas, e suas quantificações, gerados pelo DADA2 foram importados para o programa Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013), também implementado no R. As análises de diversidade Alpha e Beta, foram realizadas via pacote phyloseq, conforme descrito em (Callahan et al., 2016b). As sequências foram submetidas ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob número de acesso PRJNA907720. A inferência das vias metabólicas foi realizada utilizando as ferramentas das bases de dados BRENDA (BRENDA Enzyme Database, 2022) e KEGG (KEGG Pathway Database, 2022).

5.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Ensaio com Diferentes Alcalinizantes

Para avaliação do efeito da adição de agentes alcalinizantes na produção de hidrogênio, a partir da co-digestão de resíduos da agroindústria de citros foram conduzidos três ensaios preliminares: (1) ensaio controle sem adição de alcalinizante, (2) ensaio com carbonato de cálcio e (3) ensaio com bicarbonato de sódio. A produção de hidrogênio (P) observada nestes ensaios foi de $397,37 \text{ mL.L}^{-1}$, $1099,73 \text{ mL.L}^{-1}$ e $517,29 \text{ mL.L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.1 e Tabela 5.4). Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre os três ensaios em relação a P . O uso de carbonato de cálcio e bicarbonato de sódio favoreceram aumento de $176,8\%$ e $30,2\%$ de P , respectivamente, em relação ao ensaio controle. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), também foi observada entre os ensaios com carbonato e bicarbonato, sendo observado P $112,6\%$ superior para o primeiro alcalinizante em relação ao segundo.

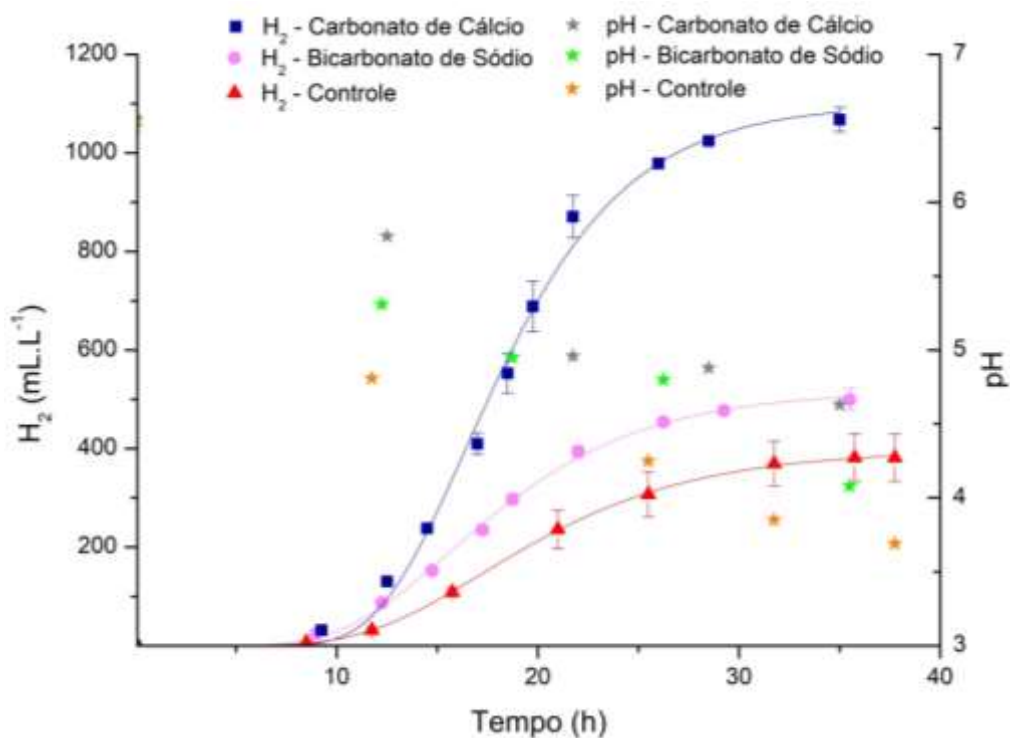


Figura 5.1. Ajuste de Gompertz modificado da produção acumulada de H₂ dos ensaios com diferentes alcalinizantes.

Tabela 5.4. Parâmetros cinéticos de Gompertz dos ensaios em reator em batelada de avaliações alcalinizantes.

Reator em Batelada	P mL.L ⁻¹	Rm mL.L ⁻¹ .h ⁻¹	λ h	%H ₂ Biogás	Y_1 mLH ₂ .g ⁻¹ CHO	Y_2 molH ₂ .mol ⁻¹ hexose	pH final
Bicarbonato de sódio	517,29	35,57	10,28	44,1%	99,45	0,86	4,08
Carbonato de cálcio	1099,73	91,26	12,04	45,5%	162,22	1,65	4,63
Sem Alcalinizante	397,37	24,76	11,32	46,4%	71,44	0,55	3,69

Em relação ao parâmetro cinético de tempo de início da produção de hidrogênio (λ) não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os ensaios com diferentes alcalinizantes em relação ao ensaio controle. Sob tais condições os λ observados foram 10,1 h, 11,8 h e 12,4 h, para os ensaios com bicarbonato, controle sem alcalinizante e com carbonato, respectivamente. O pH inicial do processo tem sido reportado como um parâmetro significativo para o tempo de início de produção de H₂ em reatores em batelada utilizando diferentes substratos, como resíduos de alimentos (Kim et al., 2011), água residuária e resíduos sólidos de indústrias de processamento de alimentos e bebidas (Wongthanate et al., 2014), e resíduos de bananas (Mazareli et al., 2020), com pH inicial próximo a 7,0 favorecendo menores valores para λ . Para os ensaios do presente estudo o ajuste para estabelecer um mesmo pH inicial nos três ensaios ($6,5 \pm 0,1$) é provável ter sido determinante para que não fosse observada diferença significativamente estatística em relação ao parâmetro de tempo de início de produção.

No início da produção de hidrogênio, com tempo médio próximo a 12h, observou-se variação de pH nos três ensaios em relação ao verificado inicialmente de $6,5 \pm 0,1$, observando para o ensaio controle diminuição mais acentuada. No início da fase exponencial de produção de H₂ o pH do ensaio controle estava em 4,8, muito próximo ao limite inferior da faixa ideal para produção de H₂ (4,5), apontada por exemplo, por Lee et al. (2010). Todavia, para os ensaios com alcalinizante observou-se pH de 5,3 e 5,8 para bicarbonato e carbonato, respectivamente. Provavelmente, estas condições foram mais favoráveis para atividade de produção de hidrogênio. Conforme descrito por Lin et al. (2004), um meio contendo compostos alcalinizantes minimiza as flutuações de pH durante o período inicial da fermentação impactando significativamente no desempenho da produção de H₂, tal como foi observado no presente estudo, com menor flutuação do pH para os ensaios com bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio. Os autores destacam ainda que uma falha no controle de alcalinidade, pH e desequilíbrio na concentração de AOVs pode resultar na interrupção da

produção de hidrogênio. Neste contexto é fundamental um ajuste na concentração do agente alcalinizante em relação à disponibilidade de substrato, minimizando falhas no controle do pH, mantendo-o em faixa adequada para produção de H_2 .

Apesar da significativa diferença observada de P entre os ensaios, não foi verificada diferença estatística em relação ao percentual de hidrogênio na composição do biogás; ou seja, foram observados 44,1%, 45,5% e 46,4% para os ensaios com bicarbonato, carbonato e controle, respectivamente. Todavia, vale destacar que apesar de percentuais de H_2 semelhantes, a manutenção do pH operacional por maior período na faixa entre 4,5 e 6,5, delimitada como ideal para produção de H_2 (Lee et al., 2010), foi determinante para observar maior P no ensaio com carbonato, em relação aos demais ensaios. Sistemas acidogênicos de produção de hidrogênio são vulneráveis a perdas de desempenho relacionadas a fatores como variações nas rotas metabólicas e atividade das hidrogenases (Fuess et al., 2016).

No período entre 25 – 30 h após início da fermentação, já era observada uma tendência de estabilização da produção de hidrogênio para o ensaio controle, momento este em que o pH verificado foi de 4,2. Em condição de pH na faixa ácida pode ocorrer o aumento da concentração de AOV em sua forma protonada, o que causa inibição das bactérias fermentativas (Salek et al., 2015). Neste mesmo período a produção de hidrogênio dos ensaios com bicarbonato e carbonato ainda se encontrava na fase exponencial, com pH próximo de 4,9.

Ao final dos ensaios o pH verificado foi de 3,7, 4,1 e 4,6, para os ensaios controle, com bicarbonato, e com carbonato, respectivamente. Para o ensaio controle o pH final é provável ter sido inibitório para prosseguimento do processo fermentativo, uma vez que o perfil de consumo de carboidratos indica que houve estagnação na concentração de carboidratos no reator após 25h de ensaio, de forma que o consumo de carboidratos foi de apenas 63,70% (Tabela 5.5 e Figura 5.2). Tal dinâmica observada no ensaio sem adição de alcalinizante do presente estudo é destacada por Kim et al. (2011), apontando que para valores de pH ácidos, além da dinâmica de alteração das rotas metabólicas, a utilização do substrato pode ser diretamente inibida.

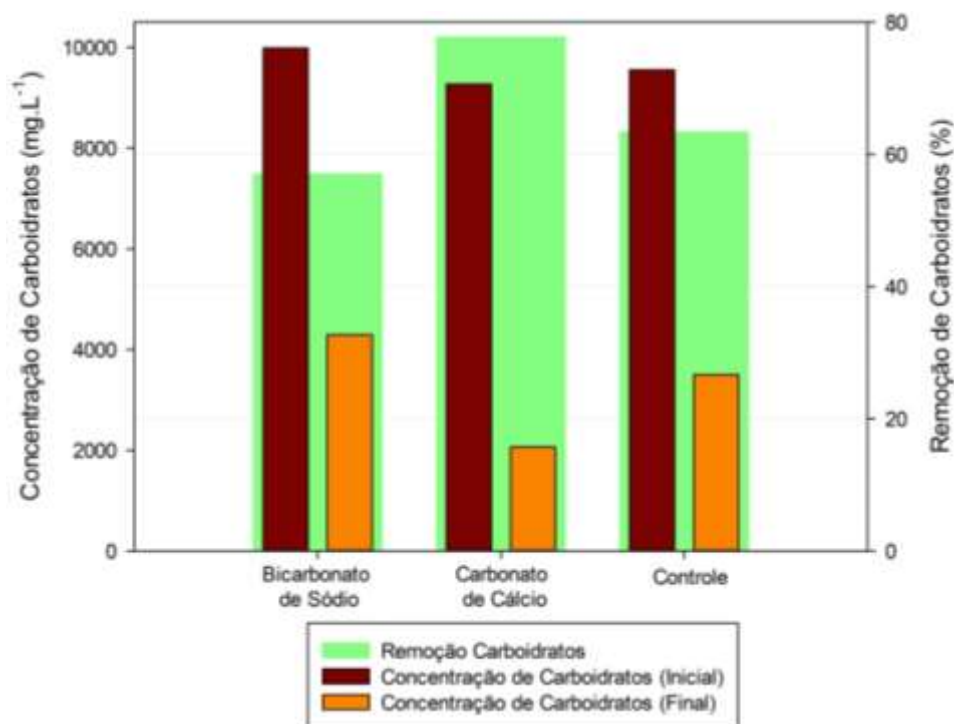


Figura 5.2. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos dos ensaios preliminares de avaliação da alcalinização.

Tabela 5.5. Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada com diferentes alcalinizantes.

Ensaio	Alcalinidade Parcial Inicial (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	g Alcalinizante. g ⁻¹ CHO	Carboidratos (mg.L ⁻¹)		RC (%)	AOV Predominate (mg.L ⁻¹)	HBu/HAc
			Inicial	Final			
Bicarbonato de sódio	355,73	0,20	9985,0	4291,0	57,03	HLa: 1753,0	0,36
Carbonato de Cálcio	127,88	0,22	9270,0	2064,17	77,73	HAc: 1192,7 HBu: 1232,8	1,03
Sem Alcalinizante	16,28	0,00	9552,3	3499,0	63,70	HLa: 1768,0	0,35

RC: remoção de carboidratos.

Para o ensaio com bicarbonato de sódio acentuada diminuição do pH foi observada em intervalo coincidente com a estagnação da produção acumulada de H₂. Conforme verificado na Tabela 5, o consumo de carboidratos deste ensaio foi de apenas 57,0%, provavelmente a alcalinidade não foi suficiente para maior remoção de substrato, e o pH inferior a 4,8 a partir de 25h de ensaio foi desfavorável à produção de H₂, como pôde ser observado no platô na curva de produção.

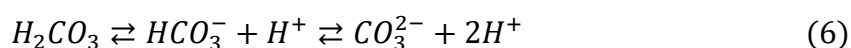
A diminuição menos acentuada do pH e a maior remoção de carboidratos (77,7%) foram verificadas com carbonato de cálcio, e alinhadas com o maior *P*, corroborando a ideia de que o uso do carbonato de cálcio como agente alcalinizante proporcionou maior estabilidade ao processo. A melhor efetividade no tamponamento do sistema ao longo do

processo, constatada pela manutenção do pH ainda acima de 4,5 ao final do ensaio, resultou em condições mais favoráveis para a prevalência de rotas metabólicas com produção de hidrogênio. Comportamento similar foi observado por Chen et al. (2015) ao avaliarem o efeito do bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio na estabilidade da digestão anaeróbia de resíduos de alimentos em reatores batelada. Nesta perspectiva constaram que apesar do bicarbonato possibilitar a neutralização mais rápida dos ácidos orgânicos produzidos, resultando em melhor desempenho no início do processo, nas condições com carbonato foi observada melhor capacidade de tamponamento resultando em maior produção acumulada de hidrogênio.

A alcalinidade parcial inicial do ensaio com bicarbonato foi quase 3 vezes maior em relação ao ensaio com carbonato, entretanto conforme verificado pelo perfil de pH ao longo dos ensaios o tamponamento do processo foi mais eficiente com o uso do carbonato (Tabela 5.5). Tal fato decorre das características de solubilidade dos compostos. De acordo com o PubChem a solubilidade do bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio em água é de aproximadamente 10g.L^{-1} ($25^{\circ}\text{C}/1\text{ atm}$) e 15 mg.L^{-1} ($25^{\circ}\text{C}/1\text{ atm}$) (National Center for Biotechnology Information, 2022a, 2022b), respectivamente. De acordo com Ai et al. (2014), devido a baixa solubilidade e lenta dissolução, o carbonato de cálcio em excesso não conduzirá ao aumento significativo do pH do meio, mas ao invés disso promoverá maior tamponamento do meio. Sendo assim, nas condições com bicarbonato foi observada maior alcalinidade de forma imediata, enquanto com carbonato ocorreu liberação da alcalinidade gradativamente, conseqüentemente propiciou maior estabilidade para produção de hidrogênio.

O aumento da pressão parcial de CO_2 é reportado como um fator que promove o aumento da solubilidade do carbonato na fase líquida, conforme discutido por Weyl (1959) e também Frear e Johnston (1929). Entretanto, de acordo com o modelo matemático validado em experimentos realizados em reator CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) por Salek et al. (2015), o aumento da concentração de CO_2 na fase gasosa e conseqüente aumento da sua pressão parcial tem efeito negativo no pH da fermentação. Isto pode estar relacionado à baixa taxa convectiva de transporte do CO_2 para o *headspace* ou a baixa transferência de massa de CO_2 da fase líquida para gasosa, causando aumento de ácido carbônico (H_2CO_3^*) (soma de $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_{2(\text{aq})}$) no meio, mudando o equilíbrio do sistema com predominância de CO_3^{-2} e levando ao aumento da concentração de prótons e conseqüente redução de pH, como pode ser observado na Eq. (6) (Salek et al., 2015). Sendo assim, fatores como a periódica

despressurização do *headspace* para os reatores em batelada de todos os ensaios mantendo baixas $p\text{CO}_2$, e a condução do processo sob agitação (130 rpm) para melhorar a efetividade da transferência de massa da fase líquida para gasosa foram estratégias que proporcionaram bom funcionamento do sistema carbonato no sentido de neutralizar os prótons H^+ provenientes do processo fermentativo.



Salek et al. (2015) destacam importantes fatores relacionados à cinética de dissolução do carbonato de cálcio em sistemas fermentativos. A partir da dissolução do carbonato ocorre a liberação de íons Ca^{+2} no meio aquoso que atuam neutralizando a presença dos carboxilatos originados da fermentação. Entretanto, em sistemas com alta concentração de substrato há necessidade que a taxa de dissolução de CaCO_3 (Eq. 7) seja próxima à taxa de produção de ácidos orgânicos, gerando aumento da concentração de íons CO_3^{-2} podendo ocasionar a reprecipitação de carbonato de cálcio. Desta forma, como um mecanismo de manutenção do equilíbrio termodinâmico há redução da concentração de CO_3^{-2} no meio, o que resulta em aumento da concentração de prótons H^+ e redução de pH. Assim, fica evidente que a concentração de substrato é uma importante variável no processo e está diretamente associada a ação do agente alcalinizante, uma vez que o desbalanço entre a cinética dos processos ocasiona falha na manutenção do pH, mesmo em condições nas quais ainda há disponibilidade de alcalinizante no sistema.



Para o ensaio controle sem adição de alcalinizante (pH inicial 6,5 corrigido com NaOH) verificou-se alcalinidade parcial inicial praticamente nula (Tabela 5.5). Sob tais condições, pode-se inferir que na co-digestão dos resíduos de citros é necessário a suplementação com agentes tamponantes, porque em caso contrário tem-se acidificação do sistema e tendência para predominância de vias metabólicas com produção de compostos mais reduzidos, como por exemplo, o ácido láctico (HLA). A predominância de metabólitos mais reduzidos como HLa em sistemas sem capacidade de tamponamento foi observada por Assunis et al. (2019) em reatores em batelada com soro de queijo; para ensaio sem controle de pH não foi observada produção de outros ácidos além de HLa, assim como não houve produção de H_2 , atingindo pH final inferior a 4,0, o que levou à inibição da fermentação.

Os melhores resultados obtidos no ensaio com carbonato de cálcio podem também estar associados à disponibilização de íons Ca^{2+} no meio em decorrência do processo de solubilização do CaCO_3 (Eq. 5), visto que vários íons de metais são fundamentais para estimular o crescimento celular, a atividade de cofatores de enzimas, formação de endósporos, e outras funções metabólicas (Elbeshbishy et al., 2017). Principalmente, para bactérias Gram-positivas, tal como *Clostridium*, o Ca^{2+} é observado de forma importante na região de parede e membrana celular da célula vegetativa, em quantidade muitas vezes superior à contida nas regiões citoplasmáticas (Smith, 1995), visto que a estrutura da parede celular conta com camada espessa de peptidoglicano que contém grupos carboxila que são sítios aniônicos para a ligação do metal (Plette et al., 1996; Thomas e Rice, 2014). Destaca-se também que microrganismos do filo Firmicutes, especialmente *Clostridium* são notadamente importantes produtores de H_2 , e tem por característica a capacidade de formação de endósporos como uma estratégia de sobrevivência a condições adversas (Yang e Song, 2019). A concentração do íon Ca^{2+} cerca de 20 vezes maior nos endósporos que nas células vegetativas, e a elevada resistência dos endósporos ao calor está relacionada à presença do cálcio associado ao ácido dipicolínico (DPA), na forma de um quelato Ca(II)-DPA no núcleo do endósporo (Rajan et al., 1978). Wu et al. (2012) avaliaram o efeito da adição de íons de cálcio (Ca^{2+}), de 50 a 200 ppm, na produção de hidrogênio em reator de leito fluidizado alimentado com sacarose, e constataram aumento de até 18% na produção de H_2 , associada ao desenvolvimento considerável de *Clostridium* no reator. Similarmente, Zhang et al. (2020) realizaram ensaios em reatores em batelada com resíduos de alimento e cultura de *Clostridium sp.*, sendo constatado aumento da produção de H_2 com a suplementação de carbonato de cálcio (3 g.L^{-1}). Sob tais condições foi destacado a importância do Ca^{2+} como cofator enzimático com influência na etapa de hidrólise do substrato. Tais estudos corroboram a importância do cálcio no desenvolvimento de populações de microrganismos fundamentais para produção de H_2 e principalmente relacionados ao gênero *Clostridium* e endósporos positivos.

Visando maior estabilidade do processo fermentativo tendo em vista aumento no rendimento da produção de hidrogênio, optou-se com base nas diversas respostas obtidas nos ensaios preliminares, investigar de forma mais detalhada o efeito do uso do carbonato de cálcio, para diferentes concentrações de substrato.

5.3.2 Ensaio com carbonato de cálcio e diferentes concentrações de resíduos de citros

Identificada a melhor estratégia para alcalinização do processo de co-digestão de resíduos da agroindústria de citros, visando à obtenção de hidrogênio, buscou-se compreender melhor a relação entre a demanda de alcalinizante e a concentração de substrato, estabelecendo um direcionamento para maximização da produção de hidrogênio a partir do ajuste destes parâmetros.

A partir da análise ANOVA para o efeito das variáveis analisadas em relação a P pode-se identificar efeitos estatisticamente significativos (nível de confiança de 90%) para as variáveis X_1 (concentração de carbonato de cálcio, $p=0,088$) e X_2 (concentração de RSL, $p=0,017$) (Tabela 5.6). Para os ensaios A-3, A-4, A-7, A-8, conduzidos com $25,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL observou-se P bem superior em relação aos ensaios com $7,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$. Em relação ao carbonato verificou-se maior P para todos os ensaios conduzidos no nível superior ($4,0 \text{ g.L}^{-1}$), quando comparados com os ensaios com a mesma concentração de substrato, porém com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 . Sob tais condições pode-se inferir em efeito positivo da concentração do alcalinizante. Em relação ao P (Tabela 5.7) dos ensaios do ponto central cujos valores foram superiores aos obtidos para os demais ensaios do planejamento experimental, observa-se que os valores intermediários para as variáveis avaliadas ($16,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 , $2,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $3,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de lodo) resultaram em melhor condição para produção de H_2 , sendo provável que considerando o intervalo de valores avaliados para as variáveis seja possível identificar um ponto de otimização para P explorando com maior detalhe a relação entre as variáveis significativas.

Efeitos estatisticamente significativos ($p=0,263$ e $p=0,712$) não foram observados para as variáveis X_3 e X_4 , respectivamente. Influência na modificação de resposta de P não foi observada para a concentração de lodo (2 a 5 gSTV.L^{-1}), ou seja, não foi observada limitação ao processo para a razão entre inóculo e substrato (X_0/S_0) estabelecidos para cada um dos ensaios. Verificou-se que para o presente estudo que a faixa de valores para razão inóculo/substrato foi de $0,08:1,0$ a $0,71:1,0$ (calculada com base nas variáveis de inóculo e RSL para cada um dos ensaios). A menor amplitude de valores para razão inóculo e substrato em todos os ensaios (X_0/S_0 abaixo de $1,0:1,0$) é provável que tenha sido um fator importante para que não fosse observada significância da variável X_4 no que se refere a produção acumulada de hidrogênio. Como observado por Sun et al. (2011) ao avaliarem a influência de várias razões inóculo/substrato (X_0/S_0) na produção de hidrogênio utilizando *Chlorella* sp.

como substrato em reatores em batelada, só houve efeito negativo para X_0/S_0 superior a 1,0:1,0; assim como, toda faixa de valores mais baixos para razão X_0/S_0 resultaram em melhores resultados em relação a produção de H_2 .

Tanto, os resíduos sólidos de citros (X_2), como a água residuária (X_3) foram avaliadas como fontes de substrato ao processo. A partir disso verificou-se que os resíduos sólidos foram a principal fonte de carboidratos, suprimindo a importância do fornecimento de carboidratos da água residuária. Esta menor importância relativa de X_3 no fornecimento de substrato é provável motivo de efeito não significativo desta variável em relação a P , não sendo possível neste caso avaliar seu efeito de forma isolada.

Em relação à variável X_3 dois aspectos são fundamentais, a saber: (1) é provável que estabelecer uma faixa mais ampla de variação da concentração de ARL no processo do que a que foi estabelecida no presente conjunto de ensaios, possa permitir uma observação mais completa do efeito desta fonte de substrato na produção de H_2 ; (2) o segundo aspecto está relacionado ao objetivo de co-digestão dos resíduos provenientes de um mesmo segmento da agroindústria de citros, o fato de não haver efeito negativo significativo, indica que não houve inibição da produção de H_2 relacionada à água residuária nas concentrações avaliadas.

Os parâmetros cinéticos de produção de hidrogênio (P , Rm e λ), assim como o percentual de H_2 no biogás, pH final, e rendimento (Y), de cada um dos ensaios podem ser verificados na Tabela 5.7. O P dos ensaios observado foi entre 215,12 mL.L⁻¹ obtido no ensaio A-5 e 940,61 mL.L⁻¹ dos ensaios de ponto central (A-9/A-10/A-11), conforme pode ser visualizado na Figura 5.3.

Tabela 5.6. ANOVA para efeitos do carbonato de cálcio, RSL, ARL e Lodo no potencial máximo de produção de H_2

Fonte	SQ	GL	QM	Valor F	Valor-P
X_1 (L)	19405	1	19405	9,83	0,088
X_2 (L)	110826	1	110826	56,15	0,017
X_3 (L)	4685	1	4685	2,37	0,263
X_4 (L)	357	1	357	0,18	0,712
$X_1 \cdot X_2$	1892	1	1892	0,96	0,431
$X_1 \cdot X_3$	1229	1	1229	0,62	0,513
$X_1 \cdot X_4$	1135	1	1135	0,58	0,527
Erro	3948	2	1974		
Total	693546	10			

SQ=Soma dos quadrados; GL=Graus de liberdade; QM=Quadrado médio.

Tabela 5.7. Parâmetros cinéticos e de rendimento dos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado para avaliação do efeito de variáveis na produção de H₂.

Ensaio	<i>P</i> (mL.L ⁻¹)	<i>Rm</i> (mL.L ⁻¹ .h ⁻¹)	λ (h)	%H ₂ Biogás	<i>Y</i> ₁ (mLH ₂ .g ⁻¹ CHO)	<i>Y</i> ₂ (molH ₂ .mol ⁻¹ hexose)	pH final
A-1	326,27	45,80	10,4	46,7%	188,94	1,81	5,3
A-2	419,43	66,26	8,9	46,9%	155,17	1,66	5,7
A-3	579,28	60,92	9,1	53,2%	153,12	1,51	3,86
A-4	599,10	47,83	8,2	36,1%	103,82	1,08	5,63
A-5	215,12	33,09	10,0	51,3%	99,91	0,86	5,01
A-6	381,24	58,93	6,4	46,5%	148,39	1,49	5,86
A-7	522,49	56,79	8,6	51,0%	146,23	1,41	3,96
A-8	588,89	40,84	8,4	34,1%	83,82	0,88	5,59
PC (A-9/A-10/A-11)	940,61	60,64	8,1	48,1%	255,55	2,61	5,21

O menor *P* foi verificado no ensaio A-5, sendo consequência de uma condição com baixa concentração inicial de carboidratos (Tabela 5.8), com adição de 7,0 gSTV.L⁻¹ de RSL, e 3 gDQO.L⁻¹ de ARL, e também com concentração reduzida de alcalinizante (1,0 gCaCO₃.L⁻¹), resultando em relação de 0,33 gCaCO₃.g⁻¹CHO. Em contrapartida, o ensaio A-6 foi conduzido na mesma condição em relação às variáveis de substrato (*X*₂ e *X*₃), entretanto no nível superior de concentração de carbonato, e relação de 1,17 gCaCO₃.g⁻¹CHO. Sob tais condições foi observada *P* de 381,24 mL H₂.L⁻¹, valor 77,2% superior ao verificado no ensaio A-5. Em função do maior tamponamento fornecido no ensaio A-6 verificou-se maior estabilidade ao processo, com diminuição mais lenta do pH, estabilização da produção de H₂ em pH 5,9, e remoção de carboidratos de 86,20%. Todavia, no ensaio A-5 verificou-se redução acentuada do pH nas primeiras 15 horas de ensaio, até pH final 5,0, com remoção de 82,3% de carboidratos. Esta maior estabilidade de pH obtida com adição de carbonato de cálcio previamente ao início da fermentação foi destacada por Ai et al. (2014), em estudo com resíduos de palhas de arroz em reatores em batelada. Os autores observaram a manutenção do pH com menor flutuação devido à grande quantidade de alcalinidade na forma de carbonato de cálcio adicionado ao processo (1,6 g), o que proporcionou mínima redução entre o pH inicial e final, mesmo com elevada produção de AOV ao longo da fermentação.

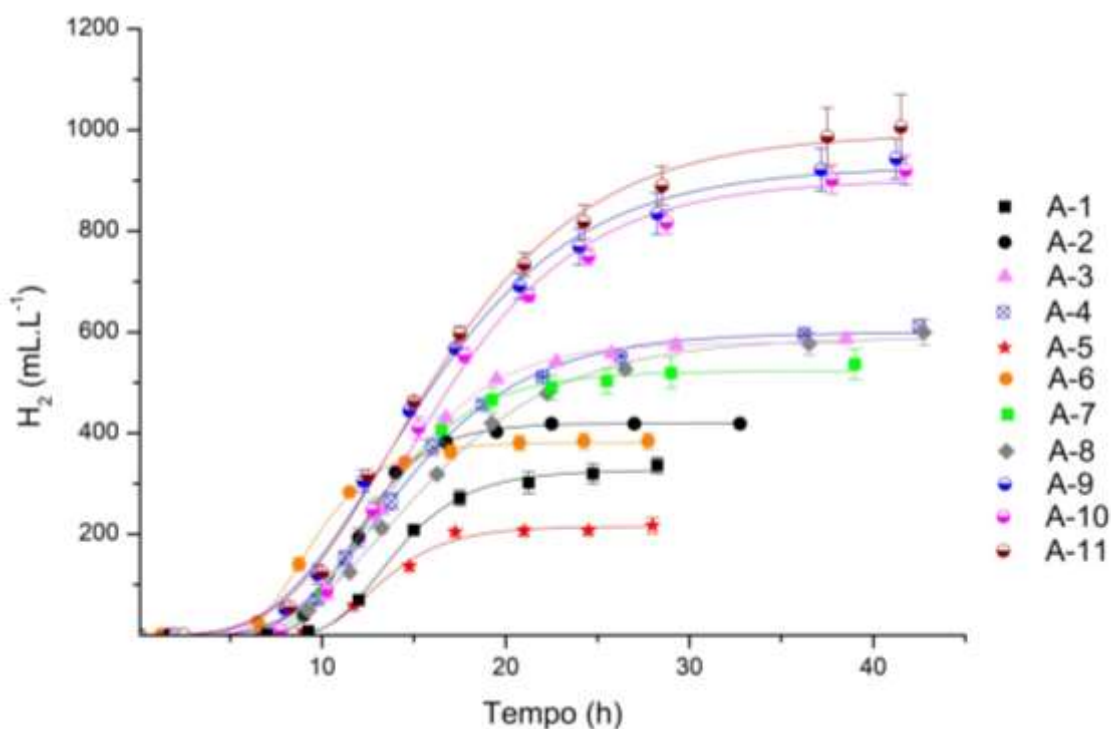


Figura 5.3. Ajuste de Gompertz modificado da produção acumulada de H₂ dos ensaios do planejamento experimental.

Os ensaios A-1 e A-2 foram realizados nas condições com nível inferior para ambas as variáveis de substrato (7,0 gSTV.L⁻¹ de RSL e 2,0 gDQO.L⁻¹ de ARL) e, portanto, com menor concentração inicial de carboidratos. Para A-1 a concentração de alcalinizante também foi fixada no nível inferior (1,0 gCaCO₃.L⁻¹) estabelecendo relação de 0,38 gCaCO₃.g⁻¹CHO, pouco superior a que foi verificada para A-5. Entretanto, verificou-se no ensaio A-1 maior *P*, 51,7% superior ao ensaio A-5. Observa-se a partir de tal resultado que esta combinação nas concentrações de substrato e de carbonato de cálcio resultou na predominância de rotas metabólicas relacionadas à produção de hidrogênio, considerando que houve maior produção de H₂ no ensaio A-1, apesar do consumo de carboidratos semelhante verificado para ambos os ensaios (80,9% para A-1, e 82,3% para A-5) (Tabela 5.8). Em relação ao ensaio A-2 a concentração de carbonato foi fixada no nível superior (4,0 gCaCO₃.L⁻¹), estabelecendo razão de 1,15 gCaCO₃.g⁻¹CHO, o que resultou em produção de hidrogênio ainda maior que a verificada em A-1, e superando em 95,0% a verificada para A-5. Observou-se pequena redução do pH; ou seja de 5,7 ao final da produção de hidrogênio, e elevada remoção de carboidratos (87,65%), a maior dentre todos os ensaios.

Tabela 5.8. Parâmetros físico-químicos principais do planejamento experimental fatorial fracionado para avaliação do efeito de variáveis sobre a produção de H₂.

Ensaio	gCaCO ₃ . g ⁻¹ CHO	Carboidratos		RC %	AOV Predominate (mg.L ⁻¹)	HBu/HAc
		Inicial	Final			
A-1	0,38	2636,7	504,03	80,9%	HAc: 948,7	0,33
A-2	1,15	3486,7	430,63	87,7%	HAc: 1624,9	0,52
A-3	0,14	7056,7	2712,67	61,6%	HLa: 3279,6	0,82
A-4	0,49	8093,3	1406,20	82,6%	HAc: 1489,4	0,08
A-5	0,33	2990,0	529,03	82,3%	HAc: 910,8	0,87
A-6	1,17	3405,0	469,90	86,2%	HAc: 1306,0	0,71
A-7	0,14	7360,0	3200,83	56,5%	HLa: 3749,4	0,66
A-8	0,40	9973,3	1391,40	86,1%	HAc: 1382,5	0,12
PC (A-9/A-10/A-11)	0,45	5639,8	1315,0	76,7%	HAc: 1457,4 HBu: 1448,9	1,00

A relação observada entre potencial de produção de hidrogênio com a concentração inicial de substrato e com a disponibilidade de alcalinidade no sistema, também pôde ser visualizada de forma interessante nos ensaios A-7 e A-8, ambos conduzidos em condição de nível superior de concentração de substrato (25,0 gSTV.L⁻¹ de RSL e 3,0 gDQO.L⁻¹ ARL), mas em níveis opostos para concentração de carbonato, 1,0 gCaCO₃.L⁻¹ e 4,0 gCaCO₃.L⁻¹, respectivamente. Nestes ensaios houve aumento importante na produção de hidrogênio (522,5 mLH₂.L⁻¹ e 588,9 mLH₂.L⁻¹, respectivamente) em comparação aos ensaios conduzidos em nível inferior para concentração de substrato (A-1: 326,3 mLH₂.L⁻¹ e A-2: 419,4 mLH₂.L⁻¹), contribuindo para que fosse identificado efeito positivo estatisticamente significativo para a variável de substrato (concentração RSL).

Entretanto foi observado que a produção de H₂ de A-8 superou em apenas 12,7% a que foi observada para A-7, não sendo, portanto, observado grande aumento na produção em A-8 apesar da aparente estabilidade e eficiência observada no processo fermentativo para tal ensaio, oposto ao verificado em A-7. A estabilidade observada em A-8 é evidenciada por um perfil sem uma redução abrupta de pH, com estabilização em pH de 5,59, e uma elevada remoção de carboidratos (86,0%), enquanto que para A-7 houve redução acentuada de pH, sendo o pH final de 3,96, e a menor remoção de carboidratos (56,5%) dentre todos os ensaios.

O percentual de hidrogênio na composição do biogás do ensaio A-8 foi de apenas 34,1%, o mais baixo dentre os ensaios (Tabela 5.7), enquanto para A-7 foi verificado 51,0% de H₂. Esse baixo percentual de H₂ verificado decorre de processos de consumo de hidrogênio, como discutido por Saady (2013). O hidrogênio pode ser consumido por meio de duas diferentes formas, como equivalentes redutores (NADH₂) que representam uma molécula potencial de H₂, ou diretamente como hidrogênio molecular. Sendo assim, foi observado que apesar das condições do processo fermentativo do ensaio A-8 terem sido favoráveis a produção de hidrogênio, assim também foram para ocorrência de reações concomitantes de consumo, reduzindo a produção líquida de H₂ obtida no processo.

A remoção de carboidratos geral dos ensaios foi de 77,6% ±10,1%, sendo o maior valor de 87,65% foi verificado em A-2, e o menor 56,5% em A-7 (Figura 5.4). Para os ensaios nos quais a concentração de RSL foi de 7,0 gSTV.L⁻¹ a remoção foi de 84,3% ±3,2%, enquanto nos ensaios com 25,0 gSTV.L⁻¹ foi de 71,7% ±14,8%. Observa-se a partir de tais resultados que apesar do aumento da concentração de RSL ter resultado em efeito positivo na produção de hidrogênio, a elevada concentração de substrato impactou negativamente na eficiência de remoção do substrato, indicando que uma otimização da concentração dos resíduos de citros é fundamental visando melhor recuperação do conteúdo energético deste substrato.

Em relação ao aumento da concentração de carbonato de cálcio, além do efeito positivo verificado para a produção de hidrogênio, também foi verificada tendência ao favorecimento de maior remoção do substrato, para os ensaios com 1,0 g.L⁻¹ de CaCO₃. Sob tais condições, a remoção de carboidratos foi de 70,3% ±13,2%, enquanto para aqueles com 4,0 g.L⁻¹ de CaCO₃ foi de 85,6% ±2,1%. Provavelmente, neste último caso ocorreu a minimização da redução do pH operacional, evitando redução acentuada em curto período de tempo, a qual foi fundamental para a manutenção da fermentação com maior eficiência na remoção do substrato. Tais observações estão alinhadas ao que foi verificado por Asumis et al. (2019) em reatores em batelada com soro de queijo. Sob tais condições, observaram que o pH operacional tem importante influência na velocidade de degradação do substrato, de forma que para o ensaio sem controle de pH verificou-se diminuição acentuada do pH cujo valor final foi de 3,78. Neste caso, a remoção de carboidratos foi de apenas 45%, enquanto para os ensaios com controle de pH entre 5,0 e 7,5 a remoção foi entre 93 – 99%. As causas da influência do pH na cinética de degradação do substrato são associadas à modificação da

atividade enzimática, e redução do aproveitamento energético da biomassa em pH com tendência à acidificação devido ao gasto metabólico para excretar prótons liberados no interior da célula por ácidos não dissociados, e também às modificações no transporte de nutrientes para as células microbianas (Infantes et al., 2011; Panesar et al., 2007; Tang et al., 2017).

A concentração residual de carboidratos no meio ao final dos ensaios foi de 430 a 3200 mg.L^{-1} (Figura 5.4). O residual de substrato para etapa acidogênica foi significativamente menor do que para aqueles ensaios avaliados no nível superior para a concentração de RSL (X_2). Todavia, o percentual de remoção não é um indicador que permite visualizar de fato o esgotamento do substrato disponibilizado, porque a concentração absoluta residual representa do ponto de vista energético uma parcela de energia não aproveitada.

Do ponto de vista de um processo de digestão anaeróbia de dois estágios, concentrações residuais de carboidratos muito elevadas descaracterizam a separação dos estágios fermentativo e metanogênico, podendo ocasionar maior instabilidade no segundo. Os AOVs produzidos na acidogênese são substratos chave para bom desenvolvimento do segundo estágio, de forma que a disponibilidade destes é um fator crítico para desempenho global do processo (Srisowmeya et al., 2020).

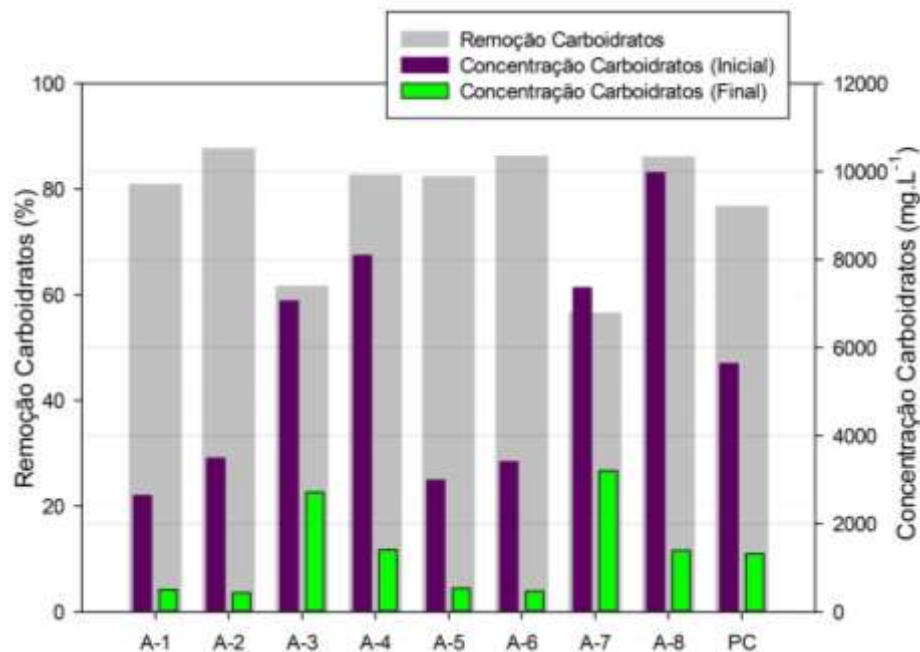


Figura 5.4. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos nos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado.

O rendimento de H_2 (Y_1) geral para os ensaios foi de $164,5 \pm 63,5 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{CHO}$; todavia, para os ensaios dos pontos centrais (A-9/A-10/A-11) observou-se maior rendimento de $255,6 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{CHO}$; ou seja, 55% superior aos demais ensaios. Para o ensaio A-8 verificou-se o menor rendimento, de apenas $83,8 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{CHO}$, cerca de 96% inferior ao valor médio, apesar de A-8 não ter sido o ensaio com menor P . Este baixo rendimento para A-8 foi resultado de elevado consumo absoluto de carboidratos, porém com produção de H_2 não proporcional ao consumo do substrato.

Adotando a hipótese de simplificação de que todo conteúdo de carboidratos é composto por hexoses calculou-se o rendimento em mol de H_2 por mol de hexose (Y_2) para os ensaios. Este é um parâmetro usado para quantificar se houve prevalência de rotas metabólicas mais favoráveis a produção de hidrogênio, considerando o rendimento teórico de $4 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$ (Thauer et al., 1977) como referência para interpretação. Y_2 observado para os ensaios foi de 0,86 a $2,61 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$, representando 21,6% a 65,2% do rendimento máximo teórico. Os rendimentos observados para os ensaios com maior produção de H_2 (pontos centrais A-9/A-10/A-11) foram bem elevados ($2,61 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$) considerando as limitações práticas, uma vez que apesar da existência do limite teórico de $4,0 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$ resultante da remoção de glicose em ácido acético acoplada a formação de H_2 via NADH_2 :Ferrodoxina oxidoreductase, é supostamente improvável atingir tal limite. A fermentação de glicose somente em ácido acético, CO_2 e H_2 na prática não ocorre, havendo sempre produção de ácido butírico. Isso ocorre devido ao mecanismo de ajuste entre a formação de ácido acético com favorecimento a maior eficiência de obtenção de ATP, e também de ácido butírico com geração de entropia que atende o metabolismo clostridial (Thauer et al., 1977). Os maiores rendimentos práticos de H_2 são observados para as vias fermentativas de ácido butírico/acético, a qual tem sido reportado ser de até $2,8 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}$ (Lee et al., 2009).

No ensaio A-5 ($0,86 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$) foi observado o menor o rendimento dentre todos os ensaios, assim como foi para P ; valor muito próximo foi observado para A-8 ($0,88 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$), contudo de forma contrária ao que se verificou para P em A-5; ou seja, maior valor ($588,9 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$). O baixo percentual de H_2 na composição do biogás (34,1%) do ensaio A-8, combinado a um baixo Y_2 permite inferir que as reações de consumo, concomitantemente à produção de H_2 de fato ocorreram de forma importante nesta condição experimental. Tal fato é também suposto no ensaio A-4, para o qual verificou-se P

intermediário ($599,1 \text{ mL.L}^{-1}$), entretanto rendimento abaixo do esperado ($1,08 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{hexose}$), com baixo percentual de H_2 no biogás (36,1%).

Em relação aos metabólitos solúveis observou-se de forma geral que cinco deles corresponderam a mais de 95% do total quantificado para todos os ensaios, sendo eles, o ácido acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), láctico (HLa) e cítrico (HCt).

Para quatro ensaios (A-1, A-2, A-4 e A-8) o ácido acético foi o principal metabólito ao final do processo; ou seja de $948,7 \text{ mg.L}^{-1}$, $1624,9 \text{ mg.L}^{-1}$, $1489,4 \text{ mg.L}^{-1}$, e $1382,5 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, representando elevada proporção do total de metabólitos (73,8%, 63,4%, 59,7% e 57,6%, respectivamente). Para A-5, A-6 e pontos centrais (A-9/A-10/A-11), o HAc também foi o principal metabólito, de $910,8 \text{ mg.L}^{-1}$, $1306,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e $1457,4 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.5). Destaca-se que foi verificado em A-3 e A-7 uma composição de metabólitos distinta dos demais ensaios, com predomínio de HLa em $3279,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $3749,4 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, sendo superior a 60% do total de metabólitos.

Nos ensaios na condição do ponto central destacados anteriormente com o maior P e Y_2 , verificou-se uma composição de metabólitos dividida basicamente apenas entre HAc ($1457,4 \text{ mg.L}^{-1}$) e HBu ($1448,9 \text{ mg.L}^{-1}$), com percentual semelhante para cada um deles na composição total (HAc: 43,8% e HBu: 43,6%), resultando em relação HBu/HAc muito próxima de 1,0 (Tabela 5.8), a maior dentre os ensaios. A predominância destes ácidos está alinhada com a elevada produção de H_2 , uma vez que vias metabólicas principais de produção de HBu e HAc estão relacionadas a elevados rendimentos de hidrogênio. Cheong et al.(2006) indicaram um forte correlação entre razões HBu/HAc e a produção acumulativa de hidrogênio, com maiores valores de P , quando foram obtidos maiores valores para esta razão. Valor elevado para a razão HBu/HAc, acima de 1, indica bom ajuste das condições para produção de hidrogênio (Kisielewska et al., 2015) e tendência de que não houve ocorrência de forma importante de rotas acetogênicas (Akhlaghi et al., 2017).

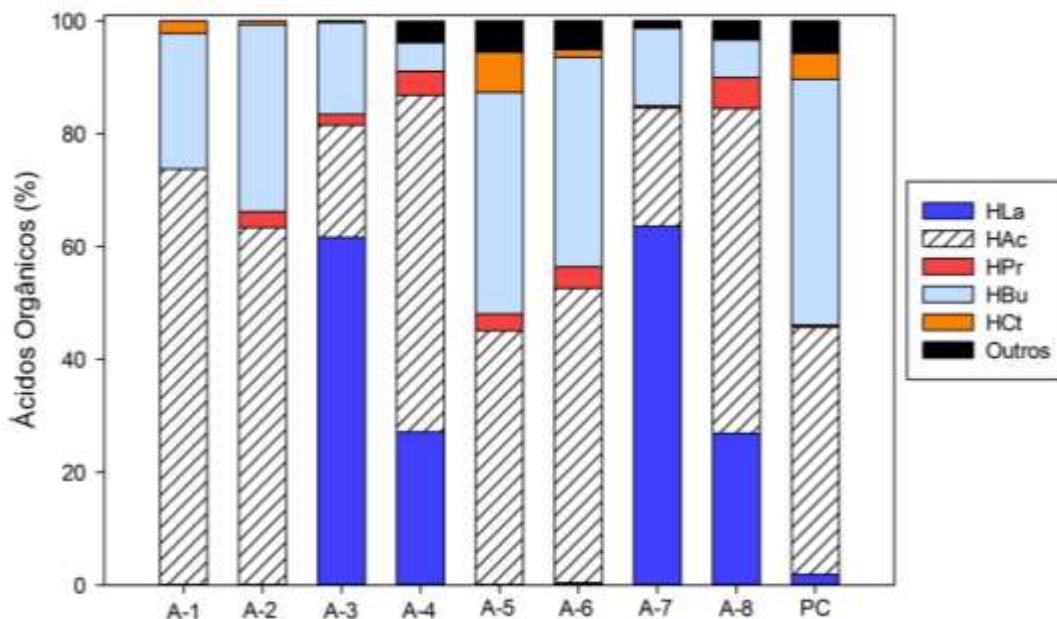


Figura 5.5. Composição percentual dos ácidos orgânicos ao final dos ensaios do planejamento experimental fatorial fracionado.

Os menores valores para razão HBU/HAc foram de 0,08 e 0,12, observados para os ensaios A-4 e A-8, respectivamente, indicando prevalência importante de HAc. A razão HBU/HAc para A-4 e A-8 associada ao já relatado baixo rendimento de H_2 , e baixo percentual de H_2 na composição do biogás, verificados para estes ensaios, fortalece-se a hipótese de ocorrência importante do processo de homoacetogênese, sendo a principal causa para baixa razão HBU/HAc. Para estes ensaios também detectou-se importante concentração de HLa, $677,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $645,8 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, sendo aproximadamente 27% do total de metabólitos em ambos os casos. Este aspecto é outro ponto importante no entendimento dos baixos valores de rendimento de H_2 e razão HBU/HAc, considerando a ausência de produção de hidrogênio associada à produção de HLa, e à produção de HAc via fermentação heteroláctica (Pessione et al., 2010).

Vale destacar que os ensaios A-4 e A-8 foram aqueles com maior concentração de ácido propiônico ao final do processo, $106,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $131,3 \text{ mg.L}^{-1}$, representando 5,5% e 4,3% do total de metabólitos, respectivamente. A produção de HPr também é uma das razões para a menor % H_2 na composição do biogás, considerando que a reação metabólica de produção de HPr envolve o consumo de 2 mols de H_2 . Para as vias de produção de ácido propiônico há consumo de equivalentes redutores disponíveis, este consumo de $NADH_2$ nestas vias modifica o fluxo de elétrons entre $NAD^+/NADH_2$ e Fd_{ox}/Fd_{red} causando redução da produção de

hidrogênio, visto que H_2 é produzido principalmente pelo consumo de Fd_{red} pelo sistema Fd:hidrogenase (Elbeshbishy et al., 2017; Lee et al., 2009).

Para os ensaios A-3 e A-7 foi observada elevada predominância de ácido láctico, além de outras respostas operacionais em comum; para ambos foi observado os piores resultados em relação à remoção de carboidratos (61,6% e 56,5%), e foram os únicos ensaios cujo pH final foi abaixo de 4,0 (3,86 e 3,96). A combinação de menor concentração de alcalinizante ($1,0 \text{ gCaCO}_3.L^{-1}$) com elevada concentração de substrato ($25,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$) foi comum aos ensaios, estabelecendo razão $\text{gCaCO}_3/\text{gCHO}$ de apenas 0,14 em ambos. Provavelmente, para condições com baixos valores desta relação ocorre o favorecimento da produção de compostos mais reduzidos, tal como o HLa. Tal tendência é reforçada pelo que foi observado nos ensaios A-1 e A-5, ou seja, apesar da adição de apenas $1,0 \text{ gCaCO}_3.L^{-1}$ a variável principal de substrato esteve fixada em seu nível inferior ($7,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$), resultando em razão $\text{gCaCO}_3/\text{gCHO}$ mais elevada, de 0,38 e 0,33, respectivamente, não sendo observado HLa ao final.

Pela análise temporal da concentração de metabólitos nos ensaios A-3 e A-7 verificou-se que a produção de HLa foi mais acentuada nas últimas horas do ensaio, período este no qual o pH de ambos os ensaios era próximo de 4,5. Nesta fase, provavelmente, toda a alcalinidade armazenada pelo sistema já havia sido disponibilizada e consumida em decorrência da produção de ácidos orgânicos, comprometendo a estabilidade do processo e sendo desfavorável para ocorrência das vias metabólicas de produção de H_2 . Os resultados observados estão alinhados aos relatos de Choi e Ahn (2015). Esses autores avaliaram diferentes concentrações de alcalinidade na fermentação em hidrogênio com sacarose e resíduos suínos. Sob tais condições identificaram para os ensaios com baixa capacidade de tamponamento diminuição significativa do pH para valores próximos a 4,0, decorrente do acúmulo de AOVs, afetando a produção de H_2 e modificando o perfil de produção de metabólitos solúveis.

O pH do processo de fermentação de hidrogênio além do impacto na dinâmica da comunidade microbiana e vias metabólicas tem papel crucial no comportamento químico dos metabólitos solúveis produzidos. Para ensaios com elevada produção de ácidos acético e butírico, por exemplo, a diminuição do pH abaixo das constantes de dissociação do ácido acético ($pK_a=4,76$) e butírico ($pK_a=4,8$) resultam na forma não dissociada destes ácidos na condição de equilíbrio. Formas não dissociadas destes ácidos atravessam a membrana celular

das bactérias, causando danos ao metabolismo celular pela dissociação intracelular destes ácidos (Tee et al., 2017). Neste contexto a adição do alcalinizante em concentração adequada para fermentação de resíduos de citros em alguns dos ensaios foi fundamental para manutenção do dentro da faixa de valores desejada, evitando a predominância destes metabólitos em formas não dissociadas que poderiam inibir o processo.

Monot et al. (1984) obtiveram resultados que confirmam a importante influência do pH na fermentação, sob a ótica do equilíbrio químico dos metabólitos originados no processo. Com a condução de experimentos em batelada sob diferentes valores de pH (4,5/5,0/5,5/6,0) detectaram correlação entre o pH e a concentração de ácido butírico não dissociado no meio, com aumento significativo do ácido nessa forma em pH entre 4,0 – 5,5, o que causou inibição do crescimento celular em concentrações de ácido butírico não dissociado acima de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, e início da produção de solventes para concentrações acima de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. Como discutido, para os ensaios com melhores resultados em relação à produção de hidrogênio (A-9/A-10/A-11) no presente estudo, houve predominância de HBU e HAc, em concentrações próximas a $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ para ambos, e o pH final foi de 5,2, de forma que a manutenção do pH acima dos valores de pKa destes ácidos pode ter sido uma das razões para obtenção favorável em relação aos valores de *P*, *Rm* e remoção de carboidratos, uma vez que não foram favorecidas condições para que elevadas concentrações de formas não dissociadas destes ácidos pudessem ser predominantes e inibir o metabolismo fermentativo.

5.3.2 Análise da comunidade microbiana

A análise da comunidade microbiana foi realizada para caracterização dos principais grupos de microrganismos atuantes no processo. Amostras dos ensaios A-7 e da condição de ponto central (A-9) foram tomadas para caracterização da estrutura da comunidade microbiana, pois para estes ensaios observou-se respostas antagônicas no âmbito das condições experimentais avaliadas. O ensaio de ponto central (A-9) foi selecionado devido ao maior valor de *P* e *Rm* de H_2 , além de maior proporção de HBU e HAc dentre os outros metabólitos observados. Enquanto em A-7 foi observado maior predominância de ácido láctico, baixa remoção de carboidratos, e diminuição acentuada do pH para valor inferior a 4,0. Além disso, amostra do inóculo alóctone (lodo de reator UASB) foi caracterizada para análise comparativa da abundância relativa das populações de bactérias em relação àquelas do final dos ensaios A-7 e A-9.

Para o lodo de inóculo obteve-se 24,394 sequências do gene RNAr 16S agrupadas em 95 ASV (Amplicon Sequence Variant), já para os ensaios A-7 e A-9 obteve-se 22.880 e 21.045 sequências agrupadas em 24 ASV e 26 ASV, respectivamente. A similaridade entre as duas amostras analisadas com base nas ASV foi de 66%. Já as similaridades entre inóculo alóctone e as amostras dos ensaios A-7 e A-9 foram de apenas 4,0% e 3,0%, respectivamente. Foi observado platô das curvas de rarefação (Figura B.2) possibilitando a inferência de representatividade para a diversidade taxonômica analisada.

Os índices ecológicos de Shannon-Wiener e Simpson foram calculados para estabelecer uma métrica da diversidade das amostras. Em relação à diversidade de Shannon verificou-se 3,51, 0,89 e 0,35 para as amostras do inóculo alóctone, ensaio A-7 e A-9, respectivamente. Neste caso específico ocorreu diminuição considerável da diversidade das populações dos ensaios em relação ao inóculo. Palladino et al. (2017) verificaram 3,67 para o índice de Shannon para o inóculo proveniente de reator UASB mesofílico, valor próximo ao observado no presente estudo. Todavia, a redução verificada na diversidade de Shannon entre a biomassa do inóculo e aquelas dos ensaios fermentativos foram provavelmente decorrentes de uma seleção imposta pelas condições nutricionais diferentes; ou seja, qualidade e quantidade de compostos orgânicos de água residuária de avicultura bem diferente dos resíduos sólidos e líquidos de citros (Camargo et al., 2021a; Mota et al., 2018).

Em relação a dominância com base no índice de Simpson foi verificado 0,05; 0,46 e 0,88, respectivamente, para inóculo, ensaio A-7 e A-9. Portanto, foi observada maior dominância em A-9, em relação a A-7 e inóculo. Provavelmente, ocorreu seleção de populações de bactérias favorecidas pelas condições impostas em A-9 com 16 gSTV.L⁻¹ de RSL e 2,0 g DQO.L⁻¹ de ARL, com 2,5 g.L⁻¹ de CaCO₃, que resultou em uma razão de 0,44 gCaCO₃.g⁻¹CHO, proporcionado a manutenção do pH em valores próximos a 5,5 ao longo de todo processo, favorável ao estabelecimento de populações produtoras de hidrogênio (Hawkes et al., 2002). Todavia, em A-7 o baixo valor para razão gCaCO₃.g⁻¹CHO de apenas 0,14, resultou em um ineficiente controle do pH, que reduziu a valores inferiores a 4,5 ao longo de quase todo o processo, sendo determinante para o estabelecimento de outros grupos de microrganismos, principalmente associados à produção de compostos mais reduzidos tal como ácido láctico (Luongo et al., 2019).

Em ambos os ensaios foi observada maior abundância relativa do filo Firmicutes de 99,26% (A-7) e 99,56% (A-9). No inóculo foi observada apenas 3,6% para o

filo Firmicutes, 17,9% para o filo Halobacterota, 16,0% para Bacteroidota (15,5% para Desulfobacterota, 13,7% para Chloroflexi e 9,3% Spirochaetota. Para o ensaio A-7 também foram identificadas em baixa abundância bactérias pertencentes aos filios Halobacterota (0,26%), Chloroflexi (0,19%), Proteobacteria (0,16%), Actinobacteriota (<0,1%) e Bacteroidota (<0,1%). No ensaio A-9 foram identificadas em baixa abundância bactérias pertencentes aos filios Halobacterota (0,20%), Chloroflexi (<0,1%), Proteobacteria (0,19%), Bacteroidota (<0,1%) e Euryarchaeota (<0,1%).

A maior abundância relativa de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes nos ensaios está alinhada provavelmente às condições nutricionais impostas ao processo fermentativo, com elevado teor de carboidratos simples e complexos no substrato, e também pelo procedimento de tratamento térmico do lodo do reator UASB empregado como inóculo, que resultou na seleção de populações formadoras de endósporos. Bactérias pertencentes a este filo são notadamente reconhecidas pela degradação de polissacarídeos (Vanwonterghem et al., 2014), contribuindo com a produção de AOVs e H₂ pela fermentação de compostos orgânicos (Qin et al., 2021).

Em relação à família verificou-se para o lodo de inóculo que aquelas em maior abundância foram Anaerolineaceae (13,7%), Methanosaetaceae (11,8%), Smithellaceae (6,1%), Methanoregulaceae (6,1%), Syntrophaceae (5,8%), Spirochaetaceae (5,3%), Lentimicrobiaceae (4,9%), Leptospiraceae (3,9%), Fermentibacteraceae (3,6%) e Cloacimonadaceae (3,6%). Para o ensaio A-9 observou-se a predominância de Clostridiaceae com abundância relativa de 95,63%, e em menor proporção representantes das famílias Caloramatoraceae (1,65%), Peptostreptococcaceae (1,15%), Peptostreptococcales-Tissierellales (0,74%), Lachnospiraceae (0,27%), Methanosaetaceae (0,20%) e, Erwiniaceae (0,19%). Todavia, para o ensaio A-7 foram identificadas bactérias pertencentes a duas famílias com maior abundância relativa, Clostridiaceae (56,07%) e Peptostreptococcaceae (42,73%), além de outras famílias em menor abundância relativa, como por exemplo, Caloramatoraceae (0,39%), Methanosaetaceae (0,22%) e, Anaerolineaceae (0,19%).

Deve-se destacar que bactérias pertencentes à família Clostridiaceae foram predominantes em ambas as condições experimentais, A-7 (56%) e A-9 (95%), enquanto no inóculo foi observada abundância de apenas 0,1% desta família. Bactérias pertencentes a família Clostridiaceae estão relacionadas às condições com bons rendimentos de H₂ conjuntamente ao acúmulo de ácido butírico (Toledo-Alarcon et al., 2020). Provavelmente, a

redução da abundância desta família no ensaio A-7 está relacionada à própria condição nutricional com elevada concentração de substrato (25 gSTV.L⁻¹ de RSL e 3 gDQO.L⁻¹ de ARL) e concentração inferior de carbonato de cálcio (1 g.L⁻¹), que resultou em razão de apenas 0,14 gCaCO₃.g⁻¹CHO, resultando em diminuição acentuada de pH em valor < 4,0, com aumento significativo da produção de ácido láctico, combinada com a redução da produção de ácido butírico.

Representantes da família Peptostreptococcaceae, cuja abundância relativa foi maior em A-7 estão relacionados a fermentação de carboidratos com produção de variedade de AOVs e H₂ (Mockaitis et al., 2020; Slobodkin, 2014). Entretanto, vias metabólicas associadas a essas bactérias não estão associadas ao mesmo rendimento de H₂ observado para o metabolismo daquelas da família Clostridiaceae.

Na biomassa usada como inóculo foram identificados diferentes gêneros de microrganismos com abundância relativa superior a 1%, sendo *Methanosaeta* (11,8%), *Bacterioidetes vadinHA17* (7,9%), *Smithella* (6,1%), *Syntrophus* (5,8%), *Methanolinea* (3,9%), *Candidatus Cloacimonas* (3,6%), *Spirochaeta* (3,3%), *Lentimicrobium* (3,2%), e outros com abundância entre 2 e 1%, tais como *Thermoanaerobaculum*, *Syntrophorhabdus*, *Mathanoregula*, *Mesotoga* e *Leptolinea* (Figura 5.6). Para o ensaio A-7 foram identificados em maior abundância relativa, *Clostridium sensu stricto 1* (52,8%), *Paraclostridium* (42,7%), *Hathewayia* (2,9%), *Bifidobacterium* (0,1%), e *Prevotella* (0,1%). Enquanto para A-9 foram identificados *Clostridium sensu stricto* (93,8%), *Paraclostridium* (1,2%), *Hathewayia* (1,4%).

Palladino et al. (2017) identificaram para o mesmo lodo de inóculo proveniente de reator UASB de avicultura abundância relativa de *Clostridium* (10,5%), *Methanosaeta* (9,5%), *Tannerella* (8,0%), *Ornithobacterium* (7,8%), *Candidatus Cloacimonas* (6,6%), *Porphyromonas* (3,7%), *Deinococcus* (3,0%) e *Thermincola* (3,0%). Comparando-se as análises das comunidades microbianas desse lodo usado como inóculo e realizadas em diferentes períodos observa-se que ocorreram modificações importantes em sua estrutura de forma que apenas *Methanosaeta* e *Candidatus Cloacimonas* mantiveram-se com abundância relativa similar nas duas amostras do lodo de inóculo. Todavia, bactérias como *Clostridium*, *Tannerella*, e *Ornithobacterium* anteriormente observados em elevada abundância não foram identificadas com relevante abundância no presente estudo. Por tratar-se do lodo de um reator UASB em escala industrial aplicado ao tratamento de águas residuárias de avicultura e operado de forma contínua, provavelmente, ocorrem alterações nas populações microbianas

decorrentes de possíveis sazonalidades nas características do efluente industrial, distúrbios no processo. De acordo com Li et al. (2018) sucessão constante ocorre entre as populações de reatores anaeróbios com modificações na abundância de determinados grupos.

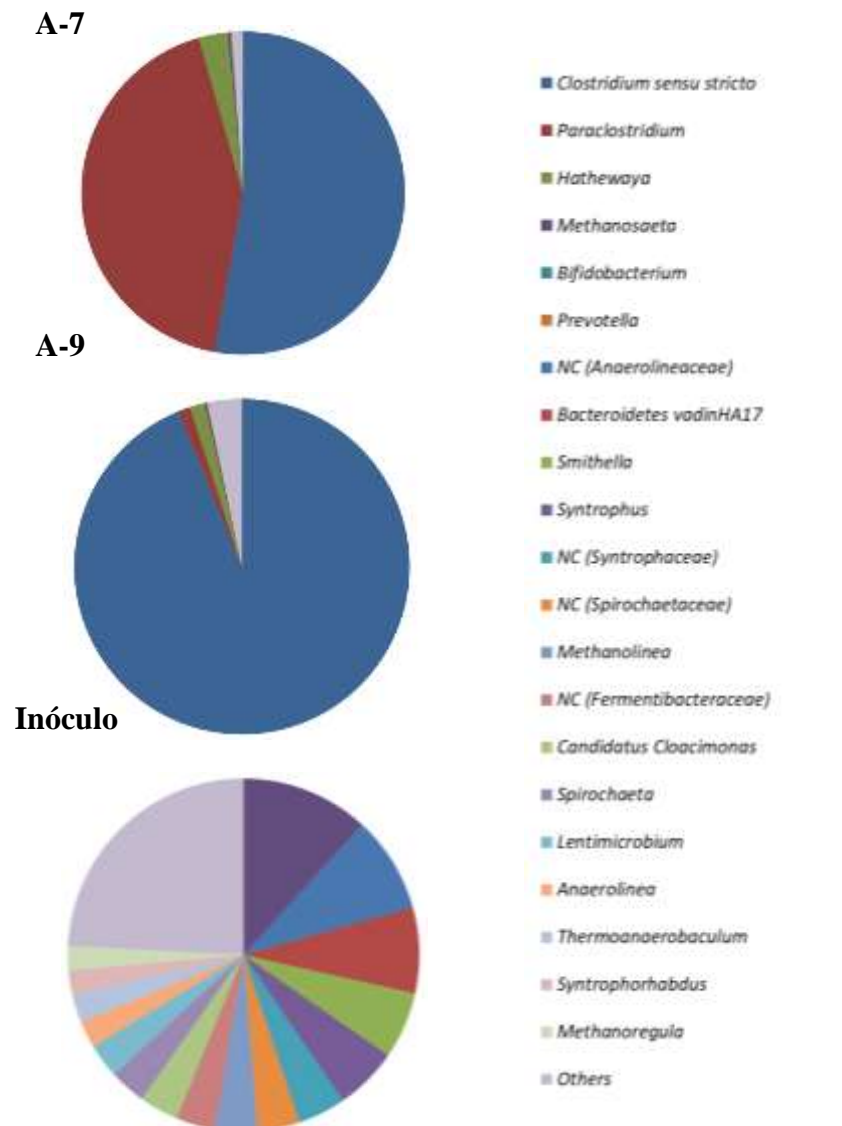


Figura 5.6. Abundância relativa dos gêneros de bactérias para o inóculo, e ensaios A-7 e A-9.

Bactérias semelhantes a *Clostridium sensu stricto* identificadas em A-7 e A-9 têm sido reportadas em diversos estudos relacionados à fermentação de diferentes substratos (Lu et al., 2020; Villa-Montoya et al., 2021; Yang et al., 2019a), sendo predominantes para condições com elevada produção de hidrogênio (Yang and Wang, 2019a). *Clostridium sensu stricto* 1 utilizam carboidratos e aminoácidos, sendo o ácido butírico o principal produto metabólico dessas bactérias, além disso estão relacionadas diretamente a produção de H₂ pela via do Piruvato Feredoxina Oxidoreductase (PFOR) na presença de [FeFe] hidrogenases (Luo et al., 2022). Tang et al. (2022) em estudo com água residuária sintética em reator em batelada

avaliaram o pH do processo na faixa de 4,0 a 11,0 e observaram a importância das condições de pH do meio em promover alterações na abundância relativa de *Clostridium*, havendo portanto uma sensibilidade delas em relação à modificação do pH. A abundância máxima deste grupo foi verificada em pH inicial 5,0, com redução desta abundância à medida que o pH avaliado se distanciou deste valor. Desta forma a redução da abundância relativa deste gênero em A-7, quando comparado a A-9 é provável estar diretamente relacionada a maior instabilidade observada no pH do reator A-7, que ficou abaixo de 4,0 ao final do processo, enquanto em A-9 foi em valor acima de 5,0.

A relação do *Clostridium sensu stricto* com o consumo de substrato e produção de hidrogênio também foi destacada por Yang e Wang (2019a) ao avaliarem a estrutura da comunidade microbiana de reatores fermentativos em batelada utilizando glicose. É possível inferir que em A-7 em função da diminuição acentuada do pH em 3,96 ao final do ensaio, além das condições nutricionais impostas (25 gSTV.L⁻¹ de RSL, e 1,0 g.L⁻¹ de CaCO₃) foram cruciais para a diminuição da abundância deste gênero, resultando em impacto direto na remoção de carboidratos, inferior a 20%, redução na produção de ácido butírico, e na produção de H₂. Destaca-se também que muitas espécies de *Clostridium* são capazes de realizar a hidrólise de pectina (Camargo et al., 2021a), que é um heteropolissacarídeo presente em abundância nos resíduos sólidos de citros (Senit et al., 2019) utilizados como substrato no presente estudo, sendo este outro provável aspecto determinante para a elevada abundância deste gênero nos ensaios.

Resultados similares com elevada abundância de *Clostridium* têm sido verificados em estudos com resíduos lignocelulósicos e águas residuárias agroindustriais. Por exemplo, Camargo et al. (2021a) identificaram alta abundância relativa de *Clostridium* (80%) em reator em batelada com resíduos sólidos de citros com elevada produção de hidrogênio (1085 mL.L⁻¹) em condição com 29,8 g RSL.L⁻¹ e pH de 8,98, em temperatura mesofílica de 37°C. Villa-Montoya et al. (2019) observaram elevada abundância de *Clostridium* (88%) em reatores em batelada fermentativos aplicados à produção de hidrogênio com resíduos do processamento de café, em condição com 7,0 g.L⁻¹ de casca de café, pH 7,0, e 30 gDQO.L⁻¹ de água residuária do processamento de café, em temperatura mesofílica de 30°C. Camargo et al. (2019) em outro estudo utilizando resíduos sólidos de citros em reatores em batelada para produção de H₂ em condição com 3,0 gSTV.L⁻¹ de RSL *in natura*, pH inicial de 7,0, e com adição de meio de cultura PCS com 5,0 g.L⁻¹ de CaCO₃, verificaram importante abundância de *Clostridium*

(18,7%), de forma que tal como no presente estudo a disponibilização de íons cálcio no meio líquido pode ter sido um fator importante no desenvolvimento da população de microrganismos deste gênero.

