

RENAN PACHIEGA

Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Imaculada Maintinguer

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P116p Pachiega, Renan
Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas / Renan Pachiega. – Araraquara : [s.n.], 2019
117 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Sandra Imaculada Maintinguer

1. Digestão anaeróbia. 2. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico. 3. *Clostridium*. 4. Resíduos industriais. 5. Energia - Fontes alternativas. I. Título.

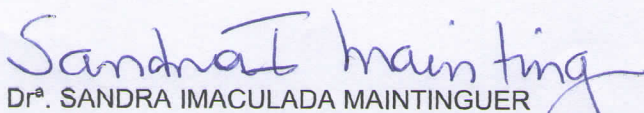
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

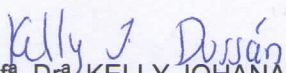
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas"

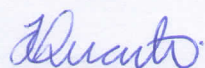
AUTOR: RENAN PACHIEGA

ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. SANDRA IMACULADA MAINTINGUER
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro


Prof.^a. Dr.^a. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a. Dr.^a. IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Câmpus Sorocaba

Araraquara, 18 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Renan Pachiega

Nome em citações bibliográficas: Pachiega, R.; Pachiega, Renan; Renan Pachiega.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Araraquara, Instituto de Química de Araraquara: Rua Prof. Francisco Degni, n. 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 Araraquara/ SP Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2017-2019: Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Título: Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Grande área: Biotecnologia.

Área: Bioenergia.

2010-2016: Graduação em Licenciatura em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

2015-2016: PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA (PIBID)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Bolsista no projeto que busca auxiliar o professor de escola pública em aulas práticas, aulas teóricas, tanto na preparação e elaboração dos conteúdos como na explanação das aulas e atividades diferenciadas apoiadas em múltiplas estratégias didáticas.

2012-2015: INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista da Fundação para O Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp).

Bolsista no projeto de pesquisa “Produção biológica de hidrogênio em reatores em batelada sob concentração reduzidas de carboidratos”. O projeto resultou em participação em congressos nacionais, internacionais e publicação em periódicos nacionais e internacionais renomados na área.

2010-2011: CENTRO DE CIÊNCIAS DE ARARAQUARA (CCA)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Monitor na área de química, recebendo turmas de escolas públicas e privadas. Experiência na realização de experimentos químicos complexos ou não, trazendo mais ludicidade e dinamismo, objetivando despertar o interesse pela área de química.

IDIOMAS

Inglês em nível avançado (escrita, leitura e conversação).

Espanhol em nível básico.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo completo publicado em periódico

1. PACHIEGA, R.; RODRIGUES, M. F.; RODRIGUES, C. V.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 155-163, 2019.
2. PACHIEGA, R.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Obtaining and Characterization of Mesophilic Bacterial Consortia from Tropical Sludges Applied on Biohydrogen Production. **Waste and Biomass Valorization**, 2018.
3. MAINTINGUER, S. L.; LAZARO, C. Z.; PACHIEGA, R.; VARESCHE, M. B. A.; SEQUINEL, R.; OLIVEIRA, J. E. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 152-160, 2017.

4. TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; CRESPI, M. S.; NESPECA, M. G.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I.. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. **Waste Management**, v. 59, p. 181-193, 2017.

5. TORQUATO, L.; PACHIEGA, R.; RODRIGUES, C. V.; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I.. Produção biológica de hidrogênio a partir de lodos de diferentes sistemas de tratamento de esgotos.. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB** (Online), v. 8, p. 27, 2016.

Apresentação de trabalho e/ou palestra

1. PACHIEGA, R.; RODRIGUES, C. V.; ADORNO, A. T.; VARESCHE, M. B. A.; MAINTINGUER, S. I. Pretreatments on a subtropical granulated sludge applied on biohydrogen production using citric wastewater. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso)

2. BOSCARO, M. E.; PACHIEGA, R.; RODRIGUES, C. V.; BLASIUS, J. P.; MAINTINGUER, S. I. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on methane production from anaerobic digestion of glycerol. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso)

3. PACHIEGA, R.; SILVA, L. V.. Atividades lúdicas e jogos didáticos na prática docente do Ensino Médio: uma observação no ambiente de Estágio dentro de um curso de Licenciatura. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. PACHIEGA, R.. Mendeley como ferramenta gerenciadora de referências no auxílio à escrita acadêmica. 2018. (Apresentação de palestra).

5. PACHIEGA, R.. Mendeley como ferramenta gerenciadora de referências no auxílio à escrita acadêmica. 2018. (Apresentação de palestra).

6. PACHIEGA, R.; SOUZA, C.