Bactérias semelhantes a *Paraclostridium*, podem utilizar celobiose, celulose, amido, D-manose, D-sorbitol, D-manitol, e fumarato para o crescimento celular, possuem capacidade hidrolítica-fermentativa e produzem H₂ (Rabelo et al., 2020). O crescimento destes microrganismos não é observado a partir de lactose, lactato, etanol ou ribose como fontes de substrato (Jyothisna et al., 2016). Desta forma pode-se inferir que para os reatores com elevada abundância deste gênero é esperado baixo consumo do ácido láctico produzido por outros grupos levando ao acúmulo de tal metabólito, tal como observado em A-7 no qual a abundância de *Paraclostridium* foi de 42,7%. Rabelo et al. (2020) observaram mudança de rota metabólica de *Paraclostridium* de acordo com o tipo de substrato disponibilizado; ou seja, na presença de glicose houve predomínio da rota de ácido acético, e para celulose a rota de ácido butírico. Para o presente estudo no qual houve elevada concentração inicial de carboidratos simples solubilizados a partir dos resíduos de citros (7,36 gCHO.L⁻¹ em A-7 e 5,7 gCHO.L⁻¹ em A-9) observou-se resultados alinhados com as características descritas por Rabelo et al. (2020), de forma que para o ensaio A-7, no qual elevada abundância de *Paraclostridium* esteve combinada à elevada disponibilidade de açúcares solúveis identificou-se predominância de ácido acético (1235,0 mg.L⁻¹) em relação ao butírico (809,0 mg.L⁻¹). Todavia, em A-9 não se observou a ocorrência de tal padrão metabólico, provavelmente devido à baixa abundância deste gênero neste ensaio (~1,0%), sendo detectada uma distribuição equitativa entre os ácidos acético e butírico.

Em relação ao gênero *Hatheway* foi verificada maior abundância relativa em A-7 (2,89%) do que em A-9 (1,43%), sendo o terceiro gênero mais abundante nas amostras de ambos os ensaios. Conforme apresentado por Lawson e Rainey (2015), o metabolismo de *Hatheway* é caracterizado pela produção dos ácidos acético, láctico e em menor proporção fórmico, e succínico, podendo também produzir H₂, com capacidade de utilização, tanto de substratos ricos em proteínas, como carboidratos. Para o ensaio A-7 no qual foi observada maior abundância do gênero *Hatheway*, destaca-se que houve maior produção de ácido láctico em comparação a A-9, podendo ser atribuída aos microrganismos deste gênero contribuição importante na produção de ácido láctico em tal ensaio, considerando as características metabólicas descritas.

Ainda, em relação ao metabolismo de produção de ácido láctico, observado com maior importância em A-7 destaca-se que foram identificados, em baixa abundância, os gêneros *Bifidobacterium* (0,1%) e *Prevotella* (0,1%), os quais não foram identificados em A-9. *Bifidobacterium* realizam a fermentação vias homo e heteroláticas, a partir da glicose pela rota bifidus, que engloba algumas reações que também ocorrem na glicólise, sendo que o ácido láctico é formado a partir do gliceraldeído-3-fosfato (Vries e Stouthamer, 1967; Wood e Holzapfel, 1995). Bactérias semelhantes a *Prevotella* realizam a produção de HLa como um de seus sub-produtos a partir da fermentação de carboidratos, sendo possível observar também a produção dos ácidos acético e succínico (Wu et al., 1992). A abundância relativa somada destes grupos em A-7 foi de 0,25% e provavelmente o ácido láctico produzido neste ensaio possa ser relacionado ao metabolismo de tais bactérias. Wu et al. (2015) identificaram *Bifidobacterium* e *Prevotella* em reator CSTR com produção de ácido láctico na fermentação de resíduos de frutas e vegetais em pH de 5,0, sendo consistente ao observado no ensaio A-7,

Nenhum dos gêneros identificados em abundância relativa >1% nos ensaios A-7 e A-9 foram identificados no lodo de inóculo. Provavelmente, ocorreu importante pressão seletiva das populações microbianas dos ensaios A-7 e A-9, devido às condições experimentais de cada ensaio e também ao tratamento térmico do lodo anaeróbio utilizado para inoculação das bateladas. Como discutido por Wang e Yin (2017), a adoção de uma etapa de tratamento do inóculo é fundamental quando objetiva-se obter altos rendimentos de hidrogênio, pois favorece a seleção de microrganismos de interesse que estão presentes nas culturas mistas de lodos anaeróbios. *Clostridium sensu stricto* e *Paraclostridium* cujas abundâncias relativas somadas totalizaram quase 99% da abundância total de ambos os ensaios (A-7 e A-9), tem como característica a formação de endósporos como forma de resistência a condições ambientais adversas (Akutsu et al., 2009; Yang et al., 2019b), sendo preferencialmente selecionados com a aplicação do tratamento térmico.

Em diversos estudos nos quais foi realizado o tratamento térmico visando aplicação posterior da biomassa em reatores fermentativos, também foi observado predomínio de microrganismos pertencentes ao filo Firmicutes, principalmente *Clostridium*, com redução significativa da diversidade microbiana entre as amostras do inóculo e aquelas dos ensaios (Toledo-Alarcon et al., 2020; Yang et al., 2019b; Yang e Wang, 2019a).

A inferência das vias metabólicas principais para os ensaios A-7 (1,0 gCaCO₃.L⁻¹, 25,0 gSTV.L⁻¹ de RSL, 3,0 gDQO.L⁻¹ de ARL, 2,0 gSTV.L⁻¹ de lodo) e A-9 (2,5 gCaCO₃.L⁻¹,

16,0 gSTV.L⁻¹ de RSL, 2,0 gDQO.L⁻¹ de ARL, 3,5 gSTV.L⁻¹ de lodo) foi construída baseada no metabolismo dos gêneros identificados, *Clostridium sensu stricto*, *Paraclostridium*, *Hatheway*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, associando aos perfis dos principais metabólitos observados (ácidos acético, butírico, láctico, e hidrogênio) (Figura 5.7). As principais enzimas (EC) envolvidas potencialmente na conversão do resíduo de citrus em ácidos orgânicos e na produção do hidrogênio foram selecionadas e alocadas no mapa das vias metabólicas inferidas.

No mapa resumo da predição do perfil metabólico (Figura 5.7), para o ensaio A-7 destaca-se o papel do metabolismo de *Clostridium sensu stricto*, *Paraclostridium*, *Hatheway*, *Bifidobacterium* e *Prevotella*, sendo a fermentação de ácido láctico (3749,4 mg.L⁻¹) uma importante rota de catabolismo dos carboidratos dos resíduos de citros, e também sendo observada produção relevante dos ácidos acético e butírico. Já para o ensaio A-9 destaca-se a predominância absoluta de *Clostridium sensu stricto* de forma que as vias fermentativas clostridiais de ácido acético e butírico foram dominantes, com presença absoluta destes metabólitos no reator ao final do ensaio (1768,3 e 1752,1 mg.L⁻¹, respectivamente), via metabólica na qual há elevado rendimento de hidrogênio. Na produção de alguns ácidos, como o acético, cítrico, láctico e butírico, tem-se o acetil CoA como intermediário fundamental. De acordo com Camargo et al. (2022), o acetil-CoA é o principal intermediário da produção dos ácidos acético, butírico, propiônico, entre outros ácidos e compostos orgânicos produzidos durante a acidogênese e acetogênese na digestão anaeróbia.

O hidrogênio produzido nos dois ensaios foi possivelmente gerado nas reações catalisadas pelas seguintes enzimas: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NADH₂) [EC:1.2.1.9], gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [EC:1.2.1.12], L-lactato desidrogenase [EC:1.1.1.27], subunidade alfa de piruvato ferredoxina oxidoredutase [EC:1.2.7.1], 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase [EC 1.1.1.157]. Para o ácido láctico, abundante no ensaio A-7, resultou da reação de conversão do piruvato catalisada pela enzima L-lactato desidrogenase [EC:1.1.1.27], destacando também a enzima transcetolase [EC: 2.2.1.1] na formação de xilulose-5-fosfato, eritrose-4-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, intermediários na rota bifidus.

Já a produção de ácido butírico ocorreu predominantemente pela via Clostridial a partir de acetil-CoA (Figura 5.7), primeiramente por meio de reações de conversão para formação do intermediário butiril-CoA, catalisadas pelas enzimas acetil-CoA C-

acetiltransferase [EC:2.3.1.9] com formação de acetoacetil-CoA, butanoil-CoA-hidroxibutiril-CoA desidrogenase [EC 1.1.1.157] formando o intermediário butanoil-CoA, 3-hidroxibutiril-CoA desidratase [EC:4.2.1.55] na conversão do butanoil-CoA para crotonil-CoA, e finalmente pela enzima butiril-CoA desidrogenase [EC: 1.3.8.1] que catalisa a reação de formação do butiril CoA. O butiril-CoA foi convertido a HBU com a formação do intermediário butiril-fosfato catalisada pela enzima fosfato butiriltransferase [EC:2.3.1.19], que é então convertido a ácido butírico na reação mediada pela enzima butirato quinase [EC:2.7.2.7]. Microrganismos do gênero *Clostridium* são reportados como o principal grupo envolvido nesta via de produção de ácido butírico descrita, sendo capazes de produzir as enzimas responsáveis por catalisar as reações intermediárias descritas (Hartmanis e Gatenbeck, 1984). Menezes et al. (2023) em estudo com reator de leito fluidizado aplicado à co-digestão de vinhaça e glicerol identificaram elevada abundância relativa de *Clostridium* (77,0%) associado às enzimas atuantes na via de formação de HBU, tal como identificado no presente estudo.

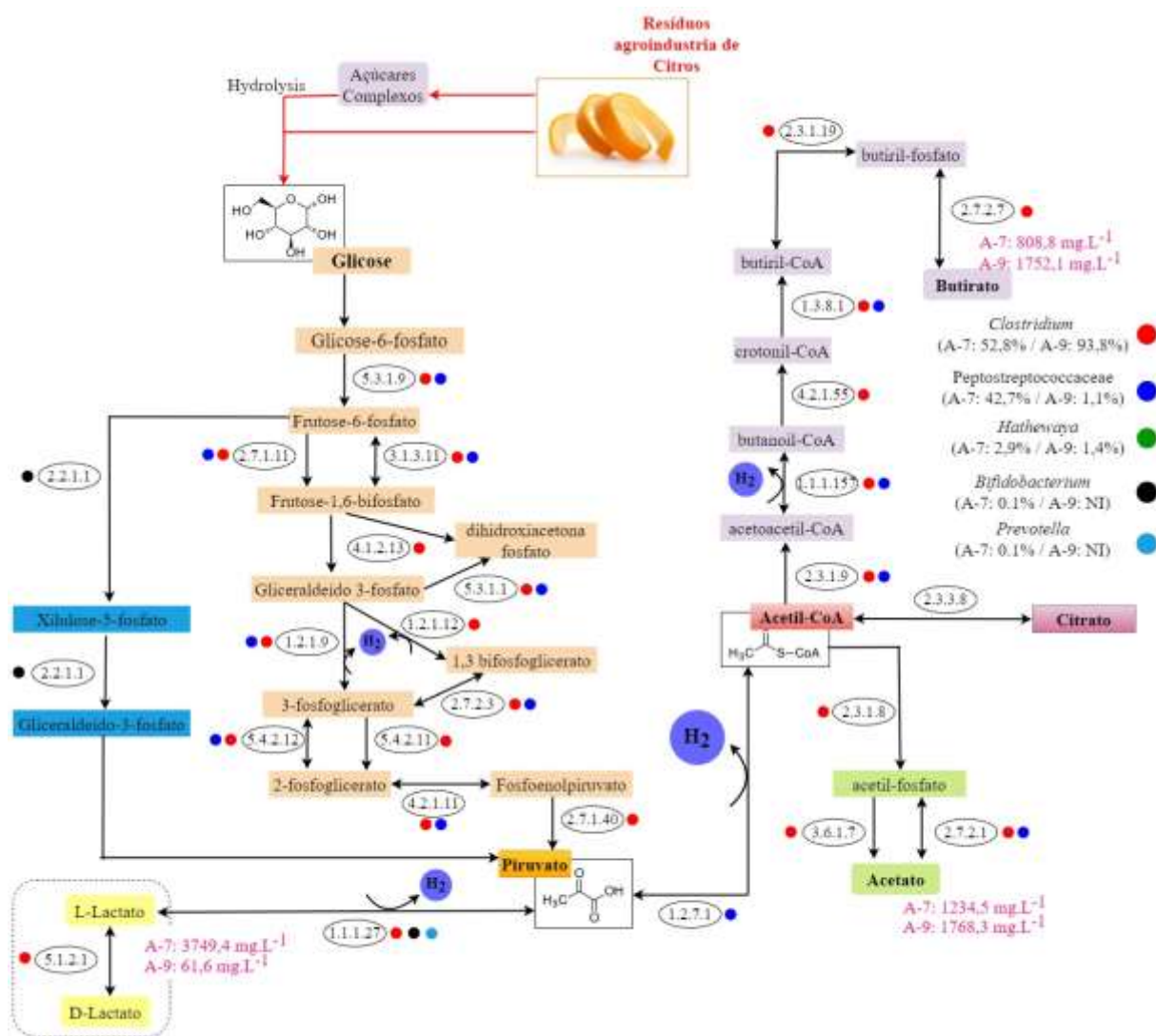


Figura 5.7. Possíveis rotas metabólicas e enzimas (circulo oval- EC = Enzyme Commission Numbers) na conversão dos resíduos de citros em H₂ e ácidos orgânicos e os possíveis microrganismo envolvidos nessas reações, nos ensaios A-7 e A-9. Os valores em mg.L⁻¹ acima dos metabólitos indicam a sua concentração ao final de cada um dos ensaios.

5.4. Avaliação de balanço energético

O potencial energético (PE_{H₂}) dos resíduos de citros foi calculado com base nos dados experimentais de produção de hidrogênio obtidos no presente estudo. Dois cenários foram avaliados, a saber: (1) cenário (CN-1) foi avaliado o PE_{H₂} dos pontos centrais (A-9/A-10/A-11) referente à máxima produção de H₂; (2) para o cenário (CN-2) foi tomado como base o ensaio A-3, por representar a condição experimental com maior produção de H₂ dentre os ensaios conduzidos no nível inferior para a concentração de carbonato de cálcio.

Para CN-1 o PE_{H₂} foi de 634,91 MJ.t⁻¹RSL, enquanto para CN-2 foi de 250,26 MJ.t⁻¹RSL. Considerando o poder calorífico inferior dos resíduos sólidos de citros, que é de

16,97 MJ.kg⁻¹ (Tamelová et al., 2018), o PE_{H₂} para CN-1 representou parcela de apenas 3,7% do conteúdo energético total dos resíduos, e para CN-2 de apenas 1,5%. Esta baixa contribuição da produção de H₂ no potencial energético total de sistemas de digestão anaeróbia de resíduos sólidos e águas residuárias também tem sido verificada por outros estudos, Fuess et al. (2017) obtiveram contribuição de 2 a 5% do hidrogênio no potencial energético da vinhaça de cana de açúcar com base na produção termofílica de H₂ em reatores contínuos de leito fixo. Para experimentos em reatores em batelada, Peixoto et al. (2012) verificaram que a produção de H₂ correspondeu a 2,5% do potencial energético da vinhaça. Já Luo et al. (2011) identificaram que a produção de hidrogênio representou somente entre 3,1 a 5,3% do potencial energético do processo de digestão anaeróbia de torta de filtro, glicerol e vinhaça, em reator de tanque com agitação contínua (CSTR).

Apesar do PE_{H₂} representar baixa contribuição na recuperação do conteúdo energético dos RSL, a obtenção de uma melhor condição para produção de H₂ (A-9/A-10/A-11) com proporções mais adequadas entre as concentrações de substrato e carbonato de cálcio proporcionou aumento de 154% no potencial energético do hidrogênio.

Uma estimativa do potencial de produção de eletricidade (PPE_{H₂}) a partir da utilização do hidrogênio em células a combustível foi realizada supondo o processo em larga escala. Com base na geração global de resíduos do processamento de citros que é estimado ser de até 20 a 30 milhões de toneladas por ano (Calabrò et al., 2016; Rosas-Mendoza et al., 2020), a estimativa foi realizada para uma amplitude de aproveitamento de até 30 milhões de toneladas dos resíduos. Para CN-1 o PPE_{H₂} estimado pode chegar a 3,2 milhões de MWh por ano, considerando a utilização de toda a disponibilidade de RSL, enquanto para CN-2 o PPE_{H₂} máximo é de 1,3 milhões MWh (Figura 5.8).

A geração de eletricidade a partir do H₂ obtido da fermentação dos resíduos de citros é uma alternativa renovável para matriz de energia elétrica no Brasil, podendo atender a crescente demanda ou ainda substituir outras fontes fósseis com elevado potencial poluidor. Por exemplo, a geração de eletricidade por derivados de petróleo, que de acordo com o Anuário Estatístico de Energia Elétrica de 2021 foi responsável pela geração de 8,6 milhões MWh no Brasil em 2020 (EPE, 2021), de forma que o PPE_{H₂} dos resíduos de citros poderia suprir cerca de 37% desta oferta de eletricidade.

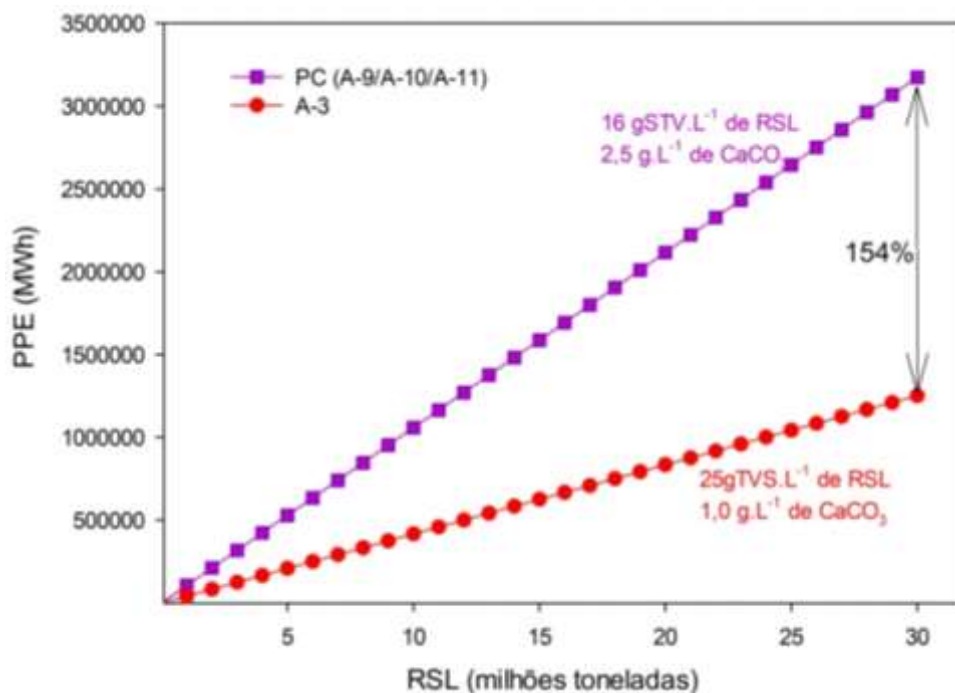


Figura 5.8. Estimativa do potencial de produção de eletricidade a partir da disponibilidade de resíduos sólidos de citros.

É importante destacar que do ponto de vista econômico a baixa contribuição do H_2 no potencial energético dos resíduos de citros, e a necessidade de alcalinização do processo, são fatores limitantes no ganho de escala. Para CN-1, por exemplo, o custo calculado associado ao carbonato de cálcio é de 694,5 US\$ por MWh de eletricidade produzida, já para CN-2 este custo é de 451,1 US\$ por MWh, considerando a concentração de carbonato de cálcio utilizada em cada condição ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente), e um custo médio de 470,35 US\$/t de CaCO_3 (Intratec Primary Commodity Prices, 2018a).

5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de alcalinizantes resultou em melhores condições para o processo de fermentação de H_2 a partir de resíduos do processamento de citros, de forma que maior produção de H_2 foi obtida para ensaio com carbonato de cálcio (CaCO_3) ($1099,7 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$), quando comparada aos ensaios com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) ($517,3 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$) e controle ($397,4 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$).

As variáveis de concentração de resíduos sólidos de citros (RSL) e CaCO_3 resultaram em efeitos estatisticamente significativos em relação ao potencial de produção de H_2 , sendo o ajuste entre estas variáveis identificadas como fundamental para maior estabilidade da fermentação em H_2 . A condição experimental com $16,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $2,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de

água residuária, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 e $3,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de inóculo, foi aquela para a qual maior potencial de produção de H_2 foi obtido de $940,6 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$ e taxa máxima de produção de $60,4 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Para o ensaio na condição de maior produção de H_2 , os ácidos acético e butírico foram os principais metabólitos solúveis, $1457,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1448,9 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, com inexpressiva produção de outros metabólitos solúveis. Para as condições com elevada concentração de substrato e baixa produção de H_2 observou-se aumento da produção de ácido láctico (HLA) de até 3500 mg.L^{-1} , representando mais de 60% do total de metabólitos solúveis.

Para o reator do ensaio de maior produção de H_2 a comunidade microbiana foi caracterizada pela predominância absoluta de *Clostridium sensu stricto* (93,8% da abundância relativa), enquanto para os reatores dos ensaios no qual houve baixa produção de H_2 associada a elevada concentração de HLa houve distribuição da abundância de *Clostridium sensu stricto* (53,8%) e *Paraclostridium* (42,7%).

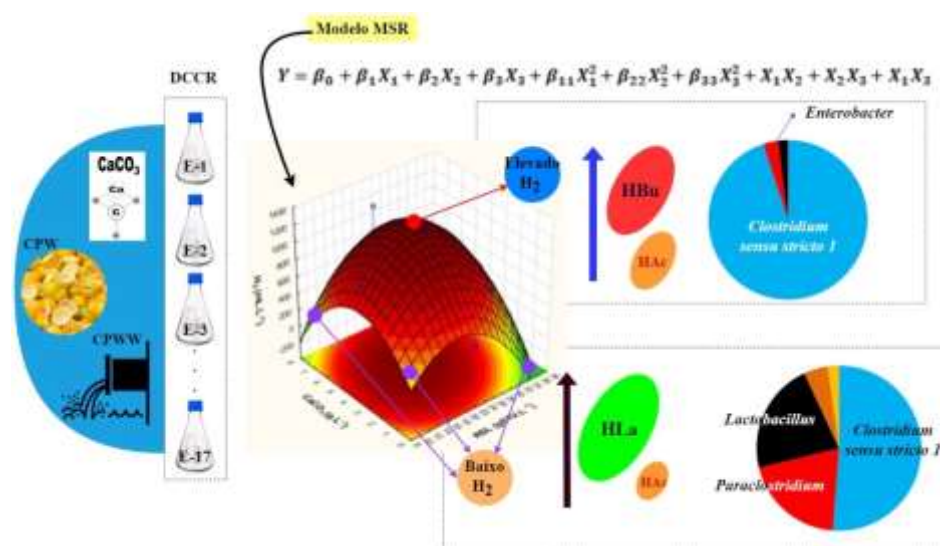
A partir da maior produção de H_2 obteve-se potencial energético de $634,91 \text{ MJ.t}^{-1}\text{RSL}$, que representa parcela inferior a 4% do conteúdo energético total dos resíduos de citros, de forma que foi estimado um potencial de geração de eletricidade de até 3,2 milhões de MWh por ano, levando em conta a disponibilidade global de resíduos gerados.

A partir dos resultados do presente estudo pode-se indicar o uso de carbonato de cálcio como melhor alternativa para alcalinização dos reatores fermentativos com resíduos de citros para produção de H_2 , além do ajuste de uma razão entre concentração de substrato e alcalinizante. Tais resultados podem direcionar para uma exploração futura mais detalhada dessas variáveis, proporcionando aumento da viabilidade do processo de produção de H_2 a partir de resíduos da agroindústria de citros por meio da otimização da recuperação do conteúdo energético.

CAPÍTULO 6

Otimização de parâmetros fermentativos para aumento da produção de hidrogênio: A co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros é uma alternativa interessante para recuperação energética?

Resumo: A co-fermentação das cascas e bagaço com a água residuária do processamento de citros é uma proposta para promover a complementação das características individuais destes substratos possibilitando obter maior eficiência na produção de hidrogênio, além de equacionar problemas relacionados à logística de destinação e tratamento destes resíduos. Para obter um modelo para otimização da produção de H_2 , com base nas variáveis de concentração de resíduos sólidos de laranja (RSL) ($9,9 - 35,1 \text{ gSTV.L}^{-1}$), concentração de água residuária (ARL) ($0,3 - 8,7 \text{ gDQO.L}^{-1}$), e concentração de carbonato de cálcio (CaCO_3) ($0,3 - 7,3 \text{ g.L}^{-1}$) empregou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (RSM) em reatores em batelada, empregando como inóculo lodo granular mesofílico submetido a tratamento térmico. Produções de hidrogênio na faixa de $199,2$ a $1241,9 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}$ foram obtidas nos ensaios, sendo que a menor produção obtida com $22,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $4,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 , para uma razão $\text{gCaCO}_3/\text{gCHO}$ de $0,03$. Na condição otimizada com $21,4 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $3,4 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 , que resultou em razão $\text{gCaCO}_3/\text{gCHO}$ de $0,53$ foi obtido P de $1249,0 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}$. Observou-se abundância relativa de 95% para *Clostridium Sensu Stricto 1* no ensaio da condição otimizada de H_2 , de forma que a via metabólica Clostridial foi inferida como predominante, com produção máxima de $2230,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de HBU e $1213,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de HAc. Já para o ensaio com baixa produção de H_2 houve redução significativa da abundância de *Clostridium sensu stricto 1* (51,2%), e aumento da abundância de *Paraclostridium* (20,0%) e *Lactobacillus* (21,9%), inferindo a fermentação de ácido láctico ($6367,8 \text{ mg.L}^{-1}$) como a via predominante. Potencial energético de $523,2 \text{ MJ.t}^{-1}\text{RSL}$ foi obtido com base na produção de H_2 da condição otimizada.



6.1.INTRODUÇÃO

Resíduos agroindustriais, que incluem cascas, sementes, caroços, polpas, tortas de prensagem, folhas, caules, e outros, que são oriundos de vários setores do processamento, são em grande parte depositados em aterros ou simplesmente descartados em locais impróprios. Tais sub-produtos podem ser utilizados na obtenção de produtos de valor agregado como biocombustíveis e outros produtos de interesse biotecnológico (Freitas et al., 2021). A cadeia de fornecimento *Waste-to-energy* (WTE) é uma alternativa para equacionar de forma simultânea a necessidade do aumento de oferta energética e melhoria no gerenciamento de resíduos, alcançando assim um modelo de economia circular. Empregando técnicas WTE adequadas, diferentes tipos de biomassa como resíduos agrícolas, florestais, domésticos, dejetos animais, podem ser convertidos em diversos produtos bioenergéticos (Pan et al., 2015).

O setor agroindustrial de processamento de laranjas para produção de suco é caracterizado como um importante gerador de resíduos sólidos lignocelulósicos e águas residuárias, tendo em vista a produção expressiva de frutos. A produção global anual de laranjas é estimada em cerca de 75 milhões de toneladas. O Brasil é o país com maior importância no mercado global da laranja e seus derivados, com produção anual de 17 milhões de toneladas do fruto, representando quase um quarto da produção mundial (FAO, 2019; Kist et al., 2018). A maior parcela da produção brasileira é direcionada para o processamento, o que faz do Brasil o principal produtor e exportador mundial de suco de laranja, sendo a União Europeia e os Estados Unidos os mercados consumidores mais relevantes (BRASIL, 2020; CITURSB, 2020).

É estimado que a partir de 1.000 kg de laranjas, extraem-se em média 553 kg de suco em sua condição natural, 30,0 kg de polpa, 3,0 kg de óleo de casca, e uma elevada quantidade de resíduos sólidos de casca e bagaço, superior a 400 kg (Tetra Pak, 2004). Além dos resíduos de casca e bagaço gerados diretamente da fruta após a extração do suco, há também a produção de água residuária resultante de diversas etapas do processamento, sendo estimado entre 0,79 – 1,25 m³ ou até 3,0 m³ de água residuária por tonelada de frutas processadas (Rosas-Mendoza et al., 2020), ou em função das práticas de uso e reaproveitamento da água na indústria (Calabro et al., 2017; Koppa e Pullammanappallil, 2013; Mendoza et al., 2018).

Alternativas convencionais para destinação dos RSL são tratadas como insuficientes e problemáticas em termos de impactos ambientais e eficiência energética (Zema et al., 2018), e portanto rotas para valorização destes resíduos têm sido propostas no intuito de estabelecer uma logística de descarte sustentável (Berk, 2016). Alternativas como a produção de fertilizantes, pectina, etanol, óleos essenciais, produtos químicos, ração para gado, material absorvente, têm sido avaliadas do ponto de vista técnico e econômico (Calabró et al., 2018). Aplicações como ração animal ou fertilizante orgânico, são alternativas mais comuns e simples de processar estes resíduos pois demandam pouca infraestrutura e investimento (López et al., 2010), entretanto devido à alta quantidade de resíduos e ao baixo valor do material recuperado, não são capazes de absorver toda a geração de resíduos (Calabrò et al., 2016).

A recuperação energética com a produção de hidrogênio por meio da fermentação utilizando resíduos agroindustriais vem sendo amplamente avaliada (Algapani et al., 2019; Camargo et al., 2020a; Fu et al., 2020; Tenca et al., 2011; Villa Montoya et al., 2019), entretanto alguns fatores ainda são obstáculos para condução de um processo viável com elevada produção de H₂. O ajuste das condições operacionais, tais como pH, temperatura, concentração de substrato, tempo de detenção hidráulica (TDH), suplementação com alcalinizantes e nutrientes, entre outras, é fundamental para o sucesso da fermentação (Moura et al., 2020; Soares et al., 2018a), e as peculiaridades de cada tipo de substrato impõem a necessidade de investigação de condições que sejam adequadas a cada caso.

A co-fermentação das cascas e bagaço de citros com a água residuária do processamento é uma alternativa com a finalidade de viabilizar a logística de tratamento e descarte destes resíduos na própria indústria. A fermentação conjunta de dois ou mais subprodutos é interessante, porque permite complementar as características dos diferentes substratos individuais para melhorar a eficiência na produção de hidrogênio (Sillero et al., 2022). A co-fermentação possibilita equilibrar o balanço de nutrientes, diluição de compostos tóxicos ou recalcitrantes, aumento da carga orgânica disponibilizada, além de promover efeitos sinérgicos entre os microrganismos (Esposito et al., 2012; Rabii et al., 2019). A característica lignocelulósica dos resíduos sólidos de citros é um aspecto que torna mais difícil sua biodegradação impondo limitações ao aproveitamento desta fonte de carbono, visto que a etapa de hidrólise para conversão direta a substrato prontamente assimilável é dificultada, sendo mais lenta a conversão de carboidratos poliméricos em monômeros fermentáveis (De la

Rubia et al., 2011; dos Santos et al., 2019; Pontoni et al., 2015), e desta forma o fornecimento de substrato solúvel pela água residuária promove um sinergismo entre os substratos.

Para processos nos quais muitas variáveis podem influenciar nas respostas, a aplicação de desenhos fatoriais podem minimizar as dificuldades de atingir a melhor otimização do processo (Elhalil et al., 2016). Por meio de desenhos fatoriais pode-se otimizar os efeitos de muitos fatores, uma vez que o modelo estatístico que compõe esses desenhos permite estabelecer relações entre respostas de duas ou mais variáveis experimentais sendo simultaneamente analisadas (Rabelo et al., 2018). De uma forma geral, por esta abordagem metodológica é possível obter a melhor resposta e ainda reduzir o número de experimentos necessários, o que implica em redução de tempo e custos (Elhalil et al., 2016).

Metodologias de planejamento experimental e de modelos de superfície de resposta (MSR) para otimizar a produção de hidrogênio são aplicadas em muitos estudos para diferentes variáveis independentes que afetam o processo fermentativo, empregando como substrato diversos resíduos de processos agroindustriais. Resíduos sólidos de citros foram avaliados por Camargo et al.(2021a) cuja máxima produção de H_2 foi de $1085,0 \text{ mLH}_2.L^{-1}$, através da otimização da concentração de inóculo, pH inicial, e concentração de substrato sólido. Villa-Montoya et al. (2020b) empregaram resíduos do processamento de café visando a produção de hidrogênio, e através da otimização dos valores de pH inicial, concentração de substrato e percentual de *headspace*, obtiveram produção máxima de $686,0 \text{ mLH}_2.L^{-1}$. Rabelo et al. (2018) e Soares et al.(2018a) buscaram o aumento da produção de hidrogênio empregando bagaço de cana de açúcar como substrato, para tanto, variáveis como concentração de extrato de levedura, concentração de substrato, e pH inicial foram otimizadas, cujas produções máximas foram de $517,0 \text{ mLH}_2.L^{-1}$ e $36,0 \text{ mLH}_2.L^{-1}$, respectivamente. Resíduos de banana como substrato para produção de hidrogênio foram avaliados por Mazareli et al.(2021), que através da otimização das variáveis pH inicial e temperatura obtiveram produção máxima de $468,0 \text{ mLH}_2.L^{-1}$.

No presente estudo foi investigado o potencial da co-digestão de resíduos sólidos e água residuária provenientes da agroindústria de processamento de citros, que até então não tem sido explorada apesar das vantagens inerentes a utilização de sub-produtos de uma mesma cadeia produtiva. Para tanto, optou-se pela aplicação de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (RSM) para obter um modelo para otimização da produção de H_2 , com base nas variáveis de concentração de

resíduos sólidos de laranja (9,9 – 35,1 gSTV.L⁻¹), concentração de água residuária (0,3 – 8,7 gDQO.L⁻¹) e concentração de carbonato de cálcio (0,3 – 7,3 g.L⁻¹). A escolha destas variáveis para otimização atende primeiramente à importância de estabelecer um equacionamento da viabilidade de utilização conjunta destes substratos, com base nas concentrações otimizadas obtidas para a resposta principal. Além disso, buscou-se também explorar a adição do alcalinizante como estratégia para melhor estabilização do processo de produção de H₂, e promover aumento significativo de rendimento de H₂. Desta forma, avaliar com base na produção máxima atingida se o processo é favorável comparado a outros estudos em condição fermentativa. A caracterização da comunidade microbiana também foi realizada para diferentes ensaios buscando associar as modificações na produção de H₂ e metabólitos solúveis às modificações das vias metabólicas principais inferidas para o processo. Uma avaliação da recuperação energética dos resíduos de citros foi estimada para verificar o potencial de utilização do H₂ como fonte alternativa de energia na agroindústria de citros estimulando a proposta de economia circular.

6.2.MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Substrato

O suco e sementes das laranjas var. Pera-Rio (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram removidos por processamento manual, e as cascas e bagaço residuais do processo foram direcionados para utilização como substrato nos ensaios. Os resíduos sólidos do processamento das laranjas (RSL) compostos pela casca e bagaço da fruta foram desidratados em estufa a 50°C por 48h, sendo então submetidos ao pré-tratamento mecânico de moagem reduzindo a partículas <0,60 mm (moinho de facas tipo Willye Modelo SL 32, 1750 rpm – Solab), e a caracterização analítica dos resíduos in natura e secos está apresentada na Tabela 4.1 (página 36).

A água residuária do processamento de laranjas utilizada nos ensaios de co-digestão com os resíduos sólidos foi fornecida por uma agroindústria do setor de produção de sucos localizada na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil, sendo armazenada a -20°C, e a sua caracterização analítica está apresentada na Tabela 5.1 (página 71).

6.2.2 Inóculo

O lodo utilizado como inóculo nos ensaios batelada é proveniente de reator UASB mesofílico empregado no tratamento de dejetos de um abatedouro de aves (Avícola Dacar –

Tietê, São Paulo, Brasil), O lodo possui um pH de 7,15, e um teor de sólidos de 6,87% m/m ST (68,7 Gst/kg Lodo) e 5,94% m/m STV (59,4 gSTV.kg⁻¹ lodo).

No intuito de selecionar bactérias formadoras de endósporos, comumente associadas a elevados rendimentos de H₂, e principalmente inativar microrganismos consumidores de hidrogênio, aplicou-se um tratamento térmico ao lodo granular anaeróbico, submentendo-o a temperatura de 90°C por um período de 15 minutos seguido por choque térmico em banho de gelo até atingir temperatura ambiente, conforme metodologia aplicada por Kim et al. (2006) e Menezes e Silva (2019).

6.2.3 Planejamento fatorial

Um conjunto de ensaios fermentativos foi realizado com diferentes concentrações de resíduos sólidos de laranja - RSL (gSTV.L⁻¹), água residuária - ARL (gDQO.L⁻¹) e carbonato de cálcio – CaCO₃ (g.L⁻¹). O desenho experimental dos ensaios foi definido com base na metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no intuito de avaliar uma faixa de valores para as variáveis independentes, identificando através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) uma condição experimental otimizada para produção acumulada de hidrogênio. Conduziu-se então um planejamento fatorial com 3 fatores (k=3), e, portanto, $\pm\alpha = 1,68$, e conforme metodologia, tem-se 2^k pontos fatoriais, totalizando 8 ensaios; mais 2 x k pontos axiais, totalizando 6 ensaios, e ainda 3 repetições do ponto central. Desta forma, o desenho experimental consistiu em 17 ensaios, realizados em triplicatas, totalizando 51 reatores em batelada.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de borossilicato (250 mL) com tampa plástica com rosca e equipados com conjunto de válvulas acopladas a tampa de butila para coleta de amostras líquidas e de gás, e incubados em *shaker Informs HT – Multitron Pro*, sendo mantidos com agitação de 130 rpm e temperatura mesofílica de 37 °C. Ademais, condições fixas de todas os ensaios foram o inóculo com adição de 3,5 gSTV.L⁻¹ de lodo pré-tratado, e 50% de *headspace* (v/v) sob atmosfera de N₂ (100%).

Na Tabela 6.1 estão apresentadas as variáveis independentes com os valores correspondentes aos níveis fatoriais e axiais delimitados, assim como os valores do ponto central. A faixa de valores definida para cada variável foi delimitada de forma a garantir que uma condição experimental de otimização da produção de hidrogênio pudesse ser identificada, considerando as três variáveis investigadas. Para o caso da água residuária

(ARL) a variação da concentração foi levada próxima aos limites possíveis pelas características do efluente bruto, conforme caracterização físico-química Tabela 5.1 (página 69).

Tabela 6.1. Variáveis independentes avaliadas nos níveis fatoriais (+1 e -1), axiais (1,68 e -1,68) e para o ponto central no delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Concentração de Resíduos Sólidos de Laranja (RSL) (g STV.L ⁻¹)	X ₁	9,9	15,0	22,5	30,0	35,1
Concentração Água Residuária (ARL) (g DQO.L ⁻¹)	X ₂	0,3	2,0	4,5	7,0	8,7
Concentração de Carbonato de Cálcio – CaCO ₃ (g.L ⁻¹)	X ₃	0,3	1,7	3,8	5,9	7,3

Na Tabela 6.2 está apresentada a matriz do planejamento experimental do Delineamento Composto Central Rotacional utilizada para estabelecer as condições experimentais de cada ensaio.

Tabela 6.2. Matriz do planejamento experimental do delineamento composto central rotacional com os níveis codificados e os respectivos valores para cada variável.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	RSL (gSTV.L ⁻¹)	ARL (gDQO.L ⁻¹)	CaCO ₃ (g.L ⁻¹)
E-1	-1	-1	-1	15,0	2,0	1,7
E-2	1	-1	-1	30,0	2,0	1,7
E-3	-1	1	-1	15,0	7,0	1,7
E-4	1	1	-1	30,0	7,0	1,7
E-5	-1	-1	1	15,0	2,0	5,9
E-6	1	-1	1	30,0	2,0	5,9
E-7	-1	1	1	15,0	7,0	5,9
E-8	1	1	1	30,0	7,0	5,9
E-9	-1,68	0	0	9,9	4,5	3,8
E-10	1,68	0	0	35,1	4,5	3,8
E-11	0	-1,68	0	22,5	0,3	3,8
E-12	0	1,68	0	22,5	8,7	3,8
E-13	0	0	-1,68	22,5	4,5	0,3
E-14	0	0	1,68	22,5	4,5	7,3
E-15	0	0	0	22,5	4,5	3,8
E-16	0	0	0	22,5	4,5	3,8
E-17	0	0	0	22,5	4,5	3,8

A equação polinomial quadrática (Eq. 1) foi utilizada para descrever o potencial máximo de produção de hidrogênio (P) com base nas variáveis independentes (X_1, X_2, X_3). Os efeitos individuais e interação dos efeitos das variáveis na resposta experimental foram avaliados em um nível de confiança de 10%.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + X_1 X_2 + X_2 X_3 + X_1 X_3 \quad (1)$$

Sendo, Y a resposta experimental (potencial máximo de produção de H₂), $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11}, β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos, e X_1, X_2 e X_3 as variáveis independentes.

6.2.4 Validação do modelo estatístico

Baseado nos resultados obtidos por meio da superfície de resposta foi realizado um ensaio para validação do modelo, permitindo verificar sua precisão através da comparação entre a produção de H₂ predita e a experimental. Para tanto, o ensaio de validação foi conduzido em condição experimental cuja máxima produção de hidrogênio é obtida, realizado com 21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 3,4 g.L⁻¹ de CaCO₃.

6.2.5 Análises físico-químicas e cromatográficas

Para o monitoramento e coleta de dados durante os ensaios acidogênicos foram realizadas análises da fração líquida dos reatores batelada, tais como, carboidratos solúveis totais (Dubois et al., 1956), demanda química de oxigênio – DQO (APHA/AWWA/WEF, 2012), sólidos totais voláteis (STV), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV), ácidos orgânicos voláteis (Lazaro et al., 2012). As análises de carboidratos, fenóis e DQO foram feitas para amostra filtrada em filtro de seringa 0.45 µm. A quantificação de carboidratos solúveis totais, pH e ácidos orgânicos foi realizada além das amostras inicial e final dos ensaios, também para amostras coletadas no decorrer do ensaio.

A quantificação da concentração de D-limoneno nas amostras dos reatores foi realizada utilizando a metodologia de adição de padrão, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS Shimadzu, Column SH-Rtx-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). A amostra teve sua temperatura elevada a 240°C no forno, em uma taxa de 30°C, com tempo de retenção de 5 min. Realizou-se a injeção de 250 µL de amostra do *headspace*, com temperatura de injeção de 200°C, Split 10:1, empregando Hélio como gás de

arraste (Rodrigues et al., 2021). Para a espectrometria de massa empregou-se o método de varredura completa para a faixa de massa de 50 a 200.

O monitoramento da produção de biogás foi realizada a partir de amostras de 500 μL do *headspace*, utilizando seringa equipada com trava de pressão. Cromatografia gasosa foi empregada para análise da composição do (Shimadzu GC- 2014, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar CarboxenTM 1010 PLOT 30 m x 0,53 mm, Supelco), a temperatura do injetor de 220°C, 130°C para coluna e 230°C no detector utilizando argônio como gás de arraste (12 mL.min⁻¹). Aferição periódica (antes e após a tomada da amostra de gás) da pressão (mbar) do headspace do reator foi realizada.

6.2.6 Análise dos dados

A produção acumulada de hidrogênio (H_i), foi obtida pela somatória do volume de H_2 produzido entre as medidas de monitoramento (i) realizadas em intervalos de 2 – 6 horas ao longo do ensaio, calculada de acordo com Eq. (2), com base nos dados de volume de hidrogênio ($V_{H,i}$) produzido entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i). E o volume de hidrogênio ($V_{H,i}$) foi obtido com base nos princípios da equação de Clapeyron, de acordo com Eq. (3).

$$H_i = \sum_{i=1}^n V_{H,i} \quad (2)$$

$$V_{H,i} = \frac{\Delta P_i \cdot V \cdot C_{H,i}}{P_i} \quad (3)$$

Sendo, $C_{H,i}$ é o percentual de hidrogênio na composição do biogás no ponto amostral (i); P_i é a pressão no *headspace* do reator; ΔP_i a variação da pressão do headspace entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i); e V o volume do headspace.

O percentual de hidrogênio no biogás (% H_2) para cada ensaio foi dado pela média aritmética dos valores percentuais de H_2 dos pontos amostrais do período no qual foi identificada estabilização da composição do biogás, estabilização esta verificada por um coeficiente de variação (CV) <5%.

As produções acumuladas de hidrogênio ao longo do tempo foram ajustadas ao modelo cinético de Gompertz modificado (Eq. 4) utilizando o software OriginPro 8.5[®], sendo

obtidos os parâmetros cinéticos de potencial máximo de produção taxa máxima de produção, e tempo para início de produção.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4)$$

Sendo, H a produção acumulada de hidrogênio (mL.L^{-1}) no tempo (t), P o potencial máximo de produção de hidrogênio (mL.L^{-1}), Rm a taxa máxima de produção de hidrogênio ($\text{mL.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), $e = 2,718281828$, e λ o tempo de início da produção de hidrogênio (h).

Os dados experimentais do planejamento fatorial e do modelo da superfície de respostas foram ajustados e analisados estatisticamente através dos softwares Minitab[®] 19.1 e STATISTICA 10, utilizando um nível de confiança de 10% ($p < 0,10$) (Rodrigues e Lemma 2014).

6.2.7 Análise de balanço energético

O potencial energético do hidrogênio obtido - PE_{H_2} ($\text{MJ.kg}^{-1}\text{RSL}$) foi calculado pela Eq. (5) baseado no potencial máximo de produção de hidrogênio - P (mL.L^{-1}), no poder calorífico inferior do H_2 - PCI_{H_2} ($10,8 \text{ MJ.m}^{-3}$) (Goldmeer, 2019), e na concentração de RSL adicionada ao reator - RSL_C (g.L^{-1}).

$$PE_{H_2} = \frac{P_{H_2} \cdot PCI_{H_2}}{1000 \cdot RSL_C} \quad (5)$$

$$PPE_{H_2} = \frac{PE_{H_2} \cdot \eta}{3600} \quad (6)$$

Com base no PE_{H_2} estimou-se o potencial de produção de eletricidade - PPE_{H_2} ($\text{MWh.kg}^{-1}\text{RSL}$) através da Eq. (6), considerando uma eficiência (η) de 60% para conversão elétrica em células combustível (DOE Energy Efficiency And Renewable Energy Information Center, 2006; Shabani e Andrews, 2015). Para fins de estimativa de ganho de escala do processo o PPE_{H_2} foi extrapolado com base na estimativa de geração global anual de resíduos sólidos de citros - RSL_G , de 20 a 30 milhões de toneladas por ano (Calabrò et al., 2016; Rosas-Mendoza et al., 2020).

6.2.8 Análise da comunidade microbiana

Extração e sequenciamento do gene RNAr 16S foram realizados para amostras coletadas ao final do ensaio de validação da condição otimizada de produção de H_2 , e também

do ensaio E-10. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm - 6 minutos), sendo o pellet de biomassa lavado com solução PBSX1 (NaCl 8,2 g.L^{-1} , Na_2HPO_4 1,05 g.L^{-1} , NaH_2PO_4 0,35 g.L^{-1}), e posteriormente armazenado a -20°C . O DNA genômico das amostras foi extraído usando o FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals). A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 0,8% e a quantificação ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e a pureza (relação 260/280nm) foi realizado no Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa NGS genomic solutions (Piracicaba-SP, Brazil), os genes 16S rRNA região V3-V4 foram amplificados por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) usando o set de primer 341F - 806R (Yu et al., 2005), realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando NEBNext Ultra DNA Library Pre ® Kit para Illumina, conforme recomendações do fabricante. O pacote DADA2 (Callahan et al., 2016a) foi utilizado 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 ($Q < 30$). As taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês *Amplicon Sequencing Variants*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade. O banco de dados Silva 138 foi utilizado como referência. As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações, foram importadas para o programa phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013), implementado na linguagem R. As sequências foram submetidas ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob o número de acesso PRJNA909571.

As bases de dados de enzimas BRENDA (BRENDA Enzyme Database, 2022) e KEGG (KEGG Pathway Database, 2022) foram utilizadas para inferência das vias metabólicas predominantes e enzimas catalisadoras da reações de conversão, com base nos gêneros de microrganismos identificados em abundância $>1\%$ nos ensaios OC-H e E-10.

6.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Ensaios de Delineamento Composto Central Rotacional de Produção de Hidrogênio

Os parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação estão apresentados na Tabela 6.3. Foram observados valores de potencial máximo de produção de H_2 (P) entre $199,21 \text{ mLH}_2.L^{-1}$ (E-13) e $1241,91 \text{ mLH}_2.L^{-1}$ (E-17); a velocidade máxima de produção de H_2 (R_m) observada foi entre $7,35 \text{ mLH}_2.L^{-1}.h^{-1}$ (A-13) e $106,58 \text{ mLH}_2.L^{-1}.h^{-1}$ (A-3); e o tempo de início de produção de H_2 (λ) observado foi entre $7,75 \text{ h}$ (A-13) e $14,83 \text{ h}$ (A-17). Conforme verificado, observou-se importante variação nos valores de P , R_m e λ sob diferentes condições experimentais (Figura 6.1), o que reflete a importância do ajuste das concentrações de resíduos sólidos, água residuária e carbonato de cálcio, para obtenção de melhor resposta em relação a produção de H_2 .

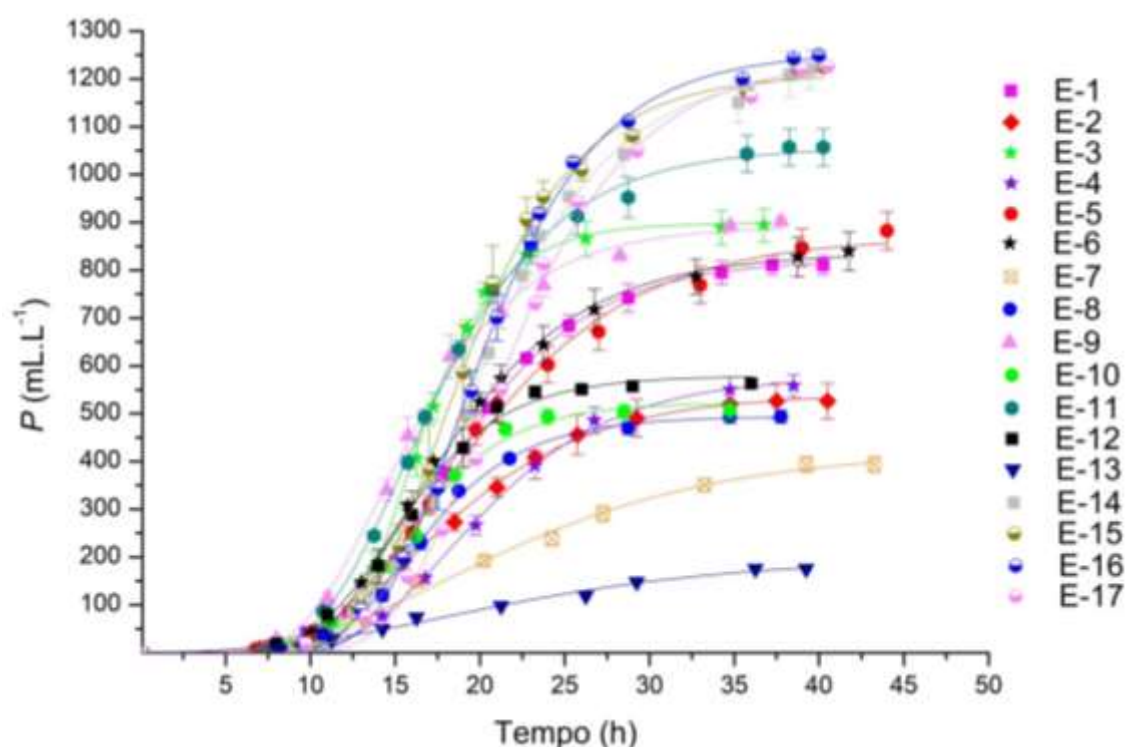


Figura 6.1. Produção acumulada de H_2 com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios do DCCR.

Tabela 6.3. Parâmetros cinéticos, rendimento e pH, para os ensaios do DCCR

Ensaio	P mL.L ⁻¹	Rm mL.L ⁻¹ .h ⁻¹	λ h	%H ₂ Biogás	Y_1 mLH ₂ .g ⁻¹ CHO	Y_2 molH ₂ .mol ⁻¹ hexose	pH inicial	pH final
E-1	823,72	58,47	11,50	47,4%	214,36	2,06	6,64	4,95
E-2	541,03	33,60	10,02	30,2%	112,23	1,05	6,31	4,90
E-3	898,80	106,58	12,25	51,0%	182,65	1,87	6,41	4,56
E-4	578,56	38,97	12,66	44,8%	75,47	0,68	6,28	4,04
E-5	869,65	49,81	10,83	42,9%	169,53	1,62	6,67	5,94
E-6	835,49	55,78	10,39	37,3%	123,55	1,17	6,51	5,67
E-7	423,39	17,18	9,12	31,9%	69,73	0,61	6,56	5,79
E-8	493,75	46,43	11,42	30,5%	53,51	0,53	6,46	5,37
E-9	892,03	71,15	9,51	47,8%	209,30	2,13	6,82	5,64
E-10	522,71	53,32	11,23	33,2%	62,74	0,61	6,28	4,27
E-11	1056,61	77,36	10,47	42,2%	181,46	1,83	6,65	5,63
E-12	578,80	56,29	10,54	39,5%	73,88	0,70	6,39	4,32
E-13	199,21	7,35	7,75	48,3%	75,87	0,65	5,86	3,52
E-14	1224,50	88,49	13,38	43,5%	144,40	1,46	6,60	5,72
E-15	1211,36	97,38	12,89	45,8%	151,46	1,65	6,58	5,33
E-16	1235,08	98,93	13,79	45,2%	172,67	1,69	6,48	5,38
E-17	1241,91	89,96	14,83	43,4%	180,87	1,64	6,57	5,47

De acordo com a análise de variância (ANOVA), o termo linear X_2 (concentração de ARL, $p = 0,093$) e os termos quadráticos X_1^2 (concentração RSL, $p = 0,015$), X_2^2 (concentração ARL, $p = 0,037$), e X_3^2 (concentração CaCO₃, $p = 0,019$) do modelo foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$), e resultaram em efeitos individuais da produção de hidrogênio (Tabela 6.4). Os termos lineares X_2 e X_3 , e os termos de interação X_1X_2 ($p = 0,912$), X_1X_3 ($p = 0,308$) e X_2X_3 ($p = 0,166$) não foram significativos ($p > 0,10$), provavelmente, sendo necessário interpretação individual das variáveis independentes.

A partir da análise de regressão dos dados foi ajustada uma função polinomial de segunda ordem dada pelas três variáveis codificadas, resultando em um modelo quadrático de potencial máximo de produção de hidrogênio. Com base nos termos identificados como significativos ($p < 0,10$) para produção de hidrogênio, o modelo pode ser representado pela Eq. (7).

$$Y \text{ (mL.L}^{-1}\text{)} = -1241 + 254,0x_2 - 3,49x_1^2 - 25,13x_2^2 - 42,2x_3^2 \quad (7)$$

Tabela 6.4. ANOVA para efeitos do CaCO_3 , RSL, ARL do potencial máximo de produção P , para um intervalo de confiança de 90%.

Fonte	SQ	GL	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	1230063	9	136674	3,23	0,068
X₁ (L)	103317	1	103317	2,44	0,162
X₂ (L)	160165	1	160165	3,78	0,093
X₃ (L)	113194	1	113194	2,67	0,146
X₁ (Q)	433292	1	433292	10,24	0,015
X₂ (Q)	278015	1	278015	6,57	0,037
X₃ (Q)	391187	1	391187	9,24	0,019
X₁. X₂	561	1	561	0,01	0,912
X₁. X₃	51061	1	51061	1,21	0,308
X₂. X₃	101387	1	101387	2,40	0,166
Erro	296226	7	42318		
Total SQ	1526289	16			

A significância do modelo foi avaliada com base no teste ANOVA, sendo estatisticamente significativo baseado nos valores F, sendo o F calculado pela regressão (3,23) maior que o valor de F tabulado (2,72) para um intervalo de confiança de 10%, e 7 graus de liberdade para os resíduos e 9 graus de liberdade para a regressão. Desta forma é possível rejeitar a hipótese nula H_0 , implicando que pelo menos umas das variáveis X_1 , X_2 , X_3 contribui significativamente com o modelo. O modelo possui um coeficiente de determinação (R^2) de 0,81, ou seja, o modelo explica 81,0% da variabilidade da produção de H_2 , indicando boa correlação entre os valores preditos e os observados para a resposta. Os valores de R^2 entre 0,75 – 1,00 indicam bom ajuste, conforme discutido por Reungsang et al. (2012), Niladevi et al. (2009), e Kainthola et al. (2019).

A interação e o nível ótimo das variáveis independentes na produção de hidrogênio podem ser claramente observados na superfície de resposta 3D (Figura 6.2). As superfícies se aproximam a característica de um hiperboloide elíptico, sendo possível neste caso identificar um ponto de máxima dentro faixa de valores avaliados para cada variável, que representam os eixos x e y no plano tridimensional, desta forma a condição otimizada para produção de H_2 pôde ser identificada.

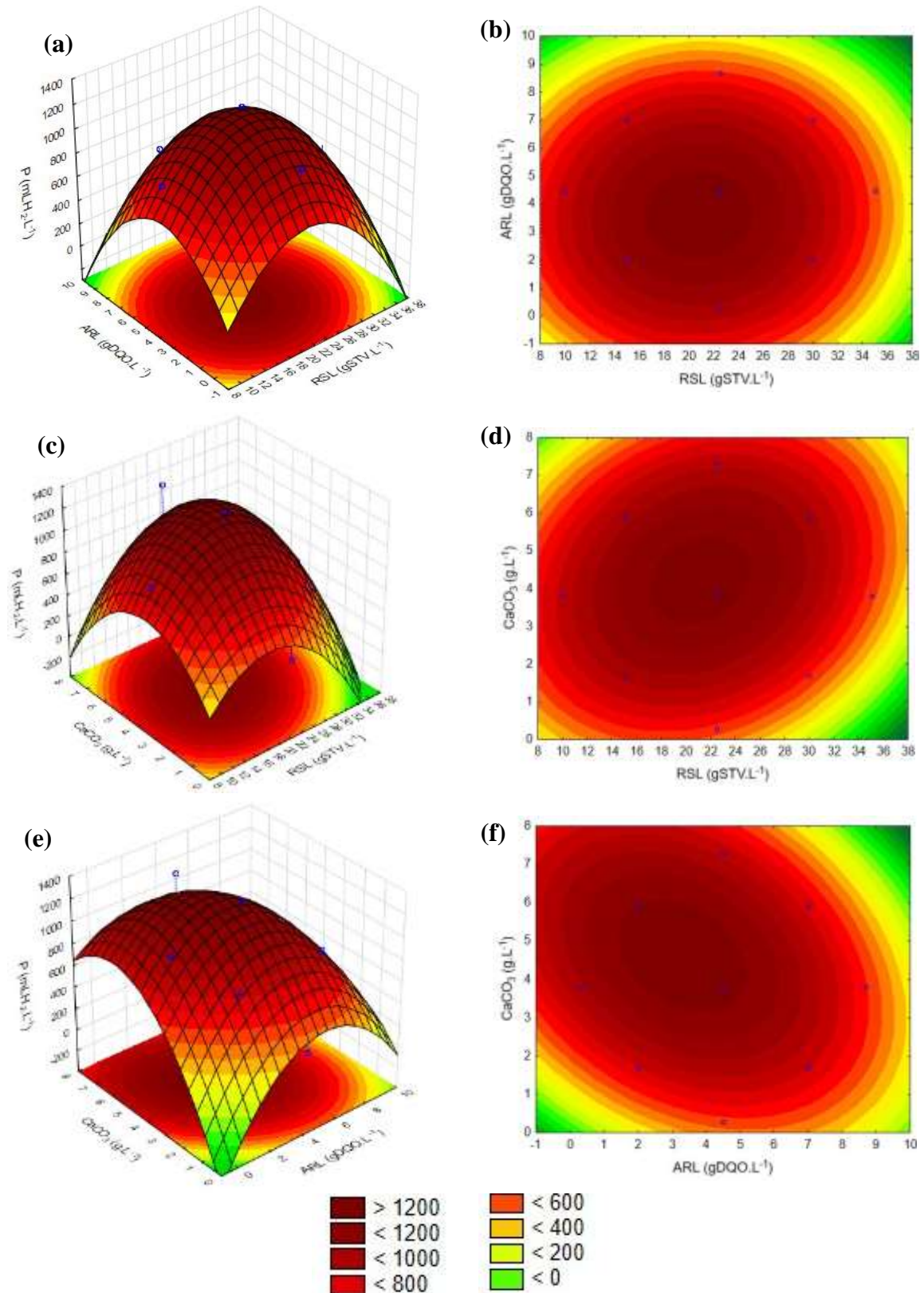


Figura 6.2. Superfícies de resposta e de contorno do modelo de produção de H_2 (a) e (b) concentração de $CaCO_3$ fixada em $3,8 \text{ g.L}^{-1}$; (c) e (d) concentração de ARL fixada em $4,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$; (e) e (f) concentração de RSL fixada em $22,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$.

A maior produção de H₂ foi verificada para os ensaios na condição do ponto central (E-15/E-16/E-17) de 1229,45±14,1 mLH₂.L⁻¹, conduzidos com 22,5 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 3,8 g.L⁻¹ de CaCO₃, para concentração inicial de carboidratos de 10,12±0,48 g.L⁻¹, e relação gCaCO₃/gCHO de 0,38±0,01. Para o ensaio E-14, conduzido no mesmo nível para as variáveis de substrato (22,5 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL) em relação àqueles ensaios do ponto central, observou-se produção de H₂ muito próxima; ou seja, de 1224,50 mLH₂.L⁻¹. Todavia, deve-se destacar que no ensaio E-14 foi aplicada concentração de carbonato de cálcio mais elevada, de 7,33 g.L⁻¹, resultando em relação 0,67 de CaCO₃/CHO.

A partir destas considerações é possível verificar dois pontos importantes, o primeiro é relacionado à concentração de alcalinizante; ou seja, valores acima de 3,8 g.L⁻¹ não resultaram em maior *P* para a mesma concentração de substrato, mas também não causaram efeitos negativos significativos na produção de H₂. O segundo ponto refere-se à percepção de que concentrações intermediárias de substrato (22,5 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹) resultaram em melhor ajuste do processo tendo em vista a maior produção de H₂ na condição de ponto central. Similar ao que foi observado no presente estudo, Pu et al. (2019) avaliaram a produção de H₂ para ampla faixa de concentração de resíduos de alimentos (até 37,5 gSV.L⁻¹) em reatores em batelada. Os autores identificaram que a maior produção, também foi obtida para concentração intermediária de substrato (15,0 gSV.L⁻¹). A partir disso, os autores destacaram que tal tendência está associada ao fato de que baixas concentrações de substrato não fornecem matéria orgânica suficiente para fermentação em hidrogênio, enquanto sobrecargas implicam na mudança de vias metabólicas e fermentação láctica.

Efeitos prejudiciais ao processo diretamente associados à elevada concentração de carbonato de cálcio (7,33 g.L⁻¹) não foram observados, provavelmente, tal possibilidade está relacionada a baixa solubilidade e lenta dissolução deste alcalinizante em meio líquido, de forma que elevadas concentrações de CaCO₃ não resultam em um demasiado aumento do pH, mas em aumento da capacidade de tamponamento (Ai et al., 2014). Caso contrário, determinadas concentrações de carbonato de cálcio conduziriam ao estabelecimento do processo acima do limite superior da faixa ideal de pH para produção de hidrogênio (pH de 4,5 a 6,5) (H. Lee et al., 2010). Coerente a este comportamento descrito para o carbonato, no presente estudo apesar da amplitude da concentração de carbonato de cálcio aplicado aos reatores (0,3 a 7,3 g.L⁻¹) não se observou impacto direto no pH inicial dos ensaios, os quais

em geral foram próximos a 6,5 (Tabela 6.3). A percepção de redução na estabilidade de manutenção da produção de H_2 nos ensaios conduzidos no nível superior para as variáveis de substrato está associada ao desequilíbrio na cinética dos processos de dissolução de carbonato e cálcio e de produção de ácidos orgânicos, de forma que elevada produção de ácidos orgânicos impõe a necessidade de elevada dissolução de carbonato de cálcio (Salek et al., 2015), a qual, as vezes não pode ser atingida.

O satisfatório ajuste das variáveis para os ensaios nos quais se obteve maiores valores de P é confirmado pelas superfícies de resposta, de forma que o ponto de otimização da produção de H_2 é verificado na região central das superfícies, e é dado pela condição com 21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL, 3,4 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 4,50 g.L⁻¹ de CaCO₃, de forma que para pontos localizados na direção das extremidades das superfícies observa-se condições experimentais com gradual redução do potencial máximo de produção. Tal como obtido no presente estudo de co-digestão de resíduos de citros, Liu et al. (2020), com base nos resultados do estudo de co-digestão de resíduos de alimentos com esterco bovino destacaram a importância da otimização da proporção entre os substratos. Assim sendo, observaram que a produção de H_2 foi significativamente reduzida à medida que foi verificado um distanciamento da concentração dos substratos dos valores de concentração da condição otimizada.

A menor produção de H_2 (199,21 mLH₂.L⁻¹) foi observada no ensaio E-13 (22,5 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 0,3 g.L⁻¹ de CaCO₃). As concentrações aplicadas de RSL e ARL desta condição são as mesmas dos ensaios E-14 e dos pontos centrais (E-15/E-16/E-17), nos quais foi verificada os maiores valores de P . Todavia, em E-13 foi adicionado 0,3 g.L⁻¹ de CaCO₃, e conseqüentemente resultando em relação CaCO₃/CHO de apenas 0,03. A partir do comportamento antagônico em relação à produção de H_2 neste ensaio é possível destacar a fundamental importância da alcalinização para manutenção de boa estabilidade do processo fermentativo. Resultados similares foram verificados por Zhang et al. (2013), os quais avaliaram o efeito da alcalinização empregando *lime mud* (1,0 a 4,0 g.L⁻¹), composto rico em carbonato de cálcio e óxido de cálcio, na fermentação em reatores em batelada com resíduos de alimento. Os autores constataram que tanto para o ensaio controle sem alcalinizante, como naqueles com menor adição (até 2,0 g.L⁻¹), a produção de H_2 foi significativamente inferior àqueles ensaios cuja concentração de alcalinizante foi mais

adequada (3,0 a 4,0 g.L⁻¹). Assim como observado no presente estudo menor estabilidade do processo foi observada devido à redução mais acentuada do pH.

Por meio das superfícies de respostas (Figura 6.2) verificou-se acentuada redução de *P*, principalmente para concentrações de carbonato de cálcio na faixa de 0,3 a 1,7 g.L⁻¹, combinadas as concentrações de substrato $\geq 30,0$ g.L⁻¹ de RSL, e $\geq 7,0$ gDQO.L⁻¹ de ARL. Para a condição com baixa concentração de carbonato de cálcio (1,7 g.L⁻¹), porém, com concentração inicial de carboidratos com valores intermediários (5,0 a 7,0 gCHO.L⁻¹, Tabela 6.5), não se verificou redução tão acentuada da produção de H₂, uma vez que a combinação das variáveis nestes níveis não resultou em razão gCaCO₃/gCHO suficientemente baixa. A importância da razão alcalinizante:substrato para fermentação também foi verificada por Sangyoka et al. (2016), utilizando bicarbonato de sódio como agente tamponante em estudo com bagaço de cana-de-açúcar em reatores em batelada. Os autores identificaram redução do potencial de produção de hidrogênio em ensaios com baixos valores para razão alcalinizante:substrato (< 0,15), similar ao que foi observado no presente estudo, e identificaram condição otimizada com razão alcalinizante:substrato de aproximadamente 0,25.

O efeito deste ajuste entre as concentrações de CaCO₃, RSL, e ARL, pode ser visualizado nos ensaios E-1 e E-3, os quais foram realizados com baixa concentração de CaCO₃ (1,7 g.L⁻¹). Entretanto, a concentração inicial de substrato também foi baixa em comparação a outros ensaios (5,25 gCHO.L⁻¹ e 7,12 gCHO.L⁻¹, respectivamente), resultando em relação 0,30 de CaCO₃/CHO. Desta forma, não se observou tão acentuada redução na produção de hidrogênio (823,72 mLH₂.L⁻¹ para E-1, e 898,80 mLH₂.L⁻¹ para E-3), quando comparada a condição do ponto central na qual se obteve a maior produção.

A estabilidade do processo nos ensaios com melhores respostas em relação à produção de H₂ esteve associada ao comportamento observado para o pH operacional, que após redução nas primeiras horas do processo (10 – 15h) partindo de pH inicial de 6,5 e atingindo valores próximos a 5,95, foi observada pequena variação atingindo valores próximos de 5,5 ao final do ensaio (~40h). Kim et al. (2011) ao avaliarem a fermentação de resíduos de alimentos em reatores em batelada constataram que a correção do pH inicial para valores entre 5,0 e 9,0 impôs efeito importante no tempo para início de produção (λ). Entretanto, sob tais condições não teve efeito sobre o pH operacional, uma vez que rapidamente houve acentuada diminuição do pH nos reatores, sendo necessário o controle com adição de solução alcalina

para manutenção das condições favoráveis à produção de H_2 , tal como observado no presente estudo com a adição do carbonato no início dos ensaios.

Conforme pode ser visualizada na superfície de respostas (Figura 6.2), a produção de hidrogênio é significativamente aumentada à medida que se estabelece um melhor ajuste entre as variáveis de substrato X_1 e X_2 (RSL e ARL). Zonas periféricas da superfície referentes a condições que simultaneamente possuem concentrações elevadas de RSL ($\geq 30,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$) e ARL ($\geq 7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$), ou ainda condições com concentrações muito baixas para uma das fontes de substrato, não resultaram em resposta favorável à produção de hidrogênio. Em condições com adição de $30,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL e $7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, tal como E-4 e E-8, a produção de H_2 foi de apenas $578,6 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$ e $493,8 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Em relação ao efeito que o ajuste das proporções dos substratos na co-digestão tem na produção de hidrogênio, Li et al. (2018) avaliaram a co-digestão de resíduos de alimentos com lodo de esgoto sanitário, e constataram que a produção de H_2 foi impactada negativamente à medida que a proporção entre as concentrações destes resíduos foi alterada, principalmente com o aumento da proporção de lodo e consequente redução de resíduos de alimentos, obtendo a melhor condição de produção de H_2 com 85,2% (baseado em Sólidos Totais) de resíduos de alimentos. Tal observação é semelhante ao que foi obtido nos resultados do presente estudo, nos quais se verificou que o aumento simultâneo na concentração de ambos os substratos resultou em efeitos negativos para produção de H_2 .

Identificou-se percentual de H_2 na composição do biogás entre 30,2% e 51,0%, uma variação importante, sendo possível inferir que diferentes condições experimentais influenciaram significativamente a qualidade do biogás. As variáveis de concentração de RSL (X_1) e concentração de CaCO_3 (X_2) foram identificadas como estatisticamente significativas ($p = 0,001$ e $p = 0,008$, respectivamente) em relação a $\%H_2$. Os ensaios E-2 ($30,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $2,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3) e E-8 ($30,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $5,9 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3) foram aqueles nos quais se verificou o menor percentual de H_2 (30,2% e 30,5%, respectivamente), enquanto em E-3 ($15,0 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $7,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3) e E-13 ($22,5 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $4,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3) foram aqueles com maior $\%H_2$ (51,0% e 48,3%).

Para os dois ensaios com maior $\%H_2$ identificou-se padrões distintos, o primeiro com maior produção volumétrica como verificado em E-3, e por conseguinte adequada

estabilidade do processo fermentativo com predomínio de rotas de produção de H₂. Enquanto, para o ensaio E-13 a elevada %H₂ no biogás apesar do baixo valor de *P* ocorreu em razão da menor adição de CaCO₃ (0,3 g.L⁻¹) em comparação aos demais ensaios, resultando em redução na liberação total de CO₂ pelo sistema carbonato. A reação de neutralização, através do sistema carbonato, dos ácidos formados na fermentação resulta na liberação de CO₂ para a fase gasosa do reator, tal como pode ser verificado na Equação (8), tomando como exemplo a reação de neutralização do ácido acético (Salek et al., 2015), de forma que maior disponibilidade de carbonato de cálcio no meio líquido possibilita maior liberação de CO₂. Lin e Lay (2004) destacam que o carbonato se correlaciona com o CO₂, de forma que o aumento da concentração de carbonato tende a proporcionar maior fração de CO₂ na fase gasosa.



A remoção de carboidratos (RC) nos ensaios variou na faixa de 29,25% (E-13) e 88,31% (E-7), conforme pode ser verificada na Tabela 6.5, uma diferença significativamente importante neste parâmetro que indiretamente permite avaliar a estabilidade e eficiência do processo fermentativo através da utilização do substrato disponível. Entretanto, a baixa remoção observada em E-13 foi uma exceção dentre as condições experimentais avaliadas (Figura 6.3), e excetuando tal condição, a remoção de carboidratos dos demais ensaios foi de 81,4%±5,7%. Elevada remoção de carboidratos (88,3% para E-7 e 81,5% para E-8) foi observada mesmo para condições com reduzido rendimento de H₂, (0,61 mol H₂.mol⁻¹ hexose em E-7 e 0,53 mol H₂.mol⁻¹ hexose em E-8).

A boa resposta em relação à remoção de carboidratos inclusive para os ensaios com elevada concentração inicial de substrato esteve diretamente associada à alcalinização com CaCO₃, visto que sua gradual solubilização ao longo do ensaio assegurou a manutenção de pH em faixa que não foi limitante ao prosseguimento do processo. Em alguns estudos envolvendo a produção de hidrogênio que utilizaram apenas a correção do pH inicial como parâmetro do processo obtiveram RC inferiores aos obtidos no presente estudo, mesmo partindo de uma concentração inicial de carboidratos em faixa inferior a que foi avaliada para resíduos de citros. Por exemplo, Villa-Montoya et al. (2020b) verificaram remoção de carboidratos de 60,4%±11,3%, em faixa de pH inicial de 4,8 a 8,5, para co-digestão de resíduos de café em reatores batelada. Camargo et al. (2021a) verificaram para resíduos de citros em reatores batelada remoção de apenas 46,8%±12,2%, com variação de pH inicial entre 4,5 a 8,5. Em

ambos os casos valores de pH inicial na faixa neutra a alcalina não foram suficientes para garantir elevada remoção de carboidratos.

Tabela 6.5. Parâmetros físico-químicos dos ensaios do DCCR.

Ensaio	gCaCO ₃ / gCHO	Carboidratos		RC %	AOV Predominate	HBu/HAc
		Inicial	Final			
E-1	0,32	5250,0	963,8	81,64%	HAc	0,54
E-2	0,21	8090,0	2462,8	69,56%	HAc e HBu	0,65
E-3	0,24	7116,7	1568,3	77,96%	HAc, HBu e HLa	0,86
E-4	0,14	11853,3	2977,7	74,88%	HLa	0,32
E-5	0,87	6773,3	872,5	87,12%	HAc e HBu	1,28
E-6	0,60	9803,3	2097,2	78,61%	HLa	0,74
E-7	0,77	7666,7	896,0	88,31%	HLa	0,78
E-8	0,46	12833,3	2380,0	81,45%	HLa	0,62
E-9	0,66	5743,3	856,7	85,08%	HBu	1,47
E-10	0,28	13473,3	3775,0	71,98%	HLa	0,45
E-11	0,46	8196,7	1592,7	80,57%	HAc e HBu	0,85
E-12	0,35	10756,7	2117,5	80,31%	HLa	0,66
E-13	0,03	9500,0	6721,7	29,25%	HLa	0,41
E-14	0,67	10896,7	1321,7	87,87%	HAc e HBu	1,31
E-15	0,36	10583,3	1422,5	86,56%	HAc e HBu	1,43
E-16	0,37	10176,7	1491,7	85,34%	HAc e HBu	1,37
E-17	0,40	9593,3	1456,7	84,82%	HAc e HBu	1,26

O rendimento de H₂ (Y₁) para os ensaios, calculado indiretamente com base na concentração de substrato e na produção acumulada de H₂, foi de 53,5 mLH₂.g⁻¹CHO a 214,4 mLH₂.g⁻¹CHO. Para os ensaios nos quais se verificou os maiores valores de *P* obteve-se um rendimento intermediário, cujos valores foram de 168,3 mLH₂.g⁻¹CHO (E-15/E-16/E-17) e 144,4 mLH₂.g⁻¹CHO para E-14.

Em alguns ensaios foram observados rendimentos de 214,4 mLH₂.g⁻¹CHO para E-1 (15,0 gSTV.L⁻¹ de RSL, 2,0 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 1,7 g.L⁻¹ de CaCO₃) e 209,3 mLH₂.g⁻¹CHO para E-9 (9,9 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 3,8 g.L⁻¹ de CaCO₃). Tais ensaios tem em comum as mais baixas concentrações iniciais de substrato dentre todos os demais ensaios (5,25 e 5,74 gCHO.L⁻¹, respectivamente) avaliados. Verificou-se, portanto que para

menores concentrações de substrato combinadas a razão $\text{CaCO}_3/\text{CHO} > 0,3$ foram favoráveis a obtenção dos maiores rendimentos de H_2 .

Os rendimentos mais baixos verificados foram $53,5 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{CHO}$ para E-8 ($30,0 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ de RSL, $7,0 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARL, e $5,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de CaCO_3), e $62,7 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{CHO}$ para E-10 ($35,1 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ de RSL, $4,5 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARL, e $3,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de CaCO_3), ensaios que têm em comum as concentrações iniciais de carboidratos solúveis mais elevadas dentre todos os ensaios ($12,8$ e $13,5 \text{ gCHO} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente). A elevada concentração de substrato é provável ter favorecido maior velocidade de produção de ácidos orgânicos conduzindo a modificação das rotas metabólicas predominantes, sendo desfavorável à produção de hidrogênio. Em outras pesquisas tem sido também reportado aumento no rendimento de hidrogênio à medida que se obtém o ajuste na concentração de substrato, com redução neste rendimento para concentrações de substrato que resultam em sobrecarga no processo, causando acúmulo de ácidos orgânicos, e conseqüentemente redução acentuada de pH (Jianlong e Wei, 2008; Yang e Wang, 2019b).

Considerando a hipótese de que os carboidratos solúveis do início dos ensaios foram em sua totalidade representados por hexoses, obteve-se um rendimento de H_2 (Y_2) com valores entre $0,53$ e $2,13 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{hexose}$, o que representa $13,3\%$ a $53,2\%$ do rendimento máximo teórico, que é de $4 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{hexose}$ obtido nas reações metabólicas da via de conversão de glicose a ácido acético (Thauer et al., 1977). Os rendimentos obtidos para alguns ensaios foram elevados, como por exemplo E-1 ($2,06 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{hexose}$) e E-9 ($2,13 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{hexose}$), considerando as limitações práticas de atingir o máximo teórico, conforme apresentado por Thauer et al. (1977). Lee et al. (2009) infere que os rendimentos máximos observados em estudos de fermentação têm sido de até $2,8 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{hexose}$, o que representa 70% do rendimento teórico, similar aos maiores rendimentos obtidos no presente estudo. Tal como observado destaca-se que uma variação significativa em Y_2 é frequentemente verificada em razão de diferentes condições experimentais avaliadas, evidenciando a importância de se realizar um adequado ajuste de variáveis significativas. Akhlaghi et al. (2019), por exemplo, ao realizarem experimentos fatoriais para avaliação a produção de H_2 em reatores em batelada, obtiveram rendimentos de H_2 de $0,36$ a $1,45 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose}$. Enquanto, Gioannis et al. (2014) obtiveram valores de Y_2 de $0,04$ a $2,6 \text{ mol H}_2/\text{mol lactose}$, ao avaliarem a influência do pH na produção de H_2 em reatores em batelada a partir de soro de queijo.

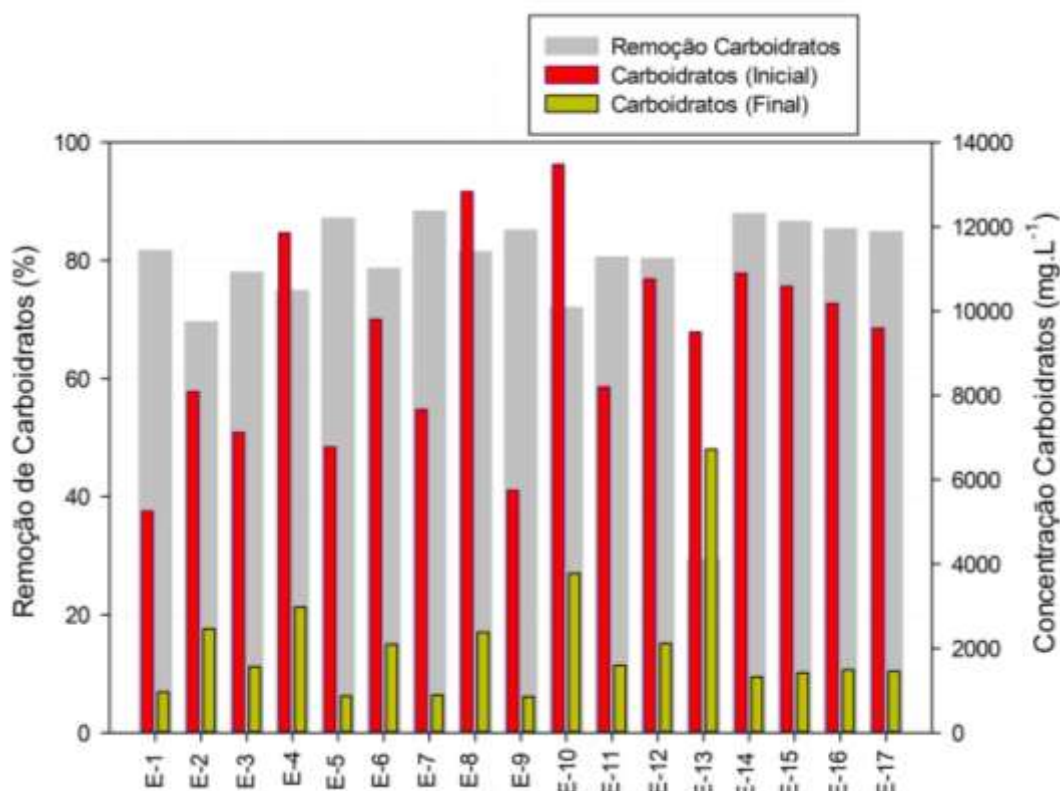


Figura 6.3. Concentração de carboidratos nos pontos inicial e final, e remoção de carboidratos dos ensaios do planejamento experimental.

A concentração de limoneno foi determinada para amostras do início e final dos ensaios fermentativos em reatores batelada, como pode ser verificado na Figura 6.4. A concentração inicial de limoneno foi em geral inferior a 15 mg.L^{-1} . Camargo et al. (2020b) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de limoneno nos parâmetros cinéticos de produção de H_2 em reatores batelada e verificaram que para concentrações de até 100 mg.L^{-1} não houve efeito inibitório significativo para P . Todavia, foi observada diferença estatística nos valores de λ para ensaios com concentração de limoneno acima de $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Considerando as concentrações de limoneno reportadas por Camargo et al. (2020b) que resultaram em efeitos negativos para P e λ , não é provável a ocorrência de inibição ou efeitos negativos significativos sobre P relacionados a presença deste composto nas concentrações observadas no presente estudo, inferiores a 15 mg.L^{-1} .

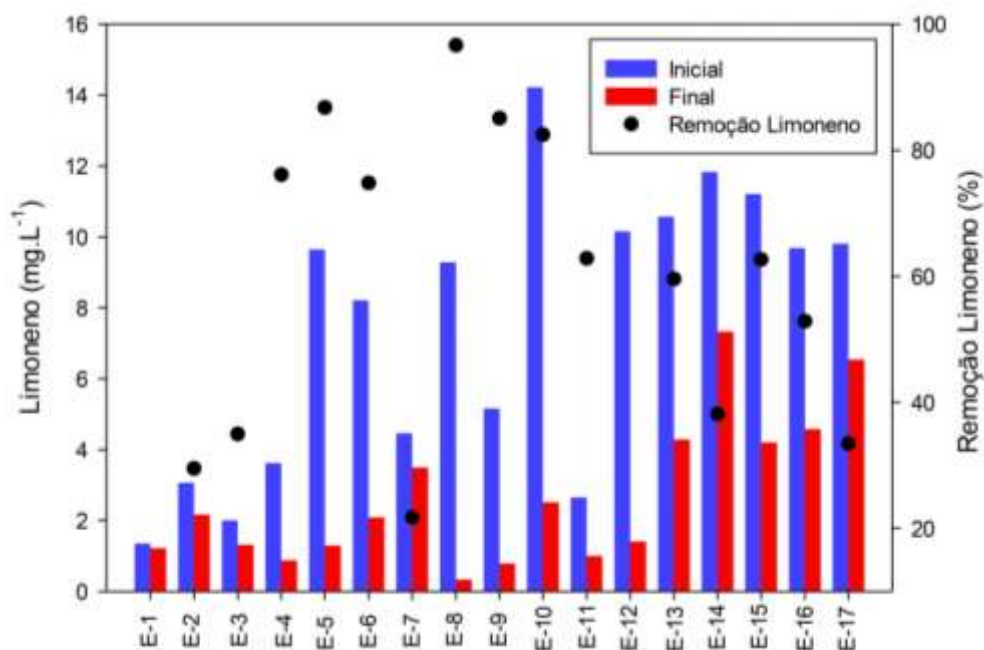


Figura 6.4. Concentração de limoneno para início e final do processo de fermentação em reatores batelada, e remoção de limoneno observada.

De maneira geral foi observada diferença significativa entre a concentração inicial e final de limoneno nos ensaios, sendo verificada máxima remoção de 96,7% no ensaio E-8, e mínima de 9,9% para E-1. Nos ensaios em batelada do presente estudo é provável que a remoção de limoneno tenha ocorrido via degradação, enquanto a adsorção do limoneno no lodo de inóculo não foi avaliada visto que tal mecanismo não tem sido observado como significativo na remoção deste composto em reatores anaeróbios (Camargo et al., 2020b). O processo de adsorção na fase sólida dos resíduos de citros é outro provável mecanismo que pode ter contribuído na remoção de limoneno do meio líquido, assim como discutido por Calabro et al. (2016). Os autores avaliaram o conteúdo de limoneno na digestão anaeróbia em reatores em batelada e identificaram adsorção de até 76% na fase sólida dos resíduos de citros, apontando que este mecanismo tem importante papel na redução do conteúdo de limoneno na fase líquida dos reatores.

A análise da distribuição dos metabólitos solúveis nos ensaios foi realizada para interpretação conjunta com os dados de produção de hidrogênio e possível compreensão acerca das rotas metabólicas predominantes nos diferentes ensaios do planejamento experimental. Os ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), láctico (HLa) e fórmico (HFo) foram observados em pelo menos um dos ensaios (Figura 6.5).

Conforme pode ser verificado na Tabela 6.5 em relação aos metabólitos predominantes ao final do processo fermentativo foi observado o ácido láctico (HLa) como o principal metabólito nos ensaios A-4 com $4302,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (representado 64,1% do total), A-6 com $3333,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (60,3%), A-7 com $3926,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (70,5%), A-8 com $7312,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (79,6%), A-10 com $6367,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (81,9%), A-12 com $6247,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (78,0%) e A-13 com $3992,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (91,5%). Todavia, para o ensaio A-1 identificou-se predominância do ácido acético com $1897,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (63,6%); e para os ensaios A-2, A-3, A-5, A-9, A-11, A-14, e PC observou-se como principais metabólitos, tanto o ácido acético, como o butírico, cada um deles representando de 40% a 50% do total (Figura 6.5).

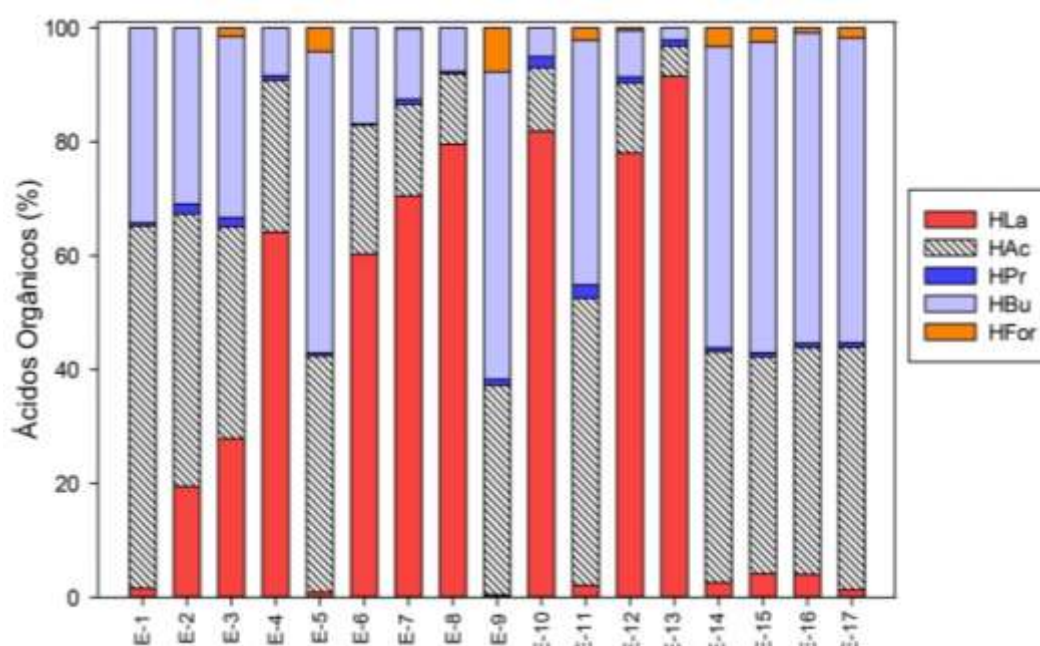


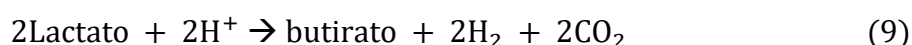
Figura 6.5. Composição percentual de ácidos orgânicos ao final dos ensaios do planejamento experimental.

Em relação aos ensaios com predominância de HLa, com exceção de E-6, observa-se um padrão de correspondência com outra resposta importante do processo que é a produção de hidrogênio. O rendimento de H_2 dos ensaios A-4, A-7, A-8, A-10, A-12 e A-13, foi de apenas $0,63 \pm 0,06 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{hexose}$, coerente ao que se espera levando em consideração as reações bioquímicas de produção de ácido láctico, nas quais o catabolismo das moléculas de carboidratos não envolve a produção direta de H_2 (Guo et al., 2010).

Dentre estes ensaios com predominância de HLa, para E-8, E-10 e E-12 observou-se concentrações mais elevadas deste metabólito, de $7,3 \text{ g.L}^{-1}$, $6,4 \text{ g.L}^{-1}$, e $6,3 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Nestes ensaios a combinação de elevada concentração, tanto de substrato ($12,8 \text{ gCHO.L}^{-1}$, $13,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$, e $10,8 \text{ gCHO.L}^{-1}$, respectivamente), como de CaCO_3 ($5,9$

g.L⁻¹, 3,8 g.L⁻¹, e 3,8 g.L⁻¹, respectivamente) favoreceram populações de bactérias lácticas impactando a produção de hidrogênio nestas condições. Todavia, para E-13, apesar da grande proporção de HLa em relação ao total de metabólitos (91,5%), não foi observada sua concentração tão elevada (4,0 g.L⁻¹) como nos ensaios E-8, E-10 e E-12. É provável que a baixa concentração de CaCO₃ adicionada em E-13 (0,3 g.L⁻¹) não foi suficiente para o tamponamento do processo, resultando em redução importante do pH, e com isso efeitos inibitórios à fermentação, visto que o pH final foi de apenas 3,52, o mais baixo de todos os ensaios. Assim como observado no presente estudo, Tang et al. (2017) identificaram que a prevenção de uma redução acentuada do pH operacional nos ensaios possibilitou obter maiores concentrações de HLa, em comparação aos ensaios cujo controle de pH não foi realizado, para os quais verificou-se que valores de pH < 4,0 foram inibitórios ao crescimento e a atividade dos microrganismos.

Para o ensaio E-6, que diferentemente do que foi identificado para os demais ensaios cuja produção de HLa foi elevada, não se observou correspondência com baixa produção de H₂, uma vez que obteve-se rendimento de H₂ intermediário (1,17 molH₂.mol⁻¹hexose) para este ensaio. É provável que o rendimento de H₂ intermediário obtido, apesar da predominância de produção de HLa esteja relacionado a produção de H₂ por vias de oxidação do ácido láctico. Pelo perfil de ácidos ao longo deste ensaio é possível inferir que a produção de H₂ e H₂ tenha ocorrido a partir do consumo de HLa (Eq. 9), sendo esta a via metabólica favorável do ponto de vista termodinâmico ($\Delta G^\circ = -64,1$) (Grause et al., 2012; Z. Lee et al., 2010). Vias metabólicas de utilização de ácido láctico no decorrer do processo fermentativo foram investigadas por Baghchehsaraee et al. (2009) em reatores em batelada com amido. Os autores avaliaram a adição de HLa em até 0,9 g/L, e observaram que a disponibilização de HLa no meio de fermentação resultou em aumento significativo da produção de hidrogênio, associada com aumento da formação de ácido butírico. Tais resultados são similares aos observados no ensaio E-6, cujo consumo de parcela do HLa produzido ocorreu em período concomitante ao aumento da concentração de H₂, com manutenção da produção de H₂.



A composição dos metabólitos dos ensaios com maior produção de hidrogênio (E-14 e pontos centrais) é caracterizada pela prevalência dos ácidos acético e butírico, contribuindo com cerca de 95% dos metabólitos ao final do processo. Provavelmente, a conversão do

substrato ocorreu majoritariamente pela via Clostridial, o que representa uma vantagem no que se refere a maior produção de H_2 por mol de carboidrato consumido (Sikora et al., 2013).

Nos ensaios do ponto central (E-15/E-16/E-17) as concentrações de HAc e HBU ao final do processo foram de $1590,1 \pm 11,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2153,7 \pm 156,0 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente, e representaram 40,1% (HAc) e 54,2% (HBU) da composição final dos metabólitos solúveis. Tal característica foi muito semelhante ao observado para o ensaio E-14 ($1684,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de HAc e $2199,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de HBU), no qual a produção de H_2 foi similar aos ensaios do ponto central. Todavia, nos ensaios E-1 ($1897,3 \text{ mg HAc.L}^{-1}$) e E-4 ($1785,2 \text{ mg HAc.L}^{-1}$) identificou-se concentrações de HAc semelhantes ou até superiores aos ensaios de maior produção de hidrogênio (E-14, E-15, E-16, e E-17). Esse aspecto não foi verificado para o ácido butírico, cuja concentração foi notadamente superior aos ensaios E-14 E-15, E-16 e E-17.

Para os ensaios E-3, E-5, E-9 e E-11 a concentração de HBU ($1305,6 \text{ mg.L}^{-1}$, $1728,8 \text{ mg.L}^{-1}$, $1776,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1240,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente) foi intermediária, assim como o observado para a produção de hidrogênio nestes ensaios ; ou seja de $900 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$. Sendo assim, verificou-se maior correlação da produção de H_2 nos ensaios com a predominância de HBU em relação ao HAc.

Matyakubov et al. (2022) verificaram que a relação HBU/HAc é importante para correlacionar com o rendimento de H_2 . A partir dos resíduos de citros foi observada relação entre 0,3 e 1,5. Assim sendo, para os ensaios com maiores valores para esta resposta ($>0,80$) foram aqueles com maior P . Para os ensaios do ponto central, por exemplo, obteve-se relação HBU/HAc média de 1,35. Em relação ao ensaio E-4, para P de apenas $578 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$, a razão foi de 0,30.

6.3.2 Ensaio de validação do modelo

O ajuste proporcionado pelo desenho experimental e pelo modelo da superfície de respostas conduziu ao P otimizado de H_2 de $1249,04 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$, e velocidade máxima de produção (R_m) de $89,60 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$, com tempo para início de produção de 8,56 h (Figura 6.6), em uma condição experimental com $21,4 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $3,4 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL, e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCO_3 (Tabela 6 6). A produção de hidrogênio obtida é 5,3 vezes superior (530%) a produção de H_2 verificada no ensaio E-13 ($199,21 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$), por exemplo, no qual a menor produção de H_2 foi obtida.

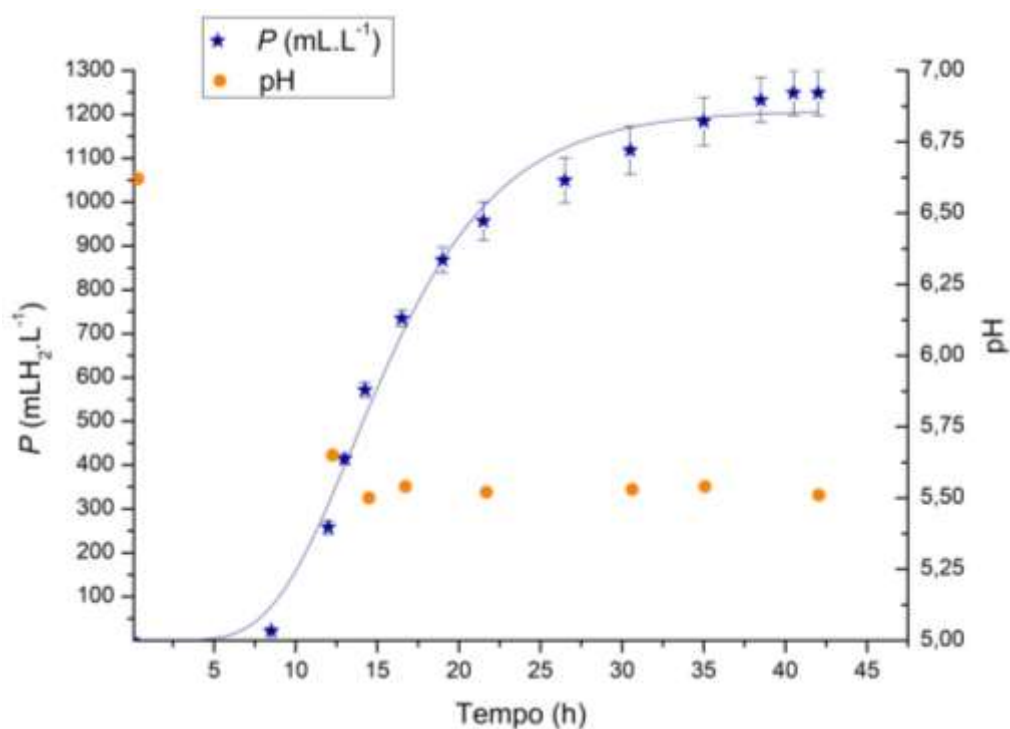


Figura 6.6. Produção acumulada de H₂ com ajuste de Gompertz modificado, e perfil de pH, para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H₂.

Tabela 6 6. Condição experimental e principais respostas para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H₂.

Condição Experimental		
RSL	21,4 gSTV.L ⁻¹	Valor Predito
ARL	4,5 gDQO.L ⁻¹	P (mLH ₂ .L ⁻¹)
Carbonato de Cálcio	3,4 g.L ⁻¹	1287,5
Parâmetros do ensaio de validação da condição otimizada de produção de H₂		
<i>P</i> (mL.L ⁻¹)	1249,04 ± 40,1	
<i>Rm</i> (mL.L ⁻¹ .h ⁻¹)	89,60	
<i>λ</i> (h)	8,56	
%H ₂	47,5%	
Y ₁ (mLH ₂ /gCHO)	195,07	
Y ₂ (molH ₂ /mol hexose)	2,07	
pH final	5,51	
gCaCO ₃ /gCHO	0,53	
RC	86,6%	
AOV predominante	HBu	
HBu/HAc	1,84	

RSL=Resíduos Sólidos Laranja; ARL=Água Residuária Processamento de Laranjas RC=Remoção de Carboidratos; AOV=Ácidos Orgânicos Voláteis.

Na condição do ensaio otimizado (OC-H) obteve-se relação gCaCO₃/gCHO de 0,53, sendo, portanto, este valor tomado como um direcionamento importante no que se refere à alcalinização para processos fermentativos com foco na produção de H₂ com resíduos de

citros. Diminuição acentuada de pH (de 6,62 para 5,65) foi verificada entre o início do ensaio e da fase exponencial de produção de H_2 (~10-12h) (Figura 6.6). Entretanto, até o final do processo (~42h) houve baixa variação do pH (de 5,65 para 5,51), mesmo com elevada produção de H_2 e ácidos orgânicos. Portanto, o ajuste das condições possibilitou fornecer tamponamento suficiente, para que o processo ocorresse de forma estável, mesmo com elevada concentração inicial de substrato ($8,4 \text{ gCHO.L}^{-1}$). No ensaio da condição otimizada obteve-se remoção de 86,6% de carboidratos e rendimento de H_2 de $195,07 \text{ mLH}_2/\text{gCHO}$ ou $2,07 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{hexose}$.

O percentual de H_2 na composição do biogás da condição otimizada foi de 47,5%. Tal percentual de H_2 na composição do biogás é importante para o equacionamento de viabilidade técnica e econômica da recuperação energética a partir da produção biológica de H_2 , visto que o biogás obtido no processo fermentativo não é viável para direta utilização, em razão da presença de outros gases, tal como CO_2 , sendo os processos de separação/concentração de hidrogênio é fundamental, não só para viabilizar o uso como também para o transporte e armazenamento (Baeyens et al., 2020; Bélafi-bakó et al., 2006).

Com base no perfil da composição de metabólitos ao longo do processo verifica-se que os ácidos acético e butírico foram os metabólitos em maior concentração ao longo de todo o ensaio, entretanto modificações importantes em relação as suas proporções na composição total dos metabólitos foram observadas (Figura 6.7). Destaca-se que a partir de 30h de ensaio observou-se aumento da concentração de Hbu em maior proporção do que a verificada para o HAc, sendo o ácido butírico o metabólito solúvel em maior concentração ao final do ensaio ($2230,8 \text{ mg.L}^{-1}$), enquanto a concentração de ácido acético foi de $1213,6 \text{ g.L}^{-1}$, representando proporções de 60,8% e 33,1% do total de metabólitos solúveis, respectivamente.

Obteve-se relação Hbu/HAc de 1,87, tal valor é superior a verificada para todos os ensaios realizados previamente na etapa do delineamento, coerente ao que é descrito pela literatura (Matyakubov et al., 2022); ou seja, maior relação Hbu/HAc está associada a maior P de H_2 .

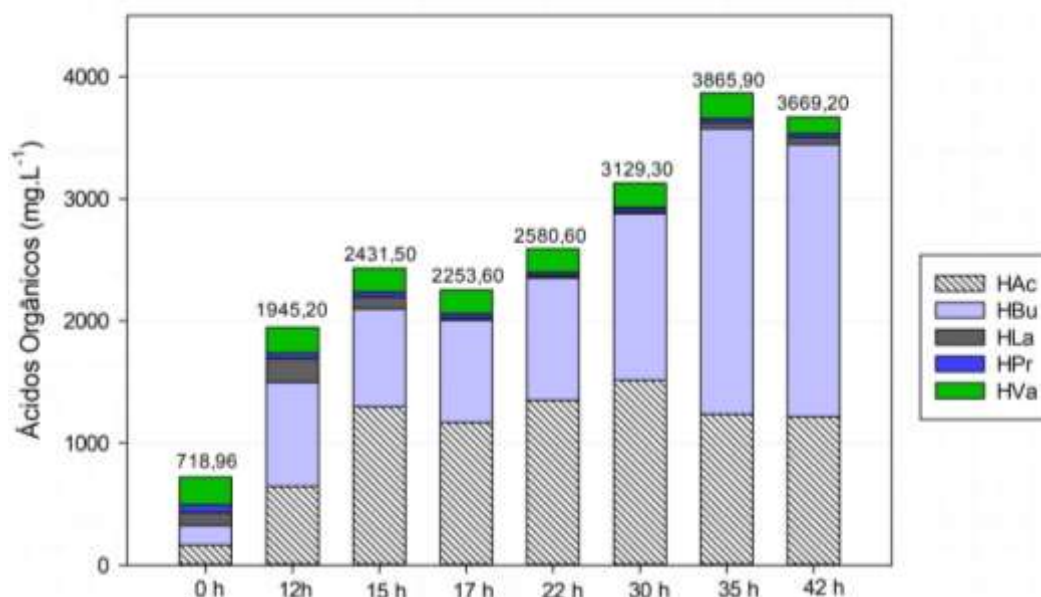


Figura 6.7. Perfil temporal da composição dos ácidos orgânicos para o ensaio de validação da condição otimizada de produção de H₂.

Conforme pode ser verificado na Tabela 6.7 a produção de H₂ com resíduos de citros é superior à obtida por outros estudos que empregaram a co-digestão. Por exemplo, Villa-Montoya et al. (2020b) que avaliaram a co-digestão de resíduos sólidos e água residuária do processamento do café. Os resultados de produção de H₂ obtidos no presente estudo também são superiores a de estudos que empregaram a monodigestão de resíduos agroindustriais como alternativa, como Mazareli et al. (2021) que avaliaram resíduos de banana, e Soares et al. (2018a) e Rabelo et al. (2018) que usaram o bagaço de cana de açúcar.

É possível inferir sobre a viabilidade técnica da co-digestão de água residuária e resíduos sólidos de citrus em função da produção de H₂ e comparada com ensaios nos quais a monodigestão dos resíduos sólidos de citrus foi avaliada. Por exemplo, Camargo et al. (2021a) obtiveram P de 1085 mLH₂.L⁻¹; ou seja, 15,0% inferior à obtida no presente estudo de co-digestão. Portanto, do ponto de vista da produção de hidrogênio, e também com base em outros parâmetros do processo, como remoção de carboidratos, e %H₂ no biogás, a proposta de co-digestão é tecnicamente viável, uma vez que possibilita importante recuperação do conteúdo energético empregando dois fluxos residuais da mesma cadeia produtiva.

Tabela 6.7. Comparação entre a produção otimizada de H₂ de resíduos de citros com outros substratos lignocelulósicos.

Substrato	Condições otimizadas	Produção de H ₂ *	Referência
Resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros	21,4 gSTV.L ⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L ⁻¹ de ARL, e 3,4 g.L ⁻¹ de CaCO ₃	1249,1 mL.L ⁻¹	Presente estudo
Polpa/Casca de Café e água residuária do processamento de café	7,0 g.L ⁻¹ de polpa/casca de café, 30% headspace, pH inicial 7,0	240 mL (686 mL.L ⁻¹)	(Villa Montoya et al., 2020b)
Resíduos sólidos de citros	4 gSTV.L ⁻¹ de lodo, 29,8 gSTV.L ⁻¹ de RSL, e pH inicial de 8,98	48,47 mmol.L ⁻¹ (1085 mL.L ⁻¹)	(Camargo et al., 2021a)
Bagaço de cana de açúcar	2,77 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 5,84 g.L ⁻¹ de bagaço de cana de açúcar	1,5 mmol.L ⁻¹ (36 mL.L ⁻¹)	(Soares et al., 2018a)
Bagaço de cana de açúcar	7,0 84 g.L ⁻¹ de bagaço de cana de açúcar, pH inicial 7,2	23,1 mmol.L ⁻¹ (517 mL.L ⁻¹)	(Rabelo et al., 2018)
Resíduos de banana	5,0 g.L ⁻¹ de substrato, temperatura 37°C, pH inicial 7,0	70,2 mL (468 mL.L ⁻¹)	(Mazareli et al., 2021)

*os valores entre parênteses foram calculados de forma aproximada com base nos dados fornecidos pelos autores, e utilizando a conversão de gases ideais de 1 mol = 22,4 litros.

6.3.3 Caracterização Microbiana

A caracterização da comunidade microbiana foi realizada para fins de identificação dos grupos de microrganismos que foram predominantes nos reatores dos ensaios selecionados, auxiliando na inferência do perfil metabólico do processo. Para tanto, foram analisadas amostras de dois reatores com resultados antagônicos para as principais respostas do processo, que são a produção de H₂ e a composição dos metabólitos solúveis.

A primeira amostra foi tomada do reator do ensaio OC-H (21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 3,4 g.L⁻¹ de CaCO₃) de validação da condição otimizada sendo obtido o maior valor de *P* de H₂, além do HAc e HBU como os metabólitos solúveis predominantes. A segunda amostra foi referente ao reator do ensaio E-10 (35,1 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de ARL, e 3,8 g.L⁻¹ de CaCO₃), com menor *P* e *Rm* de H₂, e predominância absoluta de HLa entre os metabólitos solúveis.

Para a amostra do ensaio da condição otimizada e ensaio E-10 obteve-se 45.813 e 37.906 sequências do gene RNAr 16S, e agrupadas em 19 ASV e 33 ASV (*Amplicon*

Sequencing Variants), respectivamente. A similaridade obtida entre as amostras foi de apenas 26,8%, e provavelmente, as distintas condições nutricionais resultaram em significativa diferença na distribuição de populações de bactérias nos reatores em batelada.

A diversidade das amostras foi avaliada com base nos índices ecológicos de Shannon-Wiener e Simpson (Tabela 6.8). Diversidade significativamente maior (1,30) e menor dominância (0,34) foi observada em E-10; enquanto no ensaio de otimização (OC-H) foi observado apenas 0,30 e 0,90, respectivamente. É provável que o ajuste estatístico das variáveis do ensaio OC-H para estabelecer uma condição cuja produção de hidrogênio fosse levada ao seu máximo potencial com manutenção do pH operacional em faixa de 5,5 a 6,5 estável durante todo o processo, estabeleceu ambiente favorável ao desenvolvimento e estabelecimento de populações específicas, sem criar ambientes transitórios para favorecimento de outras bactérias ao longo do processo, resultando assim em menor diversidade e maior dominância. Baseados no índice Shannon-Wiener, Camargo et al. (2021a) também identificaram redução na diversidade para amostra do reator de uma condição otimizada para produção de H₂ a partir de resíduos de citros, atribuindo tal fato a seleção de populações em razão da otimização das variáveis do processo para favorecimento da produção de H₂.

Tabela 6.8. Índices de diversidade

Índice	Condição Otimizada	E-10
Shannon-Wiener	0,30	1,30
Simpson	0,90	0,34

Tanto no reator da condição otimizada (OC-H) como do ensaio E-10, foram identificadas bactérias pertencentes ao filo Firmicutes como aquele com maior abundância relativa, respectivamente de 96,9% e 93,7%. Para OC-H os outros filios identificados foram Proteobacteria (3,0%), e Halobacterota e Chloroflexi com abundância < 0,01%. Já para E-10 Proteobacteria (5,9%), Halobacterota (0,2%), Actinobacteriota (~0,1%), Desulfobacterota (~0,1%) e Chloroflexi, Spirochaetota e Synergistota com abundância relativa < 0,01%. A absoluta abundância observada para o filo Firmicutes para os ensaios OC-H e E-10 está alinhada ao que tem sido reportado em diversos estudos aplicados a fermentação de variados tipos de substratos (Mazorra-manzano et al., 2022; Park et al., 2014; Ribeiro et al., 2022), constituído por bactérias com ampla variedade fisiológica na fermentação da matéria orgânica (Maintinguer et al., 2015).

Em termos de família identificou-se para o ensaio OC-H bactérias pertencentes a Clostridiaceae com 96,15% da abundância relativa, e também Enterobacteriaceae (3,0%) e Peptostreptococcaceae (0,6%) identificadas com menor abundância. Todavia, para E-10 foram identificadas bactérias pertencentes a três famílias do filo Firmicutes, tais como, Clostridiaceae (51,6%), Lactobacillaceae (21,9%) e Peptostreptococcaceae (20,0%); além de Enterobacteriaceae (5,58%), Moraxellaceae (~0,2%) e Methanosaetaceae (~0,2%), em menor abundância relativa. Foi possível observar significativa redução da abundância relativa de representantes da família Clostridiaceae no ensaio E-10, quando comparado ao ensaio OC-H (Figura 6.8a), ou seja de 96% para 50%, respectivamente. Associado a esta redução foi verificado no ensaio E-10 aumento da abundância relativa de bactérias família Peptostreptococcaceae.

Em relação aos gêneros, para o ensaio da condição otimizada verificou-se apenas dois deles com abundância relativa >1%, *Clostridium sensu stricto 1* (95,0%) e *Enterobacter* (3,0%), e outros gêneros com abundância relativa <1%, tais como, *Paraclostridium* (0,54%), *Clostridium sensu stricto 2* (0,34%), *Clostridium sensu stricto 10* (0,10%), e *Hathewayia* (0,14%). Para o ensaio E-10 também foi identificado *Clostridium sensu stricto 1* como aquele com maior abundância relativa (51,2%), além de *Paraclostridium* (20,0%) e *Lactobacillus* (21,9%). Tal possibilidade pode ser apontada como a mais importante alteração na estrutura da comunidade microbiana de E-10 em relação ao ensaio OC-H. Outros gêneros como *Enterobacter* (4,7%), *Kosakonia* (0,6%), *Clostridium sensu stricto 18* (0,4%), *Klebsiella* (~0,2%) e *Acinetobacter* (~0,2%), também foram identificados, entretanto em baixas abundâncias relativas em ambos os ensaios (E-10 e OC-H) (Figura 6.8b).

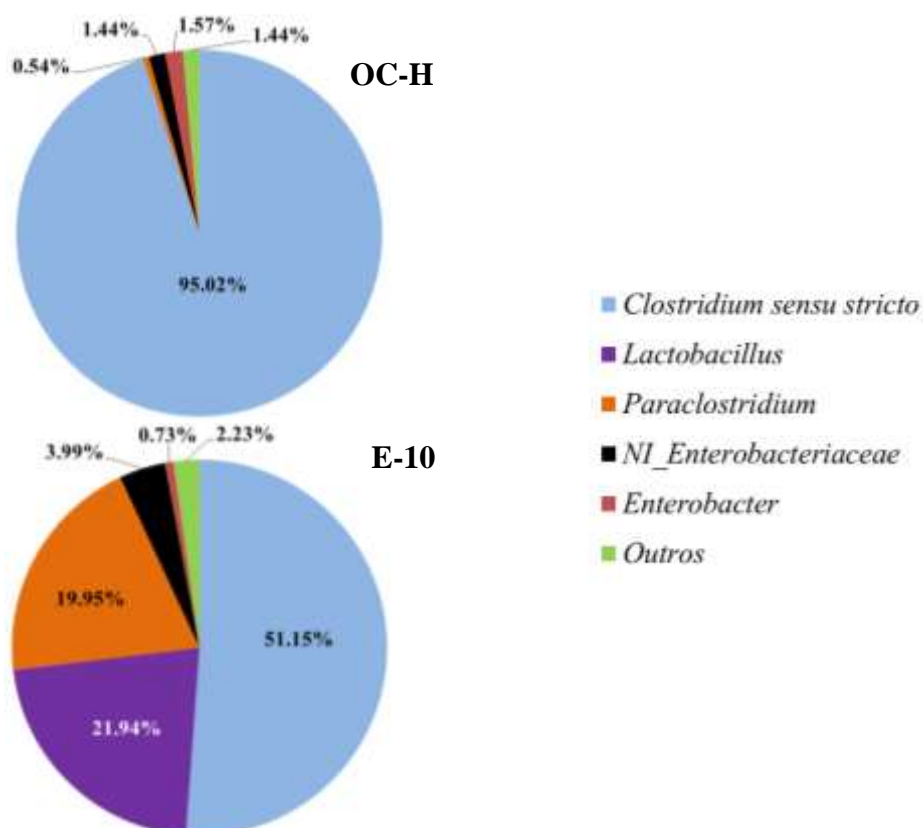


Figura 6.8. Abundância relativa dos gêneros de bactérias para os ensaios da condição otimizada de produção de H₂ (OC-H) e E-10.

O lodo granular de reator UASB mesofílico aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves utilizado como inóculo para os ensaios é caracterizado por uma cultura mista com diversidade de bactérias e arqueias (Palladino et al., 2017), e portanto, optou-se pela estratégia de aplicação do tratamento térmico como forma de estabelecer uma pressão seletiva, favorecendo microrganismos que tem por característica a formação de endósporos em resposta a um estresse ambiental, como por exemplo o gênero *Clostridium sp.* (Diallo et al., 2021). Todavia, mesmo partindo de um mesmo inóculo, as diferentes condições nutricionais aplicadas aos ensaios OC-H e E-10 resultaram no estabelecimento de comunidades microbianas com diferenças importantes na abundância relativa dos principais gêneros identificados nas amostras dos reatores.

Bactérias semelhantes a *Paraclostridium*, e *Clostridium sp.* tem por característica a formação de endósporos (Yang et al., 2019b). É provável que tal característica tenha sido importante para que em condições propícias ao seu desenvolvimento, tal como foi no ensaio E-10, microrganismos deste gênero pudessem vir a ocupar importante papel na estrutura da comunidade microbiana, sendo identificados com elevada abundância. Outro grupo com importante abundância relativa em E-10, foram as bactérias semelhantes a *Lactobacillus*, as

quais são endósporos negativos (Salveti et al., 2012). Provavelmente, a origem estas bactérias sejam fonte autóctone dos resíduos sólidos (Hu et al., 2022) e da água residuária do processamento de citros (Zerva et al., 2021).

Clostridium sensu stricto 1 utiliza principalmente carboidratos e aminoácidos como substrato, de forma que o ácido butírico é o seu principal produto metabólico (Luo et al., 2022), além disso, tal gênero é amplamente reportado como importante produtor de hidrogênio, capaz de utilizar outros tipos de substratos mais complexos como resíduos de alimento, amido, celulose (Yang e Wang, 2021). Tais características metabólicas estão alinhadas com as respostas observadas para o ensaio da condição otimizada de H₂ (OC-H), sendo observado P de 1249,1 mL.L⁻¹, além de 2230,8 mg.L⁻¹ de H₂Bu. A menor estabilidade do pH do processo em E-10 devido a menor razão gCaCO₃/gCHO em comparação a OC-H, dada a elevada concentração de RSL (35,1 gSTV.L⁻¹) com 3,8 g.L⁻¹ de CaCO₃, resultou em redução da abundância de *Clostridium sensu stricto 1* neste ensaio, o que é provável estar associada com a menor produção de H₂ (507,1 mL.L⁻¹) e dos ácidos acético e butírico (867,1 mg.L⁻¹ e 393,5 mg.L⁻¹, respectivamente). Luo et al. (2022) com base em uma análise de componentes principais (ACP), destacam que a produção de H₂, assim como de H₂Bu e HAc estiveram positivamente correlacionadas a *Clostridium sensu stricto 1* em reatores em batelada com resíduos de alimentos utilizando como inóculo lodo granular submetido a tratamento térmico.

Similarmente, Mazareli et al. (2020) observaram importante abundância de *Clostridium* sp. (~40%) em ensaio fermentativo em reatores em batelada utilizando resíduos de banana, com produção de H₂, além dos ácidos acético e butírico. Da mesma forma, Soares et al. (2018a) identificaram *Clostridium* sp. como o mais abundante (33%) em reator em batelada com bagaço de cana de açúcar. Rabelo et al. (2018) também identificaram *Clostridium* sp. em reator em batelada da condição experimental otimizada de produção de hidrogênio a partir de bagaço de cana de açúcar, associado aos ácidos acético e butírico como principais metabólitos solúveis do processo.

Lactobacillus identificado em elevada abundância no ensaio E-10, realiza a fermentação de carboidratos, sendo o ácido láctico o principal sub-produto, além do ácido acético, etanol, ácido fórmico e CO₂ (Salveti et al., 2012). Elevada produção de ácido láctico é frequentemente associada às bactérias ácido lácticas (LAB), pertencente ao gênero *Lactobacillus*, que são classificadas em homofermentativas e heterofermentativas (Cizeikiene et al., 2018). A significativa produção de ácido láctico (6367,8 mg.L⁻¹) no ensaio E-10 e

elevada proporção (81,9%) deste dentre os metabólitos solúveis, como por exemplo o HAC (867,1 mg.L⁻¹) permitem inferir que a abundância deste gênero esteve associada as LAB majoritariamente homofermentativas (Kandler, 1983). A redução significativa da produção de H₂ no ensaio E-10 associado a maior abundância de *Lactobacillus*, pode também estar relacionada às bacteriocinas secretadas por LAB, que tem efeitos deletérios para outras bactérias (Liu et al., 2009). Além disso, Liu et al. (2009) destacam que *Lactobacillus* sp. produzem grandes quantidades de CO₂, sendo esta uma condição adversa para estabilização da concentração de H₂ no biogás. Tal fato, pode estar associado ao baixo percentual de H₂ (33,2%) na composição do biogás no ensaio E-10, quando comparado ao ensaio OC-H (47,5%).

De forma similar aos resultados observados no presente estudo, outros autores têm constatado redução e falhas na produção de H₂ associado ao aumento da abundância de *Lactobacillus* nos reatores fermentativos. Por exemplo, Jo et al. (2007) ao avaliarem a produção de H₂ a partir de resíduos de alimentos em reator contínuo com agitação, observaram que o aumento da abundância de *Lactobacillus* spp. esteve associado com a redução da produção de H₂ e mudanças na composição dos metabólitos solúveis, com aumento da concentração de ácido láctico efluente. Park et al. (2015) em ensaios fermentativos em reatores contínuos de tanque agitado (CSTR) com galactose como substrato, observaram mudanças na comunidade microbiana do reator ao longo da operação com aumento da abundância relativa de *Lactobacillus* sp., o que afetou negativamente a produção de H₂, e resultou em acúmulo de ácido láctico.

Paraclostridium identificado no reator do ensaio E-10 e também em reatores de produção de hidrogênio (Yin e Wang, 2019), são capazes de utilizar ampla variedade de substratos orgânicos (Jyothsna et al., 2016), além de metabolismo hidrolítico (Rabelo et al., 2020).

Destaca-se também que em ambos os ensaios foi identificado *Enterobacter* com abundância relativa entre 3-5%. Bactérias semelhantes a este gênero caracterizam-se pelo rápido crescimento utilizando diferentes substratos, e robustez em relação à variação de pH (Santiago et al., 2019) em reatores fermentativos (Zhuang et al., 2011). O metabolismo de microrganismos semelhantes a *Enterobacter* também pode ser caracterizado pela produção de ácido láctico. Por exemplo, Thapa et al. (2017) verificaram em reatores em batelada com meio

sintético e diferentes carboidratos (glicose, manitol, sacarose, frutose) elevada produção de ácido láctico levogiro (ácido L-láctico) ($46,0 \text{ g.L}^{-1}$) a partir de *Enterobacter* sp.

Tanto, *Paraclostridium*, como *Enterobacter* possuem características metabólicas semelhantes às de outros gêneros identificados com elevada abundância nos ensaios E-10 e OC-H, tais como *Clostridium sensu stricto 1* e *Lactobacillus*, resultando em composição de metabólitos solúveis com restrita diversidade de ácidos orgânicos, e basicamente na forma de HAc e HBU em OC-H, e HLa em E-10. A avaliação de que não houve ampla diversidade metabólica é um aspecto interessante em relação ao ensaio da condição otimizada de produção de H_2 (OC-H), a julgar pelo objetivo de direcionar a utilização do substrato para vias de maior rendimento de H_2 , tal como foi observado.

A predição das vias metabólicas envolvidas na fermentação dos resíduos de citros foi realizada para os ensaios OC-H ($4,5 \text{ gCaCO}_3.\text{L}^{-1}$, $21,4 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $3,4 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL) e E-10 ($3,8 \text{ gCaCO}_3.\text{L}^{-1}$, $35,1 \text{ gSTV.L}^{-1}$ de RSL, $4,5 \text{ gDQO.L}^{-1}$ de ARL) (Figura 6.9). Procedeu-se ao desenho metabólico a partir dos principais gêneros (*Clostridium*, *Paraclostridium*, *Lactobacillus* e *Enterobacter*) e dos principais produtos metabólicos identificados (ácidos acético, butírico, láctico, propiônico, e hidrogênio).

Para o ensaio OC-H a produção de hidrogênio esteve associada a reações intermediárias das vias de formação dos ácidos acético e butírico, não sendo inferida a ocorrência de vias de produção de ácido láctico. A conversão do ácido pirúvico em acetil-CoA e posteriormente em outros metabólitos como HAc e HBU, foi identificada como uma reação fundamental no ensaio OC-H. Tal reação característica da fermentação clostridial (Hallenbeck, 2005), é catalisada pela enzima piruvato-ferredoxina oxidoredutase [1.2.7.1] (PFOR), na qual também é formada ferredoxina reduzida (Fd_{red}) que posteriormente é reoxidada, resultando na formação de hidrogênio pela ação de hidrogenases (Feng et al., 2022; Karube et al., 1976). De acordo com a inferência, a formação do ácido acético ocorreu predominantemente pela via clostridial, para a qual destaca-se o papel das enzimas fosfato acetiltransferase [2.3.1.8], e acetato quinase [2.7.2.1]. Em relação à formação do ácido butírico, as principais enzimas catalisadoras das reações para a via metabólica identificada na inferência foram a acetil-CoA acetiltransferase [2.3.1.9], butirato quinase [2.7.2.7], e hidroxibutiril-CoA desidrogenase [1.1.1.157], atribuídas principalmente ao metabolismo de microrganismos do gênero *Clostridium*.

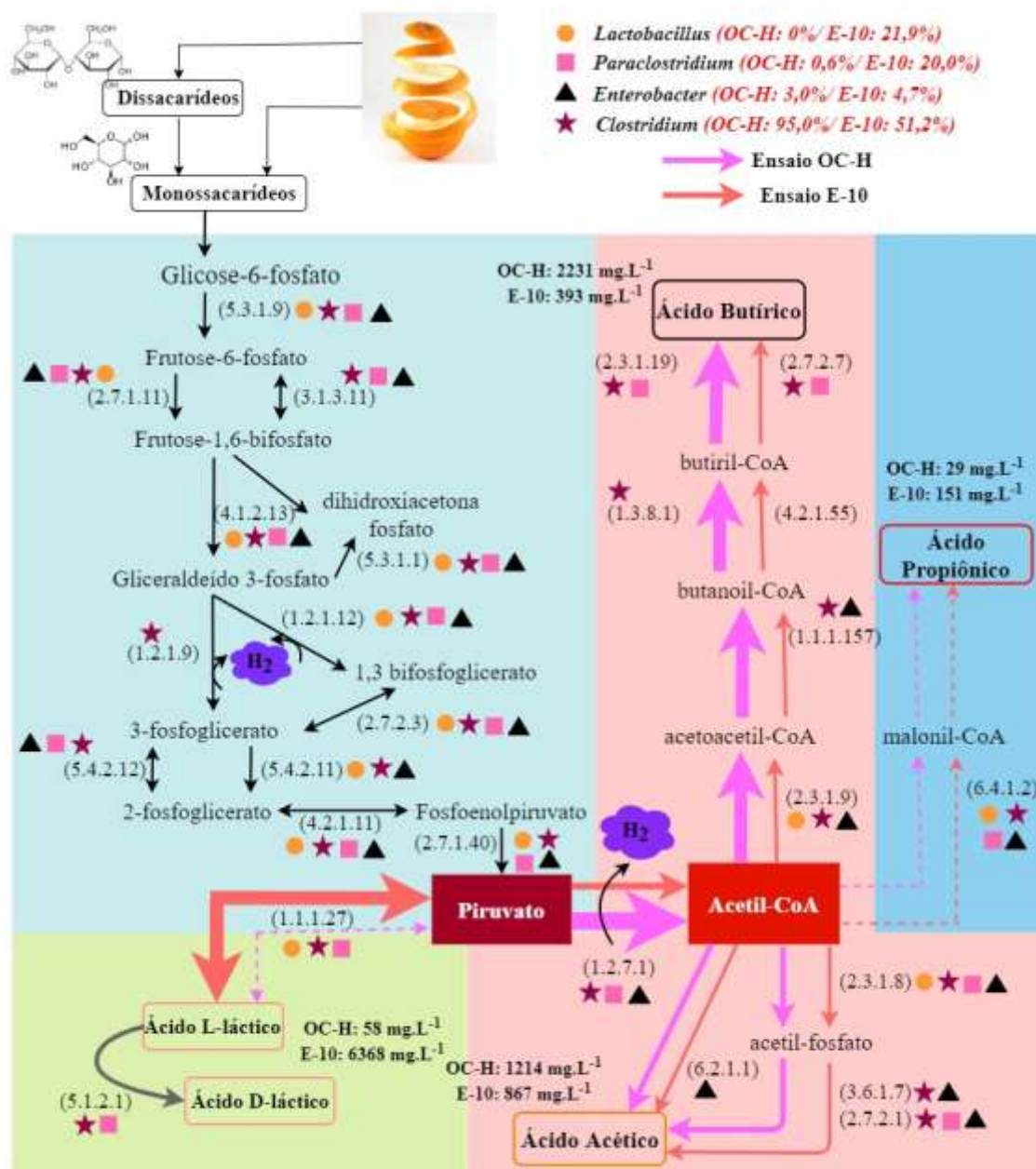


Figura 6.9. Mapa metabólico simplificado, com as prováveis enzimas (EC) na conversão de resíduos de citros em H₂ e ácidos orgânicos para a condição otimizada (OC-H) e ensaio E-10 de produção de H₂.

Já para o ensaio E-10, foi inferido o importante papel do metabolismo homofermentativo das bactérias ácido lácticas; com destaque para importância da enzima L-lactato desidrogenase [1.1.1.27] (Figura 6.9), que catalisa a reação de conversão do ácido pirúvico em HLa, sendo atribuída principalmente aos microrganismos do gênero *Lactobacillus* a capacidade de produção de tal enzima em processos fermentativos (Rhee e Pack, 1980); mas determinados microrganismos dos gêneros *Clostridium* e *Paraclostridium*

também são associados a produção de L-lactato desidrogenase (KEGG Pathway Database, 2022).

6.3.4 Análise de balanço energético

O balanço energético da condição otimizada de produção de hidrogênio (OC-H) foi calculado e tomado como um cenário de referência (CN-R) para avaliação do efeito da obtenção de uma otimização da produção volumétrica de H₂ e da alcalinização no balanço energético e econômico, comparando-o a cenários alternativos representados pelos ensaios E-7 (CN-A1) e E-13 (CN-A2), cujas condições resultaram em demandas máxima e mínima de alcalinizante por unidade de energia produzida, respectivamente.

Para o cenário de referência (CN-R) o PE_{H2} foi de 523,2 MJ.t⁻¹RSL, enquanto para os cenários alternativos foi de apenas 253,0 MJ.t⁻¹RSL para CN-A1, e 79,4 MJ.t⁻¹RSL (Tabela 6.9). Observa-se que pelos valores de PE_{H2} que a otimização da produção volumétrica de H₂ resultou em importante ganho na recuperação do conteúdo energético contido nos resíduos. Entretanto, destaca-se que apesar disso o potencial energético do H₂ ainda representa uma parcela muito pequena do conteúdo energético total dos resíduos, cerca de 3%, considerando o poder calorífico de 16,97 MJ.kg⁻¹RSL (Tamelová et al., 2018).

Tabela 6.9. Potencial Energético (PE_{H2}), Potencial de Produção de Eletricidade (PPE_{H2}), e demanda de alcalinizante para diferentes condições experimentais de produção de hidrogênio.

Cenário	Ensaio	MJ.t ⁻¹ RSL	MWh. t ⁻¹ RSL	tCaCO ₃ .MWh ⁻¹	US\$.MWh ⁻¹
CN-R	OC-H	523,2	0,087	2,00	941,45
CN-A1	E-7	253,0	0,042	7,74	3641,33
CN-A2	E-13	79,4	0,013	0,75	351,85

Em relação ao potencial de produção de eletricidade (PPE_{H2}) a partir da utilização do hidrogênio em célula combustível, obteve-se para CN-R 0,872 MWh.t⁻¹RSL, e 0,422 e 0,132 MWh.t⁻¹RSL para CN-A1 e CN-A2, respectivamente. Apesar de não representar uma elevada produção de eletricidade o PPE_{H2} pode atender uma parcela dessa em operações da própria indústria de processamento. Galvagno et al. (2019) realizaram uma análise de integração energética para uma fábrica de produção de sucos de citros localizada na Sicília - Itália. Nessa avaliação para processamento de 72.000 toneladas anuais de citros houve uma demanda próxima de 9.000 MWh, com geração de cerca de 8.600 toneladas de resíduos secos (umidade residual < 20%). Levando em conta esta demanda de eletricidade e geração de resíduos e o PPE_{H2} obtido no presente estudo, é possível inferir que a recuperação de energia a partir do H₂

para CN-R poderia suprir 8,3% da demanda de eletricidade de uma indústria com características semelhantes a que foi objeto do estudo de Galvagno et al. (2019), enquanto que CN-A1 possibilitaria suprir 4,0%, e CN-A2 apenas 1,3%.

Um comparativo importante entre os cenários avaliados está relacionado à demanda por alcalinizante em cada uma das condições, representando um importante obstáculo para viabilidade econômica da recuperação energética a partir do processo de fermentação de hidrogênio, visto que o custo médio por tonelada de carbonato de cálcio é de US\$ 470,35 (Intratec Primary Commodity Prices, 2018a). Para CN-R relativo à condição otimizada de produção de H₂ identifica-se uma demanda de 2,0 tCaCO₃.MWh⁻¹, que resulta em um custo associado de 941,45 US\$.MWh⁻¹, superior à demanda e custo associado observado em CN-A2 que é de 0,75 tCaCO₃.MWh⁻¹ resultando em custo de 351,85 US\$.MWh⁻¹. Entretanto, apesar do menor custo associado à alcalinização no CN-A2 o PPE_{H₂} desta condição é incipiente, quase 7 vezes inferior ao obtido no cenário de referência. Ao observar a demanda de alcalinizante (7,74 tCaCO₃.MWh⁻¹) e o custo associado (3641,33 US\$.MWh⁻¹) para o CN-A1 verifica-se como uma condição não otimizada pode resultar em um distanciamento ainda maior de um contexto de viabilização do processo. Sendo assim, aspectos econômicos relacionados a insumos do processo devem ser avaliados como variáveis dentro de estudos que tenham como objetivo avaliar o potencial de recuperação energética a partir da fermentação de H₂ visando o ganho em escala do processo.

6.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A condição ótima para produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de citros foi 21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL, 3,4 gDQO.L⁻¹ de água residuária, e 4,5 g.L⁻¹ de CaCO₃, conduzindo à obtenção de potencial de produção de 1249,0 mL.L⁻¹, com taxa máxima de produção de H₂ de 89,6 mL.L⁻¹.h⁻¹. Tal produção foi 5,3 vezes superior a menor produção obtida nos ensaios que foi de 199,21 mLH₂.L⁻¹.

Para o ensaio da condição otimizada de produção de H₂ a via metabólica Clostridial foi predominante com produção máxima de 2230,8 mg.L⁻¹ de ácido butírico e 1213,6 mg.L⁻¹ de ácido acético, com inexpressiva produção de outros metabólitos solúveis. Para os ensaios nos quais se obteve baixa produção de H₂ verificou-se predominância da fermentação de ácido láctico (6367,8 mg.L⁻¹) observada no ensaio E-10 com 35,1 gSTV.L⁻¹ de RSL, 4,5 gDQO.L⁻¹ de água residuária, e 3,8 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio.

Em relação ao perfil da comunidade microbiana do ensaio de otimização de produção de H₂ *Clostridium sensu stricto 1* foi favorecido tendo em vista sua elevada abundância (95,0%). Para o ensaio de maior produção de HLa observou-se redução da abundância de *Clostridium sensu stricto 1* (51,2%), com importância relevante de *Lactobacillus* (21,9%) e *Paraclostridium* (20,0%).

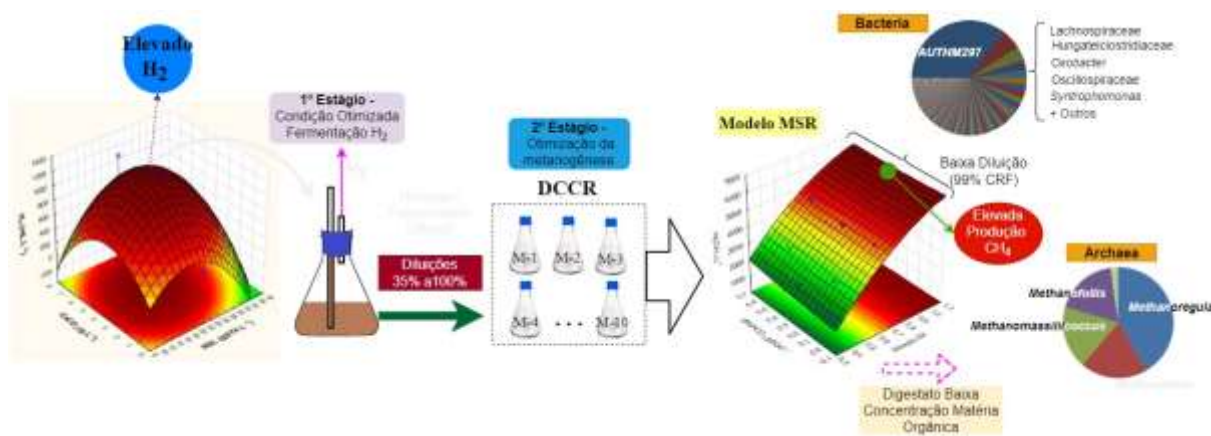
Potencial energético máximo de 523,2 MJ.t⁻¹RSL foi estimado com base na condição otimizada de produção de H₂, representando um potencial de produção de eletricidade de 0,872 MWh.t⁻¹RSL. Nesta condição a demanda de alcalinizante foi de 2,0 tCaCO₃.MWh⁻¹.

Os resultados obtidos da co-fermentação de resíduos de citros da condição otimizada de produção de hidrogênio são importantes para a investigação do processo em reatores contínuos e descontínuos, possibilitando o escalonamento do processo para alcançar a aplicação industrial.

CAPÍTULO 7

Otimização da produção de metano a partir da co-digestão de resíduos da agroindústria de citros em um sistema de dois estágios: Investigação dos efeitos da concentração de matéria orgânica e alcalinização

Resumo: A digestão anaeróbia em dois estágios é alternativa prática para superar limitações do processo, a partir de resíduos sólidos e água residuária de citros. No intuito de obter condições otimizadas para o estágio metanogênico foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (RSM), delimitando a diluição do conteúdo do reator fermentativo (CRF) do primeiro estágio como uma das variáveis analisadas (CRF 35,7% - 100%), e também a razão $\text{NaHCO}_3/\text{substrato}$ (até $0,60 \text{ gNaCHO}_3.\text{gDQO}^{-1}$). Valores na faixa de $2100,4$ a $6320,6 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}$ foram obtidos nos ensaios do delineamento experimental, não sendo identificada inibição pela alta concentração de substrato, nem pela presença de limoneno ($1,5$ a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Menor diluição do conteúdo do reator fermentativo (90% a 100% de CRF) resultou em maior produção acumulada de metano, enquanto a variação da razão alcalinizante/substrato não implicou em efeitos significativos sobre esta resposta. A condição otimizada para potencial máximo de produção foi obtida com 99,3% de CRF e $0,58 \text{ gNaCHO}_3.\text{gDQO}^{-1}$, atingindo produção de $6549,7 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}$, com remoção de matéria orgânica (DQO_7) de 87,1%, e redução de 58,6% no conteúdo de resíduos sólidos. Para tal condição observou-se predomínio do metabolismo acetogênico na conversão de HBu e HPr em HAc . Na análise da comunidade microbiana do ensaio da condição otimizada observou-se elevada abundância relativa de bactérias hidrolíticas e acidogênicas (*AUTHM297*, *Lachnospiraceae*, e *Hungateiclostridiaceae*), assim como de arqueias metanogênicas relacionadas a metanogênese acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica (*Methanoregula*, *Methanolinea*, *Methanomassiliicoccus*, *Candidatus Methanomethylicus*, e *Methanofolis*).



7.1.INTRODUÇÃO

A produção anual de laranjas é superior a 75 milhões de toneladas (FAO, 2019), sendo 70% destinados para indústrias de produção de suco (Zema et al., 2018). Com uma proporção de 50 a 60% do peso da fruta (casca e bagaço) correspondendo a resíduos no processamento (Calabrò e Panzera, 2018; Satari e Karimi, 2018), há de fato uma considerável produção de resíduos sólidos nas agroindústrias do setor. Estima-se ainda que nesta cadeia produtiva tem-se geração próxima a 1 m³ de água residuária por tonelada de frutas processadas (Rosas-Mendoza et al., 2018; 2020), sendo também outro importante e problemático fluxo residual do processamento de citros.

Rotas para valorização dos resíduos sólidos de laranja têm sido propostas buscando estabelecer uma logística de descarte sustentável e oferecer a possibilidade de agregar rentabilidade ao empreendimento (Berk, 2016). A produção de ração para gado têm sido uma alternativa comumente adotada (Calabró et al., 2018), mas a elevada quantidade de RSL produzida somada ao valor pouco atrativo do material recuperado, resultam em baixa perspectiva em relação a esta alternativa (Calabrò et al., 2016). Em relação à água residuária do processamento destaca-se que devido a suas características normalmente é necessário tratamento em estações com tecnologias intensivas, com longo tempo de detenção hidráulica (TDH) e alto consumo de energia para aeração, conduzindo a elevados custos operacionais (Guzmán et al., 2015; Karaouzas et al., 2010; Torquato et al., 2016). O elevado conteúdo orgânico, com alta concentração de vários carboidratos solúveis e insolúveis qualificam tais fluxos residuais como promissores substratos para a produção de biocombustíveis por meio do processo de digestão anaeróbia (DA) (Zema et al., 2018).

A condução do processo de digestão anaeróbia empregando resíduos de citros tem alguns desafios, principalmente relacionado à presença de óleos essenciais inibitórios ao bioprocessamento (Ruiz e Flotats, 2016). O D-limoneno, que constitui 70-90% dos óleos essenciais, afeta principalmente a etapa metanogênica do processo, devido a características das arqueias metanogênicas, como seu lento crescimento, e ausência de peptidoglicano em sua parede celular (Kurniawan et al., 2018). Calabrò et al. (2016) ao avaliarem o efeito que o aumento da concentração (0 a 2000 mg.L⁻¹) de óleos essenciais no processo de DA detectaram importantes modificações na cinética de produção de metano, como redução da produção específica e aumento do tempo para início da produção.

Pré-tratamentos aplicados aos resíduos de citros visando à redução do conteúdo de limoneno auxiliam a minimizar a inibição da atividade metanogênica (Wikandari et al., 2015), tais como aeração e centrifugação (Lane, 1983), biológico (Srilatha et al., 1995), destilação a vapor (Martín et al., 2010), explosão a vapor (Forgács et al., 2012), e extração líquida com solventes (Wikandari et al., 2015). Entretanto, a adição da etapa de pré-tratamento muitas vezes inviabiliza o ganho de escala do processo, devido aos custos inerentes com energia e compostos químicos. Uma estratégia utilizada para superar a inibição do processo de AD pelo limoneno é a co-digestão de RSL com outros resíduos como restos de alimentos (Anjum et al., 2017), fração orgânica de resíduos sólidos municipais (Forgács et al., 2012), glicerol (Martín et al., 2013), sendo esta uma alternativa que permite uma diluição da concentração de compostos inibitórios.

Entretanto, a utilização conjunta de outra fonte de substrato reduz a capacidade de utilização dos resíduos de citros, sendo indesejável de um ponto de vista industrial (Lukitawesa et al., 2018). Além disso, muitas vezes a co-digestão não é uma solução prática quando grandes quantidades de resíduos devem ser manejados entre diferentes locais (Calabrò et al., 2019). Neste contexto a co-digestão da água residuária e resíduos sólidos do processamento de laranjas é uma alternativa interessante, considerando que ambos são gerados na mesma cadeia produtiva, e que características da água residuária como seu alto teor de matéria orgânica solúvel (Guzmán et al., 2015; Rosas-Mendoza et al., 2020) são complementares na AD de resíduos lignocelulósicos. Sendo assim, a co-digestão dos resíduos sólidos e água residuária de citros é proposta suprir a necessidade por soluções com potencial e viabilidade de ganho em escala plena, tendo em vista fatores logísticos, econômicos e ambientais.

No intuito de buscar alternativas para otimizar o desempenho da digestão anaeróbia, obtendo maior recuperação energética global, a separação do processo em dois estágios é uma solução prática. Para cada etapa da AD identifica-se diferentes graus de susceptibilidade às limitações de ordem cinética, termodinâmica, de transferência de massa, e de condições ideais de crescimento para as diferentes populações de microrganismos (Algapani et al., 2019; Xiao et al., 2018). Um sistema de dois estágios com a separação das etapas acidogênica e metanogênica é recomendado para degradar diferentes substratos (Guo et al., 2010).

Especificamente, em relação aos resíduos de citros, Lukitawesa et al. (2018) destaca que processos físicos e biológicos de remoção de D-limoneno no reator do primeiro estágio

(acidogênico) podem proporcionar redução significativa da concentração deste composto no meio líquido ao final do estágio acidogênico, possibilitando consequente redução dos efeitos inibitórios no processo metanogênico de segundo estágio (Lukitawesa et al., 2018). A alta degradabilidade e concentração de carboidratos solúveis presentes nos resíduos de citros são fatores que dificultam a estabilidade do processo em único estágio, devido ao rápido acúmulo de AOVs, impondo a necessidade de operação com baixas cargas orgânicas. Como constatado por Wikandari et al. (2014) em um sistema de único estágio com resíduos de citros, o aumento da carga orgânica foi acompanhada por redução gradativa até a interrupção da produção de metano, associado ao acúmulo de AOVs. A separação em dois estágios permite conduzir o processo com maiores cargas orgânicas, e promover maior recuperação energética de metano partindo da possibilidade de otimização da acidogênese e acetogênese no primeiro estágio, resultando em alta quantidade de AOVs prontamente disponíveis para posterior etapa da metanogênese (Kurniawan et al., 2018).

O presente estudo visa investigar a cinética de produção de metano em uma abordagem de co-digestão anaeróbia de resíduos da agroindústria de processamento de citros empregando um sistema de dois estágios. A proposição busca por meio da separação de fases e da possibilidade de manipulação isolada de parâmetros de cada etapa do processo, transpor inconvenientes associados à utilização destas fontes de substrato na AD. Para tanto, deseja-se obter dois estágios com elevados desempenhos operacionais e assim tornar mais viável o processo de recuperação energética destes resíduos, e favorecer a economia circular. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (RSM) foram usados para obtenção de condições otimizadas para produção de metano, avaliando as variáveis de diluição do conteúdo do reator fermentativo de produção de hidrogênio (CRF 35,7% - 100%), e razão alcalinizante/substrato (até 0,60 gNaHCO₃.gDQO⁻¹). Também buscou-se realizar inferência das vias metabólicas acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas predominantes no processo com base na caracterização da comunidade microbiana dos ensaios. Estimativa do potencial de recuperação energética a partir do metano foi realizada para avaliação técnico-econômica da proposta de AD de resíduos de citros.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Ensaios em batelada

No fluxograma da Figura 7.1 é mostrada a configuração do sistema de dois estágios proposta para o processo de co-digestão de resíduos da agroindústria de citros, com a delimitação da proposta de avaliação do presente estudo (estágio II).

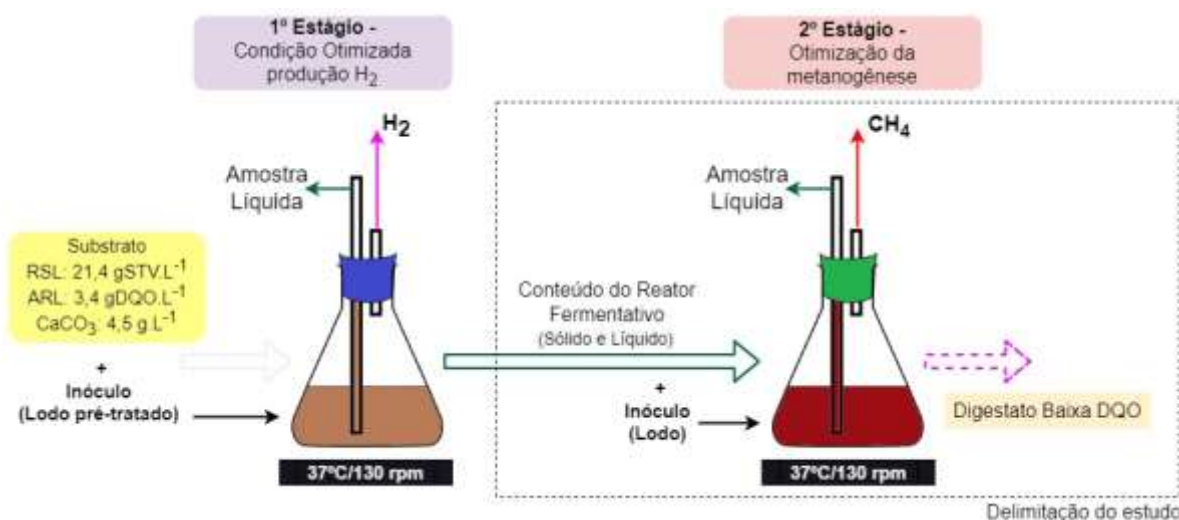


Figura 7.1. Fluxograma da co-digestão anaeróbia em dois estágios de resíduos da agroindústria de citros, para produção de hidrogênio e metano.

Os ensaios metanogênicos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de borossilicato de 250 mL, equipados com conjunto de válvulas acopladas a tampa de butila para coleta de amostras líquidas e de gás, e fechados com tampa plástica com rosca, e mantidos sob atmosfera de N₂ (100%), incubados com agitação de 130 rpm em temperatura mesofílica de 37 °C (*shaker Informs HT – Multitron Pro*). O volume reacional dos reatores em batelada foi de 100 mL com adição de inóculo (10% v/v). Água destilada foi utilizada para diluição do substrato (CRF) conforme condições experimentais, e o pH do meio foi ajustado em 7,0 com NaOH (50%) e HCl (1 M) para todos os ensaios, previamente à adição do alcalinizante.

7.2.2 Substrato para reator metanogênico (estágio II)

O substrato nos experimentos metanogênicos consistiu em todo o conteúdo (fração líquida e sólidos) do reator em batelada fermentativo operado em condição otimizada para produção de hidrogênio, em um estágio anterior, tal como descrito no Capítulo 6.

As condições experimentais do estágio I, assim como a caracterização do conteúdo do reator de fermentação de hidrogênio (CRF) utilizado como substrato para metanogêse (estágio II), podem ser verificadas na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Caracterização das condições experimentais, e do conteúdo reacional do reator em batelada ao final do primeiro estágio fermentativo.

Condição experimental e parâmetros de resposta do estágio I		
RSL	21,4 gSTV.L ⁻¹	
ARL	4,5 gDQO.L ⁻¹	
Carbonato de Cálcio	3,4 g.L ⁻¹	
Produção H ₂ (P)	1249,04 ± 40,1 mL.L ⁻¹	
Rendimento H ₂	2,07 molH ₂ .mol hexose	
%H ₂ no biogás	47,5%	
Remoção de carboidratos	87,0%	
Caracterização do conteúdo do reator fermentativo (CRF)		
	mg.L ⁻¹	mgDQO.L ⁻¹
ST	31310,0	-
STV	25805,0	-
DQO _s	-	15616,67
Carboidratos	1130,67	1209,81
Fenóis	708,75	963,90
Etanol (EtOH)	305,73	638,98
Metanol (MtOH)	672,42	1008,63
Ácido Láctico (HLA)	58,00	62,06
Ácido Acético (HAc)	1213,56	1298,51
Ácido Propiônico (HPr)	29,00	43,79
Ácido Butírico (HBu)	2230,84	4060,13
Ácido Valérico (HVa)	137,80	281,11

DQO_s: Demanda Química de Oxigênio da fração solúvel.

7.2.3 Inóculo

O lodo utilizado como inóculo nos ensaios metanogênicos em batelada é proveniente de reator UASB mesofílico empregado no tratamento de dejetos de um abatedouro de aves (Avícola Dacar - Tietê, São Paulo, Brasil). O lodo possui um pH de 7,15, e um teor de sólidos de 6,87% m/m ST (68,7 gST/kg Lodo) e 5,94% m/m STV (59,4 gSTV/kg lodo). Previamente a sua utilização nos ensaios o lodo foi triturado utilizando liquidificador doméstico no intuito de fragmentar os grânulos.

7.2.4 Planejamento Experimental

Os efeitos da diluição da concentração de matéria orgânica do conteúdo do reator de fermentação de hidrogênio (CRF 35,7% - 100%), e da razão de NaHCO_3 para substrato (até $0,60 \text{ gNaCHO}_3.\text{gDQO}^{-1}$), nas respostas cinéticas de produção de metano e de remoção de matéria orgânica (rDQO), foram avaliados por meio de um desenho experimental de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Posteriormente por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) obter condições experimentais otimizadas para as respostas de interesse.

Foram realizados 10 ensaios, 4 ensaios dos pontos fatoriais (2^k), 4 ensaios dos pontos axiais ($2 \times k$), e 2 ensaios de repetição do ponto central, conforme metodologia para um planejamento fatorial com 2 fatores ($k=2$), cujo $\pm\alpha = 1,41$. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, totalizando 30 reatores. Os valores para os níveis fatoriais, axiais e do ponto central do planejamento podem ser verificados na Tabela 7.2 e na Tabela 7.3 está apresentada a matriz do planejamento experimental do DCCR de 2 fatores, que delimita as condições experimentais de cada ensaio.

Um ensaio controle (*blank*) foi realizado para avaliar o volume de metano produzido a partir do lodo usado como inóculo. Foi utilizado um reator com adição apenas do lodo na mesma proporção utilizada nos demais ensaios, sendo o volume reacional completado com água destilada.

Tabela 7.2. Variáveis independentes avaliadas nos níveis fatoriais (+1 e -1), axiais (+1,41 e -1,41) e para o ponto central no delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	1	+1,41
Conteúdo do reator de fermentação (CRF) (%)	X_1	35,7	45,0	67,5	90,0	100,0
Razão NaHCO_3 para substrato ($\text{gNaHCO}_3.\text{g DQO}^{-1}$)	X_2	0,0	0,1	0,3	0,5	0,6

Tabela 7.3. Matriz do planejamento experimental do DCCR com os níveis codificados e seus respectivos valores para cada variável.

Ensaio	X_1	X_2	Conteúdo do reator de fermentação (CRF) (%)	Razão NaHCO_3 para substrato ($\text{gNaHCO}_3 \cdot \text{g}^{-1}\text{DQO}$)
M-1	-1,0	-1,0	45,0	0,1
M-2	-1,0	1,0	45,0	0,5
M-3	1,0	-1,0	90,0	0,1
M-4	1,0	1,0	90,0	0,5
M-5	-1,4	0,0	35,7	0,3
M-6	1,4	0,0	100,0	0,3
M-7	0,0	-1,4	67,5	0,0
M-8	0,0	1,4	67,5	0,6
M-9	0,0	0,0	67,5	0,3
M-10	0,0	0,0	67,5	0,3

Com base nas variáveis independentes (X_1, X_2), a equação polinomial quadrática (Eq. 1) foi utilizada para descrever o modelo estatístico das respostas de interesse do estudo. Um nível de confiança de 10% foi definido para avaliar os efeitos individuais e interação dos efeitos das variáveis nas respostas experimentais.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + X_1 X_2 \quad (1)$$

Sendo, Y a resposta experimental, β_0, β_1 e β_2 são os coeficientes lineares, β_{11} e β_{22} os coeficientes quadráticos, e X_1, X_2 as variáveis independentes.

7.2.5 Validação do modelo estatístico

Para verificar a precisão dos modelos obtidos, ensaios de validação foram realizados em condições de otimização de respostas de interesse, para estabelecer uma comparação entre valores preditos e experimentais. Três diferentes condições de otimização foram obtidas com base nos modelos, todas envolvendo a principal resposta do estudo, que é a produção acumulada de metano, portanto foram conduzidos três ensaios de validação, um para cada condição de otimização.

O ensaio V-1, refere-se à otimização do potencial máximo de produção de CH_4 . Os outros dois ensaios são condições de otimização simultânea de duas respostas, V-2 que combina o potencial de produção com a taxa máxima de produção de metano ($P + R_m$), condição otimizada na qual um máximo potencial de produção é obtido com máxima velocidade de produção; e V-3 que combina o potencial de produção com a remoção de

matéria orgânica ($P + rDQO$), que traduz uma condição otimizada de eficiência de conversão do substrato a metano, obtendo máxima produção com mínimo residual de matéria orgânica no efluente do processo.

A otimização simultânea das respostas foi embasada na ideia de que as várias respostas Y_1, Y_2, \dots, Y_i para as quais foram construídos modelos, decorre do mesmo conjunto de variáveis codificadas X_1, X_2 , seguindo metodologia de Derringer e Suich (1980). Sendo a desejabilidade global (D) para cada condição de otimização simultânea (Eq. 2) dada pela média geométrica das n desejabilidades individuais (d) das respostas envolvidas, de forma que D varia de $[0,1]$, com zero significando um valor inaceitável, e 1 o valor mais desejável.

$$D = (d_1 * d_2 * \dots * d_n)^{1/n} \quad (2)$$

7.2.6 Análises físico-químicas e cromatográficas

Análises de amostras líquidas dos reatores batelada foram realizadas para demanda química de oxigênio – DQO (APHA/AWWA/WEF, 2012), fenóis totais (Buchanan e Nicell, 1997), carboidratos solúveis totais (Dubois et al., 1956), sólidos totais voláteis (STV) (APHA/AWWA/WEF, 2012), e alcalinidade (Ripley et al., 1986). Ácidos orgânicos voláteis e solventes foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização e chama (GC-FID) de acordo com Adorno et al. (2014).

A concentração de D-limoneno nas amostras dos reatores foi quantificada por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS Shimadzu, Column SH-Rtx-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm), utilizando a metodologia de adição de padrão. A amostra teve sua temperatura elevada a 240°C no forno, em uma taxa de 30°C, com tempo de retenção de 5 min. Utilizou-se uma temperatura de injeção de 200°C, Split 10:1, empregando Hélio como gás de arraste, para uma injeção de 250 µL de amostra do headspace (Rodrigues et al., 2021). Para a espectrometria de massa o método de varredura completa para a faixa de massa de 50 a 200 foi empregado.

Análise da composição do biogás foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, com detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar CarboxenTM 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco), utilizando como gás de arraste argônio (12 mL.min⁻¹), com temperatura do injetor de 220°C, 230°C no detector, e 130°C para coluna. O

monitoramento da pressão (mbar) do headspace foi realizado antes e após a coleta de amostras para quantificação do volume de biogás produzido.

7.2.7 Análise dos dados

A produção acumulada de metano (M_i) do ensaio no ponto amostral (i) foi monitorada com intervalos de 6 – 24 horas ao longo do ensaio, sendo obtida com base na Eq. (3) a partir dos dados de volume de metano ($V_{M,i}$) produzido entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i), sendo este volume de metano ($V_{M,i}$) obtido com base nos princípios da equação de Clapeyron, de acordo com Eq. (4).

$$M_i = \sum_{i=1}^n V_{M,i} \quad (3)$$

$$V_{M,i} = \frac{\Delta P_i \cdot V \cdot C_{M,i}}{P_i} \quad (4)$$

Onde, V e P_i são respectivamente o volume e a pressão do headspace do reator; $C_{M,i}$ é o percentual de metano na composição do biogás no ponto amostral (i); e ΔP_i a variação da pressão do headspace entre os pontos amostrais anterior (i-1) e atual (i).

O percentual de metano no biogás (%CH₄) para cada condição experimental foi dado pela média aritmética dos valores percentuais de CH₄ no biogás dos pontos amostrais do período com estabilidade da composição do biogás, identificada por um coeficiente de variação (CV) <5%.

Seguindo metodologia de padronização definida por Holliger et al. (Holliger et al., 2021) os ensaios metanogênicos foram encerrados quando a produção diária de metano durante três dias consecutivos foi <1% do volume total acumulado.

A produção acumulada de metano de cada ensaio foi ajustada ao modelo cinético de Gompertz modificado (Eq. 5) por meio do software OriginPro 8.5[®], obtendo os parâmetros cinéticos do processo de produção de metano. Para algumas condições detectou-se um perfil caracterizado por duas fases de produção de metano, de forma que o ajuste ao modelo de Gompertz foi realizado separadamente para cada uma delas, obtendo dois conjuntos de parâmetros cinéticos para estes casos.

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

Sendo, H é produção acumulada de metano (mL.L^{-1}) no tempo (t), P o potencial máximo de produção de metano (mL.L^{-1}), Rm a taxa máxima de produção de metano ($\text{mL.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), $e = 2,718281828$, e λ é o tempo de início da produção de metano (h).

Os softwares Minitab[®] 19.1 e STATISTICA 10 foram utilizados para ajuste e análise estatística dos dados experimentais do planejamento fatorial e do modelo da superfície de respostas, empregando um nível de confiança de 10% ($p < 0,10$) (Rodrigues e Iemma 2014).

7.2.6 Avaliação de balanço energético e econômico

A recuperação energética obtida a partir do potencial de produção de metano (P_{CH_4} , mL.L^{-1}) no segundo estágio do processo foi avaliada com base no potencial energético específico – PE_{CH_4} ($\text{MJ.kg}^{-1}\text{RSL}$) obtido pela Eq. (6), tomando como referência a concentração de RSL fixada para condição otimizada no reator do primeiro estágio (RSL_C), o poder calorífico inferior do metano – LHV_{CH_4} de $35,8 \text{ MJ.m}^{-3}$ (Ellacuriaga et al., 2022), e o coeficiente de diluição (fd) do CRF (conteúdo do reator fermentativo) específico para cada condição do segundo estágio obtido pela Eq. (7).

$$PE_{CH_4} = \frac{P_{CH_4} \cdot PCI_{CH_4} \cdot fd \cdot 10^{-6}}{RSL_C} \quad (6)$$

$$fd = \frac{1}{\%CRF} \quad (7)$$

Supondo uma instalação com um sistema de cogeração de eletricidade e calor (CHP) foram inferidos os potenciais de geração de eletricidade PGE_{CH_4} (Eq. 8) e de geração de calor PGC_{CH_4} (Eq. 9), a partir da produção de metano obtida. Para tanto foi considerada a utilização de um motor a gás GE Jenbacher 620, cujas eficiências elétrica (η_E) e térmica (η_T) são de 43,0% e 42,1%, respectivamente (GE Power and Water, 2013).

$$PGE_{CH_4} = \frac{PE_{CH_4} \cdot \eta_E}{3600} \quad (8)$$

$$PGC_{CH_4} = \frac{PE_{CH_4} \cdot \eta_T}{3600} \quad (9)$$

Para uma avaliação econômica simplificada do segundo estágio do processo foi considerado o custo médio do bicarbonato de sódio utilizado para alcalinização do processo,

US\$489,63 por tonelada, o custo médio de energia elétrica para classe de consumo industrial no Brasil US\$ 92,51 por MWh (EPE, 2021), e para o calor um custo estimado com base na combustão do gás natural em caldeiras de recuperação de calor com uma eficiência de 80,4% (15% excesso de ar, e temperatura de aproximadamente 205°C para os gases de combustão) (U.S. Department of Energy, 2012). O custo médio do gás natural para o segmento industrial no Brasil para o ano de 2022 foi de 22,4 US\$.MMBtu⁻¹ (MME - Ministério de Minas e Energia, 2022).

7.2.7 Análise da comunidade microbiana

Amostras coletadas ao final dos três ensaios de validação das condições otimizadas foram selecionadas para realização das extrações e sequenciamentos de DNA genômico. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm - 6 minutos), e solução PBSX1 (NaCl 8,2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,05 g.L⁻¹, NaH₂PO₄ + H₂O 0,35 g.L⁻¹) foi empregada para lavagem do pellet de biomassa. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals). A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 0,8% e a quantificação (ng/μL) e a pureza (relação 260/280nm) foi realizado no Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa ByMyCell Genomics Made Simple (Ribeirão Preto-SP, Brazil). As amostras de DNA foram submetidas à preparação da biblioteca de “amplicons”, seguido da amplificação do gene 16S rRNA. Os fragmentos resultantes foram submetidos ao sequenciamento em plataforma Illumina NovaSeq6000 PE 250. Na classificação da microbiota utilizou-se o Qiime2 (v2022.2.0). No processo da análise de qualidade foram removidos os “reads” de comprimento insatisfatório e chimeras. Os “reads” curados foram utilizados na definição dos ASV (*Amplicon Sequence Variant*). As “reads” foram mapeadas contra o banco de dados de 16S rRNA (região V3 e V4) de referência (Silva 138 Full Length). A predição do metabolismo foi feita usando PICRUSt2 (v2.4.2) e a geração e exploração dos dados biológicos foram feitas em Python (v3.7). As sequências foram submetidas ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob número de acesso PRJNA909575, sendo identificadas como MP (V-1), MPR (V-2) e MPD (V-3).

7.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.3.1 Ensaios em Reatores Metanogênicos

Os ensaios com as diferentes condições experimentais foram executados conforme desenho experimental estabelecido, e a produção acumulada de metano foi ajustada ao modelo de *Gompertz Modificado* (Tabela 7.4). Os valores de potencial máximo de produção de CH₄ (*P*) obtidos foram entre 2100,4 mLCH₄.L⁻¹ (M-5) e 6320,6 mLCH₄.L⁻¹ (M-6); a velocidade máxima de produção de CH₄ entre 16,44 mLCH₄.L⁻¹.h⁻¹ (M-8) e 30,56 mLCH₄.L⁻¹.h⁻¹ (M-10); e o tempo de início de produção de H₂ (λ) entre ~0 h e 10,9 h (M-4).

Tabela 7.4. Parâmetros cinéticos e percentual de metano no biogás, para os ensaios do planejamento experimental do reator metanogênico.

Ensaio	<i>P</i> mL.L ⁻¹	<i>Rm</i> mL.L ⁻¹ .h ⁻¹	λ h	%CH ₄ Biogás
M-1	2872,36	17,07	0,00	65,5%
M-2	3057,58	23,26	0,00	65,0%
M-3	1055,37 ^a 5367,51 ^b	10,61 ^a 17,44 ^b	3,22 ^a 173,3 ^b	64,7%
M-4	486,82 ^a 5390,11 ^b	6,31 ^a 24,97 ^b	10,90 ^a 204,10 ^b	68,9%
M-5	2100,43	19,43	0,00	64,5%
M-6	690,35 ^a 6320,56 ^b	8,36 ^a 21,62 ^b	5,81 ^a 221,17 ^b	66,3%
M-7	671,57 ^a 4547,56 ^b	6,96 ^a 12,13 ^b	0,00 ^a 208,92 ^b	66,5%
M-8	4816,28	16,44	8,34	69,1%
M-9	4547,97	29,39	5,16	65,6%
M-10	4469,90	30,56	4,12	65,5%

Para condições nas quais se verificou a distinção clara de dois platôs de produção de metano identificou-se por ^a: parâmetros cinéticos ao final do primeiro platô, e ^b: parâmetros cinéticos ao final do segundo platô.

As diferentes condições experimentais resultaram em elevado impacto na cinética de produção de metano (Figura 7.2), considerando a importante variação nos parâmetros *P*, *Rm* e λ , e a observação de duas fases de produção para alguns dos ensaios. A partir da avaliação minuciosa de cada condição experimental, cruzando os dados cinéticos com informações dos parâmetros físico-químicos da avaliação operacional foi possível diagnosticar e direcionar o ajuste das condições para atingir melhores respostas.

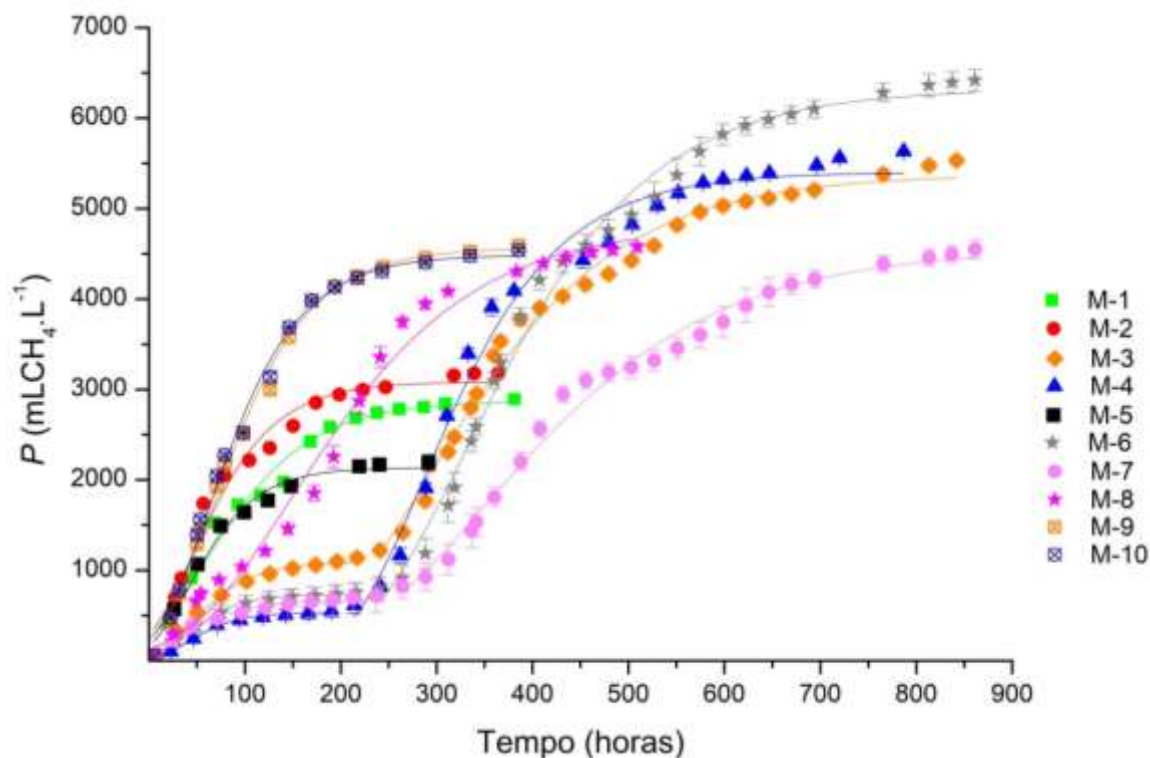


Figura 7.2. Produção acumulada de CH_4 com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios do planejamento experimental dos reatores metanogênicos.

Em relação ao potencial máximo de produção de metano verificou-se por meio da análise de variância (ANOVA) que apenas o termo linear X_1 (%CRF, $p = 0,000$) do modelo foi estatisticamente significativo ($p < 0,10$) (Tabela 7.5). O termo linear X_2 , os termos quadráticos X_1^2 (%CRF, $p = 0,175$), X_2^2 (razão NaHCO_3 /substrato, $p = 0,899$), e o termo de interação X_1X_2 ($p = 0,788$), do modelo não foram significativos, indicando que apenas uma das variáveis resultou em efeito individual na produção de metano, obtendo-se um modelo bem simplificado em relação a esta resposta.

Entretanto, por meio da análise de variância (ANOVA) para a resposta de velocidade máxima de produção de metano (R_m) verificou-se que o termo linear X_2 (razão NaHCO_3 para substrato, $p = 0,062$) e os termos quadráticos X_1^2 (%CRF, $p = 0,037$) e X_2^2 (razão NaHCO_3 /substrato, $p = 0,005$) do modelo foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$) (Tabela 7.6). A interação entre as variáveis (X_1X_2) permaneceu como não significativa para esta resposta ($p = 0,818$). Por meio dos resultados da análise estatística verificou-se que para R_m a variável de razão NaHCO_3 /substrato torna-se muito importante no processo, resultando em um modelo mais complexo que o obtido para P .

Tabela 7.5. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO_3 /substrato do potencial máximo de produção (P), para intervalo de confiança de 90%.

Fonte	SQ	GL	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	14904760	5	2980952	37,28	0,002
X₁ (L)	14568784	1	14568784	182,20	0,000
X₂ (L)	43196	1	43196	0,54	0,503
X₁ (Q)	216853	1	216853	2,71	0,175
X₂ (Q)	1467	1	1467	0,02	0,899
X₁. X₂	6611	1	6611	0,08	0,788
Erro	319843	4	79961		
Total SQ	15224602	9			

Tabela 7.6. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO_3 para substrato na taxa máxima de produção de metano Rm, para um intervalo de confiança de 90%.

Fonte	SQ	GL	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	282,96	5	55,59	7,65	0,036
X₁ (L)	3,35	1	3,35	0,45	0,538
X₂ (L)	49,08	1	49,08	6,63	0,062
X₁ (Q)	69,71	1	69,71	9,42	0,037
X₂ (Q)	225,60	1	225,60	30,49	0,005
X₁. X₂	0,45	1	0,45	0,06	0,818
Erro	29,60	4	7,39		
Total SQ	312,56	9			

Com base na análise de regressão dos dados foram ajustadas funções polinomiais dadas pelas variáveis codificadas, resultando em modelos descritivos para o potencial máximo de produção e a taxa máxima de produção de metano. Considerando os termos identificados como significativos ($p < 0,10$) obteve-se para P um modelo linear, representado pela Eq. (10), já para Rm os termos significativos resultaram em um modelo quadrático, que pode ser representado pela Eq. (11), sendo o termo linear de X_1 mantido para preservar um modelo hierárquico.

$$P(mL.L^{-1}) = 301,0 + 59,98 x_1 \quad (10)$$

$$Rm (mL.L^{-1}.h^{-1}) = -26,6 + 1,07 x_1 + 117,8 x_2 - 0,008 x_1^2 - 175,6 x_2^2 \quad (11)$$

A significância dos modelos foi avaliada com base no teste ANOVA, os modelos obtidos para P e Rm são estatisticamente significativos baseado nos valores F. Para o modelo estatístico do potencial de produção de metano (P) o F calculado pela regressão (37,28) é muitas vezes superior ao valor de F tabulado (4,05), e para o modelo da taxa máxima de produção (Rm) o F calculado pela regressão (7,65) também é superior ao F tabulado (4,05), para ambos considerando um intervalo de confiança de 10%, e 4 graus de liberdade para os resíduos e 5 graus de liberdade para a regressão. Em ambos os casos rejeita-se a hipótese nula

H_0 , de forma que pelo menos umas das variáveis X_1, X_2 contribui significativamente com o modelo.

O modelo para P possui um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98, e o modelo para Rm um coeficiente R^2 de 0,91; ou seja, por meio dos modelos é possível explicar 98,0% e 91,0% da variabilidade, respectivamente. A partir disto, é possível inferir correlações positivas entre os valores preditos e aqueles observados para tais respostas. Modelos com bons ajustes são aqueles nos quais o coeficiente R^2 tem valor na faixa de 0,75 – 1,00 (Kainthola et al., 2019; Niladevi et al., 2009; Reungsang et al., 2012), portanto de acordo com o que foi obtido para os modelos apresentados para P e Rm, o ajuste foi adequado.

A interação entre as variáveis independentes em relação as respostas P e Rm pode ser observada com clareza nas superfícies de respostas 3D (Figura 7.3a e c) e nos gráficos de contorno (Figura 7.3b e d), permitindo identificar condições com valores ótimos para tais respostas.

A maior produção acumulada de CH_4 foi verificada para o ensaio M-6, cuja produção média foi de 6320,6 mL CH_4 .L⁻¹, conduzido com 100% de conteúdo do reator fermentativo - CRF (sem diluição) e uma razão 0,3 gNaHCO₃.g⁻¹DQO. Enquanto a menor produção acumulada (2100,4 mL CH_4 .L⁻¹) foi observada no ensaio M-5, cujas condições foram 35,7% de CRF (maior diluição avaliada) e razão 0,3 gNaHCO₃.g⁻¹DQO. De uma forma geral, o potencial de produção de metano dependeu exclusivamente da concentração de matéria orgânica inicial dos ensaios, sendo observada uma correlação entre maior diluição do conteúdo do reator fermentativo com a redução de P. (Figura 7.3a). O fato da maior produção de metano ter sido verificada para o ensaio sem diluição do conteúdo fermentado do primeiro estágio, e a menor produção no ensaio cuja maior diluição foi aplicada, permite inferir que não houve inibição do processo devido a maiores concentrações de matéria orgânica, alto teor de sólidos, nem pelo conteúdo de óleos essenciais contido nos resíduos de citros.

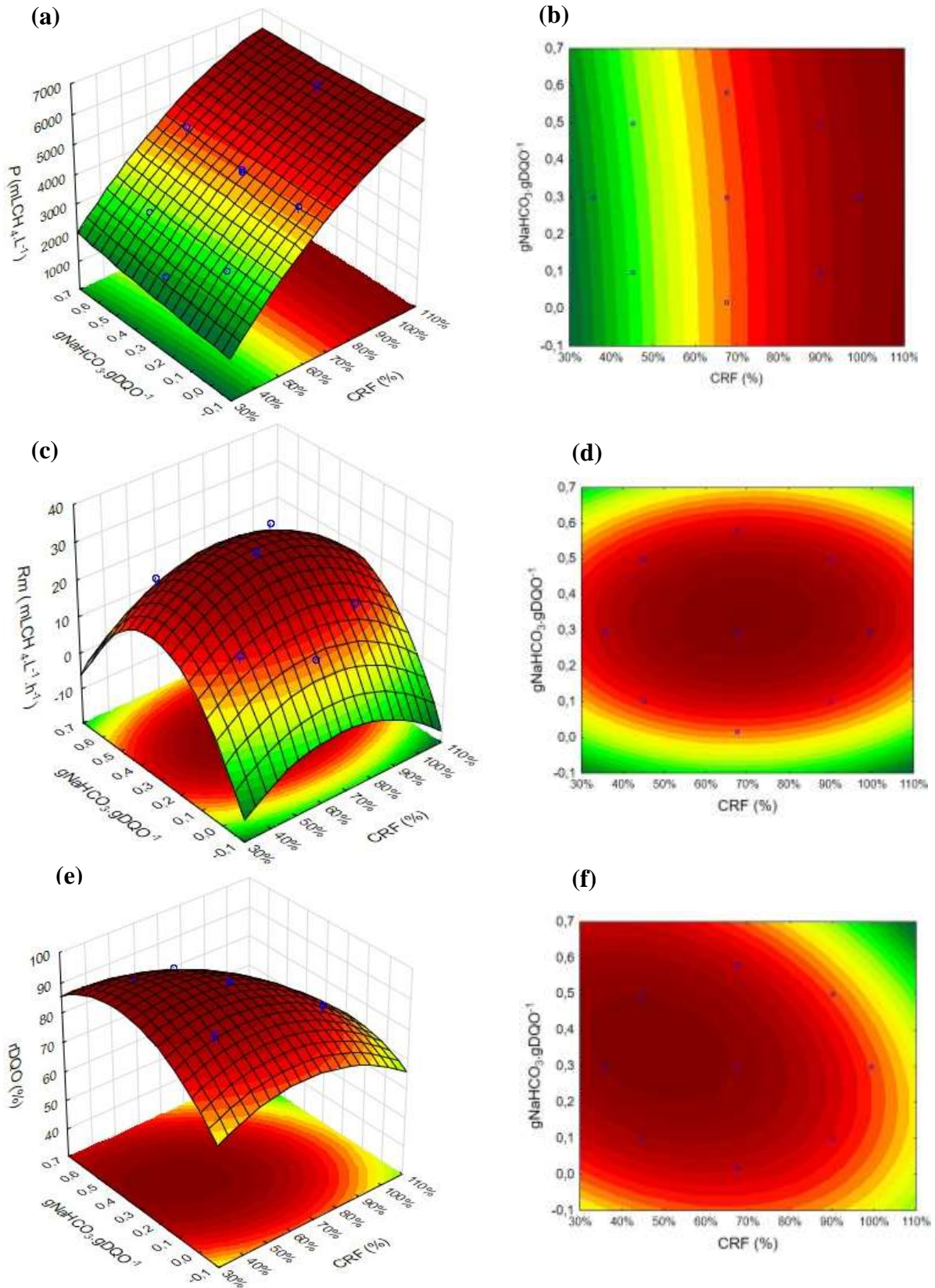


Figura 7.3. (a) Superfície de resposta e (b) superfície de contorno, para o modelo de produção de CH₄; (c) Superfície de resposta e (d) superfície de contorno, para o modelo de velocidade máxima de produção (R_m); (e) Superfície de resposta e (f) superfície de contorno para remoção de matéria orgânica (rDQO).

Kurniawan et al. (2018) avaliaram a produção de metano a partir dos resíduos de citros em um sistema de dois estágios, e também observaram aumento da produção acumulada de metano com incremento da concentração de matéria orgânica, sem acúmulo de AOVs. Entretanto, a faixa de concentração de matéria orgânica avaliada (0,6 e 3,6 gDQO.L⁻¹) foi bem inferior a avaliada no presente estudo. Empregando um processo de único estágio para digestão anaeróbia de resíduos de citros, Bouaita et al. (2022) identificaram instabilidade no processo metanogênico com o aumento da concentração de matéria orgânica para valores próximos a 3 gSTV.L⁻¹.dia⁻¹ (~2,73 gDQO.L⁻¹.dia⁻¹, com base nos dados do estudo). Tanto para sistemas de único estágio quanto de dois estágios ocorrem limitações na condução do processo com aumento da concentração de resíduos de citros. Todavia, em reatores em batelada de dois estágios no presente estudo não foi observada inibição para concentrações iniciais de substrato mais elevadas, próximas de 15,0 gDQO.L⁻¹.

Nos ensaios M-3, M-4, M-6 e M-7 foi observada produção de metano em duas fases distintas, diferentes em relação aos demais ensaios. Em geral, a produção da primeira fase se iniciou nas primeiras horas de ensaio, e representou parcela relativamente pequena da produção total do ensaio, sendo 19,7% (M-3), 9,0% (M-4), 10,9% (M-6), e 14,8% (M-7) (Figura 7.2). Depois de cessada a produção na primeira fase foi observado um platô na curva de produção que teve duração de alguns dias (~100h), a partir do qual teve início a segunda fase de produção por volta de 200 horas após o início destes ensaios. Lotito et al. (2018) e Fagbohunge et al. (2016) em estudos com resíduos de citros obtiveram um comportamento cinético da produção de metano semelhante ao observado no presente estudo. Os autores atribuíram tal fato ao rápido consumo da fração solúvel de matéria orgânica disponível no início do processo, de forma que o período de estagnação na produção ocorreu até que novamente fosse disponibilizado substrato assimilável pela via metanogênica a partir da degradação dos resíduos sólidos. Fagbohunge et al. (2016) destacaram também provável papel do limoneno neste comportamento cinético da produção de metano. No presente estudo, provavelmente, a disponibilidade inicial de ácidos orgânicos no conteúdo fermentado do primeiro estágio utilizado como substrato, possibilitou rápido início da produção nos ensaios metanogênicos.

É provável que o limoneno não tenha sido um fator importante na produção de metano do presente estudo, visto que concentrações iniciais muito baixas foram observadas, entre 1,5 a 5,0 mg.L⁻¹. Como discutido por Ruiz e Flotats (2014) para reatores batelada em temperatura

mesofílica, o limoneno pode inibir a digestão anaeróbia em concentrações acima de 10 mg.L⁻¹.

Vale destacar que foi verificada remoção de limoneno superior a 90% nos ensaios metanogênicos, sendo observados ao final concentrações residuais na faixa de 0,01 a 0,15 mg.L⁻¹. Calabro et al (2016) observaram que remoção significativa de limoneno em reatores em batelada associada à biodegradação, as quais ocorreram, a partir de 15 dias de incubação. No presente estudo o longo período de incubação dos ensaios, entre 15 a 35 dias, é provável que tenha favorecido a biodegradação do conteúdo residual de limoneno, resultando em baixas concentrações residuais ao final dos ensaios.

Para os ensaios M-3, M-4 e M-6 a elevada concentração de matéria orgânica inicial é provável ter sido determinante para longa duração destes ensaios, e estabelecimento de um platô de produção de metano em período intermediário do processo. Sob tais condições, foram mantidas menores diluições do conteúdo do reator fermentativo, ou seja de 100% CRF (M-6), e 90% CRF (M-3 e M-4).

Para tais ensaios, observou-se no início remoção da matéria orgânica solúvel (~8%) e diminuição do pH operacional (~6,5), em período coincidente ao primeiro platô de produção de metano. No período de estagnação da produção, verificou-se aumento da concentração de matéria orgânica solúvel (Figura 7.5), e diminuição acentuada do pH operacional (Figura 7.4), e somente com o início da segunda fase de produção de metano verificou-se gradual recuperação do pH operacional para valores > 6,5, e redução na concentração de matéria orgânica solúvel. Desta forma, a solubilização de matéria orgânica resultando na diminuição do pH operacional foi determinante para ocorrência de um platô intermediário da produção de metano.

Um perfil semelhante ao identificado nestes ensaios do presente estudo foi observado por Zhang et al. (2019) em ensaios metanogênicos com resíduos de alimentos em reatores batelada, com diminuição acentuada de pH e aumento da concentração de matéria orgânica solúvel no início dos ensaios, como resultado da hidrólise e produção de ácidos orgânicos, consumindo a alcalinidade do sistema. A partir disso, os autores constataram menor produção de metano nesse período. Após essas primeiras horas dos ensaios também detectaram recuperação do pH atribuindo ao aumento da atividade metanogênica. Assim como observado no ensaio M-7 do presente estudo e por Zhang et al. (2019), a diminuição do pH para valores

abaixo de 6,0 resultou em longo período de estagnação no processo sem produção de metano, identificando recuperação do processo após longo período (20-30 dias), coincidente com a recuperação do pH para valores $> 6,5$.

A solubilização e conversão do conteúdo orgânico dos sólidos causou aumento da concentração orgânica solúvel e diminuição do pH, tornando o ambiente desfavorável para as populações metanogênicas, havendo um período caracterizado pela estagnação da produção de metano. Sambusiti et al. (2013) mencionam para substratos complexos, tal como lignocelulósicos, que a hidrólise é uma etapa limitante, de forma que sua efetiva ocorrência possibilita obter maiores rendimentos de metano.

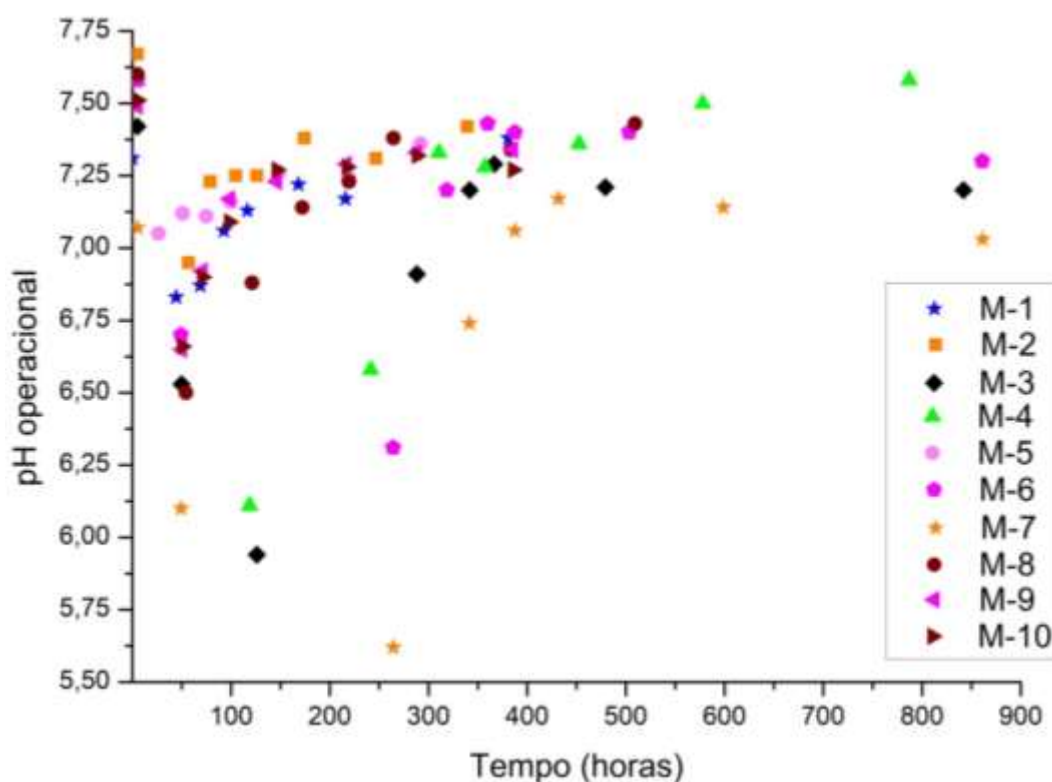


Figura 7.4. Variação temporal do pH operacional dos ensaios do planejamento experimental.

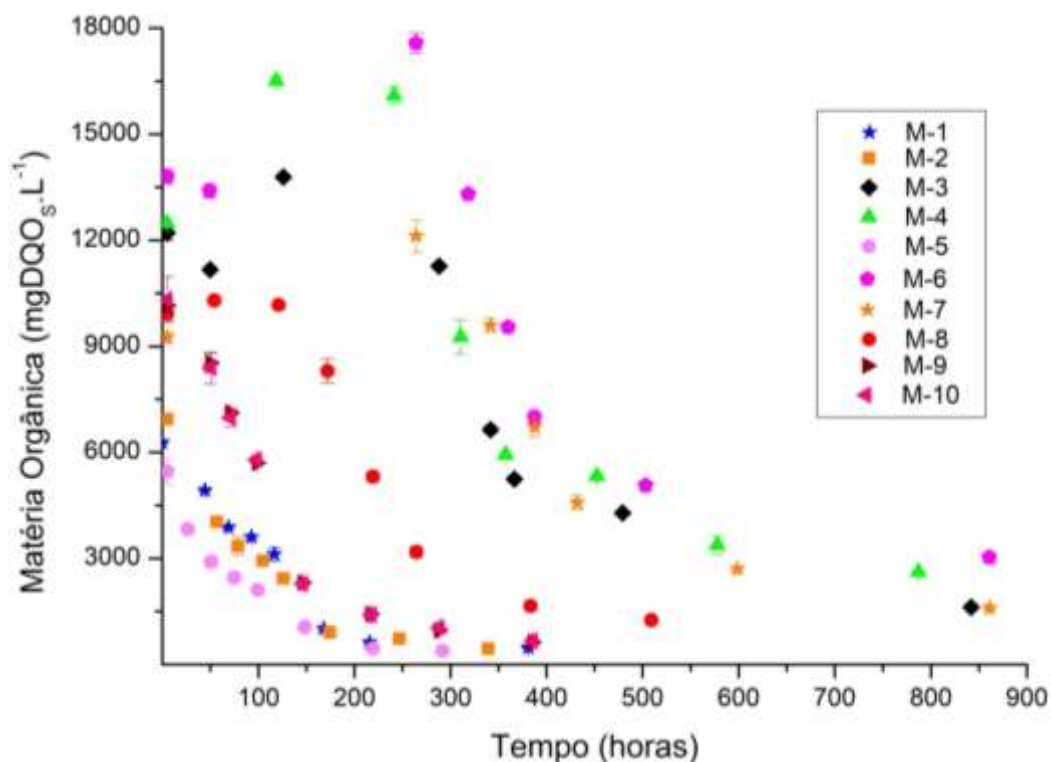


Figura 7.5. Variação temporal da concentração de matéria orgânica nos ensaios do planejamento experimental.

Os demais ensaios (M-1, M-2, M-5, M-8, M-9, M-10) foram caracterizados por única exponencial de produção de metano, com tempo bem reduzido para início da produção (<5h), com exceção de M-8, cujo tempo para início foi próximo de 35h. A menor concentração de matéria orgânica inicial destes ensaios decorrente da maior diluição do conteúdo do fermentativo do primeiro estágio (35,7% a 67,5% de CRF), e a adição NaHCO_3 , foram determinantes para que não fosse observada uma estagnação intermediária na produção de metano, mesmo com a solubilização e conversão do conteúdo orgânico dos sólidos, e também não sendo observada diminuição significativa do pH operacional do processo (Figura 7.4).

Vale destacar que o tempo de duração dos ensaios esteve associado principalmente à concentração de substrato. Os ensaios com maior diluição do conteúdo do reator fermentativo (35,7% a 67,5% de CRF) tiveram duração entre 288 e 500 horas, sendo significativamente inferior ao verificado para M-3, M-4, M-6 e M-7 (67,5% a 100,0% de CRF) cujo tempo de ensaio foi entre 786 a 861 horas (Figura 7.2). Braga et al. (2018), também avaliaram a obtenção de metano a partir de resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana de açúcar) em sistema de dois estágios, e empregaram baixa concentração de substrato (2 g.L^{-1} de bagaço de cana de açúcar), de forma que o tempo de duração do segundo estágio foi relativamente baixo, de aproximadamente 450 horas. Para concentração de substrato elevada ($\sim 19,0 \text{ gDQO.L}^{-1}$)

empregando resíduos de citros, Camargo et al. (2021b) obtiveram para o segundo estágio do processo tempo de ensaio de 700 horas. O padrão verificado no presente estudo, com ensaios de maior duração associados à maior concentração de substrato, e menor duração para baixas concentrações, está alinhado aos processos de dois estágios empregando resíduos sólidos como substrato.

O rendimento teórico médio de metano reportado por Ferraz et al. (2016) é de 350 mLCH₄.g⁻¹DQO_r. Para os ensaios do presente estudo, tal rendimento foi bem superior ao teórico, considerando a remoção de matéria orgânica solúvel, dada pela diferença entre concentração inicial e final. Para M-6, por exemplo, ensaio no qual se empregou o conteúdo do reator fermentativo sem diluição (100% de CRF), e que, portanto, teve maior concentração de sólidos orgânicos, o rendimento foi de 458,0 mLCH₄.g⁻¹DQO_r. Sob tais condições, provavelmente a solubilização da matéria orgânica pela degradação dos sólidos foi importante na produção de metano. O impacto da solubilização de resíduos sólidos orgânicos na produção de metano foi observado por Lin e Wang (2013), que identificaram aumento de até 21% no rendimento de metano para ensaios cuja solubilização do material particulado de resíduos de alimentos foi aumentada. Os autores destacaram que o efeito de uma maior solubilização ocorreu em períodos mais longos, após 25 dias de ensaio.

A redução da concentração de sólidos voláteis (rSTV) (Tabela 7.7) foi outro parâmetro importante para validar a importante contribuição dos resíduos sólidos de citros na disponibilização de conteúdo orgânico solúvel para o meio reacional dos reatores, por meio de mecanismos físicos e biológicos relacionados à atividade hidrolítica de microrganismos. A redução do tamanho das partículas dos resíduos de citros (<0.6 mm) foi fundamental para que seu conteúdo orgânico pudesse ser solubilizado. Agrawal et al. (2021) destacam a importância do tamanho das partículas no aumento da velocidade de hidrólise da biomassa, aumentando a área superficial de contato para atividade enzimática. A percepção de uma hidrólise efetiva do material lignocelulósico resultante da atividade hidrolítica dos microrganismos é de grande interesse no que se refere a recuperação energética a partir de resíduos sólidos, uma vez que promove eficiente disponibilização de açúcares solúveis a partir da celulose e hemicelulose (Tsegaye et al., 2019).

De forma geral houve remoção de STV de 48,8% ± 13,2%, sendo a maior rSTV (64,8%) verificada justamente no ensaio M-6, no qual foi obtida a maior produção de metano. A menor remoção (23,3%) foi verificada no ensaio M-5, com menor *P*. Para os ensaios M-3 e

M-4, também se observou elevada rSTV, de 62,2% e 63,3% respectivamente, estes juntamente com o ensaio M-6, foram aqueles com maior concentração inicial de STV, em razão da menor diluição a partir do conteúdo do reator fermentativo, o que implicou nos maiores tempos de duração dos ensaios.

O aumento da concentração de fenóis totais ao longo dos ensaios é outra evidência importante da ocorrência da hidrólise dos sólidos de citros ao longo do estágio metanogênico. De acordo com Camargo et al. (2021b), a despolimerização da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise pode gerar furanos e compostos fenólicos. A concentração de fenóis totais dos ensaios M-8, M-9 e M-10, por exemplo, foi de 1,5 g.L⁻¹, valor cerca de 4 a 5 vezes superior a concentração inicial, sendo posteriormente reduzida até o final dos ensaios. Em todos os demais ensaios também se identificou esse perfil, entretanto, com picos de concentração menos acentuados, na faixa de 0,8 a 1,0 g.L⁻¹. A remoção de fenóis foi entre 35,0% e 92,0% (Tabela 7.7), entretanto, se considerar a produção de compostos fenólicos ao longo do processo, as remoções absolutas foram consideravelmente maiores.

Apesar do aumento expressivo na concentração de fenóis totais ao longo dos ensaios M-8, M-9 e M-10, de até 1,5 g.L⁻¹, não foi identificado comportamento inibitório ao processo metanogênico associado a esta concentração, considerando a produção de metano obtida nestes ensaios, que foram similares à verificada no ensaio M-7, que foi conduzido com mesma concentração de substrato dos ensaios supracitados, mas cujas concentrações de fenóis detectadas ao longo do ensaio foram significativamente menores (máxima de 0,6 g.L⁻¹). Apesar de efeitos inibitórios relacionados a compostos fenólicos em processos metanogênicos serem comumente reportados (Monlau et al., 2014), outros autores que investigaram os efeitos destes compostos também não observaram efeitos negativos para concentrações na faixa verificada no presente estudo. Koyama et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes concentrações (de 0,5 a 5,0 g.L⁻¹) de compostos fenólicos resultantes da hidrólise da lignina na metanogênese em ensaios em reatores em batelada, e obtiveram que a produção de metano foi afetada somente para concentrações de compostos fenólicos > 2,5 g.L⁻¹, sendo observada uma redução de 15% na produção ao avaliarem a concentração máxima de 5,0 g.L⁻¹. Similar ao que foi observado no presente estudo, com redução significativa da concentração de fenóis totais durante os ensaios, em outros estudos também foi verificada importante degradação e consumo destes compostos fenólicos na digestão anaeróbia, Levén e Schnurer (2005), por exemplo, observaram a degradação de fenóis em reatores em batelada alimentados com

resíduos orgânicos domiciliares, principalmente em condições mesofílicas, sugerindo que os fenóis foram metabolizados através da via benzoil-CoA.

Tabela 7.7. Parâmetros físico-químicos e operacionais dos ensaios do planejamento experimental de produção de metano.

Ensaio	rDQO	rFenóis	Alcalinidade	AI/AP		pH		rSTV
			Inicial mgCaCO ₃ .L ⁻¹	Inicial	Final	Inicial	Final	
M-1	92,45%	53,07%	430,13	1,40	0,02	7,31	7,38	40,9%
M-2	93,52%	92,30%	425,48	0,40	0,02	7,67	7,42	34,6%
M-3	86,76%	63,77%	899,52	1,85	0,06	7,42	7,20	62,2%
M-4	79,01%	35,08%	818,40	0,48	0,05	7,58	7,58	61,0%
M-5	92,83%	77,20%	346,43	0,63	0,02	7,59	7,36	23,3%
M-6	78,07%	50,53%	1084,45	0,84	0,06	7,58	7,30	64,8%
M-7	82,78%	59,66%	597,02	3,85	0,03	7,07	7,03	47,1%
M-8	87,36%	60,45%	699,83	0,44	0,01	7,6	7,43	57,1%
M-9	93,76%	62,14%	660,30	0,77	0,03	7,49	7,34	47,4%
M-10	93,51%	65,78%	613,80	0,75	0,02	7,51	7,27	49,8%

rDQO: remoção DQO; rFenóis: remoção fenóis.

Outra resposta importante avaliada no processo metanogênico foi a remoção de matéria orgânica solúvel (rDQO_S), medida pela diferença entre DQO_S inicial e final. A rDQO_S foi de 88,0% ± 6,2%, sendo a maior delas verificada no ensaio M-2 de 93,5% e nos ensaios do ponto central (M-9 e M-10). A menor rDQO_S foi observada no ensaio M-6, de 78,1%, provavelmente em razão da maior concentração inicial de matéria orgânica, visto que tal ensaio foi conduzido sem diluição do conteúdo do reator fermentativo do primeiro estágio. Em outros estudos empregando resíduos de citros foram verificadas remoção de 50,0% a 66,0% (Camargo et al., 2021b; Carvalho et al., 2019; Su et al., 2016), sendo inferiores às do presente estudo. A maior rDQO_S do presente estudo é provável estar associada a fatores como estratégia de separação do processo em dois estágios estabelecendo melhores condições ambientais para o desenvolvimento da metanogênese; a baixa concentração de limoneno observada no estágio metanogênico; a alcalinização do processo; e o desenvolvimento de uma comunidade microbiana com ampla diversidade metabólica tornando o processo robusto em termos de metabolização de compostos a partir dos resíduos de citros.

Por meio da análise de variância (ANOVA) da remoção de matéria orgânica solúvel (rDQO_S) verificou-se que apenas o termo linear X₁ (%CRF, p = 0,008) e os termos

quadráticos X_1^2 (%CRF, $p = 0,071$) e X_2^2 (razão NaHCO_3 para substrato, $p = 0,062$) do modelo foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$) (Tabela 7.8). O termo linear X_2 ($p = 0,982$) e a interação entre as variáveis X_1X_2 ($p = 0,216$) não foram significativas para esta resposta ($p = 0,818$). A partir disso é possível concluir que para $rDQO_S$ a variável de %CRF exerceu efeito muito importante, com maior remoção sendo atingida em condições de maior diluição do conteúdo do reator fermentativo. Mas, a variação da razão NaHCO_3 /substrato, também resultou em efeitos sobre o processo, entretanto, com menor importância.

Tabela 7.8. ANOVA para efeitos do %CRF e razão NaHCO_3 /substrato na remoção de matéria orgânica solúvel ($rDQO_S$), para intervalo de confiança de 90%.

Fonte	SQ	GL	QM	Valor F	Valor-P
Modelo	0,031	5	0,006	6,87	0,043
X_1 (L)	0,021	1	0,021	23,39	0,008
X_2 (L)	0,000	1	0,000	0,00	0,982
X_1 (Q)	0,005	1	0,005	5,95	0,071
X_2 (Q)	0,006	1	0,006	6,63	0,062
$X_1 \cdot X_2$	0,002	1	0,002	2,16	0,216
Erro	0,004	4	0,001		
Total SQ	0,035	9			

A partir da análise de regressão dos dados foi ajustada uma função polinomial dada pelas variáveis codificadas, resultando em um modelo de remoção de matéria orgânica solúvel para o processo metanogênico. Considerando os termos identificados como significativos ($p < 0,10$) obteve-se para $rDQO$ um modelo quadrático, representado pela Eq. (12), sendo o termo linear de X_2 mantido para preservar um modelo hierárquico.

$$rDQO_S (\%) = 0,602 + 0,00832 x_1 + 0,872 x_2 - 0,000068 x_1^2 - 0,904 x_2^2 \quad (12)$$

O modelo obtido para $rDQO$ é estatisticamente significativo baseado no valor F obtido no teste ANOVA. O valor de F calculado pela regressão (6,87) é superior ao valor de F tabulado (4,05), considerando um intervalo de confiança de 10%, e 4 graus de liberdade para os resíduos e 5 graus de liberdade para a regressão. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,90. Por meio do modelo para $rDQO$ é possível explicar 90,0% da variabilidade da remoção de matéria orgânica solúvel medida entre início e final dos ensaios.

A superfície do modelo estatístico para $rDQO$ tende ao plano levemente inclinado em xz , com suave curvatura nas extremidades, indicando uma redução mais brusca na remoção para condições com maior concentração de CRF (Figura 7.3e, 7.3f).

Para os ensaios M-1, M-2, M-5, M-9 e M-10, a diminuição da concentração de matéria orgânica ocorreu rapidamente em exponencial negativa, de forma que pode ser interpretado que a velocidade de consumo da matéria orgânica foi maior que a de solubilização de matéria orgânica proveniente da degradação dos resíduos sólidos, não sendo observados picos de aumento, nem estagnação da concentração de MO ao longo do processo (Figura 7.5). Para o ensaio M-8 após curto período de aumento e estagnação da concentração de MO, a redução seguiu o perfil identificado nos ensaios citados acima. Nos ensaios M-3, M-4, M-6 e M-7, identificou-se significativos picos de aumento da concentração de MO solúvel no início dos ensaios, provavelmente, com velocidade de solubilização superior aquela de consumo no referido período.

A solubilização de carboidratos via hidrólise dos sólidos conduziu a produção de ácidos orgânicos, que inevitavelmente ocasionou diminuição do pH operacional (Figura 7.4). A elevada concentração de AOVs no conteúdo do reator fermentativo (CRF) utilizado como substrato no reator metanogênico resultou em altos valores para alcalinidade intermediária (AI) no início dos ensaios metanogênicos (Figura 7.6), principalmente para aqueles com menor diluição do CRF. Tal fato, resultou em razões AI/AP elevadas, fora da faixa considerada ideal de monitoramento de reatores metanogênicos (Ripley et al., 1986) para alguns casos, entretanto, a característica do processo em dois estágios justifica tal observação.

Nos ensaios M-3 ($0,1 \text{ gNaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}^{-1}$) e M-7 (sem NaHCO_3), para os quais baixa alcalinidade parcial (AP) inicial foi observada, houve diminuição importante de pH, em valores abaixo de 6,0 ao longo dos ensaios. Enquanto para M-4 ($0,5 \text{ gNaHCO}_3 \cdot \text{gDQO}^{-1}$), mesmo com alta concentração de substrato, não houve diminuição do pH para valores abaixo de 6,0, sendo provável estar associado a alta alcalinidade parcial inicial desta condição experimental.

Ao final dos ensaios em razão do consumo quase total dos AOVs observou-se a quase nulidade da alcalinidade intermediária (Figura 7.6), ao contrário da alcalinidade parcial que aumentou consideravelmente, uma vez que a capacidade de tamponamento tornou-se disponível em razão da baixa concentração de ácidos e da contribuição da metanogênese acetoclástica com HCO_3^- . Tais fatos levam a valores para razão AI/AP bem baixos, muito próximos à zero.

Outro aspecto importante relacionado à recuperação energética de metano é o seu conteúdo na composição do biogás (%CH₄), cujos valores típicos estão entre 45% a 75% (International Energy Agency, 2020). O percentual de CH₄ no biogás foi de 66,2% ± 1,6%, não havendo grande diferença nesta observação entre todos os ensaios. As maiores %CH₄ foram verificados nos ensaio M-8 (69,1%) e M-4 (68,9%) cujos valores foram muito próximos, e os menores %CH₄ identificados para M-3 (64,7%) e M-5 (64,5%).

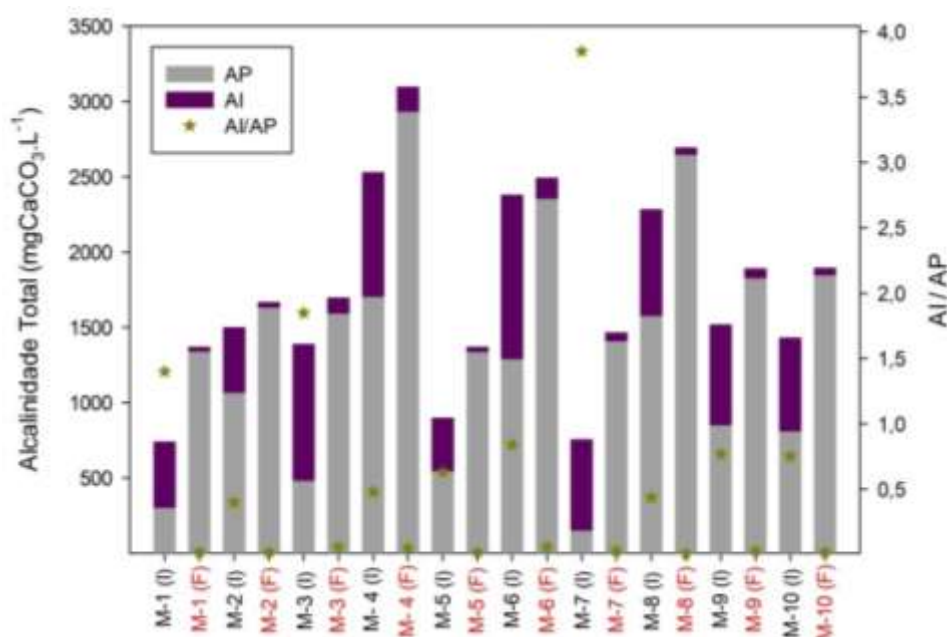


Figura 7.6. Alcalinidade intermediária, parcial e total, e relação AI/AP para início e final dos ensaios do planejamento experimental de produção de metano.

Herrmann et al. (2016) avaliaram a produção de metano para mais de 40 diferentes substratos lignocelulósicos caracterizados como resíduos de colheita de variadas culturas, de forma que o percentual de metano obtido no biogás ficou entre 49% a 61%. Empregando diversos dejetos animais Triolo et al. (2011) obtiveram biogás entre 58% - 68%, e para diferentes resíduos lignocelulósicos identificaram percentual de metano entre 54% - 63%, para ensaios em reatores em batelada. Su et al. (2016) usaram resíduos de citros submetidos a pré-tratamento biológico e obtiveram máximo conteúdo de metano de 57% em reatores em batelada. O percentual de metano no biogás dos ensaios do presente estudo foi satisfatório com base nos resultados reportados por outros autores para diferentes substratos lignocelulósicos e para resíduos de citros, cujo percentual máximo de metano no biogás é próximo a 60%.

Boa resposta em relação a este parâmetro é fundamental como medida indireta do desempenho do processo metanogênico; além disso, a variação no conteúdo de metano resulta

na variação do conteúdo energético do biogás representado pelo seu Poder Calorífico Inferior (PCI, MJ.m⁻³) (International Energy Agency, 2020), tendo impacto direto na viabilidade de escala do processo. Balat e Balat (2009) destacam que a composição do biogás é um parâmetro essencial, uma vez que possibilita identificar sistemas de purificação apropriados, melhorando as condições de sua combustão.

7.3.2 Metabólitos solúveis

A variação da concentração e distribuição dos AOVs e solventes ao longo do processo fornece informações adicionais em relação às vias metabólicas de produção, conversão e consumo destes intermediários no processo de AD, que compõem grande parcela do conteúdo de matéria orgânica solúvel.

No início dos ensaios observa-se a predominância dos ácidos acético (HAc) (402,95 - 1107,53 mg.L⁻¹) e butírico (HBu) (795,86 - 1989,65 mg.L⁻¹) em elevadas proporções (Figura 7.7), resultado do primeiro estágio fermentativo otimizado para produção de hidrogênio, uma vez que as vias de produção destes ácidos orgânicos são aquelas que favorecem maiores rendimentos de H₂ (Sikora et al., 2013). A disponibilidade inicial de HAc foi importante para o rápido início da produção de metano, uma vez que este é um dos substratos primários para metanogênese (Yadvika et al., 2004).

De forma geral nas primeiras horas de operação ocorreu aumento da concentração total de metabólitos solúveis (AOVs + solventes), com exceção do ensaio M-5 (35,7% HFE, 0,3 gNaHCO₃.gDQO⁻¹), no qual verificou-se redução da concentração de ácidos orgânicos, desde as primeiras horas, provavelmente devido à menor concentração de substrato. Nos ensaios M-1, M-3 e M-7, o aumento da concentração de metabólitos solúveis se deu principalmente pelo aumento de HBu e HPr, enquanto, nos ensaios M-4, M-6, M-8, M-9 e M-10, além do aumento destes ácidos orgânicos, foi verificado aumento da concentração de HAc.

Em todos os ensaios foi observado comportamento padrão em período intermediário de remoção de HAc. Para o HBu identificou-se dois padrões distintos, o primeiro do aumento da sua concentração nos ensaios M-6 e M-7, sendo provável de ter ocorrido devido à elevada conversão de carboidratos via hidrólise do conteúdo lignocelulósico. O segundo sendo de observados nos demais ensaios referente à remoção de HBu, sendo em alguns casos

observadas concentrações próximas a zero, além também da sua conversão em HAc por meio de reações acetogênicas (Pan et al., 2021).

Em relação ao ácido propiônico, também foi observado comportamento semelhante; ou seja, aumento da sua concentração nos ensaios M-3, M-6, e M-7, enquanto que nos demais ensaios houve a diminuição ou estagnação da sua concentração; os quais também podem estar associados aos processos acetogênicos (Li et al., 2015).

Padrões distintos para os perfis de concentração de HBU e HPr podem ser associados à termodinâmica das reações acetogênicas e ao sintrofismo entre os microrganismos acetogênicos e metanogênicos. As reações de conversão de HPr e HBU a HAc são energeticamente desfavoráveis ($\Delta G^\circ = +76,0$ kJ, e $+48,0$ kJ, respectivamente), desta forma a tendência é que tais reações ocorram para baixas concentrações de produto (HAc), resultando em uma dependência obrigatória das bactérias acetogênicas com as arqueias metanogênicas acetoclásticas (Angelidaki et al., 2011). Sendo assim menores velocidades de consumo de HAc, que resultaram em maiores concentrações de HAc neste período em alguns ensaios, podem ter limitado a conversão dos ácidos butírico e propiônico.

Para todos os ensaios a concentração final de HBU foi muito baixa ou até mesmo não observado, reforçando a ideia de que o metabolismo acetogênico foi muito importante no processo, uma vez que este foi o metabólito em maior concentração no início dos ensaios. Exceção aos ensaios M-3 e M-4, nos demais a concentração de HPr também foi baixa e praticamente zero ao final dos ensaios. Para M-3 e M-4 houve durante os ensaios constante aumento da concentração de HPr, sendo provável que as reações acetogênicas para conversão deste AOV não foram favorecidas. A conversão do ácido butírico em acético não é tão desfavorável termodinamicamente como a conversão do ácido propiônico, de forma que o acúmulo de HBU é raramente reportado na literatura (Amani et al., 2011).

Neste período intermediário do processo identificou-se aumento da concentração de metanol (MetOH) nos ensaios M-3, M-4 e principalmente em M-6. Tal aumento pode estar associado ao metabolismo de degradação da pectina, uma vez que o metanol é o principal produto final deste metabolismo (Schink e Zeikus, 1980). As pectinas pertencem ao grupo de polissacarídeos heterogêneos, sendo abundantes em espécies de citros, principalmente laranjas, as quais são degradadas pela ação das pectinases produzidas por bactérias, fungos e leveduras (Ohimain, 2016). Portanto, a degradação dos sólidos de citros ao longo do processo

favoreceu o aumento de metanol, principalmente nos ensaios com maior concentração de sólidos (M-3, M-4 e M-6).

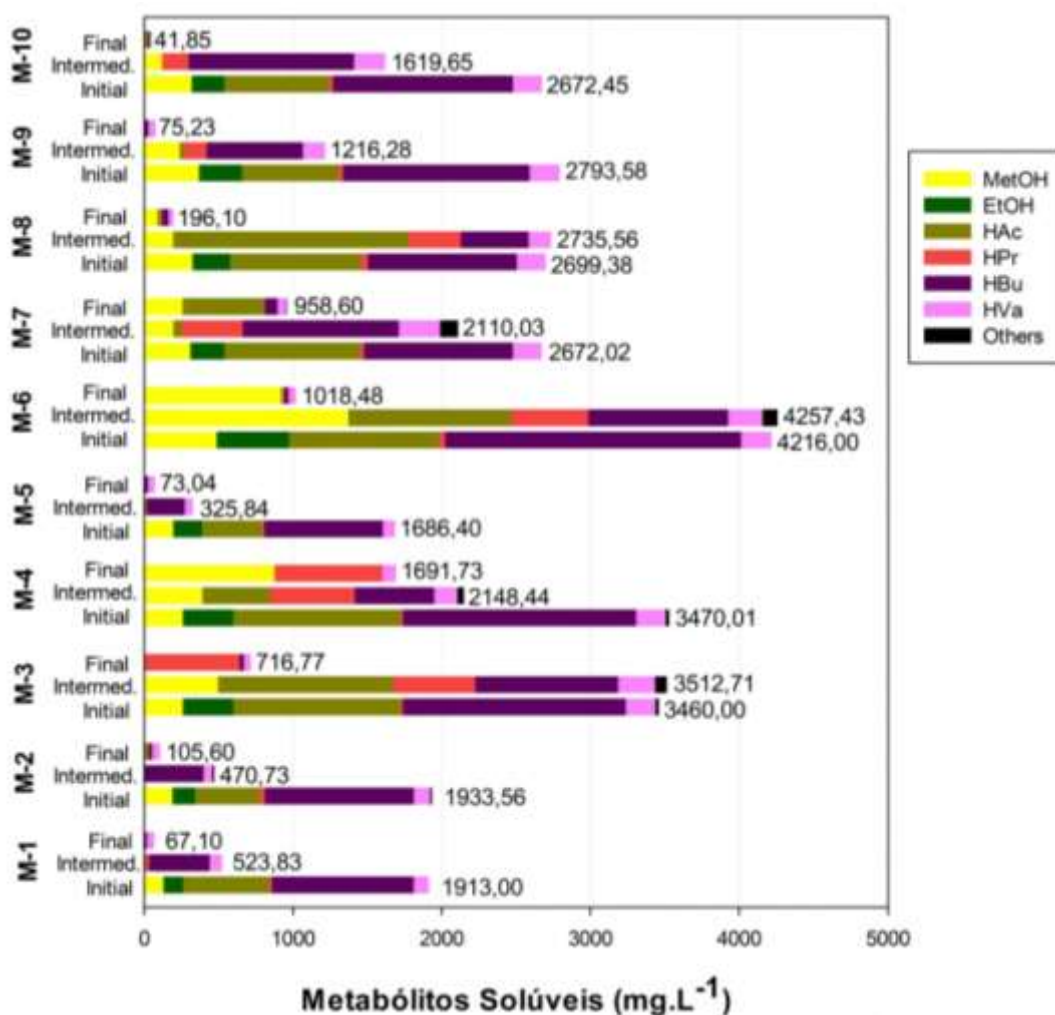


Figura 7.7. Variação dos metabólitos solúveis ao longo dos ensaios metanogênicos do planejamento experimental.

Ao final dos ensaios M-3, M-8, M-9 e M-10 concentrações muito baixas ou inexistentes de metanol foram verificadas, oposto ao que foi identificado ao longo do processo, nos quais picos de concentração de metanol foram detectados. A produção de metano a partir da utilização do metanol pode estar associado ao consumo deste metabólito, pelas vias metanogênicas metilotróficas que podem ser dependentes ou não da disponibilidade de H_2 (Kurth et al., 2020; Laloui-carpentier et al., 2006). Para os ensaios M-4 e M-6 não foi verificado relevante consumo do metanol, com acúmulo deste metabólito ao longo dos ensaios, de forma que foram observadas ao final dos ensaios expressivas concentrações. O acúmulo deste metabólito pode ser atribuído a uma limitação da ocorrência das vias

metilotróficas dependentes de hidrogênio, em razão da competição por substrato com vias hidrogenotróficas (Feldewert et al., 2020).

7.3.3 Ensaios de validação dos modelos

Os ajustes obtidos por meio do desenho experimental e pelo modelo de superfícies de respostas possibilitaram a obtenção de uma condição otimizada para o potencial máximo (P) de produção de CH_4 (V-1), com a velocidade máxima de produção (Rm) de CH_4 (V-2), e com a remoção de matéria orgânica solúvel (rDQO) (V-3).

A desejabilidade (D) que é um parâmetro importante para avaliar se as condições simultâneas de otimização são aceitáveis (1) ou não (0), foi de 0,835 para o ensaio V-2 e de 0,762 para V-3, portanto, tais condições atendem a este critério, sendo válidas para explicar com boa cobertura o comportamento das respostas avaliadas.

O ensaio de validação para otimização do potencial máximo de produção (V-1) resultou em $6549,65 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}$, com cinética caracterizada por dois platôs de produção (Figura 7.8), e longa duração do processo (aproximadamente 830 horas), assim como observado para alguns dos ensaios do planejamento experimental. Na condição experimental foram fixadas as variáveis em 99,3% de CRF, e razão de $0,58 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}.\text{L}^{-1}$ (Tabela 7.9). A produção obtida é muito próxima aquela observada em M-6 ($6320,6 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}$), ensaio com o maior P do planejamento experimental. Esta semelhança está associada ao fato de que a variável concentração inicial de substrato (%CRF) foi realizada com valores muito semelhantes para M-6 (100% de CRF) e V-1 (99,3% de CRF), a qual resultou em maior efeito na resposta avaliada (P).

O ensaio de validação para otimização simultânea do P e Rm (V-2) resultou em $5876,27 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}$ e $23,83 \text{ mLCH}_4 \text{ h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, respectivamente. Destaca-se a modificação no comportamento cinético da produção com iminente desaparecimento da distinção de dois platôs de produção, reduzindo o período de estagnação da produção durante o ensaio V-2 (Figura 7.8), e também do tempo de duração total que foi de cerca de 710 horas. Elevada Rm foi identificada no período caracterizado como primeira fase, com relevante produção acumulada neste período (25,9% do total). A condição experimental teve fixadas as variáveis em 83,9% de CRF, e razão de $0,35 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}.\text{L}^{-1}$ (Tabela 7.9).

Tabela 7.9. Condições experimentais e principais respostas, para os ensaios de validação das condições otimizadas metanogênicas.

Condições Experimentais				
Variáveis	V-1	V-2	V-3	
Otimização	<i>P</i>	<i>P + Rm</i>	<i>P + rDQO_S</i>	
Diluição CRF (%)	99,3	83,9	72,3	
gNaHCO ₃ .gDQO ⁻¹	0,58	0,35	0,30	
Desejabilidade	0,934	0,835	0,762	
Parâmetros dos ensaios de validação das respostas otimizadas pelo modelo				
		V-1	V-2	V-3
P (mL.L ⁻¹)		726,1 ^a 6549,7 ^b	1521,4 ^a 5876,3 ^b	5403,4
Rm (mL.L ⁻¹ .h ⁻¹)		9,6 ^a 37,7 ^b	19,6 ^a 23,8 ^b	25,8
λ (h)		2,6 ^a 217,8 ^b	0,4 ^a 131,9 ^b	10,5
%CH ₄		70,0%	68,6%	67,2%
pH	inicial	7,56	7,53	7,52
	Final	7,67	7,35	7,38
AI/AP	inicial	0,53	0,68	0,74
	final	0,02	0,03	0,04
rDQO		87,12%	82,44%	91,04%
rFenóis		45,70%	20,12%	59,69%
rSTV		58,6	62,0%	53,3%

^aparâmetros ao final do primeiro platô de produção de CH₄; ^bparâmetros ao final do segundo platô de produção de CH₄.

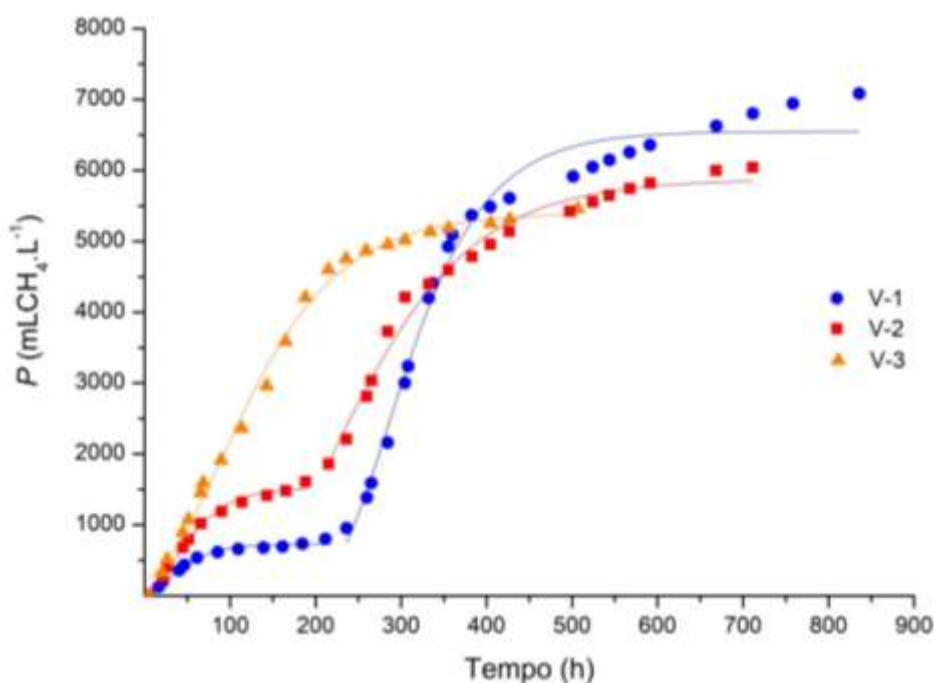


Figura 7.8. Produção acumulada de CH₄ com ajuste de Gompertz modificado, para os ensaios de validação das condições de otimização.

A remoção da matéria orgânica (rDQO) (ensaio V-3) está correlacionada à produção de metano (P) e pode ser entendida como um indicador de eficiência do processo em termos de uso do carbono (Kumar and Lin, 2013). A condição de realização do ensaio foi com 72,3% de CRF, e $0,30 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 7.9), obtendo-se P de $5403,41 \text{ mLCH}_4\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 7.8), e 91,04% de rDQO_s, o que representou $530,22 \text{ mLCH}_4\cdot\text{gDQO}_s^{-1}$. Para tal condição otimizada não se observou estagnação na produção durante o processo, havendo única e acentuada exponencial de produção de metano, com redução do tempo total de ensaio, para aproximadamente 500 horas.

Nas condições otimizadas de V-1 e V-2, as quais foram conduzidas com menor diluição do conteúdo do reator fermentativo (99,3% de CRF e 83,9% de CRF, respectivamente), observou-se um pico da concentração de matéria orgânica solúvel e diminuição de pH no início dos ensaios (Figura 7.9). Devido ao ajuste na alcalinização do processo (razão de $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$) a diminuição do pH operacional não foi tão acentuada, sendo mantida em faixa favorável ao processo (acima de 6,0).

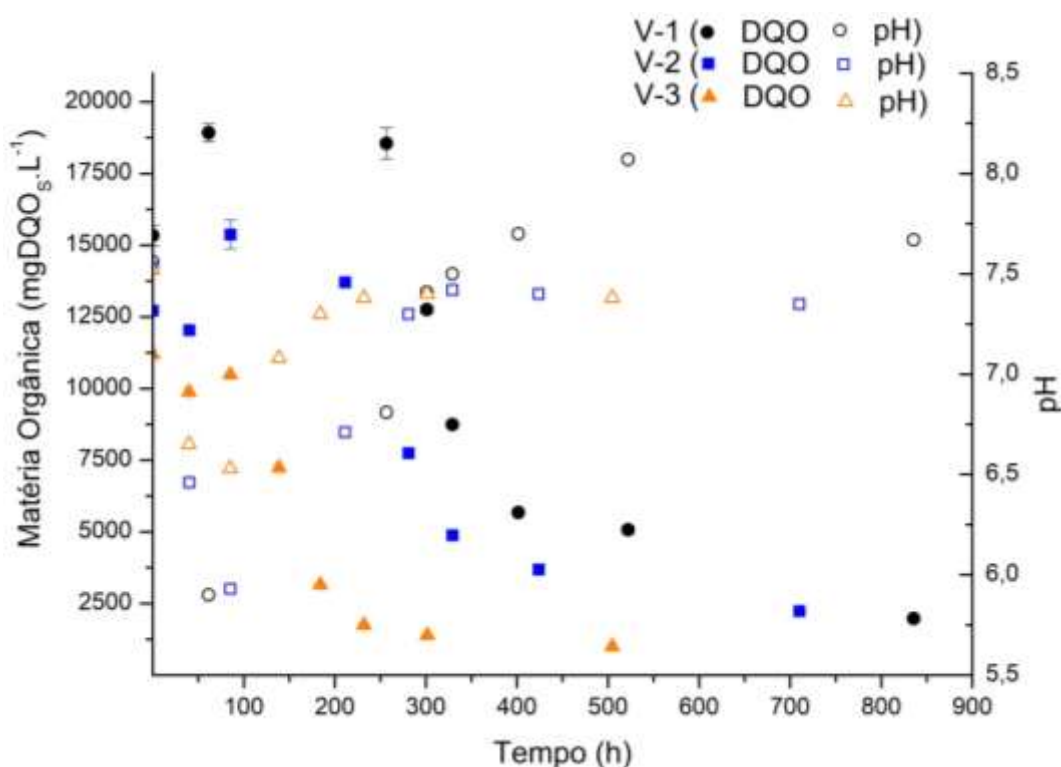


Figura 7.9. Variação temporal para pH operacional e concentração de matéria orgânica para os ensaios de validação das condições otimizadas.

Nos ensaios V-1, V-2 e V-3, observou-se aumento das concentrações de HAc, HBU e HPr no início até determinado ponto intermediário dos ensaios, verificando que a remoção de

HBu e HPr passou a ocorrer expressivamente somente quando concentrações reduzidas de HAc foram verificadas nos reatores. O perfil observado para estes metabólitos é coerente ao previsto pela termodinâmica desfavorável das reações acetogênicas, não ocorrendo conversão quando há elevada concentração de produto (HAc) no meio (Angelidaki et al., 2011).

Ao final dos ensaios V-2 e V-3 não se observou acúmulo significativo de nenhum metabólito (Figura 7.10), sendo o metanol todo consumido principalmente no período final do processo. Todavia, na condição de validação V-1 houve elevada produção e acúmulo de metanol no período final do ensaio, de forma que tal metabólito não foi consumido no processo, supondo o não favorecimento de vias metilotróficas.

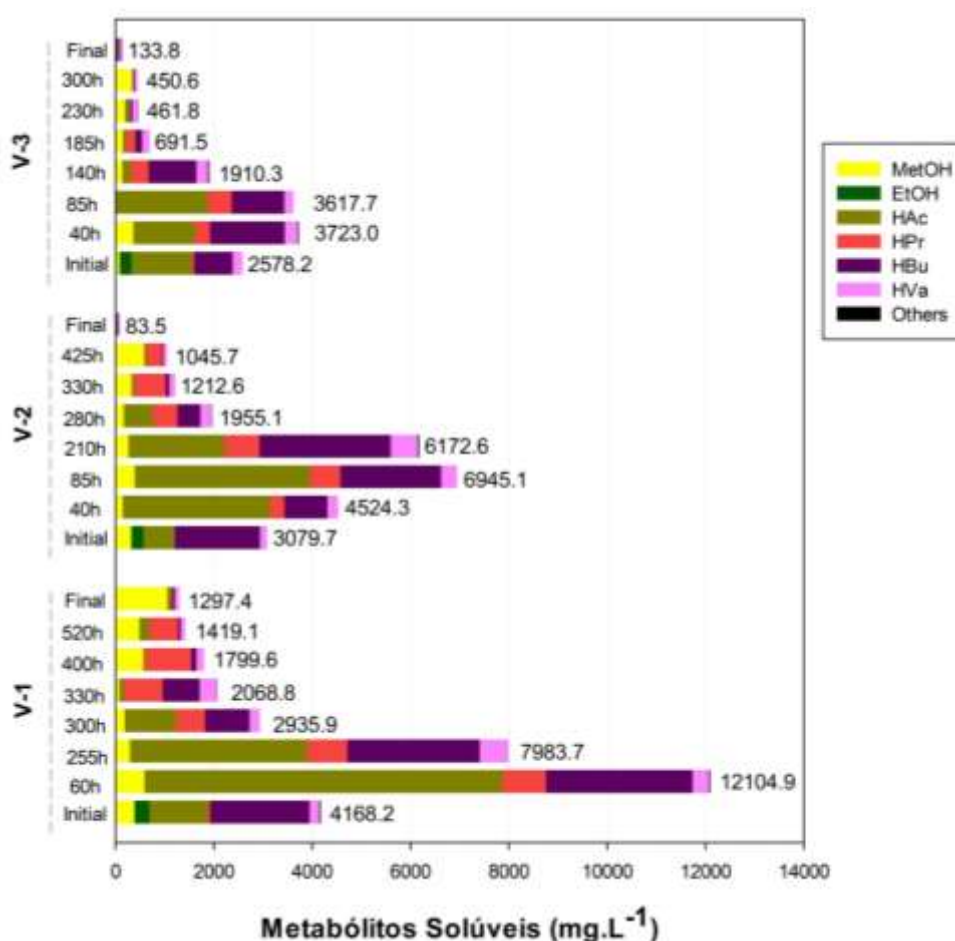


Figura 7.10. Perfil de metabólitos solúveis ao longo dos ensaios de validação das condições otimizadas.

A produção de metano obtida com resíduos de citros é superior àquela observada em outros estudos nos quais não foram aplicados pré-tratamentos térmicos ou químicos (Camargo et al., 2021b; Forgács et al., 2012; Wikandari et al., 2015). Em outros estudos foram observadas maiores produções de metano, entretanto para isso foram aplicados aos resíduos

de citros pré-tratamentos energeticamente intensivos, tais como destilação a vapor ou explosão vapor, ou ainda ambientalmente inviáveis como a utilização de solventes. Neste contexto, vale destacar que a separação do processo em dois estágios como proposto permitiu atingir elevada produção de metano, aplicando concentração de matéria orgânica superior àquela utilizada em sistemas de único estágio (Tabela 7.10).

Tabela 7.10. Análise comparativa da produção otimizada de CH₄ com resíduos da agroindústria de citros.

Substrato	Pré-tratamento	Produção de CH ₄	Referência
Efluente da fermentação de resíduos sólidos e água residuária de citros para produção de hidrogênio	Moagem dos resíduos sólidos	308,2 ^a mLCH ₄ .g ⁻¹ STV _{RSL}	Presente estudo
		327,3 ^b mLCH ₄ .g ⁻¹ STV _{RSL}	
		349,2 ^c mLCH ₄ .g ⁻¹ STV _{RSL}	
Efluente da fermentação de resíduos sólidos de citros	Moagem dos resíduos sólidos	187,4 mLCH ₄ .g ⁻¹ STV _{RSL}	(Camargo et al., 2021b)
Resíduos sólidos de laranjas (cascas)	Destilação Vapor	332,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	(Martín et al., 2010)
Mistura de resíduos de citros com resíduos sólidos municipais	Não aplicado	102,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	(Forgács et al., 2012)
	Explosão vapor	537,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	
Resíduos sólidos de laranjas (cascas)	Não aplicado	131,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	(Wikandari et al., 2015)
	Solvente (hexano)	217,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	
Resíduos sólidos de laranjas (cascas)	Tratamento Biológico	340,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	(Ruiz et al., 2016)
	Destilação a vapor	470,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	
	Extração líquido-líquido	440,0 mLCH ₄ .g ⁻¹ SV	

^a: condição otimizada V-1; ^b: condição otimizada V-2; ^c: condição otimizada V-3.

7.3.4 Caracterização Microbiana

Realizou-se a caracterização taxonômica da comunidade microbiana das amostras dos ensaios de validação das condições otimizadas V-1 (99,3% de CRF, e 0,58 gNaHCO₃.gDQO⁻¹), V-2 (83,9% de CRF, e 0,35 gNaHCO₃.gDQO⁻¹), e V-3 (72,3% de CRF, e 0,30 gNaHCO₃.gDQO⁻¹). A comparação entre as amostras destes ensaios possibilitou avaliar a relação entre a observação sistemática de diferenças nas principais respostas do processo, e

a composição da comunidade microbiana em termos de abundância relativa dos grupos identificados.

Para a amostra do ensaio V-1, V-2 e V-3 obteve-se 26.433, 22.335 e 25.894 sequências do gene RNAr 16S, além de 151 ASV, 220 ASV e 224 ASV (*Amplicon Sequence Variant*), respectivamente.

A partir do índice de Shannon-Wiener, verificou-se menor diversidade no ensaio da condição otimizada V-1 para o Domínio Bacteria (3,59), quando comparada aos demais, sendo o ensaio V-3 aquele com maior diversidade (4,54) (Tabela 7.11). Entretanto, para o Domínio Archaea identificou-se diversidade em V-3 (1,71) pouco superior a V-1 e V-2, cuja diversidade foi de 1,67. Em relação a V-3 observou-se dominância (0,981) superior à verificada para V-2 (0,955) e V-1 (0,894) para o Domínio Bacteria, com base no índice de Simpson. Todavia, para o Domínio Archaea maior dominância foi verificada em V-1 (0,789). Tais diferenças na diversidade e dominância das comunidades microbianas decorrem do ajuste das variáveis no intuito de estabelecer condições otimizadas com foco em diferentes respostas (*P*, *Rm* e *rDQO*). Nas três amostras foram identificados microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria e Archaea, com maior abundância relativa para o domínio Bacteria.

Tabela 7.11. Índices ecológicos do Domínio Archaea e Bacteria.

Índice	Archaea			Bacteria		
	V-1	V-2	V-3	V-1	V-2	V-3
Shannon	1,71	1,67	1,67	3,59	4,20	4,54
Simpson	0,789	0,769	0,770	0,894	0,955	0,981

Os filios identificados em maior abundância relativa para o Domínio Bacteria no ensaio V-1 foram Firmicutes (45,0%), Thermotogota (36,0%) e Bacteroidota (6,7%). No ensaio V-2 foram Firmicutes (47,5%), Thermotogota (22,6%), e Bacteroidota (11,2%). Enquanto, para V-3 os principais filios identificados foram Firmicutes (36,6%), Bacteroidota (25,7%), Thermotogota (8,4%), Desulfobacterota (6,7%) e Synergistota (4,9%). Em relação ao domínio Archaea os filios em maior abundância foram Halobacterota (79,3%), e Thermoplasmatota (18,4%) para V-1. No ensaio V-2 foram identificados Halobacterota (85,2%), e Euryarchaeota (10,3%), e em V-3 Halobacterota (74,3%), Thermoplasmatota (9,4%) e Euryarchaeota (13,2%).

Em relação ao Domínio Bacteria identificou-se para V-1 e V-2 representantes da família Petrotogaceae, com abundância relativa de 35,4% e 22,1%, respectivamente. Em V-1 foram identificadas as famílias Lachnospiraceae (9,2%), Hungateiclostridiaceae (4,2%), Clostridiaceae (4,0%), Syntrophomonadaceae (3,9%), Oscillospiraceae (3,8%) e Synergistaceae (3,5%) também foram identificadas com. Para V-2 as famílias Lachnospiraceae (6,5%), Limnochordia (5,5%), Syntrophomonadaceae (5,2%), Hungateiclostridiaceae (4,4%), Oscillospiraceae (4,3%) e Ruminococcaceae (3,1%), também foram identificadas em maior abundância relativa. Em relação ao ensaio V-3 não se identificou única família com destacada abundância relativa comparada as demais, sendo observadas Syntrophomonadaceae (8,2%), Petrotogaceae (7,6%), Tannerellaceae (6,8%), Dysgonomonadaceae (5,7%), Synergistaceae (4,9%), Bacteroidaceae (4,6%), Lachnospiraceae (3,9%), Hungateiclostridiaceae (3,8%), Spirochaetaceae (3,7%), Ruminococcaceae (3,7%), e Anaerolineaceae (3,2%).

Para o domínio Archaea as famílias Methanoregulaceae (61,2%), Methanomassiliicoccaceae (18,4%) e Methanomicrobiaceae (18,2%) foram abundantes no ensaio V-1. No ensaio V-2 identificou-se com maior abundância as famílias Methanoregulaceae (57,9%), Methanosaetaceae (14,8%), e Methanosarcinaceae (12,5%). Já para V-3 as famílias com maior abundância foram Methanoregulaceae (61,3%), Methanosaetaceae (13,0%), Methanomassiliicoccaceae (8,7%) e Methanobacteriaceae (8,7%).

As principais diferenças observadas entre as abundâncias relativas das principais famílias de microrganismos presentes nos ensaios foram as seguintes: a redução significativa da abundância da família Petrotogaceae no ensaio V-3; aumento da abundância da família Methanosaetaceae em V-2 e V-3 comparado a V-1, com redução da abundância das famílias Methanomassiliicoccaceae e Methanomicrobiaceae.

Em relação aos gêneros, alguns grupos pertencentes ao Domínio Bacteria não foram identificados em nível de gênero, prevalecendo a classificação da família na qual tal grupo pertence. Nos três ensaios avaliados, o gênero identificado como *AUTHM297*, pertencente à família Petrotogaceae foi aquele com maior abundância relativa, sendo 35,4% em V-1, 22,1% em V-2 e 7,6% em V-3 (Figura 7.11a). Para V-1 microrganismos não identificados a nível de gênero, pertencentes as famílias Lachnospiraceae, Hungateiclostridiaceae também foram observados em abundância relativa > 4,0%, além de grupos pertencentes ao gênero *Oxobater* (3,0%). Para V-2 os gêneros *Hydrogenispora* (4,6%) e *Syntrophomonas* (3,2%) foram

observados com relevante abundância relativa, ademais gêneros não identificados pertencentes às famílias Lachnospiraceae, Hungateiclostridiaceae foram identificados com abundância próxima a 3,0%. Em relação ao ensaio V-3 foram identificadas representantes pertencentes a *Macellibacteroides* (6,8%), *Syntrophomonas* (6,5%), *Bacteroides* (4,6%), e gêneros não identificados pertencentes às famílias Dysgonomonadaceae (4,6%), e Synergistaceae (3,4%). As principais diferenças na estrutura da comunidade microbiana foram observadas entre o ensaio V-3 em relação aos ensaios V-1 e V-2. Para V-3 identificou-se diminuição da abundância relativa de *AUTHM297*, associada ao aumento de *Macellibacteroides*, *Syntrophomonas* e *Bacteroides*.

Microrganismos semelhantes a *AUTHM297*, e identificados em V-1 e V-2, têm sido frequentemente observados em reatores aplicados à digestão anaeróbia de efluentes com presença de sólidos orgânicos (Ahmad et al., 2018; Xu et al., 2020). Como discutido por Liu et al. (2020), tal grupo tem metabolismo especializado que lhe permite se desenvolver em ambientes com matéria orgânica biodegradável. Mou et al. (2022) associou a elevada abundância observada para este gênero à maior eficiência de hidrólise em reatores UASB, que resultou em maior conteúdo de matéria orgânica degradada. No presente estudo, constatou-se efetiva hidrólise dos resíduos sólidos dos ensaios metanogênicos, sendo mais efetiva nas condições com maior concentração de sólidos, tal como em V-1 e V-2, fato que pode estar associado a observação de maior abundância destes microrganismos nestes ensaios.

Microrganismos pertencentes ao gênero não cultivado pertencente à família Lachnospiraceae, também foram identificados com razoável abundância relativa nos ensaios V-1 e V-2. Muito gêneros pertencentes a família Lachnospiraceae fermentam diversos açúcares, em ácido acético, succínico, láctico, etanol, e contribuem na acidogênese em sistemas com alto teor de sólidos (Han et al., 2017). Tais grupos também podem degradar compostos recalcitrantes, como celulose e hemicelulose em AOVs (Wang et al., 2017). A correlação reportada entre este grupo de microrganismos e o alto teor de sólidos em reatores, combinada a sua comprovada capacidade hidrolítica, é provável terem sido determinantes para maior abundância em V-1 e V-2, visto que nestes ensaios maior concentração inicial de STV foi observada em razão da menor diluição do efluente fermentativo, além do fato de que para estes ensaios, maior remoção de sólidos foi verificada, indicando importante atividade hidrolítica no processo.

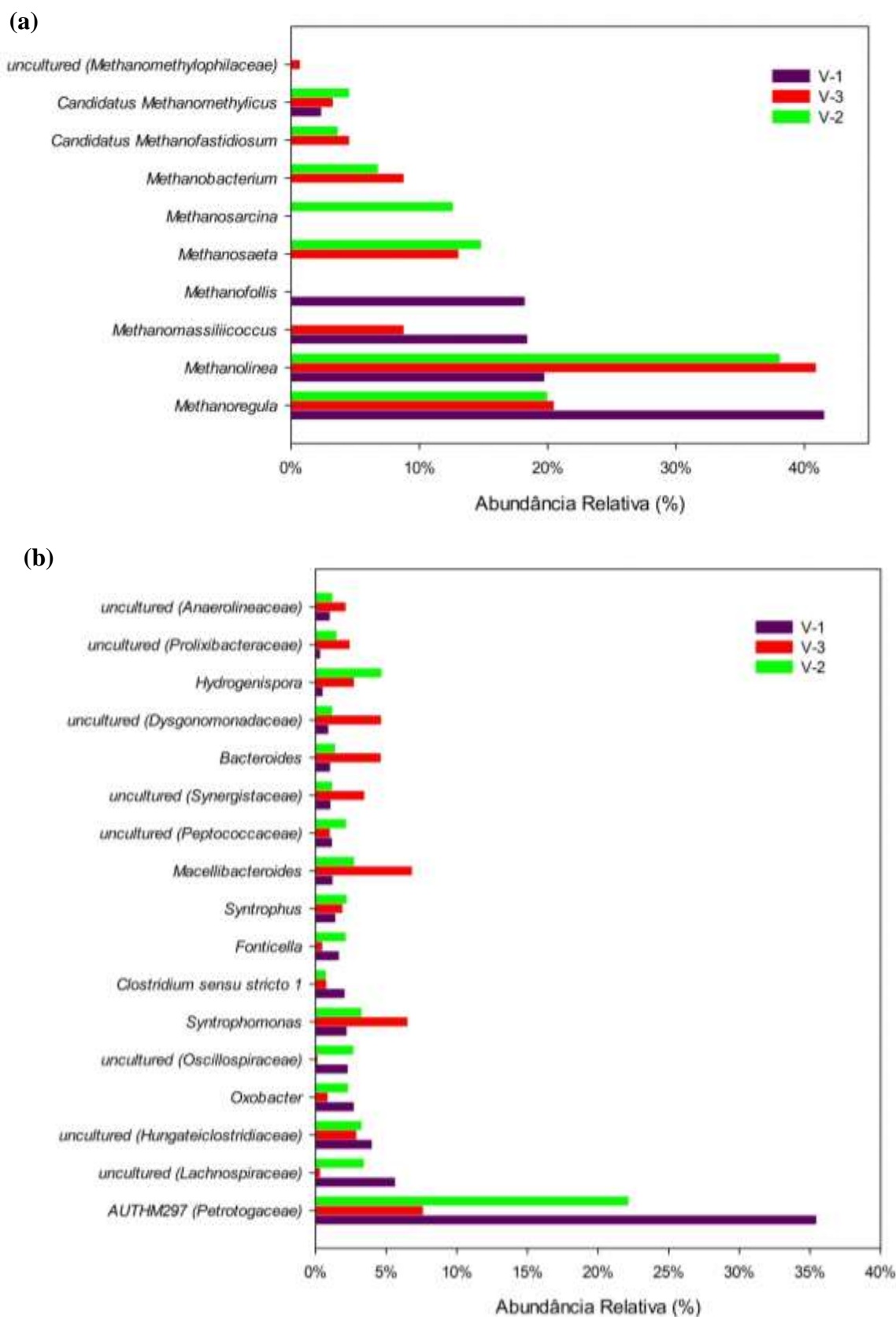


Figura 7.11. Abundância relativa dos gêneros para os Domínios (a) Archaea, e (b) Bacteria, para os ensaios V-1, V-2, e V-3.

No ensaio V-2 foi observado abundância relativa maior de *Hydrogenispora*, em relação aos outros ensaios. Tal gênero está associado à fermentação de açúcares em ácido acético, etanol e H₂ (Kang et al., 2021). Em estudo de degradação anaeróbia de palha em reatores batelada, Prem et al. (2019) associaram a significativa abundância de *Hydrogenispora* ao fornecimento a longo prazo de ácido acético. Elevada abundância de tal gênero têm sido reportada em outros estudos relacionados à digestão anaeróbia de resíduos de citros (Zhang et al., 2022), assim como, em outros substratos lignocelulósicos (Gomes et al., 2021; Kang et al., 2021).

Nos três ensaios um gênero não cultivado pertencente à família Hungateiclostridiaceae foi identificado, tal família é pertencente ao filo Firmicutes e alguns gêneros têm sido isolados, estando associados à hidrólise, com capacidade de produzirem enzimas celulolíticas e xilanolíticas (Dobrzynski et al., 2021). Nos ensaios do presente estudo, principalmente para V-2, é provável que microrganismos destes gêneros foram fundamentais no processo de disponibilização dos carboidratos da matriz lignocelulósica dos resíduos de citros, assim como na conversão a produtos metabólicos, tal como ácido acético e H₂, de forma fundamental para o desenvolvimento do processo metanogênico.

Outros grupos acidogênicos, também foram identificados nos ensaios com razoável abundância, tais como os gêneros *Bacteroides*, *Macellibacteroides*, e não cultivado pertencente à família Dysgonomonadaceae. *Bacteroides* é um importante grupo fermentativo mesofílico associado ao catabolismo de açúcares, cujos principais produtos são os ácidos propiônico, acético, láctico, fórmico, succínico e fumárico (Lu et al., 2012), sendo comumente identificados em reatores aplicados ao tratamento de águas residuárias (Wang et al., 2016). Bactérias fermentativas semelhantes a *Macellibacteroides* tem como principais subprodutos metabólicos os ácidos láctico, acético e butírico, com crescimento ótimo em pH entre 6,5 e 7,5 (Jabari et al., 2012). Zhao et al. (2022) identificaram elevada abundância deste gênero em ensaios de co-digestão de dejetos de aves, com *Enteromorpha* e aparas de grama. Microrganismos pertencentes à família Dysgonomonadaceae incluem espécies com capacidade hidrolítica, que degradam polissacarídeos recalcitrantes liberando oligossacarídeos e monossacarídeos, e capazes de converte-los em AOVs (Owusu-agyeman et al., 2022), e têm sido reportados de forma recorrente em reatores anaeróbios com resíduos lignocelulósicos (Schroeder and Logroño, 2022), tal como nos ensaios do presente estudo.

Em relação à família Anaerolineaceae, destaca-se sua relação com a biodegradação de compostos fenólicos em reatores anaeróbios (Si et al., 2018). A maior remoção de fenóis totais (59%) observada no ensaio V-3 pode estar associada à maior abundância deste gênero, quando comparada aos ensaios V-1 e V-2, nos quais a remoção foi de apenas 45,7% e 20,1%, respectivamente.

Oxobacter, *Syntrophomonas*, e gênero não cultivado pertencente a família Synergistaceae, caracterizam-se como grupos acetogênicos, fundamentais para estabelecer o processo metanogênico com elevada eficiência. Microrganismos semelhantes a *Oxobacter* não obtém energia a partir da degradação de açúcares, possuindo uma natureza acetogênica autotrófica (Bengelsdorf et al., 2015), e obtém energia principalmente catabolizando ácido pirúvico em ácido acético, ou ainda monóxido de carbono em ácido acético e butírico. Tal gênero é proximamente relacionado a *Acetobacterium woodii* (Krumholz e Bryant, 1985), sendo identificado em elevada abundância em estudos de digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos (Ndubuisi-nnaji et al., 2020). *Syntrophomonas* são capazes de degradar sintroficamente, tanto ácido butírico, como propiônico em acético (Bonugli-Santos et al., 2022). Kushkevych et al. (2019) investigaram microrganismos acetogênicos em reatores para produção de biogás a partir de variados substratos lignocelulósicos e dejetos animais. *Syntrophomonas* foi identificado em todos os digestores avaliados, sendo o grupo de microrganismos acetogênicos mais abundante na maior parte deles, confirmando a importância deste grupo no processo metanogênico.

A identificação destes e outros grupos acetogênicos representou abundância relativa superior a 10%, e suas funções metabólicas foram fundamentais para evitar o acúmulo de metabólitos intermediários, que poderiam prejudicar a eficiência do processo metanogênico. Como discutido por Anukam et al. (2019) para sucesso do processo metanogênico evitando acúmulo de AOVs a interação de microrganismos acetogênicos e metanogênicos é fundamental. O estágio acetogênico tem impacto na eficiência da produção de biogás, já que 70% do metano são formados através da redução do ácido acético, sendo em média 25% dele formado via acetogênese (Schink, 1997). Tais grupos foram mais abundantes no ensaio V-3, sendo provável que esta maior abundância esteja relacionada à menor concentração inicial de substrato sólido, em comparação a V-1 e V-2, resultando em menor atividade e abundância de grupos hidrolíticos e acidogênicos.

Para o domínio Archaea sete gêneros foram identificados em maior abundância relativa nos ensaios, sendo eles *Methanoregula*, *Methanolinea*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanofollis*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* e *Methanobacterium*, como pode ser visualizado na Figura 7.11b. No ensaio V-1 verificou-se abundância de 41,5% para *Methanoregula*, 19,7% para *Methanolinea*, 18,4% para *Methanomassiliicoccus*, e 18,2% para *Methanofollis*. Em V-2 as maiores abundâncias relativas identificadas foram para *Methanolinea* (38,0%) *Methanoregula* (19,9%), *Methanosaeta* (14,8%), *Methanosarcina* (12,5%), e *Methanobacterium* (6,7%). Já para V-3 *Methanolinea* (40,9%), *Methanoregula*, (20,4%), *Methanosaeta* (13,0%), *Methanomassiliicoccus* (8,7%), e *Methanobacterium* (8,7%). De forma geral verificou-se que representantes semelhantes a *Methanolinea* foram significativamente predominantes nos ensaios V-2 e V-3, enquanto em V-1 a predominância foi de *Methanoregula*.

Microrganismos metanogênicos semelhantes *Methanoregula* são bem reconhecidos como hidrogenotróficos, capazes de reduzir CO₂ a CH₄, utilizando H₂ como doador de elétrons (Zinder e Bräuer, 2016), e incluem espécies ácido-tolerantes (Yashiro et al., 2011). A maior abundância deste gênero no ensaio V-1 é provável estar associada a maior redução do pH operacional durante maior período do ensaio, sendo este o parâmetro que exerceu maior pressão seletiva para predominância deste gênero. *Methanolinea* também é reconhecido como hidrogenotrófico, mas tem seu crescimento ótimo em pH 7,0 (Imachi e Sakai, 2016), ao contrário do observado para *Methanoregula*. Tal gênero foi mais abundante nos ensaios V-2 e V-3, provavelmente porque não houve alteração acentuada de pH.

Apesar do H₂ ser juntamente ao HAc um dos produtos das reações acetogênicas identificadas nos ensaios, sendo produzidos 2 mols H₂ por mol de H₂Bu consumido, e 3 mols de H₂ por mol de H₂Pr consumido, além da provável produção de H₂ resultante da conversão dos carboidratos solubilizados dos resíduos sólidos, destaca-se que não foi detectado hidrogênio na composição do biogás ao longo dos ensaios. Sendo assim, reforça-se a importância da via metanogênica hidrogenotrófica em V-1, V-2 e V-3, reduzindo CO₂ a metano utilizando H₂ como doador de elétrons (Demirel e Scherer, 2008). Destaca-se também que, mesmo com a separação de fases, com recuperação de hidrogênio separadamente no primeiro estágio, a metanogênese hidrogenotrófica foi predominante para a produção de metano.

Methanofollis foi identificado em maior abundância no ensaio V-1 do que nos ensaios V-2 e V-3. Tais microrganismos caracterizam-se como metanogênicos hidrogenotróficos halotolerantes, com capacidade de metabolizar ampla faixa de substratos, tais como $H_2 + CO_2$, 2-propanol + CO_2 , butanol + CO_2 , ciclopentanol + CO_2 . Todavia, não utilizam ácido acético, metanol ou etanol (Obata et al., 2020). É provável que a maior concentração resultante da menor diluição do conteúdo do reator fermentativo e também da maior razão $gNaHCO_3 \cdot g^{-1}DQO$ em V-1, tenha favorecido maior abundância de tal gênero com características halotolerantes neste ensaio.

A metanogênese metilotrófica também ocorreu de forma importante, principalmente nos ensaios V-2 e V-3, considerando a característica metabólica de alguns dos gêneros de arqueias identificadas (*Methanomassiliicoccus*, *Candidatus Methanomethylicus*, *Candidatus Methanofastidiosum*) e perfil de concentração do metanol ao longo dos ensaios. Em tal via há produção de 3 mols de CH_4 e um mol de CO_2 a cada 4 mols de metanol consumidos, o que representa rendimento de 75% de CH_4 (Laloui-carpentier et al., 2006). Todavia, para metanogênese metilotrófica dependente de hidrogênio, há produção de um mol de CH_4 por mol de metanol e H_2 consumidos. Vale destacar que tais reações são termodinamicamente favoráveis (ΔG° -104,9 e -113,0 kJ/mol CH_4 , respectivamente) favorecendo sua ocorrência na disponibilidade dos substratos (Kurth et al., 2020; Laloui-carpentier et al., 2006).

Methanomassiliicoccus foram identificados em maior abundância no ensaio V-1 do que nos ensaios V-2 e V-3, tal grupo caracteriza-se como metanogênico metilotrófico dependente de H_2 . Tais microrganismos não expressam em seu metabolismo parte da via metanogênica na qual os grupos metil ligados ao cofator são oxidados a dióxido de carbono, sendo portanto incapazes da metanogênese a partir de apenas compostos metilados (Dridi et al., 2012; Kurth et al., 2020). A elevada abundância de grupos hidrogenotróficos neste ensaio como *Methanofollis*, *Methanoregula* e *Methanolinea* é provável ter estabelecido uma competição pelo doador de elétrons (H_2), reduzindo a atividade da via metilotrófica dependente de H_2 . Portanto, as vias hidrogenotróficas foram muito importantes na produção de metano no ensaio V-1, suprimindo a atividade metabólica metilotrófica através do estabelecimento de competição por H_2 .

Candidatus Methanomethylicus são caracterizados pelo metabolismo metanogênico metilotrófico (Vanwonterghem et al., 2016), e foram verificados nas três condições de validação. *Candidatus Methanofastidiosum* identificado em V-2 e V-3, tem metabolismo

caracterizado pela utilização de ácido acético, e compostos metilados como fonte de carbono para produzir metano, e tem sido reportado em reatores anaeróbios mesofílicos (Zhang et al., 2020), e pode ter contribuído para a metanogênese acetoclástica nestes ensaios. *Methanobacterium* também identificada em V-2 e V-3 tem como característica a redução de CO₂ a metano, sendo H₂ o principal doador de elétrons, mas com possibilidade de utilizar ácido fórmico, monóxido de carbono ou álcoois como doadores de elétrons (Boone, 2015).

Microrganismos pertencentes aos gêneros *Methanosaeta* foram identificados em em abundância >10% nos ensaios V-2 e V-3, enquanto *Methanosarcina* somente foi identificada em V-2 em abundância >10%. Tais gêneros são caracterizados pelo metabolismo acetoclástico (Kampmann et al., 2012). A baixa velocidade específica de crescimento (μ_{max}) e o baixo coeficiente de saturação (Ks) de *Methanosaeta* favorece seu crescimento em baixas concentrações de ácido acético, enquanto em concentrações mais elevadas deste ácido promove o desenvolvimento de *Methanosarcina* (Abid et al., 2021). No ensaio V-2 foi observado, por meio do perfil temporal de metabólitos, a manutenção de concentração mais elevada de ácido acético por maior período; provavelmente, tal padrão pode estar associado à maior abundância de *Methanosarcina* nesta condição experimental. Com base nas abundâncias relativas destes gêneros sugere-se elevada importância da via acetoclástica nos ensaios V-2 e V-3.

As informações metabólicas dos diferentes grupos de microrganismos identificados em maior abundância, e o perfil dos principais sub-produtos metabólicos (ácidos acético, butírico, propiônico, metano, hidrogênio, metano), foram utilizadas para inferência e delineamento de um padrão das vias metabólicas predominantes (Figura 7.12). Para os três ensaios destaca-se a importância da ocorrência de vias metabólicas acidogênicas associadas à produção de ácidos orgânicos, e hidrogênio, decorrente da disponibilização de carboidratos simples pelo processo de hidrólise do RSL que também foi notadamente importante ao longo do processo. As vias acetogênicas de conversão de HPr e HBU a HAc desenvolveram-se com dinâmicas distintas em V-1, V-2 e V-3, entretanto para todos eles, o processo acetogênico foi fundamental para a progressão satisfatória da metanogênese.

A metanogênese acetoclástica foi importante na dinâmica do processo, evitando acúmulo de HAc nos reatores, no mesmo sentido destaca-se a via hidrogenotrófica, que possibilitou o consumo de H₂, produzido tanto na acidogênese como acetogênese, mantendo baixas as pressões de H₂ e elevando o rendimento de metano (Demirel e Scherer, 2008). A

ocorrência da via metanogênica metilotrófica foi observada em maior importância para V-2 e V-3, havendo elevado consumo do metanol ao longo do processo, todavia, para V-1 não houve relevante ocorrência de tal via, sendo observado acúmulo de metanol ao final do ensaio.

As inferências funcionais e os KO (KEGG Orthology) relacionados a principais vias metabólicas identificadas nos ensaios estão apresentadas na Figura 7.13. Com base no número de correspondência para cada KO observou-se para o metabolismo de carboidratos as principais categorias observadas em V-1, V-2 e V-3, as quais foram relacionadas ao metabolismo de glicólise/gliconeogênese (1,42%, 1,43% e 1,44%), metabolismo do piruvato (1,25%, 1,23% e 1,19%), de produção de H₂ (0,39%, 0,38% e 0,35%), metabolismos do butanoato, propanoato e metanol (0,83%, 0,83% e 0,79%), e metanogênese (0,21%, 0,24% e 0,27%).

Dentre as KO preditas associadas à metanogênese (Figura 7.12), maior proporção foi observada para K01895 acetil-CoA sintetase [EC:6.2.1.1], enzima que atua na reação de conversão de ácido acético em acetil-CoA, sendo de fundamental importância para o metabolismo acetoclástico (Camargo et al., 2021b). A maior abundância de KO observados foram associados à via acetoclástica, e as principais enzimas inferidas foram a acetil-CoA decarbonilase/sintase (K00193 [EC:2.3.1.169] e K00197 [EC:2.1.1.145]) associadas à síntese de CH₃-CO(III)FeSP e na formação de 5-Metil-H4SPT, e a tetra-hidrometanopterin S-metiltransferase (K00577 [EC:2.1.1.86]) que catalisa a reação de formação de Metil-CoM. Para a via metanogênica hidrogenotrófica as principais KO observadas foram das enzimas hidrogenase redutora de F420 (K00440 [EC: 1.12.98.1]) que catalisa a redução da coenzima F420 dependente da utilização de H₂ como doador de elétrons, metilenotetrahidrometanopterin desidrogenase (K01499 [EC: 3.5.4.27]) envolvida na reação de formação de N⁵-metil-THMPT.

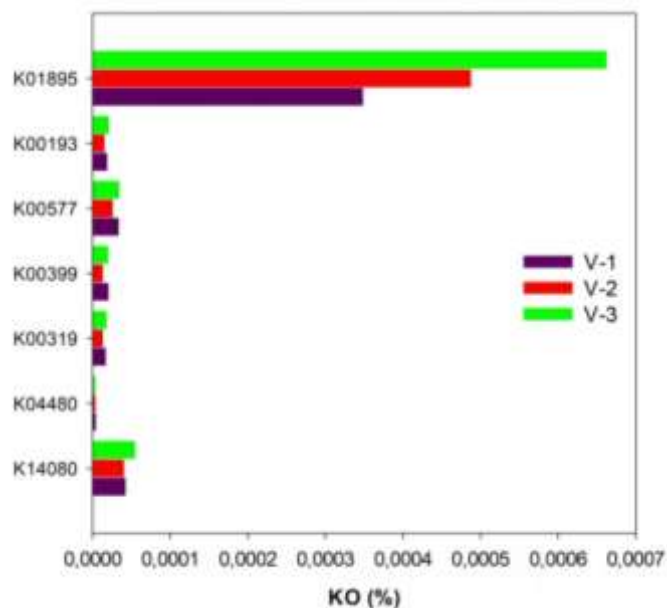


Figura 7.12. Principais KO inferidas relacionadas a produção de metano, para os ensaios V-1, V-2, e V-3.

Na via metanogênica metilotrófica as KO observadas em maior abundância são relacionadas à formação de Metil-CoM a partir do metanol, sendo elas a K14080 enzima corrinóide específica de metanol metil-Co(III) [EC: 2.1.1.246] que atua na transferência de um grupo metil da proteína corrinóide (KEGG Pathway Database, 2022), e K04480 metanol cobalamina metiltransferase [EC: 2.1.1.90], enzima que catalisa a transferência de grupos metil do metanol para uma proteína corrinóide específica de metanol (MtaC), ambas as enzimas foram inferidas em maior proporção no ensaio V-3, quando comparado a V-1 e V-2, em razão da maior abundância relativa de grupos metilotróficos em V-3 comparado a V-2, e da menor importância de tal via em V-3 considerando o acúmulo de metanol observado ao final do ensaio.

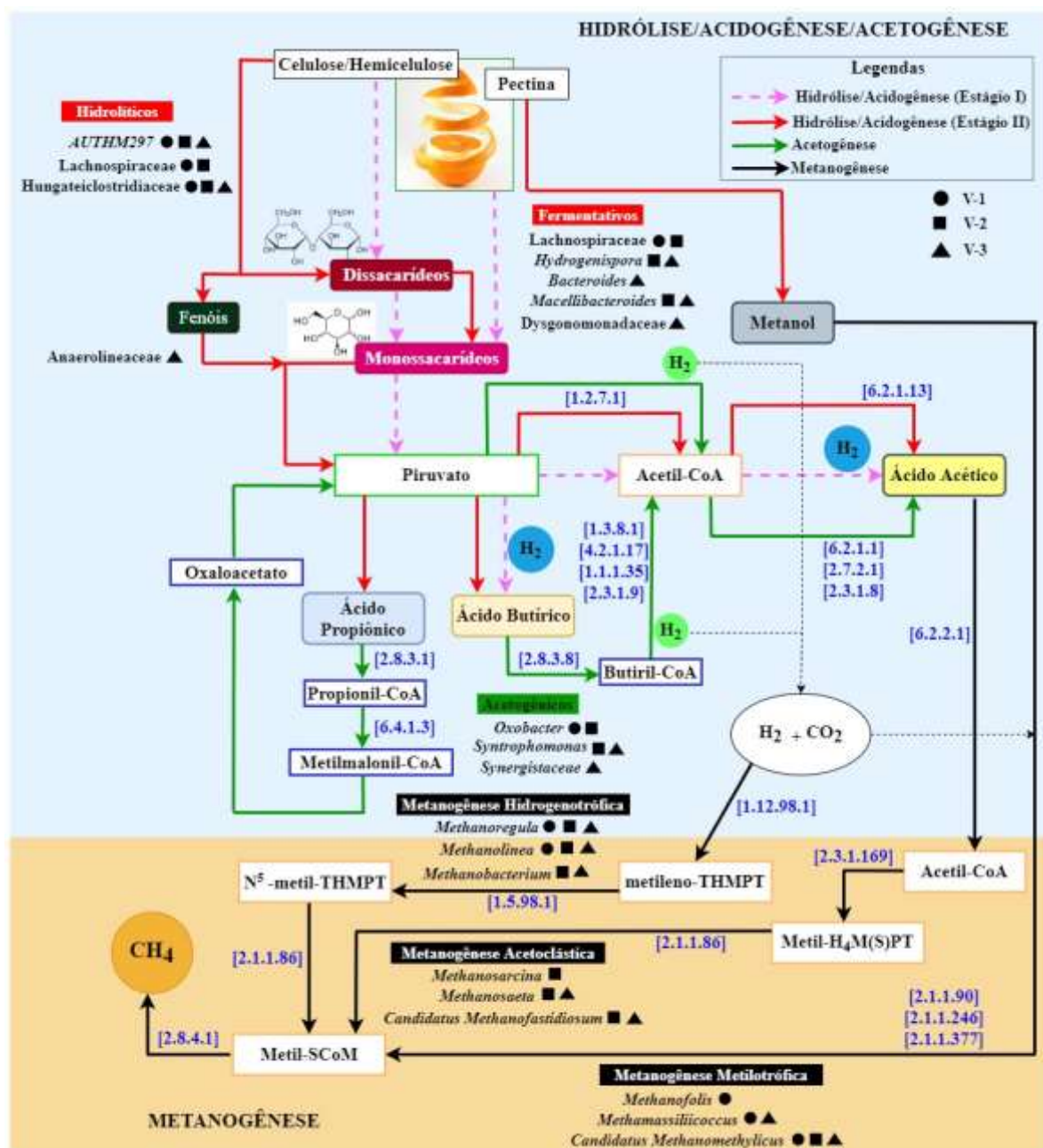


Figura 7.13. Vias de conversão de resíduos de citros em subprodutos (H_2 , AOVs e CH_4) para as condições otimizadas V-1, V-2 e V-3. A cor das setas indicam as etapas de conversão do substrato, e os microrganismos associados a cada etapa estão identificados pelos símbolos (▲●★).

7.3.5 Avaliação de balanço energético e econômico

O potencial energético (PE_{CH_4}) do segundo estágio do processo de co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros foi baseado na produção volumétrica de metano obtida experimentalmente nas condições de validação V-1, V-2 e V-3. A quantificação do conteúdo de energia disponível na forma de eletricidade e calor a partir da conversão deste potencial energético foi realizada baseada na utilização do metano

em um ciclo de cogeração (CHP), de forma que o potencial de recuperação energética foi diferenciado nos componentes de geração elétrica (PGE_{CH_4}) e térmica (PGC_{CH_4}).

Os PE_{CH_4} obtidos foram de $9,2 \text{ MJ.kg}^{-1} \text{ RSL}$ para V-1, $9,7 \text{ MJ.kg}^{-1} \text{ RSL}$ em V-2, e de $10,4 \text{ MJ.kg}^{-1} \text{ RSL}$ em V-3 (Figura 7.14). O poder calorífico inferior dos resíduos sólidos de citros é estimado ser de $16,97 \text{ MJ.kg}^{-1}$ (Tamelová et al., 2018), e para águas residuárias Korth et al. (Korth et al., 2017) reportaram um conteúdo energético médio de $13,0 \text{ kJ.g}^{-1} \text{ DQO}$, desta forma levando em consideração as condições experimentais (concentrações de RSL e de ARL) dos ensaios V-1, V-2 e V-3, estima-se que a produção de metano obtida possibilitou uma recuperação de 49,0%, 52,0% e 55,5%, respectivamente, do conteúdo energético contido nos substratos.

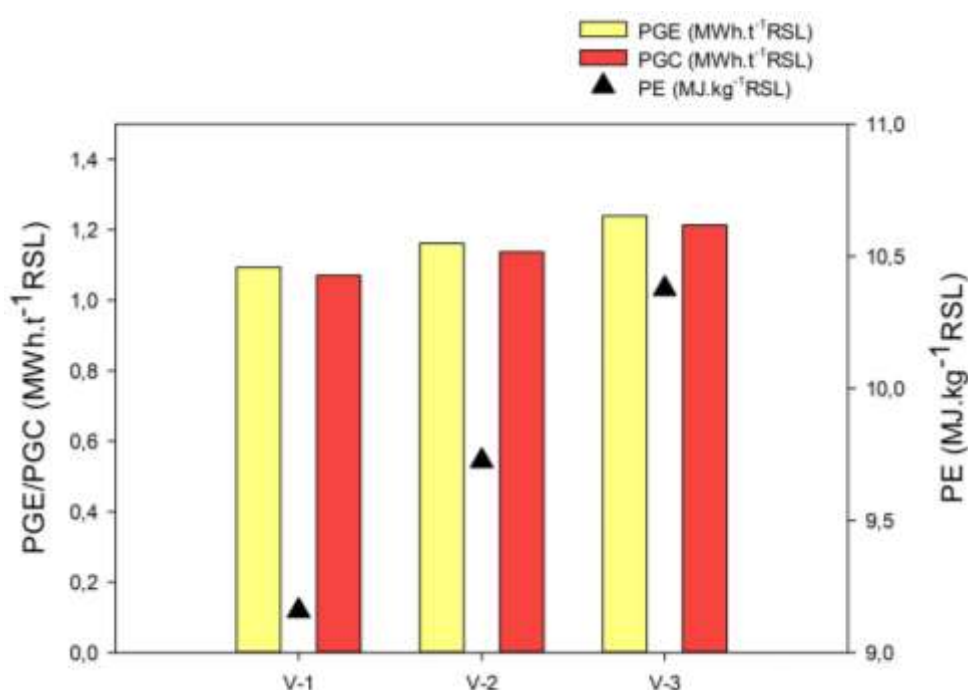


Figura 7.14. Potencial Energético (PE_{CH_4}), Potencial de Geração de Eletricidade (PGE_{CH_4}), e Potencial de Geração de Calor (PGC_{CH_4}) para as condições experimentais dos ensaios V-1, V-2 e V-3.

Para a condição V-1 o PGE_{CH_4} foi de $1,09 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ e o PGC_{CH_4} de $1,07 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ (total de $2,16 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$), para V-2 o PGE_{CH_4} foi de $1,16 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ e o PGC_{CH_4} de $1,14 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ (total de $2,30 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$), enquanto para V-3 obteve-se um PGE_{CH_4} de $1,24 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ e PGC_{CH_4} de $1,21 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$ (total de $2,45 \text{ MWh.t}^{-1} \text{ RSL}$) (Figura 7.14). Observa-se que as diferentes condições avaliadas para o segundo estágio do processo resultam em diferenças na recuperação energética obtida; para V-3 a recuperação energética foi 13,3% superior a V-1 e 6,7% superior a V-2, enquanto que para V-2 foi 6,2% superior a V-1.

Em modelo de economia circular a ideia é realizar o aproveitamento da energia gerada a partir da co-digestão dos resíduos em processos com demanda dentro da própria indústria. No contexto das indústrias de processamento de citros para produção de suco há demandas, tanto de eletricidade, como de calor, nos processos de extração, pasteurização, resfriamento, concentração e refrigeração do suco, assim como na centrifugação da emulsão de água e óleo para obtenção de óleos essenciais (Beccali et al., 2010), e também para secagem dos resíduos de casca e bagaço (Knudsen et al., 2011). Com base nos dados de Galvagno et al. (2019) que analisaram as demandas de uma fábrica real de sucos, estima-se um consumo de 0,122 MWh de eletricidade e 0,531 MWh de calor por tonelada de frutas processadas. Para uma tonelada de frutas processadas há uma geração próxima de 0,12 toneladas de resíduos sólidos (cascas + bagaço) secos com umidade < 20%, tal como utilizado nos experimentos do presente estudo. Considerando esta geração de resíduos secos por tonelada de frutas processadas, os PGE_{CH_4} obtidos no presente estudo poderiam suprir toda demanda de eletricidade relativa ao processamento, enquanto os PGC_{CH_4} poderiam contribuir de 24,2% a 27,5% com a demanda de calor da planta de processamento.

Em relação aos aspectos econômicos da recuperação energético dos resíduos de citros foi realizado um balanço simplificado com base nos ganhos relacionados à geração de eletricidade (US\$ 92,51 por MWh (EPE, 2021)) e calor (US\$ 102,25 por MWh, baseado na utilização do gás natural 22,4 US\$.MMBtu⁻¹ (MME - Ministério de Minas e Energia, 2022)), e nos custos relativos ao consumo de bicarbonato de sódio para alcalinização. Foi observado que para a condição experimental relativa ao ensaio V-3 obteve-se um lucro de 150,55 US\$.t⁻¹ RSL, o maior dentre as condições avaliadas (Figura 7.15), decorrente principalmente de um menor consumo de alcalinizante (0,30 gNaHCO₃.g⁻¹DQO) que resultou em um custo de 43,6 US\$.t⁻¹ RSL, enquanto que para V-2 este custo foi de 49,85 US\$.t⁻¹ RSL de forma que o lucro calculado foi de 123,0 US\$.t⁻¹ RSL, e para V-1 o custo com alcalinização foi de 84,2 US\$.t⁻¹ RSL impactando no lucro que foi estimado em apenas 40,5 US\$.t⁻¹ RSL.

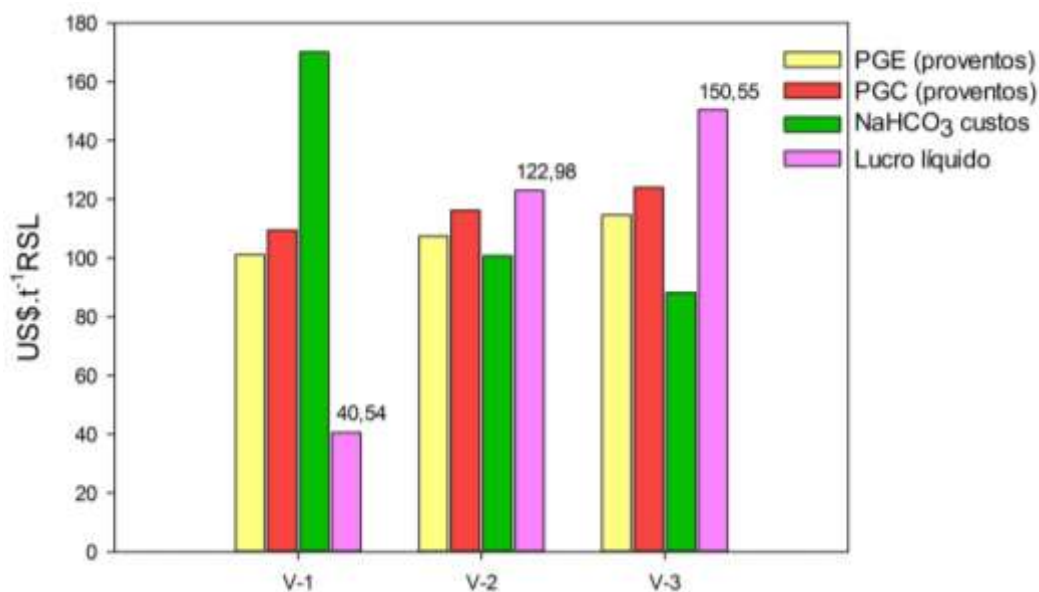


Figura 7.15. Balanço econômico relativo a recuperação energética nos ensaios V-1, V-2 e V-3, incluindo ganhos relativos ao PGE_{CH_4} e PGC_{CH_4} , e custos associados a alcalinização.

7.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A condição ótima para produção acumulada de metano para o segundo estágio do processo de co-digestão de resíduos de citros foi 99,3% de conteúdo do reator fermentativo (CRF) e 0,58 $gNaHCO_3 \cdot g^{-1}DQO$, conduzindo a obtenção de $6549,7 mL \cdot L^{-1}$, resultando em rendimento de $308,2 mLCH_4 \cdot g^{-1}STV_{RSL}$. A condição de otimização simultânea para P e $rDQO$, foi 72,3% de CRF, e 0,30 $gNaHCO_3 \cdot g^{-1}DQO$, sendo obtida produção de $5403,4 mLCH_4 \cdot L^{-1}$, entretanto, resultando em maior rendimento $349,2 mLCH_4 \cdot g^{-1}STV_{RSL}$.

Para o ensaio da condição otimizada de produção acumulada de H_2 observou-se elevada remoção de sólidos totais voláteis (STV) (58,6%), resultante da hidrólise dos resíduos sólidos de citros (RSL) ao longo do processo, sendo detectada elevada disponibilização de matéria orgânica solúvel, possibilitando que o rendimento alcançado fosse de $308,2 mLCH_4 \cdot g^{-1}STV_{RSL}$.

De forma geral as vias metabólicas acetogênicas de conversão dos ácidos butírico e propiônico a acético foram observadas com relevante importância para que o processo metanogênico ocorresse de forma satisfatória, sem a acumulação destes metabólitos intermediários.

Para o ensaio de validação da condição de otimização do potencial de produção de hidrogênio foi verificado o acúmulo de metanol, com manutenção de concentração residual de

1053 mg.L⁻¹ ao final do ensaio, sendo provável causa a supressão da atividade das vias metilotróficas dependentes de H₂ devido a competição por H₂ com as vias hidrogenotróficas.

Elevada abundância de microrganismos hidrolíticos e acidogênicos (*AUTHM297*, *Lachnospiraceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Hydrogenispora*) foi identificada nos ensaios, destacando a importância do processo de hidrólise dos resíduos sólidos de citros disponibilizando carboidratos simples para conversão à ácidos orgânicos, aumentando a eficiência do processo metanogênico.

De forma geral a ocorrência das vias metabólicas metanogênicas acetoclástica (*Methanosarcina*, *Methanosaeta*, *Candidatus Methanofastidiosum*), hidrogenotrófica (*Methanoregula*, *Methanolinea*, *Methanobacterium*), e metilotróficas (*Methanomassiliicoccus*, *Candidatus Methanomethylicus*, *Methanofolis*) foram observadas com base no perfil de metabólitos ao longo dos ensaios e na estrutura da comunidade microbiana. Considerando o sinergismo existente entre arqueias metanogênicas relacionadas a estas diferentes vias e bactérias acidogênicas e acetogênicas, no que se refere à relação entre produtos e substratos, o desenvolvimento destes três metabolismos foi fundamental para o processo de digestão dos resíduos de citros.

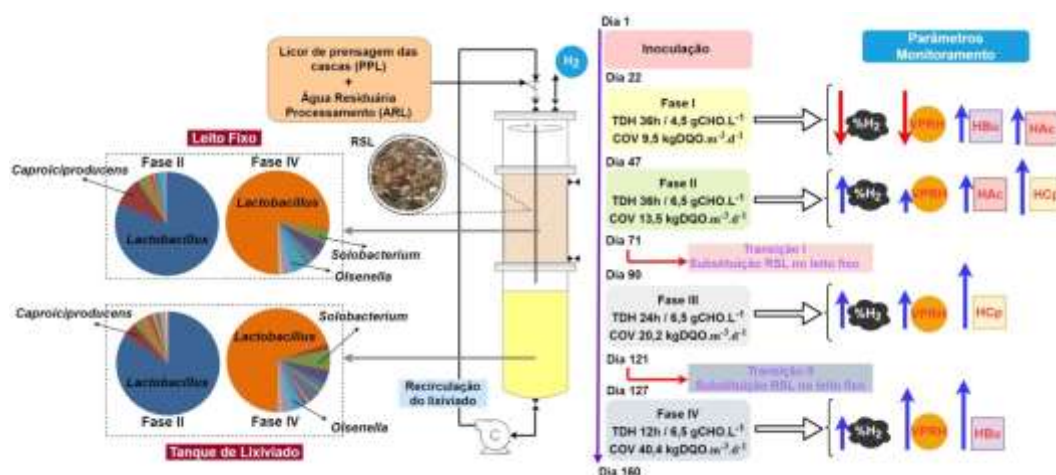
Um potencial energético (PE_{CH₄}) máximo de 10,4 MJ.kg⁻¹RSL foi estimado com base na condição otimizada de produção de metano e remoção de matéria orgânica, representando recuperação de 55,5% do conteúdo energético dos substratos, com estimativa de potencial de geração de eletricidade de 1,24 MWh.t⁻¹RSL, e potencial de geração de calor de 1,21 MWh.t⁻¹RSL.

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que o sistema de dois estágios pode ser aplicado com sucesso para a co-digestão anaeróbia de resíduos da agroindústria de citros, permitindo maximizar a recuperação energética por meio da operação em condições otimizadas, tanto para produção de hidrogênio no primeiro estágio, como para produção de metano no segundo. Assim como possibilita elevada redução do conteúdo de sólidos e a obtenção de digestato com reduzida concentração de matéria orgânica solúvel. Maior investigação é necessária acerca da viabilidade do processo em sistemas contínuos em escala piloto e industrial, avaliando qual a melhor alternativa tecnológica em termos técnicos e econômicos.

CAPÍTULO 8

Co-digestão de resíduos sólidos e líquidos da agroindústria de citros: Efeito do tempo de detenção hidráulica e carga orgânica volumétrica sobre a produção de H_2 em reator de leito lixiviado em operação contínua

Resumo: A aplicação do reator de leito lixiviado (RLL) é alternativa promissora para a digestão anaeróbia simultânea de resíduos sólidos e líquidos. O RLL foi operado de forma contínua em quatro fases distintas, a 37°C . Nas fases I e II (TDH de 36h) avaliou-se a influência do aumento da concentração de carboidratos ($4,0$ para $6,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) na produção de hidrogênio. Nas fases III e IV ($6,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$) avaliou-se o efeito da redução do TDH (24h e 12h , respectivamente). Em TDH de 36h o aumento da concentração de carboidratos na alimentação do reator na fase II ($6,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$) resultou em maior produção de hidrogênio ($582,6 \text{ mLH}_2.\text{d}^{-1}$) comparada à fase I ($38,9 \text{ mLH}_2.\text{d}^{-1}$) com $4,0 \text{ gCHO.L}^{-1}$. Entretanto, máxima produção de hidrogênio foi observada em TDH de 24h na fase III ($1128,0 \text{ mLH}_2.\text{d}^{-1}$) e 12h na fase IV ($1609,9 \text{ mLH}_2.\text{d}^{-1}$). Todavia, em TDH de 12h (fase IV) ocorreu redução no rendimento de hidrogênio ($80,4 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{CHO}$) em comparação ao TDH de 24h ($104,9 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{CHO}$). Nas fases II e III observou-se elevada concentração de ácido capróico, $1,76 \pm 0,94 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,93 \pm 0,95 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Enquanto, para a fase IV observou-se maior concentração de ácido butírico ($1,64 \pm 0,75 \text{ g.L}^{-1}$) e etanol ($0,82 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$). Com base no metabolismo dos microrganismos identificados em maior abundância, como *Lactobacillus*, *Caproiciproducens*, *Bifidobacterium*, *Olsenella* e *Solobacterium*, inferiu-se sobre rotas de alongamento de cadeia na produção dos ácidos butírico e capróico, com produção de hidrogênio resultante da oxidação do ácido láctico.



8.1.Introdução

O contínuo aumento na demanda por energia tem impulsionado nas últimas décadas a busca por novos combustíveis e recursos energéticos. Associado a isso as emergentes preocupações em relação às mudanças climáticas decorrentes das emissões antrópicas de gases de efeito estufa impulsionam a necessidade de investimentos em energia renovável (Julio et al., 2022; Liao e Roc, 2020). Neste cenário o hidrogênio é tratado como um combustível promissor para geração de eletricidade e para propulsão veicular, em razão de sua combustão livre de carbono e sua elevada densidade energética específica (Rievaj et al., 2019; Rocha et al., 2021; Yue et al., 2021).

A produção de H₂ por meio da fermentação escura tem sido investigada com a utilização de ampla variedade de substratos (Bundhoo, 2019; Dahiya et al., 2021), tais como açúcares simples como glicose e sacarose (Han et al., 2011; Zhang et al., 2015), e com maior interesse empregando águas residuárias industriais (Fernandes et al., 2010; Fuess et al., 2016) e diferentes biomassas lignocelulósicas (Rabelo et al., 2018; Villa Montoya et al., 2020a). Neste contexto, os resíduos sólidos e águas residuárias da agroindústria de citros têm sido ainda discretamente avaliados como potenciais substratos para produção de H₂ (Abd-Alla et al., 2018; Camargo et al., 2021a; Torquato et al., 2016; Mohan et al., 2009), apesar de seu alto teor de açúcares simples como glicose, frutose e sacarose, e também polissacarídeos como pectina, celulose e hemicelulose (Calabró et al., 2018; Forgács et al., 2012; Rosas-Mendoza et al., 2020). Destaca-se que a produção anual de citros é superior a 75 milhões de toneladas por ano, e que há geração de 500 – 600 kg de resíduos sólidos (cascas, bagaços, sementes) por tonelada de laranjas processadas (Calabrò e Panzera, 2018; FAO, 2019), e estima-se que seja gerada em média 0,80 – 1.25 m³ de água residuária a cada 1 tonelada de frutas processadas (Mendoza et al., 2018; Rosas-Mendoza et al., 2020).

Estudos com aplicação de configurações de reatores contínuos no intuito de investigar e otimizar o processo fermentativo para produção biológica de H₂ a partir de resíduos da agroindústria de citros ainda são escassos. Avanços relacionados à identificação de melhores condições para obtenção de hidrogênio a partir de resíduos de citros têm sido predominantemente obtidos com o emprego de reatores em batelada. Por exemplo, Camargo et al. (2021a, 2019) avaliaram o efeito de pré-tratamentos nos resíduos sólidos de citrus e identificaram condições de pH e concentração de substrato ótimas para produção de H₂. Abd-Alla et al. (2018) avaliaram a remoção de limoneno, e a utilização de um hidrolisado dos

resíduos de citros como substrato nos ensaios fermentativos utilizando bactérias isoladas. O efeito da concentração de substrato também foi avaliado por Mohan et al. (2009) e Torquato et al. (2016), que empregaram extrato de cascas de laranja e água residuária do processamento, respectivamente.

A digestão anaeróbia (AD) de resíduos sólidos impõe muitas limitações para aplicação de configurações de reatores usualmente utilizados com águas residuárias. Neste contexto, o reator de leito lixiviado (RLL) (*Leach Bed Reactor* – LBR) é uma alternativa promissora para a AD de resíduos com elevado teor de sólidos, superando alguns inconvenientes de reatores usualmente utilizados, como por exemplo o CSTR (Xiong et al., 2019). Nesta configuração tem-se como principais vantagens sua simples e econômica operação, dispensa a utilização de equipamentos de agitação, e a separação sólido-líquido pós-fermentação (Bayrakdar et al., 2018; Demirer e Chen, 2008). Nesta configuração o substrato sólido é carregado no compartimento do reator, e a fase líquida aspergida sobre o leito sólido percolando através dele e atingindo o compartimento inferior de armazenamento do lixiviado. O lixiviado é recirculado, de forma contínua ou intermitente, do tanque inferior para o topo do reator, realizando ciclos de percolação através do leito de resíduos sólidos (Hussain et al., 2017; Riggio et al., 2017a).

O reator de leito lixiviado (RLL) é aplicado em estudos de digestão anaeróbia com diversos tipos de resíduos sólidos orgânicos. Xu et al. (2014) conduziram a digestão anaeróbia de resíduos de alimentos em reator de leito lixiviado operado em regime de batelada, e avaliaram práticas de recirculação contínua e intermitente do lixiviado, assim como diferentes razões sólido-líquido. A co-digestão de uma mistura de resíduos de cereais e cama de vaca foi avaliada por Riggio et al. (2017b) em um sistema com seis RLL operados em paralelo, investigando diferentes taxas de descarga de lixiviado, e otimização da degradação do substrato. A co-fermentação de fibra lignocelulósica de resíduos de dendê e dejetos de suínos foi conduzida em RLL operado em modo batelada por 60 dias por Saritpongteeraka et al. (2015). Sob tais condições, os autores identificaram que maiores intervalos entre as recirculações de lixiviado e maior proporção de dejetos de suínos proporcionaram aumento da hidrólise e produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV). Lu et al. (2008) aplicaram um sistema de dois estágios para co-digestão de resíduos de flores e vegetais, empregando um RLL no primeiro estágio para potencializar a etapa de hidrólise, e identificaram que a

recirculação de uma fração do efluente do reator metanogênico permitiu potencializar a hidrólise do substrato neste sistema reacional.

No presente estudo foi explorada a aplicação da configuração de reator de leito lixiviado em modo de operação contínuo para a co-fermentação de resíduos sólidos e líquidos da agroindústria de citros, avaliando-se o efeito da carga orgânica (COV) e do tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de hidrogênio e AOV. A abordagem de operação em modo contínuo, estabelecendo fases de operação com estratégia de substituição do leito fixo de forma cíclica, até então não tem sido reportada na literatura para esta configuração de reator. Sendo assim, o presente estudo buscou estabelecer estas condições operacionais para obter produção contínua de hidrogênio, apoiando a logística de recuperação energética a partir dos resíduos da agroindústria de citros. Por meio da caracterização da comunidade microbiana para diferentes fases de operação e compartimentos do RLL, buscou-se construir uma inferência das vias metabólicas predominantes e detalhar a distribuição espacial da comunidade microbiana no reator. Além disso, por meio de um balanço energético da produção de H₂ estimar o potencial de recuperação energética.

8.2.MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Substrato e Inóculo

Lodo granular de reator UASB mesofílico aplicado ao tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar - Tietê, São Paulo, Brasil) foi utilizado para inoculação do reator de leito lixiviado. O lodo granular foi triturado e submetido a tratamento térmico, 90°C por 15 minutos, seguido de choque térmico até atingir temperatura ambiente, conforme metodologia aplicada por Kim et al. (2006) e Menezes e Silva (2019). As características do lodo mesofílico utilizado são 6,87% m/m ST (68,7 gST/kg Lodo) e 5,94% m/m STV (59,4 gSTV/kg Lodo) e pH 7,15.

Os substratos empregados no estudo foram provenientes da agroindústria de processamento de laranjas para produção de suco, localizada na cidade de Matão – SP, Brasil. Os resíduos sólidos correspondem as cascas e bagaços das laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio) pós-extração mecanizada do suco, que foram secos em estufa a 50°C por 48h previamente a sua utilização. A caracterização dos resíduos sólidos após a secagem em estufa, podem ser verificados na Tabela 4.1 (página 36).

O substrato líquido utilizado na operação contínua do reator foi composto pela mistura de água residuária do processamento e do licor concentrado de prensagem das cascas, em proporções ajustadas de acordo com a concentração de carboidratos definida. A água residuária consiste no efluente líquido principal originado na indústria, sendo proveniente da lavagem das frutas e máquinas, e demais atividades de limpeza de rotina. O licor concentrado provém do efluente da prensagem mecânica das cascas e bagaço após sua passagem pelo evaporador de calor residual onde ocorre a volatilização de óleos essenciais e remoção de água, resultando em um licor com elevada carga orgânica e concentração de açúcares. A caracterização da água residuária e do licor concentrado pode ser verificada na Tabela 8.1.

Tabela 8.1. Caracterização da água residuária do processamento de citros e do licor de prensagem das cascas e bagaço.

Parâmetro	Água residuária	Licor de prensagem concentrado
pH	4,57	4,50
TS (mg.L ⁻¹)	4232,5	97802,0
TVS (mg.L ⁻¹)	3185,0	91101,8
SST (mg.L ⁻¹)	1950,0	43740,0
SSV (mg.L ⁻¹)	1750,0	41320,0
DQO bruta (g.L ⁻¹)	9,78	212,2
DQO Filtrada (g.L ⁻¹)	5,13	191,2
Carboidratos Totais (g.L ⁻¹)	0,54	93,2
Carboidratos Solúveis (g.L ⁻¹)	0,11	85,2
Fenóis Totais (g.L ⁻¹)	0,45	13,2
EtOH (mg.L ⁻¹)	354,5	177,5
HAc (mg.L ⁻¹)	530,6	742,5
HPr (mg.L ⁻¹)	115,5	26,0
HBu (mg.L ⁻¹)	274,1	283,0
HVa (mg.L ⁻¹)	140,0	185,6

8.2.3 Configuração e montagem do reator de leito lixiviado

Os experimentos foram conduzidos em um RLL cilíndrico construído em acrílico com fundo cônico, com altura total de 70 cm e 8,5 cm de diâmetro, e equipado com conectores de engate rápido para conexão de mangueiras de poliuretano (8 e 6 mm). Como pode ser visualizado na Figura 8.1 o reator é dividido em três compartimentos principais, o *headspace* no topo do reator (0,68 L), um tanque de armazenamento do lixiviado na parte inferior (1,68 L), e um leito fixo de resíduos (1,5 L) confinado em uma câmara central, sendo sustentado por uma tela metálica com malha de 2 mm. Um tubo de inox de 6 mm de diâmetro conecta o tanque de lixiviado ao *headspace* do reator, no intuito de equalizar a pressão entre os

compartimentos do reator a medida que o leito de resíduos torna-se suficientemente compacto, evitando o aprisionamento de biogás no compartimento inferior do reator.

Como pode ser verificado no aparato experimental apresentado na Figura 8.1, o sistema é equipado por duas bombas, sendo uma para manter a recirculação do lixiviado, e outra para realizar a alimentação de substrato líquido no sistema. No sistema de recirculação do lixiviado uma bomba dosadora de acionamento eletromagnético de diafragma foi utilizada, levando lixiviado do tanque de armazenamento para o topo do reator, onde é feita a aspersão sobre o leito de resíduos. O sistema de alimentação de substrato foi realizado por meio de uma bomba peristáltica, para bombeamento do substrato líquido, o qual era armazenado em refrigerador a 4°C, para o topo do reator, onde também foi realizada sua aspersão sobre os resíduos. O biogás produzido foi coletado na parte superior do reator, passando por um selo hidráulico com solução salina, sendo direcionado ao sistema de quantificação volumétrica.

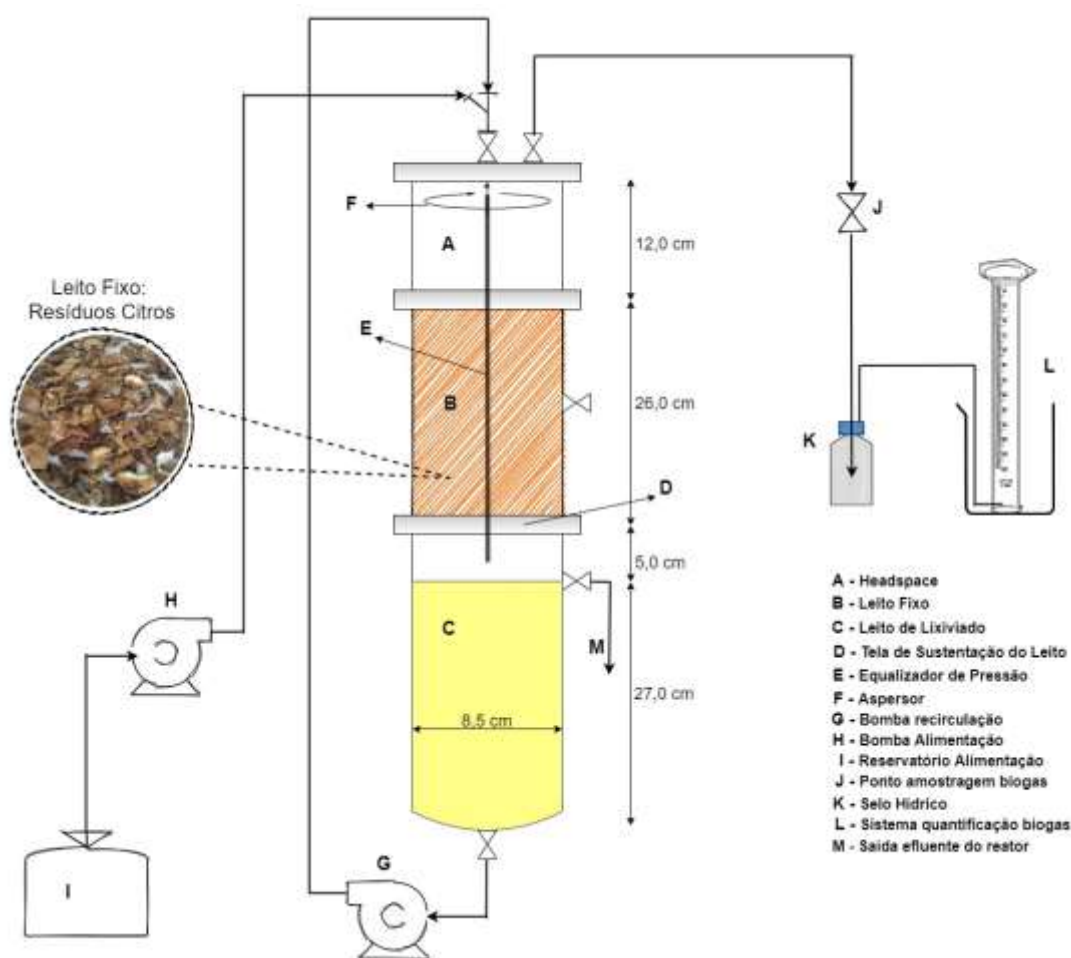


Figura 8.1. Aparato experimental do RLL acidogênico, operado em modo contínuo.

8.2.4 Modo de operação

O leito fixo do RLL foi preenchido com 200 g (massa seca) de resíduos sólidos de citros, o que corresponde a aproximadamente 175 g de ST. Argila expandida com diâmetro de 1 cm foi misturada com o RSL no leito, em proporção volumétrica de 1:1, sendo um material inerte para enchimento do compartimento e minimizar a compactação do substrato e a formação de canais preferenciais de percolação do lixiviado. A substituição do RSL no leito fixo foi realizada de forma cíclica à medida que se observou o entupimento do leito impedindo a percolação do lixiviado, levando ao acúmulo de líquido na parte superior do leito fixo. Para tanto, o reator foi equipado com uma tampa removível para carregamento e descarregamento dos resíduos.

Na fase de inoculação o reator foi operado em modo batelada (20 dias), com recirculação em circuito fechado. Tal processo foi realizado a partir de um reservatório externo (mantido sob refrigeração a 4°C) com volume de 6 L contendo substrato líquido (água residuária + licor concentrado) e 5% v/v de lodo que foi submetido ao tratamento térmico. Durante este período as concentrações de carboidratos e ácido láctico, além do pH foram monitoradas até que fosse observado o estabelecimento de um patamar residual de substrato.

Após a etapa de inoculação (INC) o RLL foi operado em modo contínuo por 140 dias, em 4 diferentes fases operacionais. As estratégias de operação do reator consistiram em aumentar a concentração de carboidratos totais da alimentação de substrato líquido, com aumento da proporção de licor concentrado na mistura com a água residuária, de 4,0 gCHO.L⁻¹ na fase I, para 6,5 gCHO.L⁻¹ na fase II, e redução do TDH de 36 h (fase II), para 24h (fase III) e 12 h (fase IV), promovendo um aumento da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada, sendo observado a estabilização dos parâmetros de monitoramento entre as mudanças de fases. Detalhes das condições operacionais estão apresentados na Tabela 8.2.

Tabela 8.2. Condições operacionais aplicadas ao reator de leito lixiviado (RLL)

Fase Operação	HRT ^a (h)	Período (d)	Substrato líquido ^a (gCHO.L ⁻¹)	OLR ^a (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	NaHCO ₃ .g ⁻¹ CHO _t
INC	-	1 - 21	-	-	-
I	36	22 - 46	4,5	9,5	0,50
II	36	47 - 70	6,5	13,5	0,30
T-I	-	71 - 89	-	-	-
III	24	90 - 120	6,5	20,2	0,30
T-II	-	121 - 126	-	-	-
IV	12	127 - 159	6,5	40,4	0,30

INC: período de inoculação; T-I e T-II: períodos de transição após substituição do leito fixo. ^a: valores teóricos

Na etapa de inoculação (INC), assim como em todas as fases operacionais contínuas (I, II, III, e IV), foi fixada uma taxa de 12 recirculações por dia, calculada com base no volume do tanque de armazenamento de lixiviado, proporcionando suficiente contato sólido-líquido por meio da percolação do lixiviado pelo leito de resíduos.

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi adicionado ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) ao substrato líquido utilizado na alimentação do reator, no intuito de fornecer capacidade tamponante ao meio líquido, controlando o pH operacional em valores próximos a 5,0. O reator foi mantido em câmara climatizada em temperatura controlada de 37°C .

8.2.5 Amostragem, análises, e métodos analíticos

O monitoramento do reator foi baseado na medida diária dos seguintes parâmetros para a fase líquida: demanda química de oxigênio solúvel (DQOs) (APHA/AWWA/WEF, 2012), carboidratos totais (CHOt) e solúveis (CHOs) (Dubois et al., 1956), ácidos orgânicos voláteis (AOVs) e solventes (Adorno et al., 2014), ácido láctico (HLA) (Taylor, 1996), fenóis totais (FT) (Buchanan e Nicell, 1997) e pH (APHA/AWWA/WEF, 2012). Sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), e sólidos suspensos voláteis (SSV) (APHA/AWWA/WEF, 2012), foram quantificados duas vezes por semana. As análises de CHOs, fenóis e DQOs foram realizadas para amostras filtradas em filtro de seringa $0,45 \mu\text{m}$. O peso seco (APHA/AWWA/WEF, 2012) dos resíduos foi quantificado antes de sua adição e após sua remoção do leito do reator. Análise de amostras da biomassa lignocelulósica para sua caracterização quanto ao conteúdo de lignina, hemicelulose, celulose, cinzas e extrativos foi realizada baseado na metodologia de análise de fibras em detergente descrita por Van Soest (1967, 1963).

A composição e volume do biogás foram monitorados diariamente; amostras $500 \mu\text{L}$ de biogás do *headspace* do reator foram coletadas utilizando seringa equipada com trava de pressão, e a composição do biogás (H_2 , CH_4 , e CO_2) analisada por cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar CarboxenTM 1010 PLOT ($30 \text{ m} \times 0,53 \text{ mm}$, Supelco), gás de arraste argônio (12 mL.min^{-1}), temperatura do injetor de 220°C , 130°C para coluna e 230°C no detector). A produção volumétrica de biogás foi monitorada de forma descontínua através do método de deslocamento de coluna empregando uma solução salina acidificada, conforme Walker et al. (2009), sendo realizadas três medidas diárias para obtenção de uma média representativa da produção ao longo do dia.

8.2.7 Análise dos dados

Uma série de variáveis de resposta para avaliar o desempenho do reator foram obtidas com base nos parâmetros de monitoramento, sendo elas a conversão de carboidratos totais (EC_{CHO}), conversão de ácido láctico (EC_{HLA}), taxa produção de hidrogênio (HFR), taxa de produção volumétrica de hidrogênio (VPRH) dada em $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$ Eq.(1), e rendimento de hidrogênio (HY) em termos de carboidratos consumidos do em $mLH_2.g^{-1}CHO$ Eq.(2).

$$VPRH = \frac{V_B \cdot \%H_2}{V_U} \quad (1)$$

$$HY = \frac{V_B \cdot \%H_2}{CHO_C} \quad (2)$$

Sendo V_B o volume de biogás produzido por dia (L biogas.d⁻¹), $\%H_2$ o percentual de hidrogênio na composição do biogás, V_U o volume útil do reator (L), e CHO_C os carboidratos consumidos por dia (gCHO.d⁻¹).

Os softwares Minitab[®] 19.1 e STATISTICA 10 foram utilizados para análise estatística dos dados experimentais, avaliando a diferença estatística das variáveis resposta entre as fases de operação, empregando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, para que os testes estatísticos mais adequados pudessem ser aplicados ao conjunto de dados. Para séries de dados com distribuição normal as respostas foram comparadas por meio do teste ANOVA e teste de Tukey, para séries de dados cuja normalidade não foi constatada para sua distribuição as respostas foram comparada pro meio do teste de Kruskal-Wallis, e teste de Dunn estabelecendo comparações múltiplas.

8.2.6 Potencial Energético

A estimativa de recuperação energética resultante da produção de H_2 nas diferentes fases operacionais do reator de leito lixiviado foi padronizada com referência a uma unidade métrica (m³) de licor de prensagem concentrado, visto que este representou a principal fonte de fornecimento de carboidratos ao processo fermentativo. O potencial energético do hidrogênio - PE_{H_2} (MJ.m⁻³licor) foi calculado por meio da Eq. (3), sendo a variável CHO_{Licor} refere-se à concentração de carboidratos no licor de prensagem concentrado, PCI_{H_2} o poder

calorífico inferior do H₂ (10,8 MJ.m⁻³) (Goldmeer, 2019), e as variáveis EC_{CHO} e HY já descritas anteriormente.

$$PE_{H_2} = HY \cdot PCI_{H_2} \cdot CHO_{Licor} \cdot EC_{CHO} \cdot 10^{-3} \quad (3)$$

$$PPE_{H_2} = \frac{PE_{H_2} \cdot \eta}{3600} \quad (4)$$

Para estimativa do potencial de produção de eletricidade - PPE_{H₂} (MJ.m⁻³licor) com base na Eq. (4), foi considerada uma eficiência (η) de 60% para conversão elétrica em células combustível (DOE Energy Efficiency And Renewable Energy Information Center, 2006; Shabani e Andrews, 2015).

8.2.7 Análise de biologia molecular

Extração e sequenciamento do DNA genômico foram realizados para amostras coletadas do leito fixo de resíduos e do tanque de lixiviado ao final das fases II e IV. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm - 6 minutos), e solução PBSX1 (NaCl 8,2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,05 g.L⁻¹, NaH₂PO₄ + H₂O 0,35 g.L⁻¹) foi empregada para lavagem do pellet de biomassa. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals). A integridade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 0,8% e a quantificação (ng/μL) e a pureza (relação 260/280nm) foi realizado no Nanodrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa ByMyCell Genomics Made Simple (Ribeirão Preto-SP, Brazil). Amostras de DNA foram submetidas a preparação da biblioteca de amplicons, seguido da amplificação com set primer 341F-806R dos genes 16S rRNA região V3-V4. Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento em plataforma Illumina NovaSeq6000 PE 250. A avaliação das sequências foi realizada utilizando Qiime2 (v2022.2.0). Na análise dos dados brutos, sequências de comprimento insatisfatório e chimeras foram removidos. Os *reads* curados foram utilizadas na definição dos ASV (*Amplicon Sequence Variant*). Em seguida as *reads* foram mapeadas usando o banco de dados de RNAr 16S de referência (Silva 138 Full Length). As sequências foram submetidas ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob número de acesso PRJNA909578. As bases de dados BRENDA (BRENDA Enzyme Database, 2022) e KEGG (KEGG Pathway Database, 2022) foram utilizadas para inferência das vias metabólicas.

8.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.3.1 Degradação dos resíduos sólidos e desempenho do reator

O reator de leito lixiviado (RLL) foi continuamente alimentado com uma mistura de água residuária e licor de prensagem concentrado, com proporção baseada na concentração de carboidratos totais contidos na composição de cada um deles, visando atender a concentração de substrato fixada para a respectiva fase operacional. O leito fixo composto por resíduos sólidos de citros e argila expandida (proporção 1:1 em volume) foi inicialmente adicionado ao reator previamente no período de inoculação (INC: 0-20 dias), sendo substituído por necessidade de forma cíclica.

Durante o período de 160 dias de operação foram realizadas duas substituições do leito fixo em resposta à colmatagem e compactação da estrutura do leito, que levaram primeiramente à maior resistência à percolação da alimentação e do lixiviado em recirculação, e posteriormente ao impedimento total causando acúmulo de líquido no topo do leito fixo. Tal comportamento era esperado para um longo período operacional, em virtude da fragmentação e degradação dos sólidos orgânicos do leito, caracterizados inicialmente em partículas (~1 cm), sendo conduzidos a uma condição que se assemelha a uma lama (*slurry*). Vale ressaltar que o tempo observado para que seja necessária a substituição do preenchimento de resíduos no leito difere em decorrência das especificidades de cada tipo de resíduo utilizado.

Riggio et al. (2017a) ao avaliarem diferentes “spent beddings” coletadas de estábulos de ovelhas, cabras, cavalos e vacas como leito fixo para a digestão anaeróbia em reator de leito lixiviado, reportaram que após 60 dias de operação quando o processo foi então finalizado, houve comportamento similar ao que foi observado no presente estudo em relação à compactação e redução da capacidade de percolação do lixiviado no leito. Os autores relataram que a presença da palha e mistura de resíduos no leito foi determinante no processo para garantir uma estrutura favorável à percolação do lixiviado, mas que a perda de rigidez das fibras da palha com o decorrer do processo foi determinante no comprometimento da estrutura e porosidade do leito. Riggio et al. (2017a) não empregaram materiais de enchimento no leito para auxiliar na estruturação, visto que a palha presente nos resíduos cumpriu tal função. Devido às características dos resíduos utilizados no presente estudo, a utilização da argila expandida como material de enchimento foi fundamental para garantir boas condições de operação, assim como em outros estudos que avaliaram diferentes materiais de enchimento para composição do leito, tal como lascas de madeira (Demirer e

Chen, 2008) e cascas de pistache (Myint e Nirmalakhandan, 2009). Visando prolongar ainda mais as boas condições de percolação de lixiviado pelo leito e garantir maior degradação dos resíduos sólidos ali contidos, outros materiais de enchimento combinados aos resíduos de citros podem ser avaliados, sendo possível explorar materiais inertes no processo, tal como, a argila expandida; ou ainda, resíduos com características complementares favoráveis a estruturação do leito, e que sejam degradados no processo, tal como a palha.

A primeira troca dos resíduos de citros no leito foi realizada 71 dias após o início da operação, ao final da Fase II, e uma segunda troca ocorreu posteriormente com 50 dias (dia 121 de operação). A substituição cíclica do leito fixo foi avaliada como estratégia operacional para possibilitar a manutenção de uma operação contínua do RLL. A manutenção da elevada concentração de biomassa microbiana no tanque de lixiviado, com uma contínua recirculação e percolação através do “novo leito” garantiu o reestabelecimento do desempenho operacional do reator após um curto período de transição. Após a primeira troca de resíduos sólidos do leito (dia 71), um período de transição (T-I) com duração de 19 dias foi estabelecido até que fosse observada a recuperação de alguns parâmetros operacionais de monitoramento, como pH, remoção de carboidratos, produção de biogás, a níveis satisfatórios, tendo como base o monitoramento da fase de operação anterior. Posteriormente, a segunda troca de resíduos sólidos do leito (dia 121), um novo período de transição foi delimitado (T-II) com duração de apenas 6 dias, sendo observada rápida recuperação do desempenho operacional do reator.

Os sólidos iniciais e finais do leito fixo do RLL foram quantificados de forma que a diferença foi identificada como a remoção promovida pela hidrólise/degradação dos resíduos ao longo do processo. Após a primeira troca de leito realizada ao final da fase II quantificou-se 41,5 g de RSL em peso seco, 35,9 gST e 34,5 gSTV, o que representou 79,3% de remoção de ST em período de residência dos resíduos no reator de 70 dias. Ao final da fase III, quando o leito foi substituído após 50 dias de residência no reator, uma massa de 85,8 g de RSL em peso seco foi quantificada, com 74,3 gST e 71,2 gSTV, atingindo assim redução de 57,1% do conteúdo de sólidos do leito fixo. Já ao final da operação 77,0 g de RSL em peso seco, com 66,7 gST e 63,9 gSTV, após 40 dias de operação, observou-se a remoção de 61,5% de sólidos.

Caracterização analítica dos resíduos sólidos de citros foi realizada para amostras antes da operação e outra coletada ao final da fase II. Sob tais condições foi possível verificar modificações importantes em sua composição em relação aos teores de lignina, celulose e hemicelulose. Para a amostra dos resíduos pré-operação do reator observou-se conteúdo de

11,4% de hemicelulose, 19,4% de celulose e 5,5% de lignina, com 0,9% de cinzas. Em relação a amostra coletada ao final da fase II verificou-se 20,0% de hemicelulose, 29,7% de celulose, e 2,8% de lignina, com aumento do percentual de cinzas para 7,1%. Verifica-se que o processo de hidrólise dos RSL no leito fixo do RLL resultou no aumento da proporção de hemicelulose, celulose e cinzas, sendo provável que a redução do conteúdo dos resíduos no leito foi possível devido à dissociação da complexa e recalcitrante matriz lignocelulósica da estrutura da parede celular em compostos mais simples como celulose e hemicelulose (Patria et al., 2022).

O maior período de residência dos resíduos (70 dias) é provável ter favorecido melhor remoção de sólidos do leito fixo para as fases I e II. Em relação a maior degradação de sólidos do leito na fase IV em comparação ao da fase III, mesmo com menor tempo de residência, é provável que outros fatores operacionais possam ter favorecido maior hidrólise. A taxa de recirculação do lixiviado é reportada como um fator importante no aumento da hidrólise dos resíduos do leito (Lu et al., 2008; Xu et al., 2014). No presente estudo fixou-se 12 recirculações.d⁻¹ para todo o período operacional, sendo provável esta taxa de recirculação, um dos fatores para a elevada remoção de sólidos. Fatores como pH e modificações na estrutura da comunidade microbiana também têm sido apontados como importantes no desempenho da degradação dos resíduos do leito (Cysneiros et al., 2012; Xiong et al., 2019).

A remoção de carboidratos no RLL permaneceu entre $95,0 \pm 0,8\%$ (Fase II) e $88,2 \pm 2,7\%$ (Fase IV), todavia, para as fases II e III observou-se menor amplitude e dispersão para este parâmetro durante o período de operação, indicando maior estabilidade operacional (Figura 8.2a). O aumento da concentração de substrato entre as fases I ($4,0 \text{ gCHO.L}^{-1}$) e II ($6,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$) não resultou em efeito negativo no que se refere à diminuição do rendimento da utilização do substrato (Tabela 8.3), pelo contrário, houve aumento da eficiência de remoção de carboidratos. O aumento da concentração de substrato entre as fases I e II se alinha com resultados reportados na literatura, nos quais são descritas respostas positivas em relação à eficiência de conversão de substrato em reatores contínuos acidogênicos com aumento da concentração de substrato em determinada faixa (Ottaviano et al., 2016), sendo avaliado como necessário o aumento da sua concentração no intuito de atingir maior produção volumétrica de H₂ (Lukajtis et al., 2018).

A redução do TDH avaliado entre as fases II (36h), III (24h) e IV (12h), ocasionou ligeira e gradativa diminuição da remoção de carboidratos à medida que o TDH foi reduzido.

Assim como observado em outros estudos que empregaram diferentes configurações de reatores contínuos com substratos ricos em carboidratos visando à produção de H_2 , também identificaram diferentes respostas em relação ao comportamento da remoção de carboidratos com a variação do TDH, sendo muito dependente da configuração do reator e da característica do substrato (Ghimire et al., 2015).

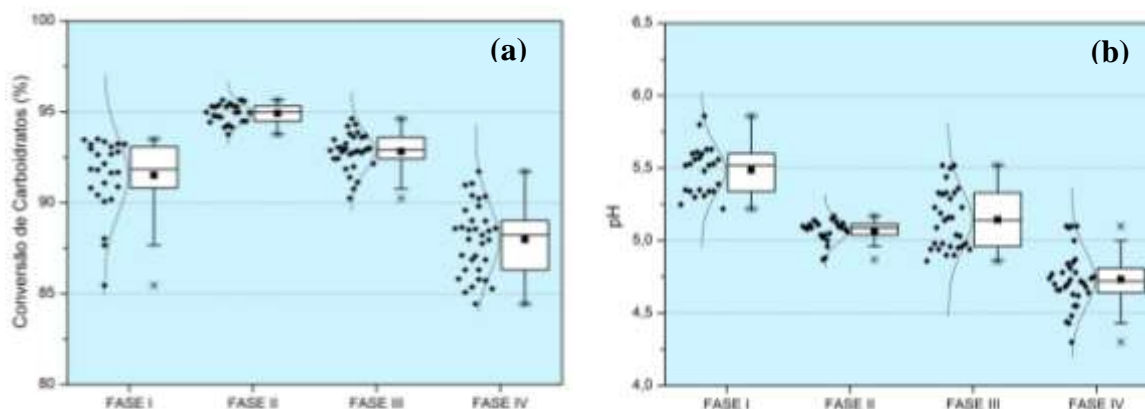


Figura 8.2. Performance do RLL nas diferentes fases operacionais: (a) eficiência da remoção de carboidratos (EC_{CHO} , %), (b) pH operacional.

Observou-se diminuição significativa da eficiência de remoção de carboidratos ao longo da operação, e posteriormente à substituição dos resíduos de citros no leite. Identificou-se uma elevada liberação de carboidratos solúveis a partir dos resíduos sólidos de citros para o meio líquido nas primeiras 24h e após a adição de novos resíduos ao leite, em decorrência do contato sólido-líquido promovido pela percolação da alimentação e da recirculação do lixiviado (Figura 8.3a). Após substituições do leite verificou-se liberação de $12,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$ (após primeira troca de leite) e de $8,5 \text{ gCHO.L}^{-1}$ (após segunda troca de leite), tendo como base a relação de equivalência de $1,07 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{CHO}$, sendo observado nos dias subsequentes uma normalização com menor variação na matéria orgânica afluenta e efluente. Um padrão com gradativa recuperação da remoção de carboidratos é observada ao longo dos dias durante os períodos de transição T-I e T-II, reestabelecendo níveis de remoção próximos a 90%.

É provável que este pico na concentração de substrato seja determinante para a diminuição significativa da remoção de carboidratos, após a troca do leite fixo, causando uma sobrecarga no sistema. O período de transição mais curto (6 dias) observado após a segunda substituição do leite (T-II) pode estar associado ao menor TDH, neste período, em comparação a primeira substituição, promovendo maior diluição dos açúcares liberados pelos RSL, em decorrência da maior vazão ao sistema. A remoção do biofilme estabelecido no leite

fixo substituído é provável ser outro fator importante para a redução da eficiência, logo após a substituição, entretanto a elevada taxa de recirculação do lixiviado (12 recirculação.d⁻¹) garantiu rápida formação de biofilme aderido ao novo leito de resíduos e argila expandida, visivelmente observado, reestabelecendo uma condição com alta densidade de microrganismos.

Tabela 8.3. Desempenho geral do RLL nas quatro fases operacionais.

Parâmetros de Operação	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
pH afluente	6,23 (±0,10)	6,00 (±0,11)	6,14 (±0,19)	6,06 (±0,11)
pH operacional	5,52 (±0,26)	5,09 (±0,07)	5,14 (±0,37)	4,72 (±0,15)
CHO afluente (g.L ⁻¹)	4,05 (±0,31)	6,39 (±0,58)	6,25 (±0,59)	6,59 (±0,27)
EC _{CHO} (%)	91,9 (±2,3)	95,0 (±0,8)	92,9 (±1,1)	88,2 (±2,7)
HLa afluente (g.L ⁻¹)	0,44 (±0,10)	0,72 (±0,09)	0,79 (±0,13)	0,81 (±0,09)
EC _{HLa} (%)	98,0 (±1,7)	98,8 (±0,4)	98,2 (±1,7)	7,5 (±52,5)
Fenóis totais afluente (g.L ⁻¹)	0,95 (±0,08)	1,08 (±0,14)	1,12 (±0,12)	1,06 (±0,12)
Fenóis totais efluente (g.L ⁻¹)	1,75 (±0,54)	1,51 (±0,16)	1,77 (±0,31)	1,37 (±0,34)
%H ₂ (%)	6,9 (±9,7)	23,0 (±19,2)	21,9 (±4,3)	19,5 (±3,5)
HFR (mLH ₂ .d ⁻¹)	38,9 (±49,6)	582,6 (±562,2)	1128,0 (±525,6)	1609,9 (±427,2)
VHPR (mLH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	31,2 (±21,5)	346,8 (±334,6)	671,4 (±312,9)	958,3 (±254,3)
HY (mLH ₂ .g ⁻¹ CHO)	11,3 (±7,0)	91,7 (±91,4)	104,9 (±44,3)	80,4 (±19,2)
STV efluente (mg.L ⁻¹)	5503,8 (±426,7)	5033,7 (±268,9)	6100,3 (±713,3)	7269,5 (±216,4)
SSV efluente (mg.L ⁻¹)	777,5 (±147,7)	575,0 (±117,9)	705,6 (±125,3)	948,8 (±176,3)

CHO: Carboidratos; EC_{CHO}: eficiência remoção carboidratos; HLa: ácido láctico; EC_{HLa}: eficiência remoção ácido láctico; HFR: taxa produção de hidrogênio; VHPR: taxa de produção volumétrica de hidrogênio; HY: rendimento de hidrogênio.

A elevada taxa de recirculação é apontada por Hussain et al. (2017) como fator importante para melhor distribuição dos microrganismos acidogênicos dentro do reator, promovendo um reabastecimento dos microambientes com bactérias acidogênicas, possibilitando maior acesso ao substrato. A importância da taxa de recirculação para o estabelecimento de melhores condições para consumo do substrato também foi reportada por Xu et al. (2014). Os autores destacaram favorecimento de novos nichos para os microrganismos hidrolíticos entrar em contato com a superfície sólida, conduzindo ao concomitante aumento de biofilme associado a atividade de enzimas extracelulares.

A redução da EC_{CHO} após as trocas do leito fixo foi acompanhada por uma acentuada diminuição do pH operacional atingindo valores próximos a 4,0 (Figura 8.3b); o gradativo reestabelecimento do pH operacional para um patamar próximo 5,0 esteve diretamente relacionado a recuperação de outros parâmetros operacionais, tal como EC_{CHO} , e também com a remoção de ácido láctico, e produção de hidrogênio. Desta forma, observou-se ao longo da operação do RLL elevada sensibilidade ao pH operacional, de forma que variações do pH resultaram em modificações nos principais parâmetros de monitoramento e respostas observadas. A observação converge com o que é reportado por outros autores (Cysneiros et al., 2012; Hussain et al., 2017), reconhecendo o pH como um fator chave, com efeito substancial na fermentação e influenciando nas vias metabólicas, atividades enzimáticas, e nas populações de bactérias (De Gioannis et al., 2013; Sivagurunathan e Kumar, 2015).

O pH operacional do RLL permaneceu entre $5,52 \pm 0,26\%$ (Fase I) e $4,72 \pm 0,15$ (Fase IV) (Figura 8.2b). Todavia, para a fase II observou-se menor amplitude e dispersão para as medidas deste parâmetro durante o período de operação, indicando maior estabilidade operacional. Para as fases III e IV cujo TDH foi reduzido em comparação a II, observou-se maiores flutuações do pH ao longo da operação, de forma que o aumento da COV pode estar relacionada a maior instabilidade do processo, uma vez que maior concentração de AOVs foi observada. Padrão semelhante ao do presente estudo foi verificado por Perna et al. (2013) em reator acidogênico de leito empacotado (packed bed) empregado para produção de hidrogênio. Os autores observaram que a medida que a COV foi aumentada de 22,0 até 37,0 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$ houve maior variação do pH operacional, com redução do pH médio, mesmo com a manutenção da adição de bicarbonato de sódio na alimentação. E também verificaram considerável aumento da concentração total de AOV decorrente da redução do TDH de 24h para 8h, com conseqüente incremento da COV (Ferraz et al., 2014).

O aumento da concentração de substrato entre as fases I ($4,0 gCHO.L^{-1}$) e II ($6,5 gCHO.L^{-1}$) resultou em importante diminuição do pH (Tabela 8.3), como esperado, em virtude da maior conversão de produtos ácidos, e redução da relação $gNaHCO_3.gCHO_t$. A diminuição do TDH entre as fases II (36h) e III (24h) não teve impacto no pH operacional, com manutenção de valores próximos a $5,1 \pm 0,2$. Todavia, com a redução do TDH para 12h resultou em diminuição do pH operacional do RLL, com valor de $4,7 \pm 0,1$, e observação de maior instabilidade deste parâmetro ao longo do período.

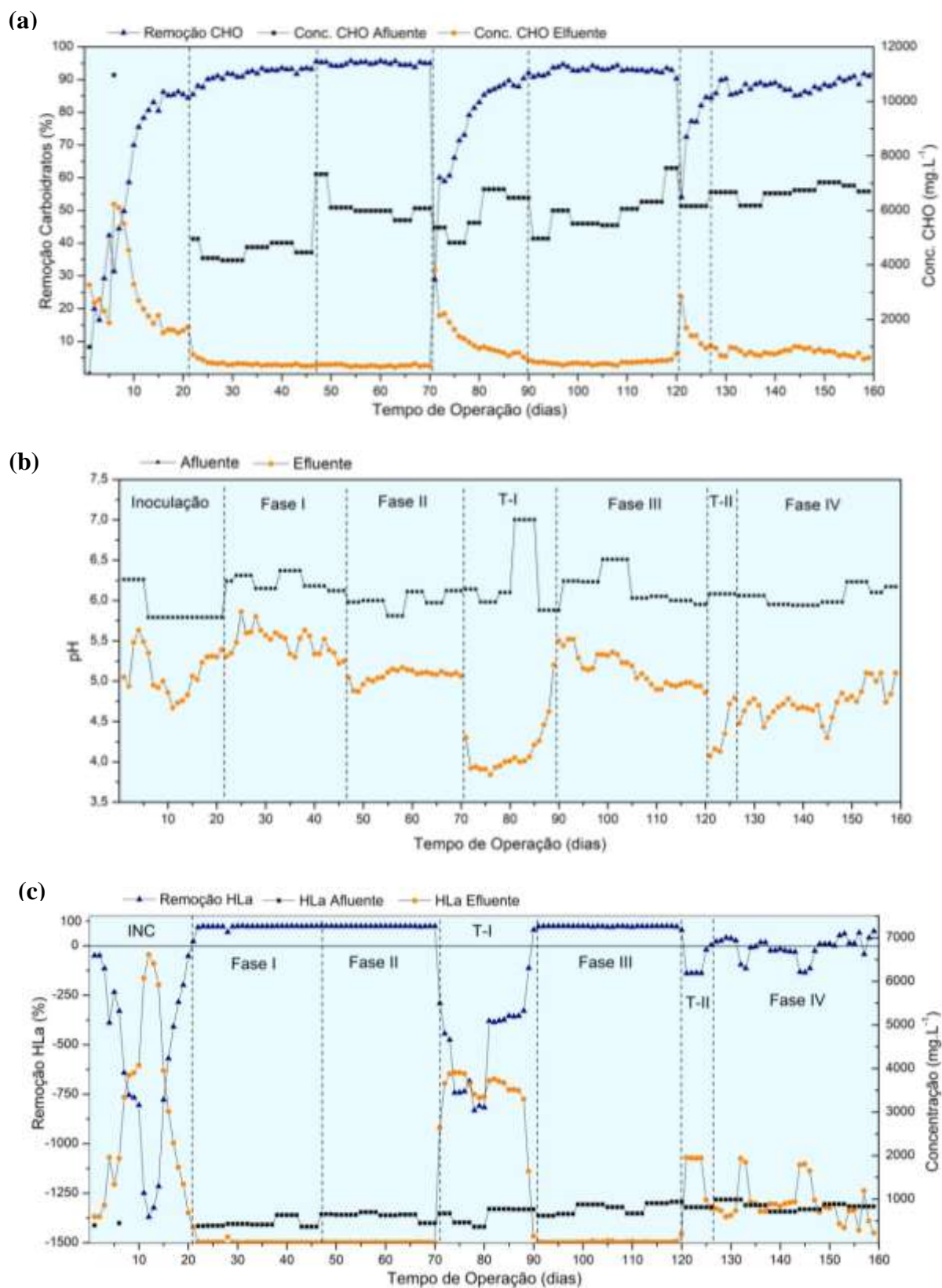


Figura 8.3. Variação temporal do monitoramento do RLL para (a) eficiência de remoção de carboidratos (EC_{CHO} , %), (b) pH operacional, (c) Eficiência de remoção de ácido láctico (EC_{HLA} , %).

A concentração de ácido láctico efluente foi tomada como um parâmetro de monitoramento do processo, uma vez que, tem-se relação importante com a produção de hidrogênio. O ácido láctico pode ser utilizado por determinadas populações de microrganismos como substrato em vias metabólicas cujo H_2 é um dos subprodutos (Sikora et al., 2013). Nas fases I, II e III foi verificado um padrão de consumo do HLa afluente, com eficiência de remoção (EC_{HLa}) muito próxima a 100% (Tabela 8.3), sendo consumidos aproximadamente $0,29 \pm 0,07 \text{ kgHLa.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ na fase I, $0,48 \pm 0,06 \text{ kgHLa.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ na fase II, e $0,79 \pm 0,13 \text{ kgHLa.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ na fase III. Na fase IV houve alternância entre períodos com diminuição da concentração de HLa efluente e outros com aumento em relação ao afluente, de forma que a medida de dispersão para a EC_{HLa} neste período foi elevada (Tabela 8.3), resultados estes que se alinham a redução e maior instabilidade de pH observada nesta fase operacional.

Imediatamente, após a primeira troca de leite (dia 71 de operação) ocorreu aumento relevante da concentração de HLa efluente ($4,0 \text{ gHLa.L}^{-1}$), o qual permaneceu durante quase todo período em T-I. O mesmo padrão foi observado após a segunda troca (dia 120 de operação), entretanto de forma bem menos intensa, reestabelecendo rapidamente uma condição de consumo de HLa (Figura 8.3c).

Por meio de tais observações pode-se inferir sobre a mudança das vias metabólicas predominantes nos períodos de operação em T-I e T-II, provavelmente, em decorrência de alguns fatores, como a sobrecarga de substrato devido ao aporte extra de carboidratos por meio dos resíduos de citros, além da reduzida densidade de biomassa no reator nestes períodos em decorrência da remoção do biofilme presente no leite fixo que foi substituído. Aumento da concentração de HLa em sistemas fermentativos tem sido reportadas em situações de maior aporte de substrato ou de maior carga orgânica volumétrica (Bundhoo e Mohee, 2016), tal como ocorreu nestes períodos pós substituição do leite do RLL.

Foi observada maior concentração de SSV no efluente do RLL, de $575,0 \pm 117,9 \text{ mg.L}^{-1}$ na fase II em até $948,8 \pm 176,3 \text{ mg.L}^{-1}$ na fase IV, a partir da diminuição do TDH e consequente aumento da COV entre as fases II, III e IV (Tabela 8.2). O aumento da COV de $13,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (fase II), para $20,2 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (fase III) e até $40,4 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (fase IV) favoreceu maior crescimento microbiano no leite, levando também à maior concentração de sólidos no efluente. Similarmente, Borges et al. (2022) verificaram aumento das concentrações de SSV no efluente do reator de leite estruturado utilizando vinhaça de

cana-de-açúcar e glicerol como substrato, atribuindo a maior lavagem celular ocasionado pelo aumento do crescimento de biomassa no reator. O *washout* de biomassa do reator decorrente da diminuição do TDH pode também ser apontado como um fator para o aumento da concentração de SSV no efluente, como consequência de maiores velocidades de circulação do líquido no reator, provendo a lavagem e eliminação de microrganismos (Liu et al., 2014). A elevada concentração de SSV efluente da fase I pode estar associada a eliminação de biomassa acumulada durante o período anterior de inoculação (Fuess et al., 2017), em um processo autorregulado pelo sistema.

8.3.2 Produção de hidrogênio e composição dos metabólitos solúveis

A produção de hidrogênio no RLL foi a principal resposta operacional investigada no estudo, e está correlacionada aos principais parâmetros de monitoramento do reator, como pH, EC_{CHO} , e EC_{HLA} . Tal resposta foi avaliada com base nas variáveis de percentual de hidrogênio na composição do biogás (%H₂), produção volumétrica de H₂ (VPRH), e rendimento de H₂ (HY). O %H₂ ao longo da operação foi verificado entre 1,6% e 31,9%, os valores médios foram de $6,9 \pm 9,7\%$ ao longo da fase I, $23,0 \pm 19,2\%$ na fase II, $21,9 \pm 4,3\%$ na fase III, e $19,5 \pm 3,5\%$ durante a fase IV.

Na fase I ocorreu redução no %H₂ ao longo dos dias de operação, de forma que a partir do 30º dia o %H₂ foi verificado estabilização em valor abaixo de 10%, até o final desta fase, conduzindo ao baixo percentual médio relativo a este período. O perfil observado para fase II foi oposto, ou seja, a partir de baixo percentual no 47º dia de operação, ocorreu gradativo aumento de hidrogênio ao longo dos dias, com estabilização a 25% a partir do 60º dia de operação. Ao longo das fases III e IV não foram observadas importantes oscilações no %H₂, que se manteve em patamar estável durante todo o período, conduzindo a baixos valores de dispersão para esta medida. Vale destacar que nos períodos de transição (T-I e T-II) o %H₂ tendeu a valores muito próximos a zero, sendo muito afetado pela instabilidade operacional nestes períodos de operação (Figura 8.4b).

Especificamente, na operação do RLL com resíduos de citros não foi observado %H₂ da ordem de 40-50% como reportado em outros estudos com reatores contínuos (Dounavis et al., 2015; Ferraz et al., 2014; Kirli e Karapinar, 2018). Além de questões relacionadas ao padrão metabólico predominante ao longo das fases operacionais, que é determinante no estabelecimento das proporções de produtos gasosos (H₂ e CO₂), é importante destacar que provavelmente em função das características hidrodinâmicas do reator não ocorreu

favorecimento de eficiente transferência de massa da fase líquida para fase gasosa. Apesar da baixa solubilidade de H_2 na água, o que promove o escape do gás do meio aquoso no reator, esse transporte pode ocorrer de forma insuficiente, uma vez que o hidrogênio pode aderir na superfície de grânulos ou biofilme (Si et al., 2018), ou como no caso do RLL na manta de resíduos sólidos do leito fixo. Kirli e Karapinar (2018) destacam que inadequada mistura e limitações de transferência de massa, são algumas das principais características que precisam ser superadas em sistemas de leito fixo com biomassa imobilizada.

A produção volumétrica de hidrogênio (VPRH) verificada ao longo da operação foi equivalente a $31,2 \pm 21,5 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ na fase I, $346,8 \pm 334,6 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para a fase II, $671,4 \pm 312,9 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ na fase III, e $958,3 \pm 254,3 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ na fase IV (Figura 8.5a). Ao longo da fase I a produção de hidrogênio foi inferior às demais fases, mesmo com indicadores operacionais de monitoramento favoráveis a fermentação, como pH ($5,52 \pm 0,26$), EC_{CHO} ($91,9 \pm 2,3\%$), e EC_{HLA} ($98,0 \pm 1,7\%$). O aumento da concentração de substrato na fase II para $6,5 \text{ gCHO} \cdot \text{L}^{-1}$, proporcionou melhor resposta em relação à produção volumétrica de H_2 (Figura 8.4a). O elevado valor para a medida de dispersão da VPRH para fase II (Figura 8.5a) reflete esse perfil de aumento gradativo da produção de H_2 partindo de valores iniciais extremamente baixos e atingindo elevada produção volumétrica.

A partir da recuperação da VPRH em função do aumento da disponibilidade de substrato (fase II) pode-se inferir que ao longo da fase I a baixa concentração de carboidratos ($4,0 \text{ gCHO} \cdot \text{L}^{-1}$) foi limitante, promovendo uma seleção metabólica de aproveitamento energético, não sendo favorável à produção de hidrogênio, como destacado por Pu et al. (2019). Estes autores identificaram produção muito reduzida de H_2 para baixas concentrações de substrato, destacando a insuficiente disponibilidade de matéria orgânica para ocorrência da fermentação de H_2 .

A diminuição do TDH resultou em efeito positivo em relação à VPRH; ou seja do TDH de 36h (fase II) para 24h (fase III) houve aumento em 93,6% ($324,6 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), e para TDH de 12h (fase IV) observou-se 42,7% ($286,9 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) em relação a fase III. Por conseguinte, obteve-se aumento da COV de $13,5 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (fase I), para $20,2 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (fase II) até $40,4 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (fase IV), os quais foram determinantes para maior produção volumétrica de H_2 , como resultado direto da maior disponibilidade absoluta de substrato. Maior VPRH decorrente da diminuição do TDH e aumento da COV tem sido observada em diversos estudos empregando diferentes configurações de reatores contínuos

para fermentação de variados substratos orgânicos (Aguilar e García, 2013; Corbari et al., 2019; Kirli e Karapinar, 2018).

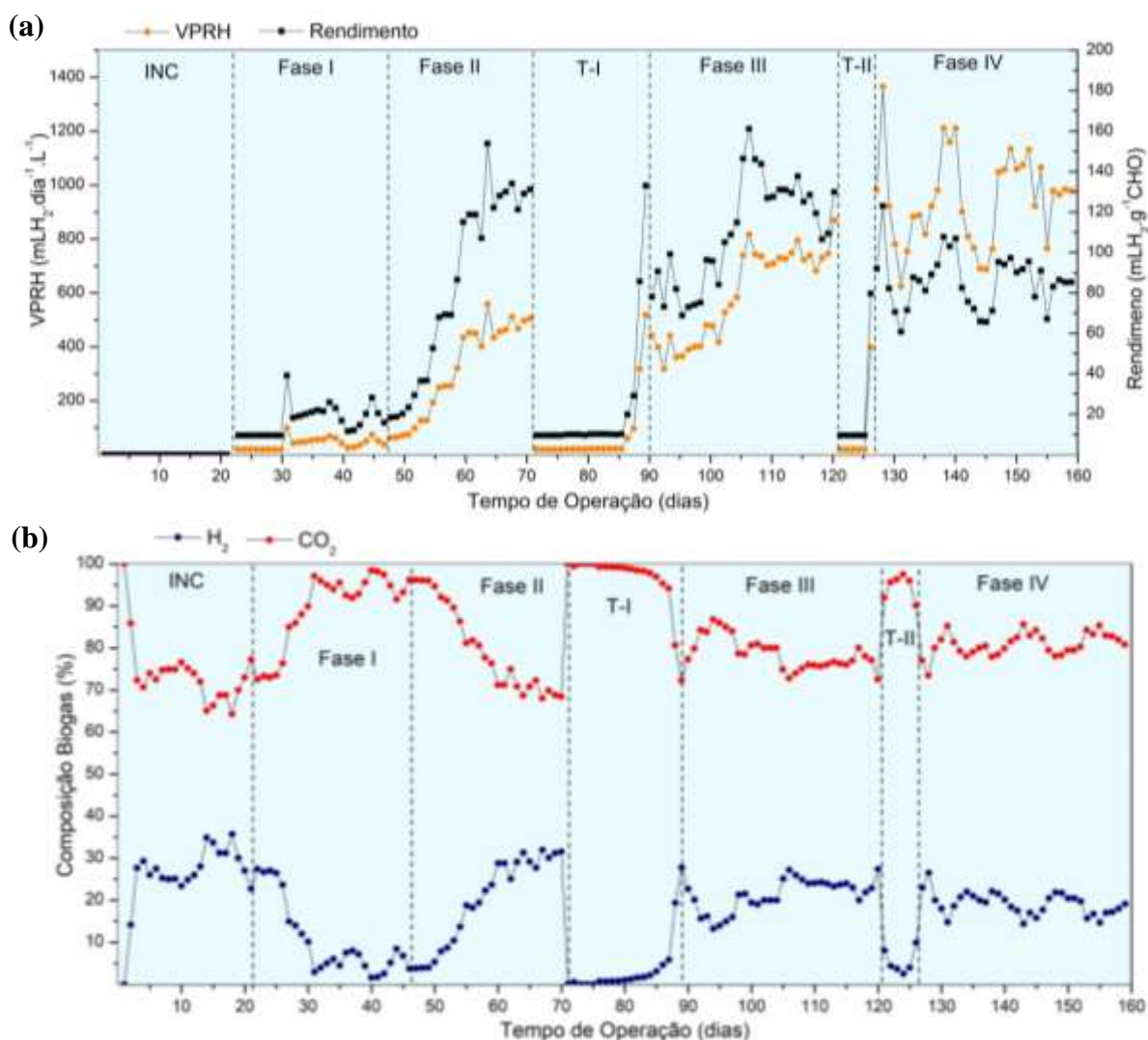


Figura 8.4. Variação temporal do monitoramento do RLL para (a) produção volumétrica (VPRH, mLH₂.d⁻¹.L⁻¹), e rendimento de hidrogênio (HY, mLH₂.g⁻¹.CHO), (b) composição do biogás (%).

Em função do aumento da COV entre as fases III e IV foi possível identificar alguns sinais de estresse operacional do reator, como por exemplo, ácido láctico no efluente ($0,82 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$), e ligeira redução da EC_{CHO} . Assim, apesar do aumento da VPRH, o rendimento de H₂ (HY) para a fase IV foi reduzido em comparação às fases II e III (Figura 8.5b). Provavelmente, a aplicação de TDH inferior a 12h pode favorecer o acúmulo de AOVs, em função do comprometimento da remoção de carboidratos, resultando na falha do processo de produção de H₂.

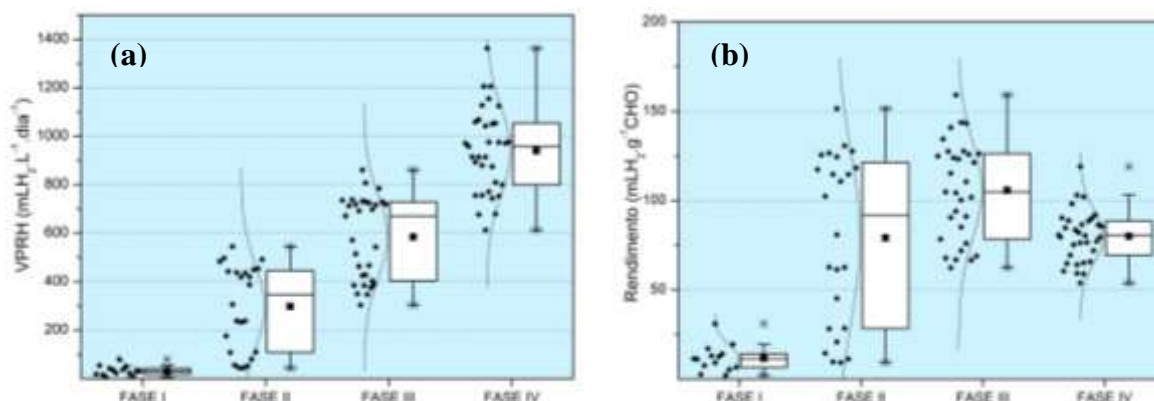


Figura 8.5. Performance do RLL de acordo com as diferentes fases operacionais: (a) produção volumétrica (VPRH, mLH₂.d⁻¹.L⁻¹), (b) rendimento de hidrogênio (HY, mLH₂.g⁻¹.CHO).

O maior HY obtido foi de $104,9 \pm 44,3$ mLH₂.g⁻¹.CHO na fase III, superando o rendimento de H₂ da fase IV equivalente a $80,4 \pm 19,2$ mLH₂.g⁻¹.CHO, e também da fase II cujo valor médio foi de $91,7 \pm 91,4$ mLH₂.g⁻¹.CHO. Sendo assim, maior HY foi atingido para TDH de 24h correspondendo à COV de 20,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. A redução do TDH tem sido observada como uma estratégia benéfica ao aumento do rendimento de hidrogênio em reatores acidogênicos (Kirli e Karapinar, 2018). Todavia, observa-se a partir de alguns resultados da literatura um comportamento similar ao observado para o HY entre as fases III e IV do presente estudo; é destacado nestes resultados que essa tendência de redução no rendimento de H₂ possa estar relacionado ao desequilíbrio no processo, em virtude de uma sobrecarga orgânica no reator, resultante da diminuição do TDH (Aguilar e García, 2013; Ferreira et al., 2019).

O ácido acético (HAc) foi o principal metabólito no efluente do reator da fase I ($1,44 \pm 0,18$ g.L⁻¹), além dos ácidos butírico (HBu) ($1,08 \pm 0,34$ g.L⁻¹) e capróico (HCp) ($0,64 \pm 0,31$ g.L⁻¹). O elevado TDH (36h) fixado na fase I é um provável fator que pode ter favorecido a ocorrência de reações de consumo de H₂ (Si et al., 2018). Apesar da inoculação do reator com lodo submetido ao tratamento térmico, ser uma estratégia para suprimir microrganismos consumidores de H₂ (Kim et al., 2006), a microbiota autóctone dos resíduos sólidos e água residuária de citros podem ter promovido a inoculação destes grupos no sistema ao longo da operação.

Nas fases II, III, e IV a concentração de HAc foi de $1,0 \pm 0,15$ g.L⁻¹, não sendo o principal metabólito observado no efluente, representando apenas 20% da composição total de metabólitos (Figura 8.7). A distribuição percentual dos metabólitos nas fases II e III foi semelhante, com predominância do ácido capróico (HCp) sendo de $1,76 \pm 0,94$ g.L⁻¹ na fase

II, e de $1,93 \pm 0,95 \text{ g.L}^{-1}$ na fase III, e representando respectivamente $35,9 \pm 9,8\%$, e $31,3 \pm 8,9\%$, da composição total de metabólitos.

O ácido capróico é um ácido carboxílico de cadeia média, produto de um processo bioquímico de alongamento de cadeia de ácidos carboxílicos baseado no ciclo reverso de β -oxidação (Cavalcante et al., 2017), ou na via de biossíntese de ácidos graxos (Dong et al., 2023), sendo o etanol ou ácido láctico os principais doadores de elétrons para estes mecanismos, possibilitando suficiente quantidade de equivalentes redutores para atender a síntese de ácidos de cadeia média (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2013). Destaca-se que o processo de alongamento de cadeia ocorre com a formação sequencial de ácido butírico e ácido capróico a partir do ácido acético, havendo condições e disponibilidade de agentes redutores (Agler et al., 2011). A partir do conhecimento do processo e dinâmica dos metabólitos ao longo das fases operacionais, na qual observou-se concomitante diminuição da concentração de HAc com o aumento de HCp, e consumo quase total de HLa nas fases II e III, foi possível inferir que o ácido láctico foi o principal agente redutor para na via de alongamento de cadeia para formação de ácido capróico, uma vez que neste período houve aumento da concentração de EtOH não indicando seu efetivo consumo neste processo bioquímico.

O ácido butírico foi o principal metabólito observado na fase IV de operação do RLL, de $1,64 \pm 0,75 \text{ g.L}^{-1}$, correspondendo a $30,3 \pm 4,9\%$ do total de metabólitos observados. Todavia, a concentração do HCp abundante nas fases II e III ($1,76 \pm 0,94 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,93 \pm 0,95 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) foi consideravelmente reduzido para $0,72 \pm 0,51 \text{ g.L}^{-1}$ (12,5% da composição total) na fase IV. Ao longo deste período identificou-se também o aumento da proporção de etanol (EtOH), dentre os metabólitos, de $0,82 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$ (16,0% da composição total), assim como diminuição do consumo do ácido láctico. É provável que as condições operacionais na fase IV não tenham sido favoráveis à ocorrência efetiva do processo de alongamento de cadeia conduzindo a diminuição da produção de HCp, e ao aumento da concentração de ácido butírico no efluente, mantendo alta disponibilidade de doadores de elétrons (lactato, etanol).

Kucek et al (2016) avaliaram a produção de n-caproato a partir da oxidação do ácido láctico e destacaram condição mais favorável ao processo em pH 5,0, tal como observado nas fases II e III do presente estudo. Além disso, observaram que adição de ácido butírico ao processo não causou aumento da concentração de n-caproato, havendo na verdade uma

produção líquida positiva de HBU devido ao alongamento de cadeia de ácido acético endógeno, com o ácido láctico como doador de elétrons. Zhu et al (2015) indicam que não há barreiras bioquímicas do ponto de vista termodinâmico para formação de n-caproato a partir do HLa, mas que os microrganismos envolvidos nesta via produzem principalmente HBU, intermediário do processo. A partir destas considerações pode-se evidenciar que o aumento da concentração de ácido butírico na fase IV esteve diretamente correlacionado à redução na formação de HCp.

A partir da importância do alongamento de cadeia na dinâmica de produção dos principais metabólitos (butírico e capróico) e consumo de HAc, ao longo da operação do reator (fases II, III e IV) é válido estabelecer que a produção de hidrogênio derivou principalmente destas reações. A reação global de alongamento de cadeia de ácido acético à ácido capróico, a partir da oxidação do ácido láctico envolve a produção de dois mols de H_2 para cada mol de HCp ($3 \text{ ácido láctico} + 2H^+ \rightarrow \text{n-capróico} + CO_2 + 2 H_2 + H_2O$ (Zhu et al., 2015)). O mesmo ocorre para a produção de HBU a partir da oxidação de ácido láctico acoplada ao ciclo do alongamento de cadeia, com a produção de dois mols de H_2 para cada mol de HBU produzido. Uma vez que a produção de hidrogênio resultou principalmente da reação de oxidação do ácido láctico para fornecer elétrons ao processo de alongamento de cadeia, a diminuição do HY na fase IV é coerente com a maior concentração residual de HLa no efluente desta fase, e também com a menor concentração de HCp.

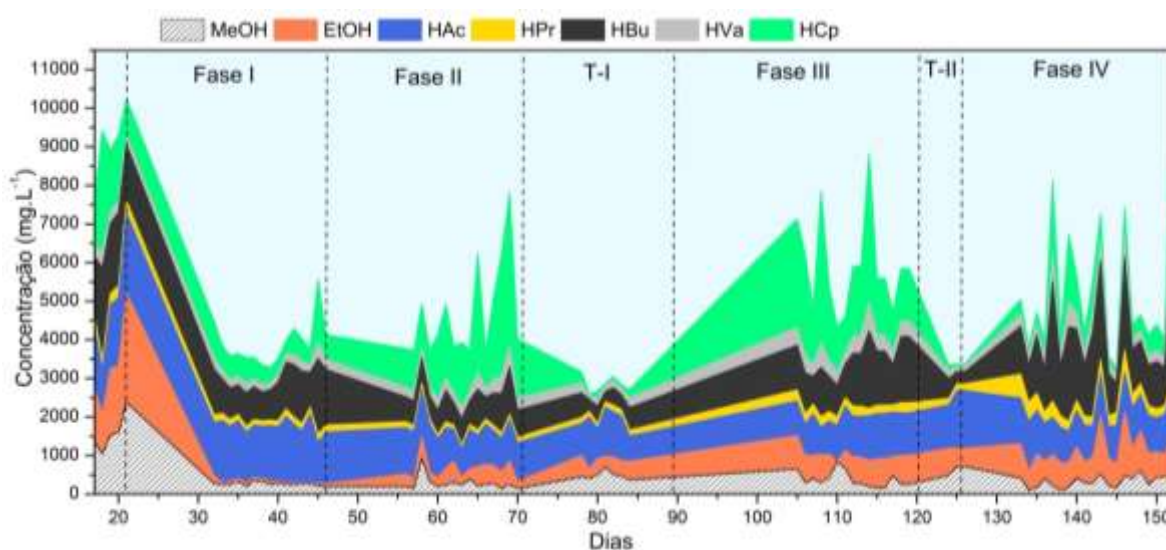


Figura 8.6. Variação temporal de concentração de AOVs e solventes ao longo da operação do RLL.

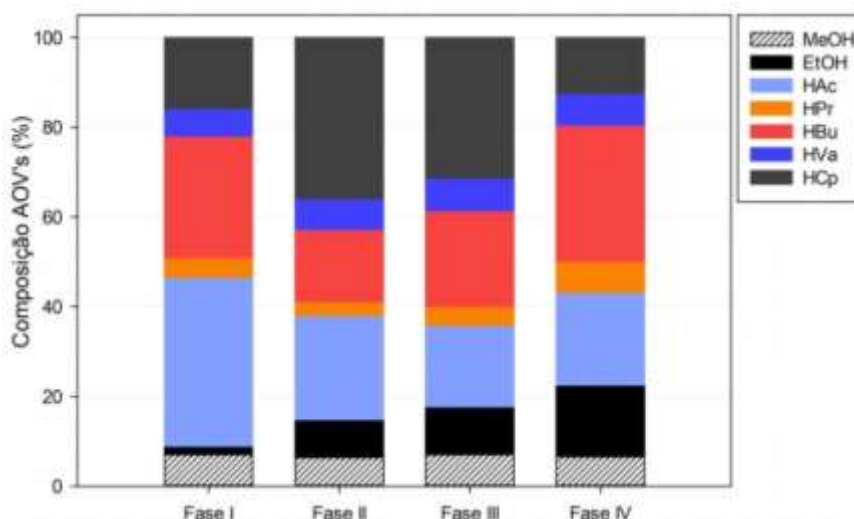


Figura 8.7. Composição percentual dos metabólitos solúveis nas fases de operação do RLL.

Outros metabólitos solúveis como o ácido propiônico (HPr), ácido valérico (HVa), e metanol (MeOH) também foram observados no efluente do RLL ao longo da operação, entretanto em menor concentração, de forma que a proporção individual de cada um deles em relação ao total esteve sempre abaixo de 10%. Em relação ao HPr não foi observado aumento em sua concentração entre afluente e efluente do reator ao longo das fases I e II, todavia, ao longo das fases III e IV foi observado de $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,24 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Para o MeOH e HVa foram observados aumentos em suas concentrações afluente e efluente do reator, de forma que a produção mais relevante de MeOH ao longo da operação ocorreu na fase IV, de $0,33 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto HVa teve maior produção semelhante nas fases III e IV, de $0,44 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,40 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

A relação HBu/HAc como um indicador metabólico do processo tem sido empregado em estudos de fermentação (Akhlaghi et al., 2019, 2017; Wicher et al., 2013), de forma que valores maiores para esta razão estão associados a maior produção de hidrogênio, uma vez que nota-se que elevadas concentrações de HAc em sistemas muitas vezes não são diretamente correlacionadas a fermentação de ácido acético, na qual a produção de H_2 atinge o rendimento máximo teórico, mas sim a reações de consumo de H_2 pela homoacetogênese autotrófica ou heterotrófica (Akhlaghi et al., 2017). A razão HBu/HAc nas fases I e II foram muito semelhantes, sendo inferior a 1, ou seja de $0,77 \pm 0,34$, e $0,76 \pm 0,27$, respectivamente, indicando maior proporção de HAc. Nas fases seguintes, houve gradativo aumento da razão HBu/HAc, com valores superiores a 1, sendo de $1,23 \pm 0,34$ para fase III, e $1,67 \pm 0,78$ para fase IV. Maiores valores para razão HBu/HAc foram observados com a diminuição do TDH

do reator, coerente com o fato de que esta diminuição do TDH foi favorável a maior produção de H_2 .

8.3.3 Efeito do aumento da concentração de substrato e redução do TDH no desempenho do reator: avaliação estatística

As diferenças absolutas nas principais respostas operacionais durante cada uma das fases foram descritas anteriormente, entretanto para que se possa afirmar de forma correta e segura se a modificação de variáveis operacionais aplicada entre as fases I, II, III e IV resultou em efeitos significativos nestas respostas operacionais se faz necessário o emprego de testes estatísticos que resguardem a tomada de decisão com elevado grau de confiança. Para tanto, foram comparados o efeito do aumento da concentração de carboidratos na alimentação do reator nas fases I e II e o efeito da diminuição do TDH nas fases II, III e IV (Tabela 8.4).

Tabela 8.4. Matriz de representação da avaliação estatística comparativa dos principais parâmetros operacionais entre as fases operacionais do RLL.

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Fase I	-	EC _{CHO} : ES ↓ EC _{HLA} : ES ↓ %H ₂ : ES ↓ VHPR: ES ↓ HY: ES ↓	-	-
Fase II	EC _{CHO} : ES ↑ EC _{HLA} : ES ↑ %H ₂ : ES ↑ VHPR: ES ↑ HY: ES ↑	-	EC _{CHO} : ES ↑ EC _{HLA} : ES ↑ %H ₂ : NES VHPR: ES ↓ HY: ES ↓	EC _{CHO} : ES ↑ EC _{HLA} : ES ↑ %H ₂ : NES VHPR: ES ↓ HY: NES
Fase III	-	EC _{CHO} : ES ↓ EC _{HLA} : ES ↓ %H ₂ : NES VHPR: ES ↑ HY: ES ↑	-	EC _{CHO} : ES ↑ EC _{HLA} : ES ↑ %H ₂ : NES VHPR: ES ↓ HY: ES ↑
Fase IV	-	EC _{CHO} : ES ↓ EC _{HLA} : ES ↓ %H ₂ : NES VHPR: ES ↑ HY: NES	EC _{CHO} : ES ↓ EC _{HLA} : ES ↓ %H ₂ : NES VHPR: ES ↑ HY: ES ↓	-

ES: diferença estatisticamente significativa; NES: diferença estatisticamente não-significativa; ↑: aumento; ↓: redução.

O aumento da concentração de carboidratos na alimentação de 4,0 g.L⁻¹ para 6,5 g.L⁻¹ resultou em diferença significativa para todos os principais parâmetros de monitoramento avaliados. Destaca-se que os efeitos observados na comparação da fase II em relação I foram

positivos para todos os parâmetros, com aumento da eficiência de remoção de carboidratos e HLa, assim como nos indicadores relacionados a produção de H₂. Neste contexto, destaca-se que a manutenção de uma alimentação com baixa concentração de substrato para TDH de 36h, delimitando COV de apenas 9,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, foi desfavorável para estabelecer produção contínua de hidrogênio, mesmo considerando a gradativa disponibilização de substrato proveniente do leito fixo de resíduos de citros ao longo do período operacional.

A diminuição do TDH operacional de 36h (fase II) para 24h (fase III), e de 36h (fase II) para 12h (Fase IV) resultou em efeitos estatisticamente significativos para algumas das variáveis operacionais. Para as variáveis de eficiência de remoção de substrato (EC_{CHO} e EC_{HLa}), a diminuição do TDH, tanto para 24h, quanto para 12h teve efeito negativo significativo, sendo observado que o conseqüente aumento da COV a partir da diminuição do TDH teve impacto na eficiência de utilização do substrato pelo sistema, aumentando o conteúdo energético não aproveitado no efluente do reator.

Em relação aos parâmetros de monitoramento da produção de H₂, não foi verificado efeito significativo em relação ao %H₂ no biogás com a diminuição do TDH de 36h (fase II) para 24h (fase III), e nem de 36h (fase II) para 12h (fase IV). A produção volumétrica foi estatisticamente impactada, com efeito positivo em ambos os casos, sendo provável que valores inferiores de TDH podem favorecer a obtenção de maior produção de H₂. Entretanto, para o rendimento de H₂ (HY) só foi verificado efeito positivo estatisticamente significativo com a diminuição do TDH de 36h para 24h, com aumento do HY para o TDH de 24h.

Por meio da avaliação estatística da diminuição do TDH de 24h para 12h (fases III e IV, respectivamente) verificou-se efeito estatisticamente significativo positivo em relação à produção volumétrica de hidrogênio. O efeito observado foi significativamente negativo para o rendimento de H₂, de forma que identificou-se que acima de determinada COV, resultante da diminuição do TDH para 12h, o aumento no consumo absoluto de substrato não teve relação proporcional com o aumento da produção de H₂. Para as variáveis de monitoramento da eficiência de remoção de substrato (EC_{CHO} e EC_{HLa}), o efeito da diminuição do TDH de 24h para 12h foi estatisticamente negativo, confirmando que de fato houve limitações na remoção do substrato para maiores valores de COV.

Com base na análise estatística das respostas observadas em cada uma das fases operacionais, é possível afirmar considerando o aproveitamento do conteúdo energético

contido no substrato, e nos parâmetros de monitoramento da produção de hidrogênio, que as condições da fase III (6.5 gCHO.L⁻¹, TDH 24h, COV 20,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹) resultaram em melhor cenário de operação para o RLL empregando resíduos da agroindústria de citros.

Por meio da análise de correlação de Pearson identificou-se que a produção volumétrica de H₂ (VPRH) teve forte relação com outras variáveis do processo (Figura 8.8), reforçando a ideia de que a produção de hidrogênio esteve associada diretamente ao comportamento de outros parâmetros de monitoramento do reator. Destaca-se elevada correlação positiva com a produção de H₂ (r = 0.76), e negativa com HAc (r = -0,81), provavelmente, a produção de hidrogênio foi favorecida para valores mais elevadas considerando a razão H₂/HAc. Pela elevada correlação negativa entre VPRH e pH (r = -0,92), verifica-se que houve uma tendência de diminuição da produção de H₂ para maiores valores de pH operacional na faixa de 4,72 a 5,52 observada neste estudo, de forma que tal correlação foi influenciada principalmente pelo baixo VPRH da fase I, na qual o pH operacional foi de 5,52.

A interpretação conjunta das correlações negativas entre %H₂ e HAc (r = -0,97) e VPRH e pH (r = -0,92), com a correlação positiva entre HAc e pH (r = 0,85), permitem inferir com maior grau de evidências a possibilidade de que a homoacetogênese tenha impactado significativamente a produção de H₂, principalmente na fase I. O pH operacional de 5,5 como foi o caso da fase I, é favorável à ocorrência de reações de consumo de H₂ para produção de HAc (Ntagia et al., 2020), estabelecendo correlação positiva para estas variáveis. Tais reações de consumo resultam diretamente na redução do %H₂ e VPRH, tal como observado na fase I.

Elevada correlação positiva (r = 0,81) foi identificada entre as variáveis EC_{HLa} e pH, indicando maior diminuição do pH operacional à medida que houve menor eficiência de remoção de HLa. Tal correlação estabelecida é coerente ao que foi observado principalmente nos resultados da fase IV, na qual a EC_{HLa} foi em média inferior a 10% e o pH reduzido em relação as demais fases, sendo de 4,72±0,15. Verifica-se, portanto, que a concentração de HLa no efluente é uma variável muito importante no monitoramento do RLL, visto que a redução de sua conversão resultou diretamente na diminuição do pH operacional, o que pode ser indicativo direto de instabilidade no processo de produção de H₂.

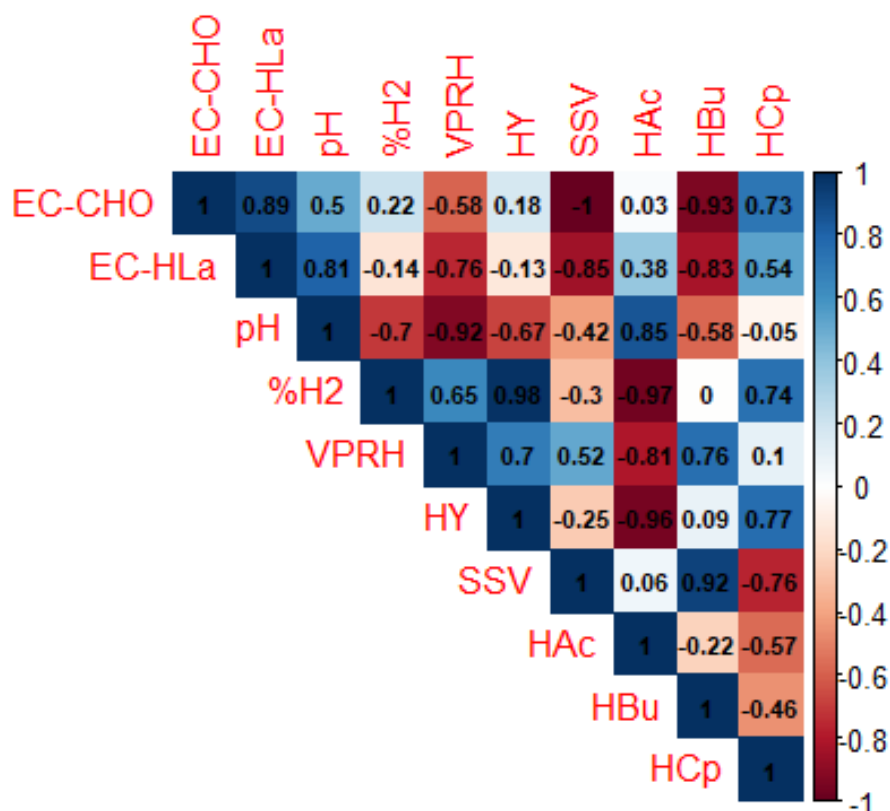


Figura 8.8. Matriz de correlação de Pearson obtida pelo pacote “*corrplot*” no ambiente da linguagem R.

8.3.4 Caracterização da comunidade microbiana

Amostras para caracterização e análise da estrutura da comunidade microbiana foram coletadas no leito fixo do reator e também do tanque de lixiviado ao final das fases II (70° dia), e IV (160° dia), assim denominadas LF-II e TL-II, e LF-IV e TL-IV, respectivamente. A coleta ao final de duas fases operacionais distintas teve como objetivo avaliar o nível de modificação da estrutura da microbiota em decorrência da imposição de diferentes TDHs e consequente variação da COV do reator, que resultou em alterações importantes nas respostas operacionais. Amostras do leito fixo e do tanque de lixiviado relativas ao mesmo período operacional foram caracterizadas para melhor compreensão da dinâmica das populações de microrganismos nos diferentes microambientes do reator.

O número de sequências, total de ASV (*Amplicon Sequence Variant*), bem como os índices de diversidade, estão apresentados na Tabela 8.5. A similaridade com base nas ASV's foi verificada entre as amostras do leito fixo e do tanque de lixiviado da mesma fase operacional, e entre as amostras das diferentes fases operacionais. Entre as amostras da mesma fase operacional, LF-II e TL-II, e LF-IV e TL-IV, observou-se similaridade de 75,0%

e 62,5%, respectivamente, sendo possível inferir sobre alterações nas populações em função das características operacionais do RLL.

Tabela 8.5. Índices de diversidade para as amostras analisadas.

Índices	LF-II	TL-II	LF-IV	TL-IV
Número de Sequências	29809	43103	28935	31413
Total de ASV	7	12	10	13
Shannon-Wiener	0,79	0,77	1,01	1,35
Simpson	0,91	0,90	0,92	0,93

LF-II: amostra do leito fixo ao final da fase II; TL-II: amostra do tanque de lixiviado ao final da fase II; LF-IV: amostra do leito fixo ao final da fase IV; TL-IV: amostra do tanque de lixiviado ao final da fase IV.

O filo Firmicutes foi identificado com a maior abundância relativa em todas as quatro amostras analisadas, LF-II (98,7%), TL-II (98,94%), LF-IV (92,0%), e TL-IV (88,9%). Em LF-II também foi identificada representantes do filo Bacteroidota (1,3%), e dos filios Bacteroidota (0,6%) e Actinobacteriota (0,5%) para TL-II. Em relação a LF-IV e TL-IV, também foram identificados os microrganismos pertencentes aos filios Bacteroidota (1,7% e 2,7%), Actinobacteriota (5,1% e 7,3%), e Patescibacteria (1,3% e 1,1%), respectivamente. Elevada abundância relativa do filo Firmicutes em reatores fermentativos destinados a produção de hidrogênio e AOVs tem sido reportada em outros estudos (Garcia-Peña et al., 2011; Wainaina et al., 2020). Identificação dessas bactérias pode estar associada ao elevado conteúdo de carboidratos dos substratos, além das características hidrolíticas e acidogênicas deste filo, os quais podem degradar compostos orgânicos provenientes de resíduos agroindustriais (Greses et al., 2020). Entre as amostras do leito fixo e do lixiviado da mesma fase operacional não se observou grande alteração na abundância dos filios identificados, entretanto, entre as amostras da fase II e IV foi observada relevante modificação, com destaque para o aumento de representantes do filo Actinobateria, cujo papel em reatores fermentativos tem sido associado à degradação de polissacarídeos, sendo frequentemente reportado em relevante abundância em reatores acidogênicos (Balagurunathan et al., 2020; Wainaina et al., 2020).

Lactobacillaceae foi a família identificada com maior abundância relativa em todas as amostras, 81,3 % em LF-II, 84,4% em TL-II, 77,0% em LF-IV, e 69,8% em TL-IV. Para as amostras da fase II de operação as outras famílias também foram observadas como Ruminococcaceae (LF-II, 9,2% e TL-II, 4,3%), Erysipelotrichaceae (LF-II, 2,9% e TL-II,

2,7%), e Lachnospiraceae (LF-II, 2,20% e TL-II, 3,6%), e outras como Prevotellaceae, Clostridiaceae, e Caloramatoraceae, cujas abundâncias foram próximas de 1%.

Nas amostras da fase IV algumas famílias foram identificadas em maior abundância em comparação a fase II, como Erysipelotrichaceae com 4,3% (LF-IV) e 6,5% (TL-IV), Prevotellaceae com 1,7% (LF-IV) e 2,7% (TL-IV), e Clostridiaceae com 1,4% (LF-II) e 1,6% (TL-IV). Algumas famílias somente foram identificadas nas amostras da fase IV, tais como Atopobiaceae com abundância de 5,1% (LF-IV) e 4,4% (TL-IV), Leuconostocaceae com 1,9% (LF-IV) e 1,9% (TL-IV), e Saccharimonadales com 1,3% (LF-IV) e 1,1% (TL-IV), assim como a família Bifidobacteriaceae que foi verificada somente na amostra TL-4 (~ 3,0%).

Lactobacillus foi dominante em todas as amostras, ou seja de 81,3%, 84,4%, 77,0%, e 69,8% para LF-II, TL-II, LF-IV, e TL-IV, respectivamente (Figura 8.9). Para as amostras da fase II identificou-se o gênero *Caproiciproducens* com 9,2% e 4,3% de abundância relativa em LF-II e TL-II, respectivamente; enquanto para as amostras da fase IV foram inferiores e de 0,3% (LF-IV) e 1,8% (TL-IV) representando a principal diferença observada na estrutura da comunidade microbiana em nível de gênero. Em contrapartida foi observado para a fase IV outros gêneros com abundância relativa diferenciada em relação a fase II. Por exemplo, *Solobacterium* com 4,3% e 6,5%, *Olsenella* com 5,1% e 4,4%, gênero não cultivado da classe Bacilli com 5,8% e 3,8%, respectivamente em LF-IV e TL-IV; além de *Bifidobacterium* identificado apenas em TL-IV com 3,0% de abundância. Outros gêneros foram identificados em menor abundância (~1%) nas amostras, como *Lachnospiraceae* NK3A20, *Saccharimonadales*, e *Clostridium sensu stricto* 12.

O gênero *Lactobacillus* identificado com predominante abundância relativa em todas as amostras é caracterizado por microrganismos homofermentativos os quais produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de hexoses por meio da via Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), e também heterofermentativos que produzem quantidades equimolares de ácido láctico, acetato ou etanol e CO₂ pela via pentose fosfato (Pot et al., 2014; Wood e Holzappel, 1995). Apesar da característica metabólica deste grupo abundante ao longo das fases operacionais II e IV do reator, não foi observado HLa no efluente da fase II, e ao longo da fase IV concentrações equivalentes entre afluente e efluente foram verificadas. Por meio de tais observações pode-se inferir que o ácido láctico produzido da fermentação dos carboidratos foi concomitantemente consumido em outras vias metabólicas. Assim como discutido por Gomez-Romero et al. (2014) é provável que as relações sintróficas

com outros grupos de microrganismos em reações fermentativas utilizando lactato como substrato suportaram a produção de hidrogênio observada ao longo da operação.

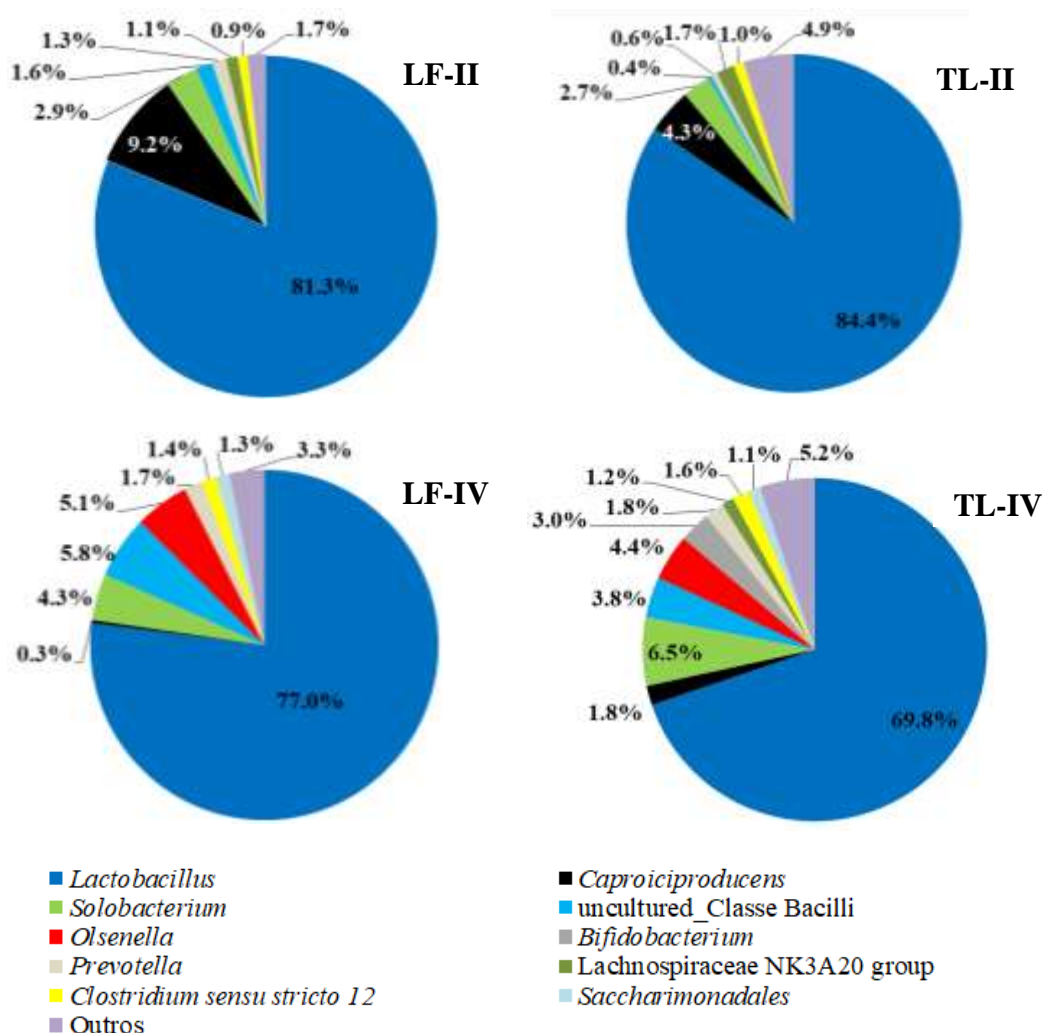


Figura 8.9. Abundância relativa para os gêneros de bactérias, para as amostras LF-II, TL-II, LF-IV, e TL-IV.

Lactobacillus tem sido reportada frequentemente em reatores fermentativos para produção de H₂ em condições de instabilidade, mas também de estabilidade operacional (Castelló et al., 2009; Fuess et al., 2018), evidenciando que a fermentação do lactato pode desempenhar papel fundamental na produção de H₂, sendo observada correlação entre abundância de *Lactobacillus* e outros metabólitos como ácidos butírico, e acético, e etanol (Santiago et al., 2019). Nas fases II e IV inferiu-se que vias metabólicas de alongamento de cadeia foram importantes no processo de formação de metabólitos como H₂Bu e H₂Cp, sendo a oxidação do ácido láctico fundamental para disponibilização de fluxo de elétrons para o processo, contribuindo na formação de H₂ (Cavalcante et al., 2017; Zhu et al., 2015), evidenciando o papel positivo da população de *Lactobacillus* no desempenho da fermentação

de hidrogênio. Além disso, é provável que uma parcela da produção de ácido acético, e etanol, observada nestas fases operacionais seja produto do metabolismo heterolático destes microrganismos.

Microrganismos pertencentes ao gênero *Caproiciproducens* foram identificados com abundância importante, principalmente nas amostras da fase II (LF-II e TL-II). Tal grupo se caracteriza pela capacidade de produzir ácidos graxos de cadeia média, tais como ácidos C4-C6 (Luo et al., 2023). A recente criação do gênero *Caproiciproducens* foi proposta para abrigar a espécie isolada *Clostridium* sp. BS-1 (nomeada *Caproiciproducens galactitolivorans*) (Kim et al., 2015) cuja característica metabólica principal é a produção de ácido capróico a partir da oxidação de ácido láctico (Andersen et al., 2017). As características metabólicas deste grupo de microrganismos são coerentes ao perfil de metabólitos solúveis observados nas fases II e IV; de forma que maior concentração de HCp foi observada na fase II, na qual maior abundância relativa deste gênero foi identificada.

O provável mecanismo de alongamento de cadeia para produção de HCp e HBU a partir de HAc, utilizando HLa como doador de elétrons, é evidenciado em bactérias semelhantes a *Caproiciproducens*. Luo et al. (2023) também identificaram *Caproiciproducens* em reator de leito lixiviado (RLL) empregado na digestão anaeróbia de resíduos de alimentos. Os autores verificaram um perfil de metabólitos semelhante ao observado no presente estudo, com aumento da concentração de ácidos de cadeia média e HBU no mesmo período em que houve consumo do HLa.

O gênero *Solobacterium* foi identificado em todas as amostras (Figura 8.9), mas principalmente na fase IV. Microrganismos pertencentes a este grupo estão mais intimamente relacionados à classe Clostridia, em específico com membros do clúster *Clostridium* XVI. A fermentação de glicose por *Solobacterium* tem como produtos principais os ácidos acético, láctico e butírico (Kageyama e Benno, 2000), a partir da fermentação de carboidratos. Microrganismos deste gênero não têm sido comumente reportados em relevante abundância relativa em reatores anaeróbios, mas Zhen et al. (2022) identificaram aumento da abundância de *Solobacterium* em reator CSTR aplicado à digestão anaeróbia de resíduos de alimentos a medida que aplicaram maiores COVs. Todavia, o papel deste grupo no desempenho do reator não foi claramente identificado. Lagoa-Costa et al. (2022) identificaram *Solobacterium* e destacaram seu papel na produção de ácido acético via fermentação ácida mista.

Olsenella e *Bifidobacterium* foram os gêneros identificados com abundâncias relativas entre 3,0 e 5,0% nas amostras da fase IV, mas não sendo identificados em LF-II e TL-II. Ambos, têm em comum o fato de que seu principal produto metabólico da fermentação de glicose é o ácido láctico, entretanto, empregam vias notadamente distintas. Não há evidências de que o hidrogênio seja produzido por microrganismos do gênero *Olsenella* (Castelló et al., 2009), entretanto são comumente reportados em reatores fermentativos de produção de hidrogênio. Tal fato, indica que este grupo estabeleça competição por substrato com microrganismos produtores de H₂ (Feng et al., 2018; Santiago et al., 2020). Desta forma, com possibilidade de diminuição do rendimento de H₂ do reator. Já os microrganismos do gênero *Bifidobacterium* reconhecidamente incluídas no grupo de bactérias ácido lácticas (LAB), produzem HLa e HAc como principais produtos fermentativos sem formação de CO₂, através de via metabólica de fermentação de hexoses distinta das demais LAB, denominada rota bifidus (Wood e Holzappel, 1995). As características destes gêneros sugerem que no presente estudo houve uma diversificação metabólica na produção de HLa a partir da fermentação dos carboidratos na fase IV, uma vez que concomitante ao aumento da abundância destes grupos identificou-se redução da abundância de *Lactobacillus* nas amostras da fase IV, quando comparada a fase II (de 81,3% em LF-II e 84,4% em TL-II, para 77,0% em LF-IV e 69,8% em TL-IV).

Xiong et al. (2019) identificaram elevada abundância relativa de *Bifidobacterium* no lixiviado do RLL aplicado à digestão de resíduos de alimentos, sendo observada redução expressiva deste grupo nas amostras dos resíduos do leito fixo. Padrão semelhante foi observado no presente estudo, uma vez que tal gênero somente foi identificado na amostra do tanque de lixiviado (TL-IV 3,0%), não sendo identificado no leito fixo. Os autores destacam o importante papel de simbiose deste grupo com outros microrganismos no reator, sendo responsável pela fermentação não só de açúcares simples, mas também de celulose, hemicelulose e pectina, disponibilizando ácido acético láctico, para posterior metabolização por outras bactérias. Todavia, tal gênero não foi identificado nas amostras do leito fixo.

Predição das prováveis vias de metabolização do substrato e produção de hidrogênio, AOVs e solventes foi realizada para as amostras da fase II e IV (Figura 8.10). A fermentação dos carboidratos resultou principalmente na produção dos ácidos láctico e acético, e também em etanol, por meio das vias metabólicas distintas, principalmente da fermentação homo e heteroláctica, rota bifidus e fermentação ácido mista, em função do metabolismo de

Lactobacillus, *Bifidobacterium* e *Olsenella*. Na rota bifidus destaca-se o papel da enzima transcetolase [2.2.1.1], a qual catalisa as reações de formação de eritrose-4-fosfato e xilulose-5-fosfato a partir da molécula de frutose-6-fosfato, e também a conversão de xilulose-5-fosfato a gliceraldeído-3-fosfato, para posterior formação de ácido láctico a partir do ácido pirúvico. Para fermentação homoláctica, destaca-se a enzima piruvato quinase [2.7.1.40]. Esta enzima catalisa a conversão de fosfofenolpiruvato em ácido pirúvico na última etapa da glicólise (Zhao et al., 2023). Já para fermentação heteroláctica destaca-se a glicose-6-fosfato desidrogenase [1.1.1.149], 6-fosfogliconolactonase [3.1.1.31], e 6-fosfogliconato desidrogenase [1.1.1.44], que catalisam a formação do intermediário 6-fosfogliconato a partir da glicose-6-fosfato, e sua conversão a ribulose-5-fosfato, respectivamente. Na via de formação de etanol tem-se a atuação da álcool desidrogenase [1.1.1.1] a partir da molécula de acetaldeído, e da enzima acetato quinase [2.7.2.1] na formação de ácido acético a partir da molécula de acetil-CoA.

A oxidação do HLa ocorreu de forma importante, destacando seu papel como doador de elétrons para o processo de alongamento de cadeia. Na predição de enzimas verificou-se L-lactato desidrogenase [1.1.1.27], que atua na reação de oxidação de ácido láctico em ácido pirúvico, convertido posteriormente em acetil-CoA para ser acoplado aos ciclos de alongamento de cadeia. Destaca-se que nesta reação de oxidação há formação de equivalente redutores (NADH), que resultam na formação de hidrogênio pela ação de hidrogenases do sistema Fed_{ox}/Fed_{red} (Weghoff et al., 2014).

O alongamento de cadeia foi fundamental na formação de ácido butírico e principalmente do ácido capróico (Figura 8.10), relacionado ao metabolismo de *Caproicoproducens*. As principais vias metabólicas relacionadas a este processo são o ciclo reverso de β -oxidação e o ciclo de biossíntese de ácido graxos (FBA), ambos partem da disponibilidade de moléculas de acetil-CoA, que podem ser derivada da oxidação do lactato ou etanol (Yin et al., 2022). A partir da predição das enzimas foi verificado que o ciclo de biossíntese ácidos graxos (FAB) tenha sido importante no processo de alongamento de cadeia (Figura 8.10), considerando as abundâncias identificadas para as enzimas que catalisam as reações nesta via. Em pesquisas recentes têm sido demonstrado que a via de biossíntese de ácidos graxos (FAB) é mais ativa do que a via de β -oxidação reversa na produção de ácidos de cadeia média por alongamento de cadeia (Dong et al., 2023). Zhang et al. (2023) avaliaram mecanismos de produção de ácidos de cadeia média a partir da fermentação de resíduos de

alimentos em reatores em batelada. Os autores observaram elevada proporção de ácido capróico (48,0%) entre os metabólitos produzidos, e a partir da análise de enzimas funcionais no processo, identificaram que a via de ácidos graxos foi a rota principal no alongamento de cadeia. Semelhante ao presente estudo foram identificados *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Caproicoproducens* entre os mais abundantes na comunidade microbiana do reator.

Em reação catalisada pelas enzimas beta-cetoacil-ACP sintase I, II e III [2.3.1.180] [2.3.1.41] [2.3.1.179] (FabH, FabB e FabF) ocorre a condensação da molécula de malonil-ACP, formada a partir da carboxilação do acetil-CoA (Wu et al., 2021) em reação catalisada pelas enzimas acetil-CoA carboxilase [6.4.1.2] e maloniltransferase [2.3.1.39] (FabD), com acetil-CoA, para formar acetoacetil-ACP, iniciando o primeiro ciclo da via FAB até a formação de butiril-ACP através de reações intermediárias catalisadas pelas enzimas 3-oxoacil-ACP redutase [1.1.1.100] (FabG), 3-hidroxiacil-ACP desidratase [4.2.1.59] (FabZ), enoil-ACP redutase I [1.3.1.9] (FabI), e enoil-ACP redutase II [1.3.1.10] (FabK), com formação de ácido butírico no alongamento de cadeia de carboxilatos C2 (Yin et al., 2022). No segundo ciclo FAB que se inicia com a condensação de butiril-ACP com malonil-ACP, formando ao final a molécula de hexanoil-ACP, por meio de reações catalisadas pelas mesmas enzimas já mencionadas para o primeiro ciclo, com formação de ácido capróico (carboxilato C6), a partir do alongamento da cadeia de HBU (carboxilato C4). Tais enzimas catalisadoras destas reações do ciclo de ácidos graxos (FAB) foram inferidas com abundância nas amostras do RLL do presente estudo.

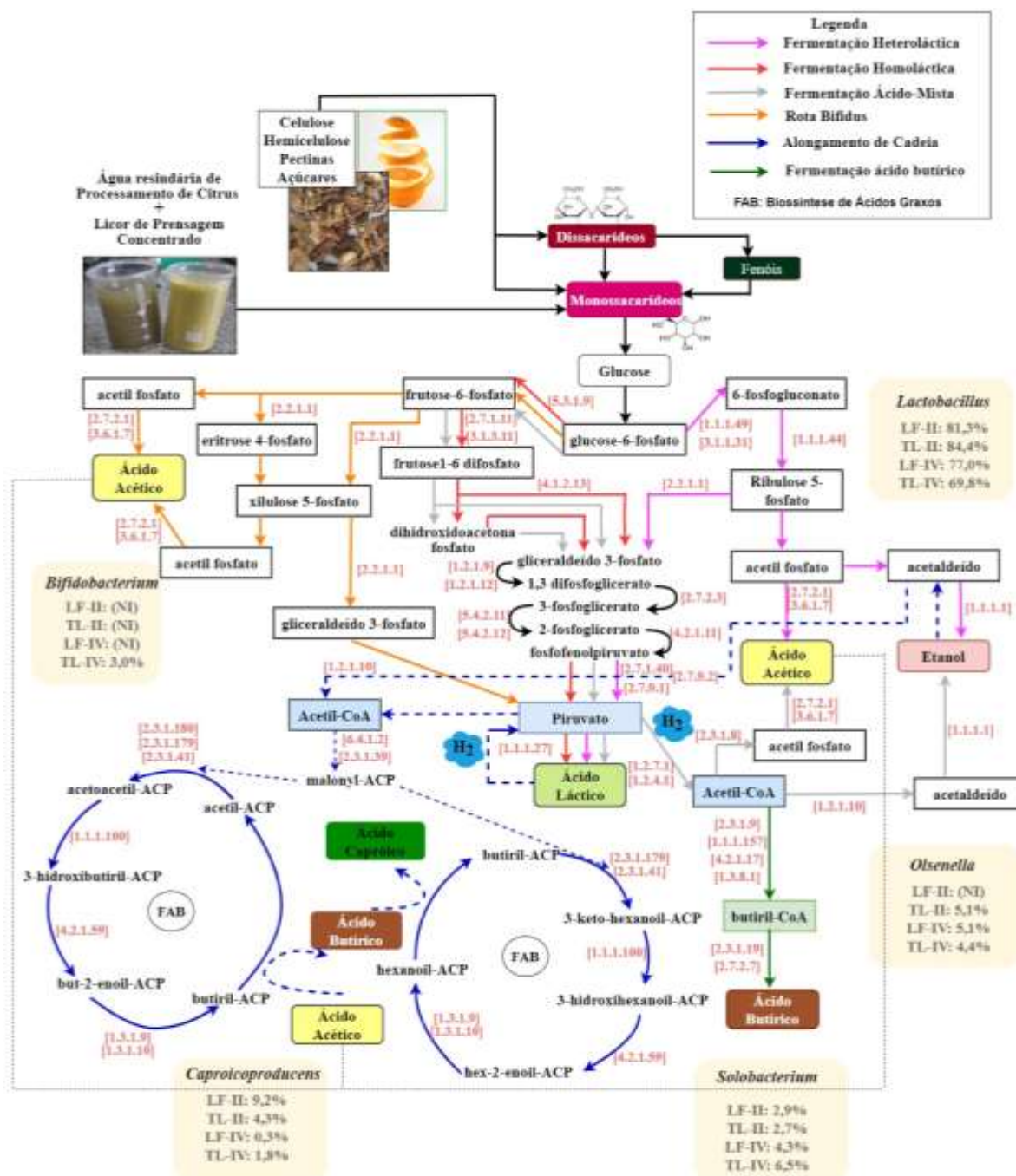


Figura 8.10. Vias de conversão dos resíduos sólidos, água residuária de processamento de licor de prensagem de cascas de citros, em H_2 , AOVs e solventes.

8.3.5 Potencial de recuperação energética

O balanço energético para as quatro fases de operação do reator de leito lixiviado foi realizado a partir das modificações nas condições operacionais que resultaram em diferentes rendimentos de H_2 e impactaram na recuperação do conteúdo energético contido no substrato. Em relação ao aspecto econômico do processo foram avaliados os custos associados com a

alcalinização do reator baseando-se nas demandas de alcalinizante por unidade de energia produzida.

O potencial energético do hidrogênio (PE_{H_2}) foi de $10,5 \text{ MJ.m}^{-3}$ licor para fase I, $87,6 \text{ MJ.m}^{-3}$ licor para fase II, $98,0 \text{ MJ.m}^{-3}$ licor para fase III, e $71,2 \text{ MJ.m}^{-3}$ licor para fase IV (Tabela 8.4). O PE_{H_2} obtido para a fase I foi bem inferior das demais; como já discutido para tal fase operacional não foi observada relevante produção de H_2 de forma que nesta condição a fermentação de hidrogênio não foi predominante e resultou em baixo potencial energético. A partir do poder calorífico inferior de $16,03 \text{ kJ.g}^{-1}$ hexoses (Dong et al., 2009), e na hipótese de que o conteúdo de carboidratos no licor de prensagem concentrado utilizado no presente estudo ($93,2 \text{ g.L}^{-1}$) é composto por hexoses, estima-se um potencial de $1494,0 \text{ MJ}$ por m^{-3} de licor; desta forma atingiu-se um percentual de recuperação energética a partir do hidrogênio de $0,70\%$ na fase I, $5,86\%$ na fase II, $6,56\%$ na fase III, e $4,77\%$ na fase IV.

Tabela 8.6. Análise energética e econômica para as diferentes fases operacionais avaliadas para o RLL

Fases	MJ.m^{-3} licor	kWh.m^{-3} licor	$\text{tNaHCO}_3.\text{MWh}^{-1}$	$\text{US}\$. \text{MWh}^{-1}$
I	10,5	1,7	26,7	13082,8
II	87,6	14,6	1,9	937,7
III	98,0	16,3	1,7	838,3
IV	71,2	11,9	2,4	1153,4

Apesar dos valores elevados para eficiência de conversão de carboidratos (EC_{CHO}) obtidos para todas as fases operacionais, o percentual de conteúdo energético do licor que foi recuperado na forma de H_2 foi baixo, não chegando a 7% . Portanto, um efluente fermentativo com elevado potencial energético ainda pode ser aproveitado, implicando em oportunidade atrativa para recuperação energética, por meio da obtenção de metano através da aplicação de um segundo estágio metanogênico. A obtenção de metano em reator metanogênico é uma alternativa que permite a recuperação energética bem superior àquela da fermentação, em razão do elevado volume de biogás produzido e densidade energética do metano por unidade de volume. Fuess et al. (2017) obtiveram em sistema de dois estágios para digestão anaeróbia da vinhaça em reatores de leito fixo produção máxima de hidrogênio de $9,5 \text{ MJ.m}^{-3}$ vinhaça na fase acidogênica, enquanto no segundo estágio por meio da produção de metano obteve-se um potencial energético de $177,7 \text{ MJ.m}^{-3}$ vinhaça.

A estimativa de potencial de produção de eletricidade (PPE_{H_2}) resultou em 1,7 kWh.m⁻³ licor para fase I, 14,6 kWh.m⁻³ licor para fase II, 16,3 kWh.m⁻³ licor para fase III, e 11,9 kWh.m⁻³ licor para fase IV. Com base no estudo de Cook (1983) estima-se que 1 tonelada de laranjas processadas resulte em produção de aproximadamente 55 litros de licor de prensagem concentrado após passagem pelo evaporador, considerando um processo de prensagem única das cascas. Em um cenário de uma indústria que processa 1 milhão de toneladas de laranjas por safra a geração de licor de prensagem concentrado seria da ordem de 55.000 m³, de forma que o aproveitamento deste licor no processo de fermentação de hidrogênio poderia resultar na geração de até 896,5 MWh (considerando o PPE_{H_2} da fase III), que poderia ser reaproveitado em diversas atividades com demanda energética dentro da indústria.

Uma análise de sensibilidade foi realizada em relação ao parâmetro de rendimento de H₂ das fases operacionais II, III e IV, de forma que considerou-se uma variação de até 25% para mais (nível superior) e para menos (nível inferior) no HY de cada fase ($HY_{-25\%}$, HY, $HY_{+25\%}$), supondo cenários nos quais poderiam ser realizadas melhorias operacionais para atingir tais rendimentos ($HY_{+25\%}$), ou ocorrer instabilidades prejudicando a produção de H₂ ($HY_{-25\%}$). Tomando como referência o PPE_{H_2} médio da fase III, que foi o maior obtido no contexto da operação do RLL, observou-se que mesmo para um cenário otimista com $HY_{+25\%}$ para fase IV o seu PPE_{H_2} , ainda assim permaneceria 10,1% inferior ao cenário de referência da fase III (Figura 8.11), evidenciando como as condições da fase operacional IV não foram favoráveis do ponto de vista da recuperação energética. Considerando a fase II, observou-se um cenário otimista com $HY_{+25\%}$ poderia proporcionar aumento de até 11,7% no PPE_{H_2} em relação a fase III. Um máximo PPE_{H_2} de até 20,41 kWh.m⁻³ licor poderia ser obtido considerando o nível superior da análise para fase III ($HY_{+25\%}$), adotando estratégias operacionais que pudessem elevar o HY desta fase para valores próximos de 131,0 mL H₂.g⁻¹ CHO, sendo um direcionamento para o aumento da recuperação energética aplicando resíduos de citros em RLL.

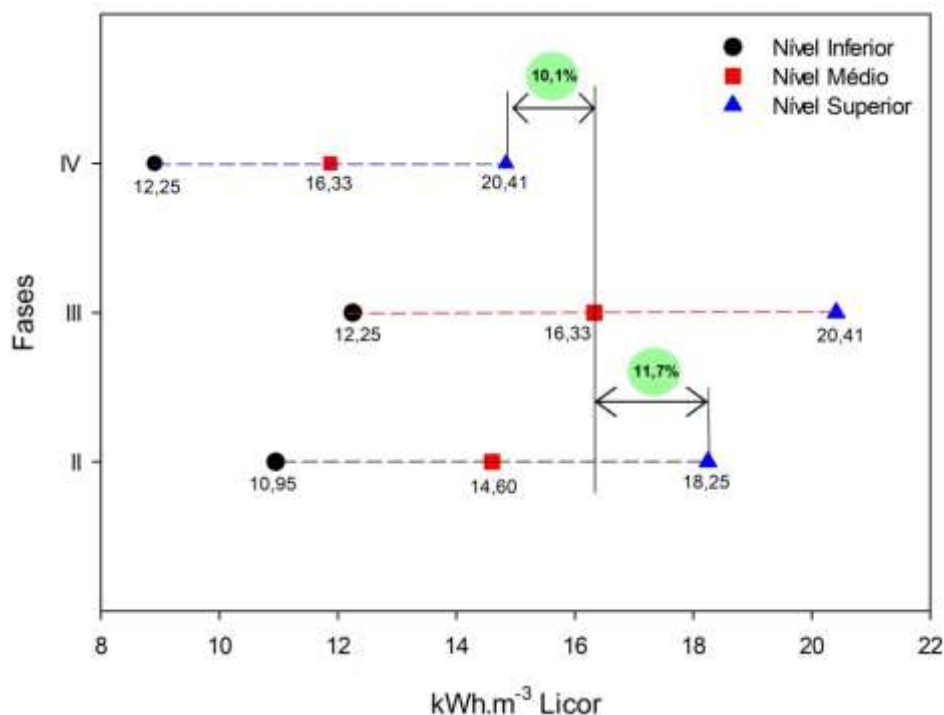


Figura 8.11. Análise de sensibilidade para PPE_{H_2} em relação a variação do HY.

Em relação à demanda por alcalinizante obteve-se consumo entre 26,7 tNaHCO₃.MWh⁻¹ (fase I) e 1,7 tNaHCO₃.MWh⁻¹ (fase III), uma amplitude elevada entre as diferentes fases operacionais que permite evidenciar a importância da otimização de HY visando reduzir a demanda específica de aditivos por unidade de energia produzida (Tabela 8.4). Entretanto, mesmo para o cenário da fase III que foi o mais favorável, a demanda ainda é elevada considerando os custos com o alcalinizante que são da ordem de US\$ 489,6 por tonelada (Intratec Primary Commodity Prices, 2018b), resultando em custos muito elevados por unidade de eletricidade produzida, sendo, portanto um obstáculo para viabilidade econômica do processo.

8.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se redução significativa do conteúdo de RSL do leito fixo do reator ao final de cada fase operacional, com remoção de 79,3% ao final da fase II (70 dias), 57,1% ao final da fase III (50 dias), e 61,5% ao final da fase IV (40 dias).

O aumento da concentração de carboidratos na alimentação de 4,0 para 6,5 gCHO.L⁻¹ resultou no aumento da VPRH de 38,9 mLH₂.d⁻¹ para 582,6 mLH₂.d⁻¹. Máxima VPRH foi observada para menores TDHs, sendo de 1128,0 mLH₂.d⁻¹ para TDH de 24h e 1609,9 mLH₂.d⁻¹ para 12h. Entretanto, a diminuição do TDH resultou na redução do HY de 104,9 mLH₂.g⁻¹CHO em TDH de 24h para 80,4 mLH₂.g⁻¹CHO em TDH de 12h.

Nos períodos de transição posteriores às trocas de resíduos do leito fixo foram verificadas instabilidades operacionais que resultaram em impacto significativo na produção de H_2 . Não houve qualquer produção de H_2 nos dias subsequentes a troca do leito, sendo que a produção de H_2 foi retomada quando houve recuperação de parâmetros operacionais do reator como pH, remoção de carboidratos e ácido láctico.

Os ácidos butírico e capróico estiveram principalmente associados às vias metabólicas de alongamento de cadeia, com o ácido láctico sendo o principal agente redutor nesta reação. A produção de hidrogênio derivou principalmente destas reações associadas à produção de HBU e HCp, sendo resultado da reação de oxidação do ácido láctico.

Lactobacillus foi identificado com maior abundância relativa em todas as amostras analisadas, LF-II, TL-II, LF-IV, e TL-IV com 81,3%, 84,4%, 77,0%, e 69,8%, respectivamente. Entre as amostras de fase II e IV a principal diferença observada na estrutura da comunidade microbiana foi em relação a *Caproiciproducens* com redução importante de sua abundância na fase IV, em comparação a fase II, coerente a menor produção de HCp na fase IV.

O máximo potencial de produção de eletricidade (PPE_{H_2}) de $16,3 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-3}$ licor, foi obtido com base na produção de hidrogênio da fase III, sendo estimada um PPE_{H_2} de até 896,5 MWh, considerando a geração de licor a partir do processamento de 1 milhão toneladas de laranjas em uma indústria.

Baseado nos resultados obtidos verifica-se que a aplicação da configuração de reator de leito lixiviado é uma alternativa promissora para co-digestão de resíduos da agroindústria de citros visando seu aproveitamento energético, sendo fundamental melhor investigação acerca de estratégias de substituição do leito de resíduos no sentido de reduzir ou até mesmo eliminar o período de transição delimitado pela instabilidade operacional.

CAPÍTULO 9

Conclusões Gerais

A partir dos objetivos e hipóteses propostos para este trabalho elaborou-se as conclusões gerais, que incluem uma síntese dos principais resultados e das contribuições desta pesquisa, os quais estão resumidas abaixo:

Hipótese I: Os resíduos sólidos compostos por casca e bagaço e a água residuária de citros são fonte de microrganismos anaeróbios fermentativos. **Aceita.**

i. O inóculo autóctone enriquecido a partir dos resíduos de citros foi efetivo na fermentação em reatores em batelada, entretanto não foram obtidos rendimentos elevados de hidrogênio, sendo *Olsenella*, *Prevotella*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os principais gêneros de bactérias identificadas na comunidade microbiana do inóculo.

Hipótese II: Nem todas as variáveis do processo tem efeitos significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-digestão de resíduos de citros. **Aceita.**

ii. Menor tamanho de partículas de resíduos sólidos (<0,6 mm), concentração de resíduos sólidos de citros, e concentração de água residuária, resultaram em efeitos positivos mais significativos na cinética de produção de H₂.

Hipótese III: A suplementação com agentes alcalinizantes proporciona maior estabilidade para o processo de fermentação, possibilitando aumento do rendimento de hidrogênio. **Aceita.**

iii. A suplementação com alcalinizantes resultou em maior estabilidade no processo de fermentação de H₂, sendo identificados melhores resultados com a utilização do carbonato de cálcio quando comparado ao uso do bicarbonato de sódio.

iv. O ajuste das variáveis de concentração de substrato e CaCO₃, equacionado pela razão gCaCO₃/gCHO, foi identificado como fundamental para promover maior potencial de produção de H₂.

Hipótese IV: A otimização nas condições operacionais da co-digestão dos resíduos permite obter produção de hidrogênio significativamente superior a condições não-otimizadas; e

Hipótese VIII: A alteração das condições operacionais nas quais as etapas fermentativa e metanogênica são conduzidas resulta em alteração significativa das rotas metabólicas

predominantes como uma resposta a mudança na estrutura da comunidade microbiana.

Aceitas.

v. Foi identificada condição otimizada para produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de citros, com 21,4 gSTV.L⁻¹ de RSL, 3,4 gDQO.L⁻¹ de água residuária, e 4,5 g.L⁻¹ de CaCO₃, resultando na produção de 1249,0 mLH₂.L⁻¹, sendo os ácidos butírico e acético os metabólitos predominantes, com inexpressiva produção de outros metabólitos solúveis.

vi. Em condição otimizada de produção de H₂ identificou-se dominância do gênero *Clostridium sensu stricto 1*, cuja abundância realiva foi de 95,0%, sendo a via metabólica Clostridial inferida como predominante.

vii. Para condições que resultaram em baixa produção de H₂ verificou-se predominância da fermentação de ácido láctico, com aumento da abundância relativa do gênero *Lactobacillus*.

Hipótese V: A diluição do conteúdo do reator fermentativo operado em condição otimizada para produção de hidrogênio utilizado como substrato para metanogênese possibilita estabelecer condições para uma eficiente produção de metano. **Rejeitada.**

viii. A utilização do conteúdo do reator fermentativo (CRF) como substrato para a fase metanogênica resultou em eficiente produção de metano, não sendo identificados efeitos inibitório ao processo decorrentes da elevada concentração de matéria orgânica, nem pela presença de limoneno.

ix. Maior produção acumulada de metano no segundo estágio foi obtida com 99,3% de CRF, e 0,58 gNaHCO₃.g⁻¹DQO, resultando em 6549,7 mLCH₄.L⁻¹, representando um rendimento de 308,2 mLCH₄.g⁻¹STV_{RSL}.

Hipótese VII: O Reator de Leito Lixiviado operado em modo contínuo é uma alternativa eficiente para a co-digestão de resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros; e

Hipótese VIII: A alteração das condições operacionais nas quais as etapas fermentativa e metanogênica são conduzidas resulta em alteração significativa das rotas metabólicas predominantes como uma resposta a mudança na estrutura da comunidade microbiana.

Aceitas.

x. A aplicação do reator de leito lixiviado para fase fermentativa no tratamento de resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros possibilitou uma eficiente remoção do conteúdo de resíduos sólidos do leito fixo.

xi. A operação do reator de leito lixiviado com TDH de 12h resultou na maior produção volumétrica de hidrogênio, entretanto, o máximo rendimento de H₂ foi obtido para TDH de 24h.

xii. Ao longo de diferentes fases operacionais do reator de leito lixiviado houve importante produção dos ácidos butírico e capróico, sendo inferido que a produção destes metabólitos esteve associada às vias metabólicas de alongamento de cadeia, com o ácido láctico sendo o principal agente redutor nesta reação.

Hipótese VI: A co-digestão de resíduos sólidos e líquidos do processamento de citros possibilita a recuperação de uma parcela importante do conteúdo energético contido nestes substratos. **Aceita.**

xiii. Apesar da elevada produção de H₂, o potencial energético máximo obtido para fase fermentativa representou uma parcela muito pequena (3%) do conteúdo energético dos substratos, entretanto o potencial da fase metanogênica possibilitou uma recuperação substancial (55,5%) deste conteúdo energético.

CAPÍTULO 10

Considerações Finais e Recomendações

Considerando os resultados obtidos no presente estudo em relação ao potencial de obtenção de produtos de valor biotecnológico, como biocombustíveis e ácidos orgânicos, conclui-se que as perspectivas para a valorização da co-digestão dos resíduos da agroindústria de processamento de citros são positivas. O processo de digestão anaeróbia como uma alternativa econômica e ambiental, tem se firmado como uma proposta consolidada para tratamento de resíduos e águas residuárias de alguns setores, com ganho de escala dos sistemas e aplicação industrial. Os resultados apresentados aqui contribuem nesta trajetória, visando ao desenvolvimento de um modelo de economia circular para a cadeia produtiva de processamento de citros. Entretanto, há que se elucidar ainda inúmeros aspectos e peculiaridades do processo, algumas recomendações e sugestões para trabalhos futuros sobre a co-digestão destes substratos são:

- i. **Avaliar diferentes estratégias para acidificação no primeiro estágio do processo:** considerando a baixa contribuição que a produção de hidrogênio representa na recuperação do conteúdo energético dos resíduos, a fermentação com foco em outros sub-produtos que possam manter ou aumentar a produção de metano obtida no presente estudo podem ser interessantes.
- ii. **Avaliar a adição de um terceiro co-substrato para o processo:** agregar um co-substrato cujas características possam agregar alcalinidade ao processo, possibilitando uma redução na demanda por alcalinizante, identificado como um dos gargalos para viabilidade econômica.
- iii. **Analisar diferentes configurações de sistema para potencializar a recuperação energética:** avaliar a recirculação de uma parcela do efluente metanogênico para o primeiro estágio, contribuindo para o tamponamento da etapa fermentativa.
- iv. **Avaliar outros materiais de enchimento não inertes para o leito do reator de leito lixiviado:** a utilização de materiais de enchimento são necessárias para manutenção da estrutura do leito fixo em virtude das características dos resíduos de citros, substituir

materiais inertes (exemplo, argila expandida) por outras matérias lignocelulósicas que possam cumprir de forma satisfatória este papel é uma alternativa interessante do ponto de vista ambiental e econômico, considerando o ganho de escala do processo.

- v. **Realizar um balanço energético, econômico e ambiental (3E) completo para o processo de valorização da co-digestão dos resíduos do processamento de citros:** a aplicação de metodologias mais específicas e avançadas para realizar estas análises com base nos resultados até então obtidos pode possibilitar identificar aspectos que precisam de maior atenção nos estudos experimentais para que o processo se torne economicamente viável e mais sustentável, como por exemplo, a identificação da necessidade de redução do consumo de energia no processo (trituração dos resíduos, manutenção temperatura mesofílica 37°C, agitação, etc), e redução do consumo de compostos químicos (alcalinizantes, nutrientes, etc).

Referências

- Abd-Alla, M.H., Gabra, F.A., Danial, A.W., Abdel-Wahab, A.M., 2018. Enhancement of biohydrogen production from sustainable orange peel wastes using *Enterobacter* species isolated from domestic wastewater. *Int. J. Energy Res.* 43, 391–404.
<https://doi.org/10.1002/er.4273>
- Abid, M., Wu, J., Seyedsalehi, M., Hu, Y., Tian, G., 2021. Novel insights of impacts of solid content on high solid anaerobic digestion of cow manure : Kinetics and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 333, 125205.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125205>
- Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC / FID : Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *Am. J. Anal. Chem.* 406–414.
- Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures : the carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* 29, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>
- Agrawal, R., Verma, A., Rani, R., Varjani, S., Di, C., Kumar, A., 2021. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 332, 125042.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125042>
- Aguilar, M.A.R., García, L.I.R., 2013. Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW. *Chem. Eng. J.* 219, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.090>
- Ahmad, F., Sakamoto, I.K., Adorno, M.A.T., Motteran, F., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 11, 31–50.
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0452-1>
- Ai, B., Li, J., Chi, X., Meng, J., Jha, A.K., Liu, C., Shi, E., 2014. Effect of pH and Buffer on Butyric Acid Production and Microbial Community Characteristics in Bioconversion of Rice Straw with Undefined Mixed Culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 676–686.
<https://doi.org/10.1007/s12257-013-0655-z>
- Akhlaghi, M., Boni, M.R., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., De Gioannis, G., Muntoni, A., Spiga, D., 2019. Fermentative H₂ production from food waste: Parametric analysis of factor effects. *Bioresour. Technol.* 276, 349–360.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.012>
- Akhlaghi, M., Rosaria, M., Gioannis, G. De, Muntoni, A., Polettini, A., Rossi, A., Spiga, D., 2017. A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey. *Bioresour. Technol.* 244, 473–483.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.158>

- Akutsu, Y., Lee, D., Li, Y., Noike, T., 2009. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 5365–5372. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.052>
- Algapani, D.E., Qiao, W., Ricci, M., Bianchi, D., M. Wandera, S., Adani, F., Dong, R., 2019. Bio-hydrogen and bio-methane production from food waste in a two-stage anaerobic digestion process with digestate recirculation. *Renew. Energy* 130, 1108–1115. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.079>
- Amani, T., Nosrati, M., Mousavi, S.M., Kermanshahi, R.K., 2011. Study of syntrophic anaerobic digestion of volatile fatty acids using enriched cultures at mesophilic conditions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8, 83–96.
- Andersen, S.J., Groof, V. De, Khor, W.C., Roume, H., Props, R., 2017. A Clostridium Group IV Species Dominates and Suppresses a Mixed Culture Fermentation by Tolerance to Medium Chain Fatty Acids Products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00008>
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2011. Chapter 16: Biomethanation and Its Potential, in: Rosenzweig, A.C., Ragsdale, S.W. (Eds.), *Methods in Methane Metabolism, Part A*. Elsevier Inc., pp. 327–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>
- Anjum, M., Khalid, A., Qadeer, S., Miandad, R., 2017. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. *Waste Manag. Res.* <https://doi.org/10.1177/0734242X17715904>
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I. V, 2011. Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 4843–4851. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.077>
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., Granström, K., 2019. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion : Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. *Processes* 1–19.
- APHA/AWWA/WEF, 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22nd ed. *Études Rabelaisiennes*, Washington, DC. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed076p1069.2>
- Argun, H., Dao, S., 2016. Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation : Effect of inoculum addition. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 2569–2574. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.225>
- Asunis, F., Gioannis, G. De, Isipato, M., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., 2019. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresour. Technol.* 289.
- Atelge, M.R., Atabani, A.E., Banu, J.R., Krisa, D., Kaya, M., Eskicioglu, C., Kumar, G., Lee, C., Yildiz, Y.Ş., Unalan, S., Mohanasundaram, R., 2020. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. *Fuel* 270, 117494. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117494>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., Deng, Y., 2020. Reviewing

- the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 131, 110023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., 2009. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>
- Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Jerrine, J., 2020. *Protocols in Actinobacterial Research*. Springer Protocols Handbooks.
- Balat, M., Balat, H., 2009. Biogas as a Renewable Energy Source — A Review. *Energy Sources, Part a* 7036, 1280–1293. <https://doi.org/10.1080/15567030802089565>
- Bayrakdar, A., Önder, R., Çalli, B., 2018. Anaerobic digestion of chicken manure by a leach-bed process coupled with side-stream membrane ammonia separation. *Bioresour. Technol.* 258, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.117>
- Beccali, M., Cellura, M., Iudicello, M., Mistretta, M., 2010. Life cycle assessment of Italian citrus-based products . Sensitivity analysis and improvement scenarios. *J. Environ. Manage.* 91, 1415–1428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.02.028>
- Bélafi-bakó, K., Búcsú, D., Pientka, Z., Bálint, B., Herbel, Z., 2006. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.022>
- Bengelsdorf, F.R., Poehlein, A., Schiel-Bengelsdorf, B., Daniel, R., Dürrea, P., 2015. Genome Sequence of the Acetogenic Bacterium *Oxobacter pfennigii*. *genomeA* 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01408-15>. Copyright
- Berk, Z., 2016. *Citrus Fruit Processing*, 1st ed. Elsevier. <https://doi.org/books/citrus-fruit-processing/berk/978-0-12-803133-9>
- Bonugli-Santos, R.C., Marteres, T.J., Luiz, F.N., Somer, J.G., Mari, Â.G., Passarini, M.R.Z., 2022. Prolonged acetogenic phase and biological succession during anaerobic digestion using swine manure. *Folia Microbiol. (Praha)*. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00937-2>
- Boone, D.R., 2015. *Methanobacterium*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00495>.
- Borges, A.V., Fuess, L.T., Takeda, P.Y., Eduarda, M., Helena, M., Zamariolli, R., 2022. Co-digestion of biofuel by-products : Enhanced biofilm formation maintains high organic matter removal when methanogenesis fails. *J. Environ. Manage.* 310. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114768>
- Bouaita, R., Derbal, K., Panico, A., Iasimone, F., Pontoni, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., 2022. Biomass and Bioenergy Methane production from anaerobic co-digestion of orange peel waste and organic fraction of municipal solid waste in batch and semi-continuous reactors. *Biomass and Bioenergy* 160, 106421. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106421>
- Boyano, A., Blanco-Marigorta, A.M., Morosuk, T., Tsatsaronis, G., 2011. Exergoenvironmental analysis of a steam methane reforming process for hydrogen

- production. *Energy* 36, 2202–2214. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.05.020>
- Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2018. Bacterial and archaeal community structure involved in biofuels production using hydrothermal- and enzymatic-pretreated sugarcane bagasse for an improvement in hydrogen and methane production. *Sustain. Energy Fuels* 2644–2660. <https://doi.org/10.1039/c8se00312b>
- BRASIL, 2020. Grupos de Produtos: Exportação Brasileira [WWW Document]. Ministério da Econ. - Secr. Comércio Exter. URL <http://www.mdic.gov.br/index.php/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/series-historicas> (accessed 7.15.20).
- BRENDA Enzyme Database, 2022. The Comprehensive Enzyme Information System [WWW Document]. URL <https://www.brenda-enzymes.org/>
- Buchanan, I.D., Nicell, J.A., 1997. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 251–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970505\)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E)
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., 2016. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production : A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, Z.M.A., 2019. Potential of bio-hydrogen production from dark fermentation of crop residues: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 17346–17362. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.098>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-venegas, E., Steyer, J., Ruiz-filippi, G., Trably, E., 2017. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses : useful insights for driving the ecosystem function. *Microbiol. Rev.* 41, 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Calabrò, P.S., Fazzino, F., Folino, A., Paone, E., Komilis, D., 2019. Semi-Continuous Anaerobic Digestion of Orange Peel Waste: Effect of Activated Carbon Addition and Alkaline Pretreatment on the Process. *Sustainability* 11, 3386. <https://doi.org/10.3390/su11123386>
- Calabro, P.S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., Zema, D.A., Zimbone, S.M., 2017. Valorisation of citrus processing waste: A review, in: *Sixteenth International Waste Management and Landfill Symposium*. CISA Publisher, Cagliari, Italy.
- Calabrò, P.S., Panzera, M.F., 2018. Anaerobic digestion of ensiled orange peel waste : Preliminary batch results. *Therm. Sci. Eng. Prog.* 6, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.tsep.2017.12.011>
- Calabrò, P.S., Paone, E., Komilis, D., 2018. Strategies for the sustainable management of orange peel waste through anaerobic digestion. *J. Environ. Manage.* 212, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.039>
- Calabrò, P.S., Pontoni, L., Porqueddu, I., Greco, R., Pirozzi, F., Malpei, F., 2016. Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. *Waste Manag.* 48, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.032>
- Calabrò, P.S., Pontoni, L., Porqueddu, I., Greco, R., Pirozzi, F., Malpei, F., 2016. Effect of

- the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization : Preliminary batch results. *Waste Manag.* 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.032>
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., Holmes, S., 2016a. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, B., Sankaran, K., Fukuyama, J., McMurdie, P., Holmes, S., 2016b. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research* 5, 1492.
- Camargo, F.P., Kimiko, I., Bize, A., Cristina, I., Duarte, S., Luiz, E., 2020a. Screening design of nutritional and physicochemical parameters on bio-hydrogen and volatile fatty acids production from Citrus Peel Waste in batch reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 7794–7809. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.084>
- Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Mariadassou, M., Loux, V., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Bize, A., Varesche, M.B.A., 2021a. Microbial and functional characterization of an allochthonous consortium applied to hydrogen production from Citrus Peel Waste in batch reactor in optimized conditions. *J. Environ. Manage.* 291, 112631. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112631>
- Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Midoux, C., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Bize, A., Varesche, M.B.A., 2022. Microbial and functional characterization of granulated sludge from full-scale UASB thermophilic reactor applied to sugarcane vinasse treatment. *Environ. Technol.* 1–20.
- Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2021b. Metataxonomic characterization of bacterial and archaeal community involved in hydrogen and methane production from citrus peel waste (*Citrus sinensis* L . Osbeck) in batch reactors. *Biomass and Bioenergy* 149. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106091>
- Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2019. Influence of alkaline peroxide assisted and hydrothermal pretreatment on biodegradability and bio-hydrogen formation from citrus peel waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 22888–22903. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.011>
- Camargo, F.P., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2020. Bioaugmentation with *Enterococcus casseliflavus*: A Hydrogen-Producing Strain Isolated from Citrus Peel Waste. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01049-7>
- Camargo, F.P., Sarti, A., Alécio, A.C., Sabatini, C.A., Adorno, M.A.T., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2020b. Limonene quantification by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and its effects on hydrogen and volatile fatty acids production in anaerobic reactors. *Quim. Nova* 1–7. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170557>
- Cappai, G., Gioannis, G. De, Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Spiga, D., 2015. EFFECT OF INOCULUM TO SUBSTRATE RATIO (ISR) ON HYDROGEN PRODUCTION THROUGH DARK FERMENTATION OF, in: *Proceedings Sardinia 2015, Fifteenth International Waste Management and Landfill Symposium*. CISA Publisher, Cagliari.

- Carvalho, A., Fragoso, R., Gominho, J., Duarte, E., 2019. Effect of Minimizing d -Limonene Compound on Anaerobic Co- digestion Feeding Mixtures to Improve Methane Yield. *Waste and Biomass Valorization* 10, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0048-1>
- Castelló, E., Santos, C.G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor : Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 5674–5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- Cavalcante, W.D.A., Leitão, R.C., Gehring, T.A., Angenent, L.T., Santaella, S.T., 2017. Anaerobic fermentation for n- caproic acid production : A review. *Process Biochem.* 54, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>
- Chen, S., Zhang, J., Wang, X., 2015. Effects of alkalinity sources on the stability of anaerobic digestion from food waste. *Waste Manag. Res.* <https://doi.org/10.1177/0734242X15602965>
- Chen, Y., Liu, H., Zheng, X., Wang, X., Wu, J., 2017. New method for enhancement of bioenergy production from municipal organic wastes via regulation of anaerobic fermentation process. *Appl. Energy* 196, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.01.100>
- Cheng, J., Yue, L., Ding, L., Li, Y.Y., Ye, Q., Zhou, J., Cen, K., Lin, R., 2019. Improving fermentative hydrogen and methane production from an algal bloom through hydrothermal/steam acid pretreatment. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 5812–5820. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.046>
- Cheong, D., Hansen, C.L., 2006. Acidogenesis characteristics of natural , mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochem.* 41, 1736–1745. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.014>
- Choi, J., Ahn, Y., 2015. Biohydrogen Fermentation from Sucrose and Piggery Waste with High Levels of Bicarbonate Alkalinity. *Energies* 1716–1729. <https://doi.org/10.3390/en8031716>
- CITURSBR, 2020. Total Brazilian Orange Juice Exports [WWW Document]. Brazilian Assoc. Citrus Export. URL <http://www.citrusbr.com/en/statistics/?ins=03>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Damasius, J., 2018. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus *Lactobacillus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.015>
- Cook, R.W., 1983. Multiple Stage Pressing, in: *Citrus Engineering Conference*. ASME, Lakeland, Florida.
- Corbari, S.D.M.L., Andreani, C.L., Torres, D.G.B., Eng, F., Gomes, S.D., 2019. Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 17214–17223. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.242>
- Cysneiros, D., Banks, C.J., Heaven, S., Karatzas, K.G., 2012. The effect of pH control and ‘ hydraulic flush ’ on hydrolysis and Volatile Fatty Acids (VFA) production and profile

- in anaerobic leach bed reactors digesting a high solids content substrate. *Bioresour. Technol.* 123, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.060>
- Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., Mohan, S.V., 2021. Renewable hydrogen production by dark-fermentation : Current status , challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.* 321, 124354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>
- Das, D., Veziroglu, T.N., 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6046–6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey : Influence of pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>
- De Gioannis, G., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., 2013. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manag.* 33, 1345–1361. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>
- De la Rubia, M.A., Fernández-Cegrí, V., Raposo, F., Borja, R., 2011. Influence of particle size and chemical composition on the performance and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode. *Biochem. Eng. J.* 58–59, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.010>
- Deheri, C., Acharya, S.K., 2020. Effect of Various Potential Additives on Hydrogen Fermentation During the Co-Digestion of Food Waste and Cow Dung. *Res. Sq.* 1–23.
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane : a review. *Environ. Sci. Biotechnol.* 173–190. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>
- Demirer, G.N., Chen, S., 2008. Anaerobic biogasification of undiluted dairy manure in leaching bed reactors. *Waste Manag.* 28, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.11.005>
- Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* 4065, 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Tzellas, N., Coleman, B., Downes, J., Spratt, D.A., Wade, W.G., 2001. Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family Coriobacteriaceae : description of *Olsenella* gen . nov ., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb . nov . and description of *Olsenella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1797–1804.
- Diallo, M., Kengen, S.W.M., López-Contreras, A.M., 2021. Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 3533–3557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-021-11289-9>
- Dobrzynski, J., Wierzchowski, P.S., Stepien, W., Górska, E.B., 2021. The Reaction of Cellulolytic and Potentially Cellulolytic Spore-Forming Bacteria to Various Types of Crop Management and Farmyard Manure Fertilization in Bulk Soil. *Agronomy* 1–12.
- DOE Energy Efficiency And Renewable Energy Information Center, 2006. Hydrogen Fuel Cells.

- Dong, L.I., Zhenhong, Y., Yongming, S.U.N., Longlong, M.A., Lianhua, L.I., 2009. Sequential Anaerobic Fermentative Production of Hydrogen and Methane from Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2009.00250>
- Dong, W., Yang, Y., Liu, C., Zhang, J., Pan, J., Luo, L., Wu, G., Kumar, M., Yan, B., 2023. Caproic acid production from anaerobic fermentation of organic waste - Pathways and microbial perspective. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 175, 113181. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113181>
- dos Santos, A.C., Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R., 2019. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Trends Biotechnol.* 37, 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.010>
- Dounavis, A.S., Ntaikou, I., Lyberatos, G., 2015. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. *Bioresour. Technol.* 198, 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.072>
- Dridi, B., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M., 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1902–1907. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>
- Duangmanee, T., Padmasiri, S.I., Simmons, J.J., Raskin, L., Sung, S., 2007. Hydrogen Production by Anaerobic Microbial Communities Exposed to Repeated Heat Treatments. *Water Environ. Res.* 79, 975–983. <https://doi.org/10.2175/106143007X175762>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE : highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Elhalil, A., Tounsadi, H., Elmoubarki, R., Mahjoubi, F.Z., Farnane, M., 2016. Factorial experimental design for the optimization of catalytic degradation of malachite green dye in aqueous solution by Fenton process. *Water Resour. Ind.* 15, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2016.07.002>
- Ellacuriaga, M., González, R., Gómez, X., 2022. Is Decentralized Anaerobic Digestion a Solution ? Analyzing Biogas Production and Residential Energy Demand. *Eng* 662–676.
- EPE, 2021. Anuário Estatístico de Energia Elétrica 2021 - Ano base 2020.
- Esposito, G., Frunzo, L., Giordano, A., Pirozzi, F., Liotta, A., Panico, F., 2012. Anaerobic co-digestion of organic wastes. *Environ. Sci. Biotechnol.* 325–341.

<https://doi.org/10.1007/s11157-012-9277-8>

- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., Anzola-rojas, M.P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V.M., 2016. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Bioenergy and Biofuels* 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>
- Fagbohunge, M.O., Herbert, B.M.J., Hurst, L., Li, H., Usmani, S.Q., Semple, K.T., 2016. Bioresource Technology Impact of biochar on the anaerobic digestion of citrus peel waste. *Bioresour. Technol.* 216, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.106>
- FAO, 2019. Food and agriculture data [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed 7.15.20).
- Feldewert, C., Lang, K., Brune, A., 2020. The hydrogen threshold of obligately methyl-reducing methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 1–7.
- Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>
- Feng, S., Hao, H., Guo, W., Woong, S., Duc, D., Liu, Y., Zhang, X., 2022. Wastewater-derived biohydrogen : Critical analysis of related enzymatic processes at the research and large scales. *Sci. Total Environ.* 851, 158112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158112>
- Fernandes, B.S., Peixoto, G., Albrecht, F.R., Saavedra del Aguila, N.K., Zaiat, M., 2010. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy Sustain. Dev.* 14, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2010.03.004>
- Ferraz, A.D.N., Koyama, M.H., Araújo, M.M. De, Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renew. Energy* 89, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.064>
- Ferraz, A.D.N., Zaiat, M., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., 2014. Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UAnPBR). *Bioresour. Technol.* 164, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.011>
- Ferraz, N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors b. *Int. J. Hydrogen Energy* 9, 0–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.017>
- Ferreira, T.B., Rego, G.C., Ramos, L.R., Menezes, C.A. de, Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2019. HRT control as a strategy to enhance continuous hydrogen production from sugarcane juice under mesophilic and thermophilic conditions in AFBRs. *Int. J. Hydrog. Energy* 4. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.050>
- Forgács, G., Pourbafrani, M., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., Hováth, I.S., 2012. Methane production from citrus wastes: Process development and cost estimation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 250–255. <https://doi.org/10.1002/jctb.2707>

- Frear, G.L., Johnston, J., 1929. THE SOLUBILITY OF CALCIUM CARBONATE (CALCITE) IN CERTAIN AQUEOUS SOLUTIONS AT 25*. *J. Am. Chem. Soc.* 51, 2082–2093.
- Freitas, L.C., Barbosa, J.R., Costa, A.L.C., Bezerra, F.W.F., Pinto, R.H.H.J., Carvalho, R.N., 2021. From waste to sustainable industry : How can agro-industrial wastes help in the development of new products ? *Resour. , Conserv. Recycl.* 169, 105466. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105466>
- Fu, S.F., Liu, R., Sun, W.X., Zhu, R., Zou, H., Zheng, Y., Wang, Z.Y., 2020. Enhancing energy recovery from corn straw via two-stage anaerobic digestion with stepwise microaerobic hydrogen fermentation and methanogenesis. *J. Clean. Prod.* 247, 119651. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119651>
- Fuess, L.T., Ferraz, A.D.N., Machado, C.B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation : The key role of lactate. *Bioresour. Technol.* 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 8132–8145. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.143>
- Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Júnior, A.D.N.F., Persinoti, G.F., Squina, F.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Appl. Energy* 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>
- Galvagno, A., Prestipino, M., Maisano, S., Urbani, F., 2019. Integration into a citrus juice factory of air-steam gasification and CHP system : Energy sustainability assessment. *Energy Convers. Manag.* 193, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.04.067>
- Garcia-Peña, E.I., Parameswaran, P., Kang, D.W., Canul-chan, M., Krajmalnik-brown, R., 2011. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues : Process and microbial ecology. *Bioresour. Technol.* 102, 9447–9455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.068>
- GE Power and Water, 2013. Jenbacher type 6.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass : Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Goldmeer, J., 2019. POWER TO GAS : HYDROGEN FOR POWER GENERATION Fuel Flexible Gas Turbines as Enablers for a Low or Reduced Carbon Energy Ecosystem. *Gen. Electr. Co.*
- Gomes, M.M., Sakamoto, I.K., Rabelo, C.A., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2021. Statistical optimization of methane production from brewery spent grain : Interaction effects of temperature and substrate concentration. *J. Environ. Manage.* 288, 112363.

- Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, A., Chairez, I., Torres, L., García-Pena, E.I., 2014. Selective adaptation of an anaerobic microbial community : Biohydrogen production by co- digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrog. Energy* 9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>
- Grause, G., Igarashi, M., Kameda, T., Yoshioka, T., 2012. Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 16967–16973. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.096>
- Greses, S., Tomás-pejó, E., Gónzalez-fernández, C., 2020. Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 297, 122486. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122486>
- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. *Bioresour. Technol.* 135, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.165>
- Guo, X.M., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P., Trably, E., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Guzmán, J., Mosteo, R., Ormad, P., Ovelleiro, J.L., 2015. Combined Photo-Fenton – SBR Processes for the Treatment of Wastewater from the Citrus Processing Industry. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf505377a>
- Hallenbeck, P.C., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2005.0494>
- Han, G., Gu, S., Lee, J., Shin, J., Hwang, S., 2017. A comparative study on the process e ffi ciencies and microbial community structures of six full-scale wet and semi-dry anaerobic digesters treating food wastes. *Bioresour. Technol.* 245, 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.167>
- Han, H., Cui, M., Wei, L., Yang, H., Shen, J., 2011. Enhancement effect of hematite nanoparticles on fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 7903–7909. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.089>
- Han, W., Yan, Y., Gu, J., Shi, Y., Tang, J., Li, Y., 2016. Techno-economic analysis of a novel bioprocess combining solid state fermentation and dark fermentation for H₂ production from food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 22619–22625. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.047>
- Hartmanis, M.G.N., Gatenbeck, S., 1984. Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum* : Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1277–1283.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1339–1347.
- Hernandez-Mendoza, C.E., Moreno-Andrade, I., Buitrón, G., 2014. Comparison of hydrogen-producing bacterial communities adapted in continuous and discontinuous reactors. *Int.*

- J. Hydrog. Energy 9, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.014>
- Herrmann, C., Idler, C., Heiermann, M., 2016. Biogas crops grown in energy crop rotations : Linking chemical composition and methane production characteristics. *Bioresour. Technol.* 206, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.058>
- Holliger, C., Astals, S., Laclos, H.F. de, Hafner, S.D., Koch, K., Weinrich, S., 2021. Towards a standardization of biomethane potential tests: a commentary. *Water Sci. Technol.* 247–250. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.569>
- Hu, C.C., Giannis, A., Chen, C.L., Qi, W., Wang, J.Y., 2013. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 15686–15692. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.131>
- Hu, X., Zeng, J., Shen, F., Xia, X., Tian, X., Wu, Z., 2022. Citrus pomace fermentation with autochthonous probiotics improves its nutrient composition and antioxidant activities. *LWT - Food Sci. Technol.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113076>
- Hussain, A., Filiatrault, M., Guiot, S.R., 2017. Acidogenic digestion of food waste in a thermophilic leach bed reactor : Effect of pH and leachate recirculation rate on hydrolysis and volatile fatty acid production. *Bioresour. Technol.* 245, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.130>
- Imachi, H., Sakai, S., 2016. *Methanolinea*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* 2014–2017. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01367>
- Infantes, D., Campo, A.G. del, Villasenor, J., Fernandez, F.J., 2011. Influence of pH , temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 6, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.061>
- International Energy Agency, 2020. Outlook for biogas and biomethane: Prospects for organic growth.
- Intratec Primary Commodity Prices, 2018a. Calcium Carbonate Prices [WWW Document]. Calcium Carbonate Prices. URL <https://www.intratec.us/chemical-markets/calcium-carbonate-price> (accessed 2.2.23).
- Intratec Primary Commodity Prices, 2018b. Sodium Bicarbonate Prices [WWW Document]. Sodium Bicarbonate Prices. URL <https://www.intratec.us/chemical-markets/sodium-bicarbonate-price>
- Izumi, K., Okishio, Y., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T., 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 64, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.013>
- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., Ohkuma, M., Hamdi, M., Fauque, G., Ollivier, B., Fardeau, M., 2012. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2522–2527. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032508-0>
- Jamroskovic, J., Chromikova, Z., List, C., Bartova, B., 2016. Variability in DPA and Calcium Content in the Spores of *Clostridium* Species. *Front. Microbiol.* 7, 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01791>

- Jianlong, W., Wei, W., 2008. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Sci. China Ser. B Chem.* 51, 1110–1117. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0104-6>
- Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, D.S., Park, J.M., 2007. Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J. Biotechnol.* 131, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.492>
- Julio, A.A.V., de Souza, T.A.Z., Rocha, D.H.D., Coronado, C.J.R., Palacio, J.C.E., Silveira, J.L., 2022. Environmental Footprints of Hydrogen from Crops, in: Subramanian Senthilkannan Muthu (Ed.), *Environmental Footprints of Crops*. Hong Kong, China, p. 143. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-0534-6>
- Jyothsna, T.S.S., Tushar, L., Sasikala, C., Ramana, C. V, 2016. *Paraclostridium benzoelyticum* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of *Clostridium bifermentans* as *Paraclostridium bifermentans* comb. nov. Proposal of a new genus *Paeniclostridium* gen. nov. to accommodate *Clostridium* s. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1268–1274. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000874>
- Kageyama, K., Benno, Y., 2000. Phylogenic and Phenotypic Characterization Some Eubacterium-Like Isolates from Human Feces : Description of *Solobacterium moorei* Gen. Nov., Sp. Nov. *Microbiol. Immunol.* 44, 223–227.
- Kainthola, J., Kalamdhad, A.S., Goud, V. V, 2019. Optimization of methane production during anaerobic co-digestion of rice straw and hydrilla verticillata using response surface methodology. *Fuel* 235, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.094>
- Kampmann, K., Ratering, S., Baumann, R., Schmidt, M., Zerr, W., Schnell, S., 2012. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.07.002>
- Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 209–224. <https://doi.org/10.1007/bf00399499>
- Kang, Y., Su, Y., Wang, J., Chu, Y., Tian, G., He, R., 2021. Effects of different pretreatment methods on biogas production and microbial community in anaerobic digestion of wheat straw. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 51772–51785.
- Karaouzas, I., Cotou, E., Albanis, T.A., Kamarianos, A., Skoulikidis, N.T., Giannakou, U., 2010. Bioassays and Biochemical Biomarkers for Assessing Olive Mill and Citrus Processing Wastewater Toxicity. *Environ. Toxicol.* 669–676.
- Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S., 1976. Continuous Hydrogen Production By Immobilized Whole Cells Of *Clostridium Butyricum*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 444, 338–343. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90376-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90376-7)
- KEGG Pathway Database, 2022. Wiring diagrams of molecular interactions, reactions and relations [WWW Document]. URL <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- Kim, B., Jeon, B.S., Kim, S., Kim, H., 2015. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a

- wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4902–4908.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000665>
- Kim, D., Han, S., Kim, S., Shin, H., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 2158–2169.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>
- Kim, D., Jang, S., Yun, Y., Lee, M., 2014. Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste : Microbial community analysis by next generation sequencing. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 16302–16309.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.004>
- Kim, D., Kim, S., Jung, K., Kim, M., Shin, H., 2011. Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 102, 8646–8652. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.030>
- Kim, H., Jeon, B.S., Sang, B., 2019. An Efficient New Process for the Selective Production of Odd-Chain Carboxylic Acids by Simple Carbon Elongation Using *Megasphaera hexanoica*. *Sci. Rep.* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48591-6>
- Kirli, B., Karapinar, I., 2018. The effect of HRT on biohydrogen production from acid hydrolyzed waste wheat in a continuously operated packed bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 10678–10685. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.175>
- Kisielewska, M., Debowski, M., Zielinski, M., 2015. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 1925–1933.
<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1434-3>
- Kist, B.B., Carvalho, C., Treichel, M., Santos, C.E., 2018. Anuário brasileiro da fruticultura. *Gaz. St. Cruz* 88.
- Knudsen, M.T., Almeida, G.F. de, Langer, V., Abreu, L.S. de, Halberg, N., 2011. Environmental assessment of organic juice imported to Denmark : a case study on oranges (*Citrus sinensis*) from Brazil. *Org. Agric.* 167–185.
<https://doi.org/10.1007/s13165-011-0014-3>
- Koppar, A., Pullammanappallil, P., 2013. Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for on site energy generation in a citrus processing facility. *Energy* 60, 62–68.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.08.007>
- Korth, B., Maskow, T., Günther, S., Harnisch, F., 2017. Estimating the Energy Content of Wastewater Using Combustion Calorimetry and Different Drying Processes. *Front. Energy Res.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00023>
- Koyama, M., Yamamoto, S., Ishikawa, K., Ban, S., Toda, T., 2017. Inhibition of anaerobic digestion by dissolved lignin derived from alkaline pre-treatment of an aquatic macrophyte. *Chem. Eng. J.* 311, 55–62.
- Kraatz, M., Wallace, R.J., Svensson, L., 2011. *Olsenella umbonata* sp . nov ., a microaerotolerant anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum , and emended descriptions of *Olsenella* , *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, 795–803. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.022954-0>

- Krumholz, L.R., Bryant, M.P., 1985. *Clostridium pfennigii* sp. nov. Uses Methoxyl Groups of Monobenzenoids and Produces Butyrate. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 6–8.
- Kucek, L.A., Nguyen, M., Angenent, L.T., 2016. Conversion of L -lactate into n -caproate by a continuously fed reactor microbiome. *Water Res.* 93, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.018>
- Kumar, G., Lin, C., 2013. Bioconversion of de-oiled Jatropha Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation : Influence of substrate concentration , temperature and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.053>
- Kung, L.J., Hession, A.O., 1995. Preventing In Vitro Lactate Accumulation in Ruminant Fermentations by Inoculation with *Megasphaera*. *J. Anim. Sci.* 250–256.
- Kurniawan, T., Lukitawesa, Hanifah, I., Wikandari, R., Millati, R., Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., 2018. Semi-continuous reverse membrane bioreactor in two-stage anaerobic digestion of citruswaste. *Materials (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/ma11081341>
- Kurth, J.M., Camp, H.J.M.O. den, Welte, C.U., 2020. Several ways one goal — methanogenesis from unconventional substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6839–6854.
- Kushkevych, I., Kobzová, E., Vítězová, M., Vítěz, T., Dordević, D., Bartoš, M., 2019. Acetogenic microorganisms in operating biogas plants depending on substrate combinations. *Biologia (Bratisl)*. 1229–1236.
- Ladd, J.N., Walker, D.J., 1965. Fermentation of lactic acid by the rumenmicroorganism *Peptostreptococcus elsdenii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 119, 1038–1047.
- Lagoa-costa, B., Kennes, C., Veiga, M.C., 2022. Influence of feedstock mix ratio on microbial dynamics during acidogenic fermentation for polyhydroxyalkanoates production. *J. Environ. Manage.* 303, 114132. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114132>
- Laloui-carpentier, W., Li, T., Vigneron, V., Maze, L., 2006. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 821, 423–434. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9051-9>
- Lane, A.G., 1983. Pretreatment of citrus peel press liquor before anaerobic digestion. *Environ. Technol. Lett.* 4, 73–78.
- Lawson, P.A., Rainey, F.A., 2015. Proposal to restrict the genus *Clostridium* (Prazmowski) to *Clostridium butyricum* and related species Proposal to restrict the genus *Clostridium Prazmowski* to *Clostridium butyricum* and related species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1–8. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000824>
- Lazaro, C.Z., Vich, D.V., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2012. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 11691–11700. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.088>

- Lee, H., Krajmalnik-brown, R., Zhang, H., Rittmann, B.E., 2009. An Electron-Flow Model Can Predict Complex Redox Reactions in Mixed-Culture Fermentative BioH₂: Microbial Ecology Evidence. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 687–697. <https://doi.org/10.1002/bit.22442>
- Lee, H., Salerno, M.B., Rittmann, B.E., 2008. Thermodynamic Evaluation on H₂ Production in Glucose Fermentation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2401–2407.
- Lee, H., Vermaas, W.F.J., Rittmann, B.E., 2010. Biological hydrogen production : prospects and challenges. *Trends Biotechnol.* 28, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.007>
- Lee, Y.J., Miyahara, T., Noike, T., 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 698, 694–698. <https://doi.org/10.1002/jctb.623>
- Lee, Z., Li, S., Kuo, P., Chen, I., Tien, Y., Huang, Y., Chuang, C., Wong, S., Cheng, S., 2010. Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 13458–13466. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.126>
- Levén, L., Schnurer, A., 2005. Effects of temperature on biological degradation of phenols , benzoates and phthalates under methanogenic conditions. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.09.004>
- Li, D., Jiao, C., He, W., Yan, Z., Yuan, Y., Li, Z., Guo, Y., Liu, X., 2016. Comparison of micro-aerobic and anaerobic fermentative hydrogen production from corn straw. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 5456–5464. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.01.141>
- Li, L., Peng, X., Wang, X., Wu, D., 2018. Anaerobic digestion of food waste : A review focusing on process stability. *Bioresour. Technol.* 248, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.012>
- Li, Q., Qiao, W., Wang, X., Takayanagi, K., Shofie, M., Li, Y., 2015. Kinetic characterization of thermophilic and mesophilic anaerobic digestion for coffee grounds and waste activated sludge. *Waste Manag.* 36, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.016>
- Li, S., Lin, J., Wang, Y., Lee, Z., Kuo, S., Tseng, I., Cheng, S., 2011. Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresour. Technol.* 102, 8682–8687. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.067>
- Li, Z., Chen, Z., Ye, H., Wang, Y., Luo, W., Chang, J., Li, Q., He, N., 2018. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste for hydrogen and VFA production with microbial community analysis. *Waste Manag.* 78, 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.06.046>
- Liao, X., Roc, X., 2020. Public appeal , environmental regulation and green investment : Evidence from China. *Energy Policy* 119, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2018.05.020>
- Lin, C., Hung, C., Chen, C., Chung, W., Cheng, L., 2006. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process*

- Biochem. 41, 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.021>
- Lin, C., Lay, C.H., 2004. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrog. Energy* 29, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.07.002>
- Lin, J.W., Wang, J., 2013. Enhanced hydrolysis and methane yield by applying microaeration pretreatment to the anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Waste Manag.* 33, 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.11.013>
- Lin, P., Whang, L., Wu, Y., Ren, W., Hsiao, C., 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium* : Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 1728–1735. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.12.009>
- Liu, C., Wu, S., Chu, C., Chou, Y., 2014. Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 9, 5–10.
- Liu, H., Wang, G., Zhu, D., Pan, G., 2009. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 9696–9701. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.025>
- Liu, S., Li, W., Zheng, G., Yang, H., Li, L., 2020. Optimization of Cattle Manure and Food Waste Co-Digestion for Biohydrogen Production in a Mesophilic Semi-continuous Process. *Energies* 13, 3848.
- Liu, T., Schnürer, A., Björkmalm, J., Willquist, K., Kreuger, E., 2020. Diversity and Abundance of Microbial Communities in UASB Reactors during Methane Production from Hydrolyzed Wheat Straw and Lucerne. *Microorganisms* 1–27.
- López, J.A., Li, Q., Thompson, I.P., 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 63–69. <https://doi.org/10.3109/07388550903425201>
- Lotito, A.M., De Sanctis, M., Pastore, C., Di Iaconi, C., 2018. Biomethanization of citrus waste: Effect of waste characteristics and of storage on treatability and evaluation of limonene degradation. *J. Environ. Manage.* 215, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.057>
- Lu, F., He, P.J., Hao, L.P., Shao, L.M., 2008. Impact of recycled effluent on the hydrolysis during anaerobic digestion of vegetable and flower waste. *Water Sci. Technol.* 1637–1643. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.511>
- Lu, J., Chen, C., Huang, C., Lee, D., 2020. Glucose fermentation with biochar-amended consortium : microbial consortium shift. *Bioengineered* 11, 272–280. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1735668>
- Lu, L., Xing, D., Ren, N., Logan, B.E., 2012. Syntrophic interactions drive the hydrogen production from glucose at low temperature in microbial electrolysis cells. *Bioresour. Technol.* 124, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.040>
- Lukajtis, R., Holowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., Kaminski, M., 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>

- Lukitawesa, Wikandari, R., Millati, R., Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., 2018. Effect of effluent recirculation on biogas production using two-stage anaerobic digestion of citrus waste. *Molecules* 23, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules23123380>
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I., 2011. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresour. Technol.* 102, 8700–8706. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.012>
- Luo, L., Sriram, S., Johnravindar, D., Louis, T., Martin, P., Wong, J.W.C., Pradhan, N., 2022. Effect of inoculum pretreatment on the microbial and metabolic dynamics of food waste dark fermentation. *Bioresour. Technol.* 358, 127404. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127404>
- Luo, L., Xu, S., Liang, J., Zhao, J., Wong, J.W.C., 2023. Mechanistic study of the effect of leachate recirculation ratios on the carboxylic acid productions during a two-phase food waste anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 453, 139800. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139800>
- Luongo, V., Policastro, G., Ghimire, A., Pirozzi, F., Fabbicino, M., 2019. Repeated-Batch Fermentation of Cheese Whey for Semi-Continuous Lactic Acid Production Using Mixed Cultures at Uncontrolled pH. *Sustainability* 1–12.
- Maintinguer, S.I., Sakamoto, I.K., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B.A., 2015. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 3180–3190. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.118>
- Martín, M.A., Fernández, R., Serrano, A., Siles, J.A., 2013. Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Manag.* 33, 1633–1639. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.027>
- Martín, M.A., Siles, J.A., Chica, A.F., Martín, A., 2010. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresour. Technol.* 101, 8993–8999. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.133>
- Matyakubov, B., Hwang, Y., Lee, T., 2022. Evaluating interactive toxic impact of heavy metals and variations of microbial community during fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 47, 31223–31240. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.038>
- Mazareli, R.C. d. S., Villa-Montoya, A.C., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Maia de Oliveira, V., Silva, E.L., Amâncio Varesche, M.B., 2020. Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. *Biomass and Bioenergy* 138, 105573. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105573>
- Mazareli, R.C. da S., Montoya, A.C.V., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Oliveira, V.M. de, Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2021. Enzymatic routes to hydrogen and organic acids production from banana waste fermentation by autochthonous bacteria : Optimization of pH and temperature. *Int. J. Hydrog. Energy* 6, 8454–8468. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.12.063>
- Mazorra-manzano, M.A., Robles-porchas, G.R., Mart, M., Ram, J.C., Garc, C.O., Torres-

- Ilanez, M.J., Gonz, F., 2022. Bacterial Diversity and Dynamics during Spontaneous Cheese Whey Fermentation at Different Temperatures. *Fermentation* 8, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation8070342>
- McMurdie, P., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, 61217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendoza, E.S.R., Contreras, J.M.M., Sibaja, A.M., Cantú, N.A.V., Alvarado, A.L., 2018. Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an Anaerobic Hybrid Reactor. *Clean Technol. Environ. Policy* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1483-1>
- Menezes, C.A., Almeida, P. de S., Delforno, T.P., Oliveira, V.M., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2023. Relating biomass composition and the distribution of metabolic functions in the co-fermentation of sugarcane vinasse and glycerol. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.271>
- Menezes, C.A., Silva, E.L., 2019. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions : The role of homoacetogenesis and lactic acid production. *Ind. Crop. Prod.* 138, 111586. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111586>
- MME - Ministério de Minas e Energia, 2022. Boletim Mensal - Acompanhamento da Indústria de Gás Natural. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Departamento de Gás Natural.
- Mockaitis, G., Bruant, G., Guiot, S.R., Peixoto, G., Foresti, E., Zaiat, M., 2020. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. *Renew. Energy* 145, 1388–1398.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures ? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 32, 934–951. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- Monot, F., Engasser, J.-M., Petitdemange, H., 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 422–426.
- Mota, V.T., Júnior, A.D.N.F., Trably, E., Zaiat, M., 2018. Biohydrogen production at pH below 3.0 : Is it possible ? *Water Res.* 128, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>
- Mou, A., Yu, N., Sun, H., Liu, Y., 2022. Spatial distributions of granular activated carbon in up-flow anaerobic sludge blanket reactors influence methane production treating low and high solid-content wastewater. *Bioresour. Technol.* 127995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127995>
- Moura, A.G.L., Rabelo, C.A.B.S., Okino, C.H., Maintinguer, S.I., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. Enhancement of *Clostridium butyricum* hydrogen production by iron and nickel nanoparticles : Effects on hydA expression. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 28477–28461. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.161>

- Myint, M.T., Nirmalakhandan, N., 2009. Enhancing anaerobic hydrolysis of cattle manure in leachbed reactors. *Bioresour. Technol.* 100, 1695–1699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.031>
- National Center for Biotechnology Information, 2022a. PubChem Annotation Record for Sodium bicarbonate, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB) [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/697> (accessed 4.20.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022b. PubChem Compound Summary for CID 10112, Calcium carbonate [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-carbonate> (accessed 4.20.22).
- Ndubuisi-nnaji, U.U., Inyang-enin, A.O., Ofon, U.A., Ibadode, O., 2020. Metagenomic Study of Bacterial and Archaeal Populations during Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Waste in Lab-scale Biogas Reactors. *Eur. J. Biol. Biotechnol.* 1, 1–10.
- Nguyen, D., Nitayavardhana, S., Sawatdeenarunat, C., Surendra, K.C., Khanal, S.K., 2019. *Biogas Production by Anaerobic Digestion: Status and Perspectives*, 2nd ed, Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816856-1.00031-2>
- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K., Jacob, N., Anisha, G.S., Prema, P.Ā., 2009. Optimization of laccase production from a novel strain — *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiol. Res.* 164, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.006>
- Ntagia, E., Chatzigiannidou, I., Williamson, A.J., Arends, J.B.A., 2020. Homoacetogenesis and microbial community composition are shaped by pH and total sul fi de concentration. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13546>
- Obata, O., Ditch, A., Hatton, A., Akunna, J., 2020. Investigating the impact of inoculum source on anaerobic digestion of various species of marine macroalgae. *Algal Res.* 46. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101803>
- Ohimain, E.I., 2016. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages : the microbial dimension. *Springerplus* 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3303-1>
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M., 2010. Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 8544–8553. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.113>
- Ottaviano, L.M., Ramos, L.R., Botta, L.S., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2016. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor : Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* 2. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.168>
- Owusu-agyeman, I., Plaza, E., Cetecioglu, Z., 2022. Long-term alkaline volatile fatty acids production from waste streams : Impact of pH and dominance of *Dysgonomonadaceae*. *Bioresour. Technol.* 346, 126621. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126621>
- Palladino, T., Gileno, D., Lacerda, V., Melline, J., Sakamoto, I.K., Bernadete, M., Valéria, A.V., 2017. Microbial diversity of a full- - scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment : integration of 16S rRNA gene amplicon and

- shotgun metagenomic sequencing. *Microbiol. Open* 1–12. <https://doi.org/10.1002/mbo3.443>
- Palma, D., Tadeu, L., Lima-model, A.N. De, Pascoli, M., Hermínia, M., Tavares, F., 2018. Using dolomitic limestone to replace conventional alkalization in the biodigestion of rapid acidified cassava processing wastewater. *J. Clean. Prod.* 172, 2942–2953. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.118>
- Pan, S., Alex, M., Huang, I., Liu, I., Chang, E., Chiang, P., 2015. Strategies on implementation of waste-to-energy (WTE) supply chain for circular economy system : a review. *J. Clean. Prod.* 108, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.124>
- Pan, X., Zhao, L., Li, C., Angelidaki, I., Lv, N., Ning, J., Cai, G., Zhu, G., 2021. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion : focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. *Water Res.* 190, 116774. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116774>
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Park, J., Kumar, G., Park, J., Park, H., Kim, S., 2015. Changes in performance and bacterial communities in response to various process disturbances in a high-rate biohydrogen reactor fed with galactose. *Bioresour. Technol.* 188, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.107>
- Park, J., Lee, S., Ju, H., Kim, S., Yoon, J., Park, H., 2016. Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation. *Renew. Energy* 86, 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.016>
- Park, J., Lee, S., Yoon, J., Kim, S., Park, H., 2014. Predominance of cluster I Clostridium in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges. *Bioresour. Technol.* 157, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.081>
- Patria, R.D., Rehman, S., Vuppaladiyam, A.K., Wang, H., Lin, C.S.K., Antunes, E., Leu, S., 2022. Bioconversion of food and lignocellulosic wastes employing sugar platform : A review of enzymatic hydrolysis and kinetics. *Bioresour. Technol.* 352, 127083. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127083>
- Peixoto, G., Pantoja-filho, J.L.R., Augusto, J., Agnelli, B., Barboza, M., Zaiat, M., 2012. Hydrogen and Methane Production , Energy Recovery , and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 651–671. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9807-4>
- Perna, V., Castello, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D.M.F., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int. J. Hydrogen Energy* 8, 0–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022>
- Pessione, A., Lamberti, C., Pessione, E., 2010. Proteomics as a tool for studying energy metabolism in lactic acid bacteria. *Mol. Biosyst.* 1–21. <https://doi.org/10.1039/c001948h>
- Plette, A.C.C., Benedetti, M.F., Riemsdijk, W.H. Van, 1996. Competitive Binding of Protons , Calcium , Cadmium , and Zinc to Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil

- Bacterium. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1902–1910.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6, 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Pontoni, L., D'Antonio, G., Esposito, G., Fabbricino, M., Frunzo, L., Pirozzi, F., 2015. Thermal pretreatment of olive mill wastewater for efficient methane production: Control of aromatic substances degradation by monitoring cyclohexane carboxylic acid. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 36, 1785–1794. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1012179>
- Pot, B., Felis, G.E., Bruyne, K. De, Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., Vandamme, P., 2014. The genus *Lactobacillus*, in: *Lactic Acid Bacteria*. pp. 249–353.
- Prem, E.M., Markt, R., Lackner, N., Illmer, P., Wagner, A.O., 2019. Microbial and Phenyl Acid Dynamics during the Start-up Phase of Anaerobic Straw Degradation in Meso- and Thermophilic Batch Reactors. *Microorganisms* 1–18.
- Pu, Y., Tang, J., Wang, X.C., Hu, Y., 2019. Hydrogen production from acidogenic food waste fermentation using untreated inoculum : Effect of substrate concentrations. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 27272–27284. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.230>
- Qin, S., Wainaina, S., Liu, H., Mahboubi, A., Pandey, A., Zhang, Z., Kumar, M., Taherzadeh, M.J., 2021. Microbial dynamics during anaerobic digestion of sewage sludge combined with food waste at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors. *Fuel* 303, 121276. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121276>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Glo, F.O., Yarza, P., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rabelo, C.A.B.S., Okino, C.H., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2020. Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. *Sci. Total Environ.* 715, 136868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136868>
- Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *J. Environ. Manage.* 223, 952–963. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015>
- Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., Elbeshbishy, E., 2019. A Review on Anaerobic Co-Digestion with a Focus on the Microbial Populations and the Effect os Multi-Stage Digester Configuration. *Energies* 12, 1–25. <https://doi.org/10.3390/en12061106>
- Rajan, K.S., Jaw, R., Grecz, N., 1978. Role of Chelation and Water Binding of Calcium in Dormancy and Heat Resistance of Bacterial Endospores. *Bioinorg. Chem.* 1, 47--491.
- Reungsang, A., Pattra, S., Sittijunda, S., 2012. Optimization of Key Factors Affecting Methane Production from Acidic Effluent Coming from the Sugarcane Juice Hydrogen Fermentation Process. *Energies* 4746–4757. <https://doi.org/10.3390/en5114746>
- Rhee, S.K., Pack, Y., 1980. Effect of Environmental pH on Fermentation Balance of

- Lactobacillus bulgaricus. *J. Bacteriol.* 144, 217–221.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jb.144.1.217-221.1980>
- Ribeiro, J.C., Mota, V.T., Oliveira, V.M., Zaiat, M., 2022. Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of cheese whey without buffers under mesophilic condition. *J. Environ. Manage.* 304, 114253.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114253>
- Rievaj, V., Gaňa, J., Synák, F., 2019. Is hydrogen the fuel of the future ? *Transp. Res. Procedia* 40, 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.trpro.2019.07.068>
- Riggio, S., Torrijos, M., Debord, R., Esposito, G., Hullebusch, E.D. Van, Steyer, J.P., Escudié, R., 2017a. Mesophilic anaerobic digestion of several types of spent livestock bedding in a batch leach-bed reactor : substrate characterization and process performance. *Waste Manag.* 59, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.027>
- Riggio, S., Torrijos, M., Vives, G., Esposito, G., Hullebusch, E.D. Van, Steyer, J.P., Escudié, R., 2017b. Leachate flush strategies for managing volatile fatty acids accumulation in leach-bed reactors. *Bioresour. Technol.* 232, 93–102.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.060>
- Ripley, A.L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Water Pollut. Control Fed.* 58, 406–411.
- Rocha, D.H.D., de Souza, T.A.Z., Coronado, C.J.R., Silveira, J.L., Silva, R.J., 2021. Exergoenvironmental analysis of hydrogen production through glycerol steam reforming. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.10.012>
- Rocha, D.H.D., Souza, T.A.Z. De, Coronado, C.J.R., Silveira, J.L., 2021. Exergoenvironmental analysis of hydrogen production through glycerol steam reforming. *Int. J. Hydrogen Energy.* <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.10.012>
- Rodrigues, B.C.G., Mello, B.S., Silva, B.F., Pozzi, E., Gomes, P.C.F.L., Sarti, A., 2021. Limonene removal using a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass bioreactor. *J. Water Process Eng.* 43, 102225. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102225>
- RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F., 2014. Planejamento de experimentos e otimização de processos., 3^a. ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Campinas - SP.
- Rosas-Mendoza, E.S., Mendez-Contreras, J.M., Aguilar-Lasserre, A.A., Vallejo-Cantú, N.A., Alvarado-Lassman, A., 2020. Evaluation of bioenergy potential from citrus effluents through anaerobic digestion. *J. Clean. Prod.* 254, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120128>
- Ruiz, B., De Benito, A., Rivera, J.D., Flotats, X., 2016. Assessment of different pre-treatment methods for the removal of limonene in citrus waste and their effect on methane potential and methane production rate. *Waste Manag. Res.* 34, 1249–1257.
<https://doi.org/10.1177/0734242X16661053>
- Ruiz, B., Flotats, X., 2016. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. *Biochem. Eng. J.* 109, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.011>

- Ruiz, B., Flotats, X., 2014. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Manag.* 34, 2063–2079. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.026>
- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Salek, S.S., Turnhout, A.G. Van, Kleerebezem, R., Loosdrecht, M.C.M. Van, 2015. pH Control in Biological Systems Using Calcium Carbonate. *Biotechnol. Bioeng.* 112. <https://doi.org/10.1002/bit.25506>
- Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E., 2012. The Genus *Lactobacillus* : A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>
- Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H., Malpei, F., 2013. A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Appl. Energy* 104, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.060>
- Sangyoka, S., Reungsang, A., Lin, C., 2016. Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method. *Sustain. Environ. Res.* 26, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2016.05.001>
- Santiago, S.G., Morgan-sagastume, J.M., Monroy, O., 2020. Biohydrogen production from organic solid waste in a sequencing batch reactor : An optimization of the hydraulic and solids retention time. *Int. J. Hydrog. Energy* 5, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.224>
- Santiago, S.G., Trably, E., Latrille, E., 2019. The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter* , *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. *Lett. Appl. Microbiolgy* 69, 138–147. <https://doi.org/10.1111/lam.13191>
- Santiago, S.G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., 2019. The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. *Lett. Appl. Microbiolgy* 69, 138–147. <https://doi.org/10.1111/lam.13191>
- Saritpongteeraka, K., Chaiprapat, S., Boonsawang, P., Sung, S., 2015. Solid state co-fermentation as pretreatment of lignocellulosic palm empty fruit bunch for organic acid recovery and fiber property improvement *International Biodeterioration & Biodegradation Solid state co-fermentation as pretreatment of lignocellulosic p.* *Int. Biodeterior. Biodegradation* 100, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.001>
- Satari, B., Karimi, K., 2018. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resour. Conserv. Recycl.* 129, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>
- Sattar, A., Arslan, C., Ji, C., Sattar, S., Mari, I.A., Rashid, H., Ilyas, F., 2016. Comparing the bio-hydrogen production potential of pretreated rice straw co-digested with seeded sludge using an anaerobic bioreactor under mesophilic thermophilic conditions. *Energies* 9. <https://doi.org/10.3390/en9030198>

- Schink, B., 1997. Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280.
- Schink, B., Zeikus, J.G., 1980. Microbial Methanol Formation : A Major End Product of Pectin Metabolism. *Curr. Microbiol.* 4, 387–389.
- Schroeder, B.G., Logroño, W., 2022. Enrichment of Anaerobic Microbial Communities from Midgut and Hindgut of Sun Beetle Larvae (*Pachnoda marginata*) on Wheat Straw : Effect of Inoculum Preparation. *Microorganisms* 1–23.
- Senit, J.J., Velasco, D., Manrique, A.G., Sanchez-barba, M., Toledo, J.M., Santos, V.E., Garcia-choa, F., Yustos, P., Ladero, M., 2019. Industrial Crops & Products Orange peel waste upstream integrated processing to terpenes , phenolics , pectin and monosaccharides : Optimization approaches. *Ind. Crop. Prod.* 134, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.060>
- Shabani, B., Andrews, J., 2015. Hydrogen and Fuel Cells, in: *Green Energy and Technology*. pp. 453–491. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2337-5>
- Si, B., Yang, L., Zhou, X., Watson, J., Tommaso, G., Chen, W., Liao, Q., Duan, N., Liu, Z., Zhang, Y., 2018. Anaerobic conversion of the hydrothermal liquefaction aqueous phase : fate of organics and intensification with granule activated. *Green Chem.* <https://doi.org/10.1039/c8gc02907e>
- Sikora, A., Błaszczuk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia : On Purpose or by Coincidence ?, in: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50364>
- Sillero, L., Solera, R., Perez, M., 2022. Anaerobic co-digestion of sewage sludge , wine vinasse and poultry manure for bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 47, 3667–3678. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.11.032>
- Singhvi, M., Zendo, T., Sonomoto, K., 2018. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains : challenges and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5911–5924.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., 2015. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems and/or NEMESTO. *Int. J. Hydrogen Energy* 1. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Slobodkin, A., 2014. The Family Peptostreptococcaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes. Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer Berlin, Heidelberg, pp. 291–302. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9>
- Smith, R.J., 1995. Calcium and Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37.
- Soares, L.A., Borges Silva Rabelo, C.A., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018a. Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. *Biomass and Bioenergy* 117, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.07.018>

- Soares, L.A., Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Monteiro, P.A.S., Seleglim, P., Varesche, M.B.A., 2018b. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. *Waste and Biomass Valorization* 0, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0201-5>
- Souza, T.A.Z. De, Rocha, D.H.D., Julio, A.A. V, Coronado, C.J.R., Silveira, J.L., Silva, R.J., Palacio, C.E., 2021. Exergoenvironmental assessment of hydrogen water footprint via steam reforming in Brazil. *J. Clean. Prod.* 311, 127577. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127577>
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003>
- Srilatha, H.R., Nand, K., Babu, K.S., Madhukara, K., 1995. Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane. *Process Biochem.* 30, 327–331. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)87041-5](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)87041-5)
- Srisowmeya, G., Chakravarthy, M., Devi, G.N., 2020. Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 119, 1–14.
- Su, H., Tan, F., Xu, Y., 2016. Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. *Fuel* 181, 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.05.055>
- Sun, J., Yuan, X., Shi, X., Chu, C., Guo, R., Kong, H., 2011. Fermentation of *Chlorella* sp . for anaerobic bio-hydrogen production : Influences of inoculum – substrate ratio , volatile fatty acids and NADH. *Bioresour. Technol.* 102, 10480–10485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.016>
- Tamelová, B., Malat'ák, J., Velebil, J., 2018. Energy valorisation of citrus peel waste by torrefaction treatment. *Agron. Res.* 16, 276–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/AR.18.029>
- Tang, J., Wang, X.C., Hu, Y., Zhang, Y., Li, Y., 2017. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. *Bioresour. Technol.* 224, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.111>
- Tang, T., Chen, Y., Liu, M., Du, Y., Tan, Y., 2022. Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification. *Environ. Res.* 208, 112663.
- Taylor, K.A.C.C., 1996. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56.
- Tee, Z.K., Jahim, J., Tan, J.P., Kim, B.H., 2017. Preeminent productivity of 1 , 3-propanediol by *Clostridium butyricum* JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. *Bioresour. Technol.* 233, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.110>
- Tenca, A., Schievano, A., Perazzolo, F., Adani, F., Oberti, R., 2011. Bioresource Technology Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and

- vegetable waste : Maximizing stable production without pH control. *Bioresour. Technol.* 102, 8582–8588. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.102>
- Tetra Pak, 2004. *The Orange Book*. Lund, Sweden.
- Thapa, L.P., Lee, S.J., Park, C., Kim, S.W., 2017. Enzyme and Microbial Technology Production of L-lactic acid from metabolically engineered strain of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Enzyme Microb. Technol.* 102, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.003>
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128%2Fbr.41.1.100-180.1977>
- Thomas, K.J., Rice, C. V., 2014. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *Biometals* 1361–1370. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9797-5>
- Toledo-Alarcon, J., Fuentes, L., Etchebehere, C., Bernet, N., Trably, E., 2020. Glucose electro-fermentation with mixed cultures : A key role of the Clostridiaceae family. *Int. J. Hydrogen Energy* 6, 0–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.10.042>
- Torquato, L.D.M., Crespi, M.S., de Oliveira, J.E., Nespeca, M.G., Maintinguer, S.I., Pachiega, R., 2016. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste Manag.* 59, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.047>
- Triolo, J.M., Sommer, S.G., Møller, H.B., Weisbjerg, M.R., Jiang, X.Y., 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion : Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 102, 9395–9402. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.026>
- Tsegaye, B., Balomajumder, C., Roy, P., 2019. Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production : an overview and future prospect. *Bull. Natl. Res. Cent.*
- U.S. Department of Energy - Energy Efficiency and Renewable Energy, 2012. *Energy Tips: STEAM - Improve Your Boiler 's Combustion Efficiency.*
- Van Soest, P.J., 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 119–128.
- Van Soest, P.J., 1963. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds . II . A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *J. AOAC Int.* 829–835.
- Vanwonterghem, I., Evans, P.N., Parks, D.H., Jensen, P.D., Woodcroft, B.J., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2016. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota*. *Nat. Microbiol.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone, D.J., Tyson, G.W., 2014. Linking microbial community structure , interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.004>
- Vasmara, C., Marchetti, R., 2017. Initial pH influences in-batch hydrogen production from

- scotta permeate. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 14400–14408.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.067>
- Venkata Mohan, S., Lenin Babu, M., Venkateswar Reddy, M., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N., 2009. Harnessing of biohydrogen by acidogenic fermentation of Citrus limetta peelings: Effect of extraction procedure and pretreatment of biocatalyst. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 6149–6156. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.056>
- Villa-Montoya, A.C., Mazareli, R.C. da S., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Oliveira, V.M., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2021. New Insights into Controlling Homoacetogenesis in the Co - digestion of Coffee Waste : Effect of Operational Conditions and Characterization of Microbial Communities. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
<https://doi.org/10.1007/s12010-021-03725-3>
- Villa Montoya, A.C., Cristina da Silva Mazareli, R., Delforno, T.P., Centurion, V.B., Sakamoto, I.K., Maia de Oliveira, V., Silva, E.L., Amâncio Varesche, M.B., 2019. Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 21434–21450. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.115>
- Villa Montoya, A.C., Cristina da Silva Mazareli, R., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020a. Improving the hydrogen production from coffee waste through hydrothermal pretreatment, co-digestion and microbial consortium bioaugmentation. *Biomass and Bioenergy* 137. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105551>
- 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., 2020b. Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 4205–4222.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.062>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W., 2009. Volume 3: The Firmicutes, in: Whitman, W. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Athens, p. 1450.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Vries, W. de, Stouthamer, A.H., 1967. Pathway of Glucose Fermentation in Relation Taxonomy of Bifidobacteria the. *J. Bacteriol.* 93, 574–576.
- Wainaina, S., Awasthi, M.K., Horváth, I.S., Taherzadeh, M.J., 2020. Anaerobic digestion of food waste to volatile fatty acids and hydrogen at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors rv a ri Horv a. *Renew. Energy* 152, 1140–1148.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.138>
- Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. *Bioresour. Technol.* 100, 6339–6346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.018>
- Wang, H., Qu, Y., Li, D., Ambuchi, J.J., He, W., Zhou, X., 2016. Cascade degradation of organic matters in brewery wastewater using a continuous stirred microbial electrochemical reactor and analysis of microbial communities. *Sci. Rep.* 1–12.
<https://doi.org/10.1038/srep27023>

- Wang, J., Yin, Y., 2017. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., Al, W.E.T., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy □ †. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, R., Zhang, J., Liu, J., Yu, D., Zhong, H., Wang, Y., Chen, M., Tong, J., Wei, Y., 2017. Effects of chlortetracycline, Cu and their combination on the performance and microbial community dynamics in swine manure anaerobic digestion. *J. Environ. Sci.* 67, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.023>
- Wang, Y., Xi, B., Li, M., Jia, X., Wang, X., 2020. Hydrogen production performance from food waste using piggery anaerobic digested residues inoculum in long-term systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 33208–33217. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.09.057>
- Weghoff, M.C., Bertsch, J., Müller, V., 2014. A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environ. Microbiol.* 17, 670–677. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12493>
- Weyl, P.K., 1959. The change in solubility of calcium carbonate with temperature and carbon dioxide content *. *Geochim. Cosmochim. Acta* 17, 214–225.
- Wicher, E., Seifert, K., Zagrodnik, R., Pietrzyk, B., Laniecki, M., 2013. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 7767–7773. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.008>
- Wikandari, R., Millati, R., Cahyanto, M.N., Taherzadeh, M.J., 2014. Biogas Production from Citrus Waste by Membrane Bioreactor. *Membranes (Basel)*. 596–607. <https://doi.org/10.3390/membranes4030596>
- Wikandari, R., Nguyen, H., Millati, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2015. Improvement of biogas production from orange peel waste by leaching of limonene. *Biomed Res. Int.* 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/494182>
- Wongthanate, J., Chinnacotpong, K., Khumpong, M., 2014. Impacts of pH, temperature and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. *Int. J. Energy Environ. Eng.* 5, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s40095-014-0076-6>
- Wood, B.J.B., Holzappel, W.H., 1995. The genus *Lactobacillus*, in: *The Genera of Lactic Acid Bacteria - Volume 2*. Springer, Boston, MA., p. 414.
- Wu, C., Johnson, J.L., Moore, W.E.C., Moore, L.V.H., 1992. Emended Descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 536–541.
- Wu, Q., Jiang, Y., Chen, Y., Liu, M., Bao, X., Guo, W., 2021. Opportunities and challenges in microbial medium chain fatty acids production from waste biomass. *Bioresour. Technol.* 340, 125633. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125633>

- Wu, S., Chu, C., Shen, Y., 2012. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15496–15502. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.119>
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., Wang, K., 2015. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresour. Technol.* 191, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.100>
- Xia, A., Jacob, A., Herrmann, C., Murphy, J.D., 2016. Fermentative bio-hydrogen production from galactose. *Energy* 96, 346–354.
- Xiao, B., Qin, Y., Wu, J., Chen, H., Yu, P., Liu, J., Li, Y.Y., 2018. Comparison of single-stage and two-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste: Performance, energy balance and reaction process. *Energy Convers. Manag.* 156, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.10.092>
- Xiong, Z., Hussain, A., Lee, J., Lee, H., 2019. Food waste fermentation in a leach bed reactor : Reactor performance , and microbial ecology and dynamics. *Bioresour. Technol.* 274, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.066>
- Xu, S.Y., Karthikeyan, O.P., Selvam, A., Wong, J.W.C., 2014. Microbial community distribution and extracellular enzyme activities in leach bed reactor treating food waste : Effect of different leachate recirculation practices. *Bioresour. Technol.* 168, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.009>
- Xu, X., Wang, W., Chen, C., Xie, P., Liu, W., Zhou, X., Wang, X., Yuan, Y., Wang, A., Lee, D., Yuan, Y., Ren, N., 2020. The effect of PBS on methane production in combined MEC-AD system fed with alkaline pretreated sewage sludge. *Renew. Energy* 152, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.052>
- Yadvika, S., Sreekrishnan, T.R., Kohli, S., Rana, V., 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques — a review. *Bioresour. Technol.* 95, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.010>
- Yang, G., Wang, J., 2021. Biohydrogen production by co-fermentation of antibiotic fermentation residue and fallen leaves : Insights into the microbial community and functional genes. *Bioresour. Technol.* 337, 125380. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125380>
- Yang, G., Wang, J., 2019a. Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 44, 25542–25550.
- Yang, G., Wang, J., 2019b. Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue : E ff ect of various substrate concentrations. *Fuel* 237, 1203–1208. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.026>
- Yang, G., Yin, Y., Wang, J., 2019a. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 13147–13156. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.216>
- Yang, G., Yin, Y., Wang, J., 2019b. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* 44, 13147–13156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.216>

- Yang, J., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J., 2021. Roles of calcium-containing alkali materials on dark fermentation and anaerobic digestion : A systematic review. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 38645–38662. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.09.129>
- Yang, S., Song, L., 2019. Succession of bacterial community structure and metabolic function during solid waste decomposition. *Bioresour. Technol.* 291, 121865. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121865>
- Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., Imachi, H., 2011. *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53–59. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014811-0>
- Yin, Y., Hu, Y., Wang, J., 2022. Co-fermentation of sewage sludge and lignocellulosic biomass for production of medium-chain fatty acids. *Bioresour. Technol.* 361, 127665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127665>
- Yin, Y., Wang, J., 2019. Enhanced Sewage Sludge Disintegration and Hydrogen Production by Ionizing Radiation Pretreatment in the Presence of Fe²⁺. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 15548–15557. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03362>
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 670–679. <https://doi.org/10.1002/bit.20347>
- Yuan, X., Shi, X., Zhang, P., Wei, Y., Guo, R., Wang, L., 2011. Anaerobic biohydrogen production from wheat stalk by mixed microflora : Kinetic model and particle size influence. *Bioresour. Technol.* 102, 9007–9012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.045>
- Yue, M., Lambert, H., Pahon, E., Roche, R., Jemei, S., 2021. Hydrogen energy systems : A critical review of technologies , applications , trends and challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 146, 111180. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111180>
- Zema, D.A., Andiloro, S., Bombino, G., Tamburino, V., Sidari, R., Caridi, A., 2012. Depuration in aerated ponds of citrus processing wastewater with a high concentration of essential oils. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 33, 1255–1260. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.618938>
- Zema, D.A., Calabrò, P.S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., Zimbone, S.M., 2018. Valorisation of citrus processing waste : A review. *Waste Manag.* 80, 252–273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>
- Zema, D.A., Fòlino, A., Zappia, G., Calabrò, P.S., Tamburino, V., Marcello, S., 2018. Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant : An environmentally sound way of citrus waste management in. *Sci. Total Environ.* 630, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.168>
- Zerva, I., Remmas, N., Melidis, P., Tsiamis, G., Ntougias, S., 2021. Microbial Succession and Identification of Effective Indigenous Pectinolytic Yeasts From Orange Juice Processing Wastewater. *Waste and Biomass Valorization* 12, 4885–4899. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01364-7>

- Zhang, C., Li, T., Su, G., He, J., 2020. Enhanced direct fermentation from food waste to butanol and hydrogen by an amylolytic *Clostridium*. *Renew. Energy* 153, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.151>
- Zhang, J., Wang, Q., 2013. Buffering and nutrient effects of white mud from ammonia e soda process on thermophilic hydrogen fermentation from food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13564–13571. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.047>
- Zhang, J., Wang, Q., Jiang, J., 2013. Lime mud from paper-making process addition to food waste synergistically enhances hydrogen fermentation performance. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 2738–2745. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.048>
- Zhang, L., Li, F., Kuroki, A., Loh, K., Wang, C., Dai, Y., 2020. Methane yield enhancement of mesophilic and thermophilic anaerobic co- digestion of algal biomass and food waste using algal biochar : Semi- continuous operation and microbial community analysis. *Bioresour. Technol.* 302, 122892. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122892>
- Zhang, L., Li, F., Tsui, T., Yoh, K., Sun, J., Loh, K., 2022. Microbial succession analysis reveals the significance of restoring functional microorganisms during rescue of failed anaerobic digesters by bioaugmentation of nano-biochar-amended digestate. *Bioresour. Technol.* 352, 127102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127102>
- Zhang, L., Zhang, L., Li, D., 2015. Enhanced dark fermentative hydrogen production by zero-valent iron activated carbon micro- electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 12201–12208. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.106>
- Zhang, W., Li, L., Xing, W., Chen, B., Zhang, L., Li, A., Li, R., Yang, T., 2019. Dynamic behaviors of batch anaerobic systems of food waste for methane production under different organic loads , substrate to inoculum ratios and initial pH. *J. Biosci. Bioeng.* 128, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.05.013>
- Zhang, Y., Bai, J., Zuo, J., 2023. Performance and mechanisms of medium-chain fatty acid production by anaerobic fermentation of food waste without external electron donors. *Bioresour. Technol.* 374, 128735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128735>
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, Z., 2023. Hydraulic retention time and pressure affect anaerobic digestion process treating synthetic glucose wastewater. *Bioresour. Technol.* 370, 128531.
- Zhao, S., Chen, W., Liu, M., Lv, H., Liu, Y., Niu, Q., 2022. Biogas production , DOM performance and microbial community changes in anaerobic co-digestion of chicken manure with *Enteromorpha* and green waste. *Biomass and Bioenergy* 158, 106359. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106359>
- Zhen, X., Luo, M., Dong, H., Fang, L., Wang, W., Feng, L., Yu, Q., 2022. Effect of organic load regulation on anaerobic digestion performance and microbial community of solar-assisted system of food waste. *Water Reuse* 12, 260–273. <https://doi.org/10.2166/wrd.2022.107>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., Toole, W.O., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera , emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901 , and union of *Lactobacillaceae*

and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2782–2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhou, P., Elbeshbishy, E., Nakhla, G., 2013. Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresour. Technol.* 130, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>

Zhu, X., Tao, Y., Liang, C., Li, X., Wei, N., Zhang, W., Zhou, Y., 2015. The synthesis of n-caproate from lactate : a new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Nat. Publ. Gr.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep14360>

Zhuang, L., Zhou, S., Yuan, Y., Liu, T., Wu, Z., Cheng, J., 2011. Development of *Enterobacter aerogenes* fuel cells : From in situ biohydrogen oxidization to direct electroactive biofilm. *Bioresour. Technol.* 102, 284–289.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.038>

Zinder, S., Bräuer, S., 2016. *Methanoregula*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.*
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01368>.

Apêndice A

Capítulo 4:

Avaliação de fatores significativos na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos na co-fermentação de resíduos sólidos e água residuária do processamento de citros

D. H. D. Rocha^a, I. K. Sakamoto^a, M. B. A. Varesche^a

^aDepartment of Hydraulics and Sanitation, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, SP, 13566-590, Brazil.

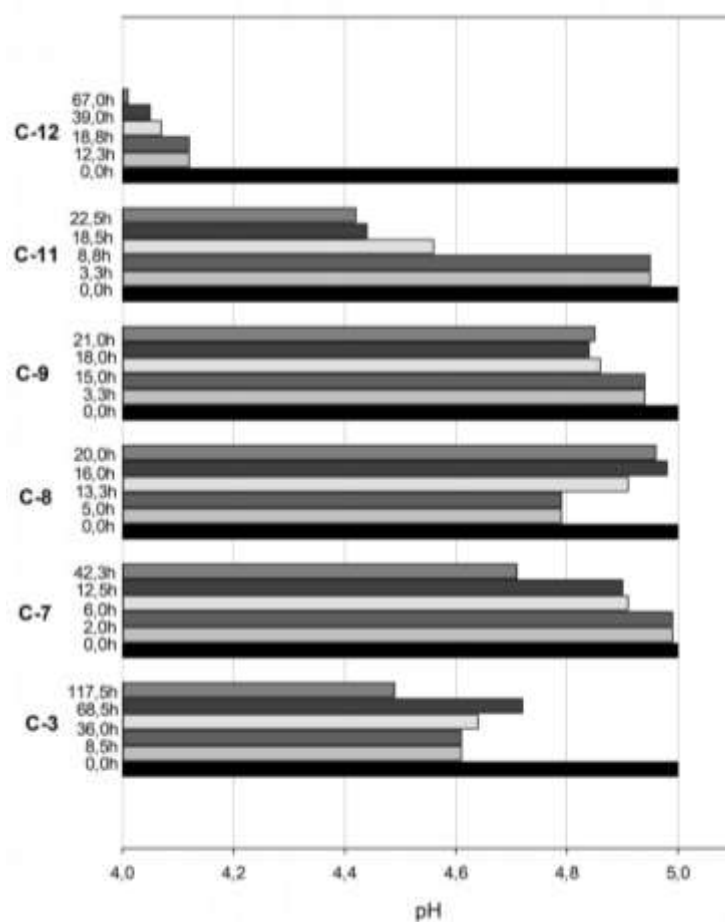


Figura A.1. Perfil de pH de ensaios do planejamento experimental de Plackett-Burman com pH inicial 5,0.

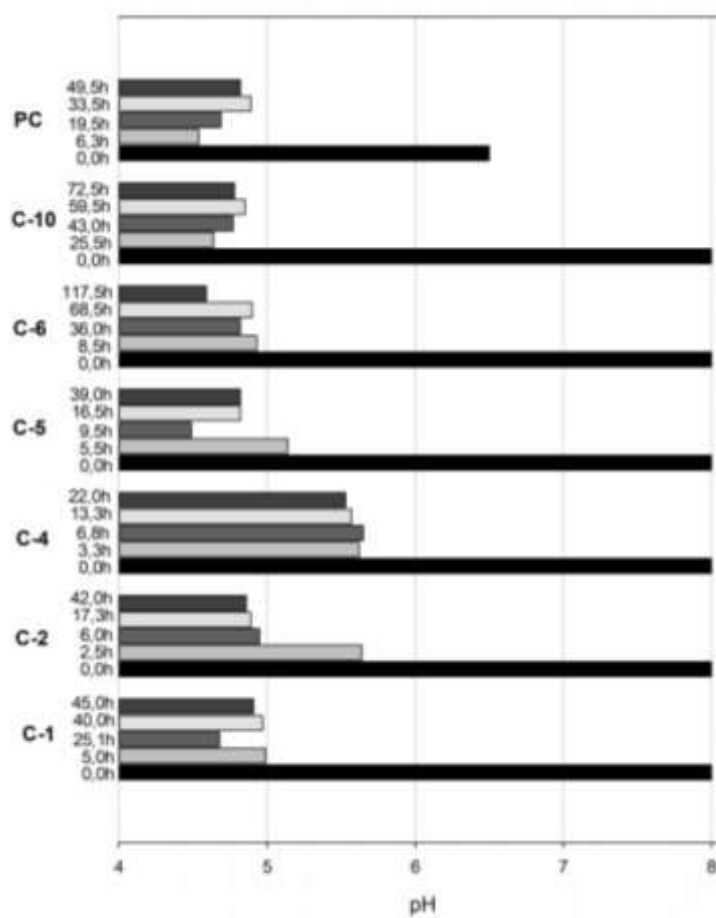


Figura A.2. Perfil de pH de ensaios do planejamento experimental de Plackett-Burman com pH inicial 8,0.

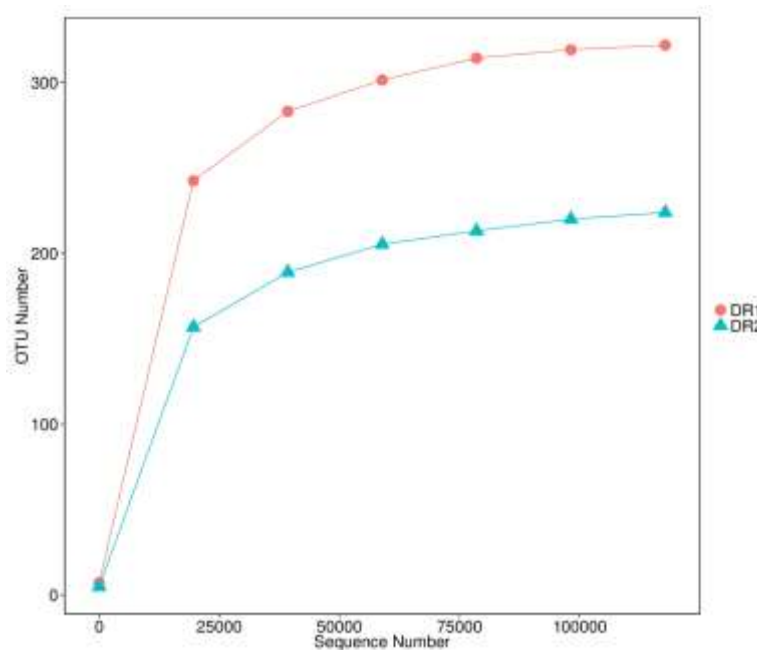


Figura A.3. Curvas de rarefação das seqüências do RNAr 16S para as amostras do inóculo autóctone (DR-1) e ensaio C-7 (DR-2).

A diversidade das amostras analisadas foi comparada através dos índices ecológicos de Shannon-Wiener, e Simpson, e a riqueza analisada através do índice Chao-1. Para o inóculo autóctone verificou-se maior diversidade de Shannon (4,19) em comparação ao ensaio C-7 (2,93), em relação à dominância por meio do índice de Simpson verificou-se que para o ensaio C-7 houve menor dominância (0,80) comparado ao inóculo (0,89). O índice de Chao-1 que representa uma medida da riqueza baseada na abundância indicou maior riqueza (322,85) para o inóculo autóctone em comparação à condição C-7 (234,50).

Para o consórcio microbiano utilizado na bioaugmentação dos ensaios foi observada maior diversidade, menor dominância e maior riqueza de espécies, tal fato relaciona-se ao fato de que ao estabelecer condições mais específicas potencializando a produção de hidrogênio como ocorreu em C-7, houve uma pressão seletiva aumentando a dominância de grupos mais específicos e assim reduzindo a diversidade e riqueza da população. Em relação ao índice de diversidade de Shannon, Villa-Montoya et al. (2020b) também verificaram maior valor para o consórcio microbiano utilizado para bioaugmentação (0,887) quando comparado ao índice obtido para o reator otimizado para produção de hidrogênio (0,689), indicando uma seleção de microrganismos após a produção de hidrogênio. E assim como obtido no presente estudo Hernández-Mendoza et al. (2014) observaram redução da diversidade de Shannon-Wiener de 2,197 verificada no inóculo, para 1,946 ao final da operação de um reator batelada sequencial, os autores concluíram que uma menor diversidade e uma comunidade microbiana estável refletiram em maior produção de hidrogênio.

Apêndice B

Capítulo 5:

Efeito da alcalinização para o aumento da produção de hidrogênio sob diferentes concentrações de substrato na co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros

D. H. D. Rocha^a, I. K. Sakamoto^a, M. B. A. Varesche^a

^aDepartment of Hydraulics and Sanitation, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, SP, 13566-590, Brazil.



Figura B.1. Reatores batelada equipados com conjunto de válvulas acopladas.

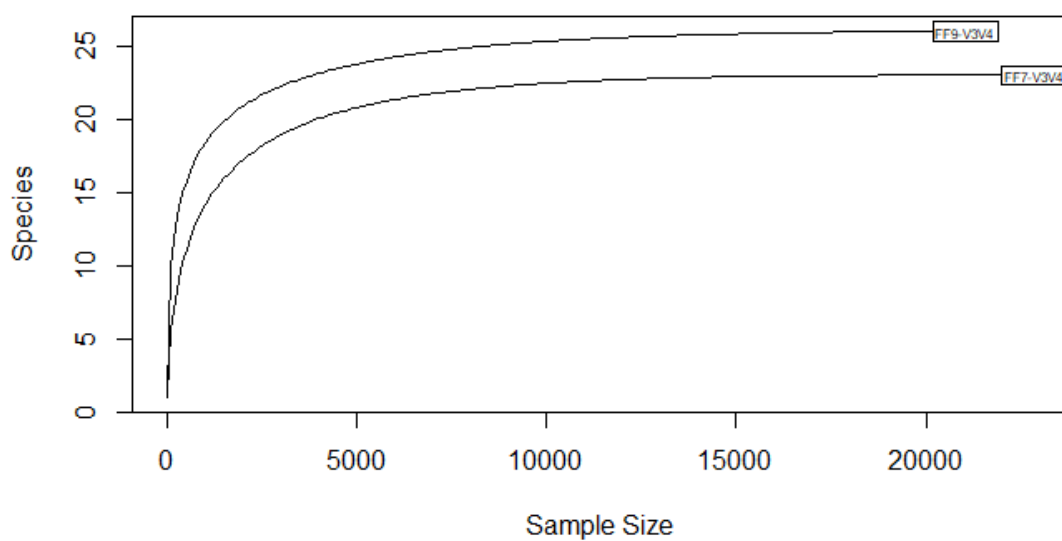


Figura B.2. Curvas de rarefação das sequências do gene RNAr 16S para as amostras dos ensaios A-7 (FF7) e ensaio A-9 (FF9).

Apêndice C

Capítulo 6:

Otimização de parâmetros fermentativos para aumento da produção de hidrogênio: A co-fermentação de resíduos da agroindústria de citros é uma alternativa interessante para recuperação energética?

D. H. D. Rocha^a, I. K. Sakamoto^a, M. B. A. Varesche^a

^aDepartment of Hydraulics and Sanitation, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, SP, 13566-590, Brazil.

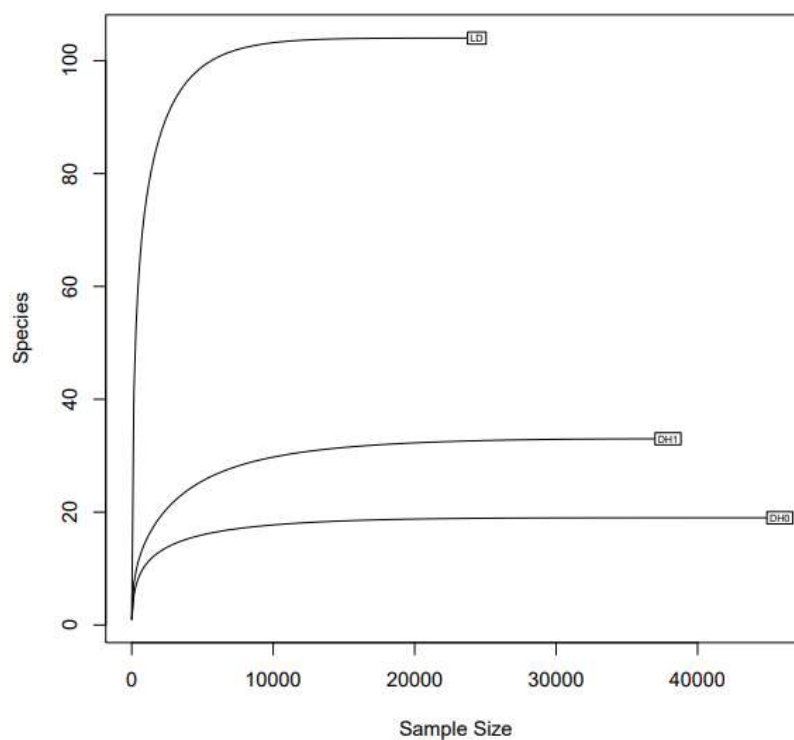


Figura C.1. Curvas de rarefação das sequências do RNAr 16S para as amostras do lodo granular (LD) e ensaios E-10 (DH1), e OC-H (DH0).



EESC • USP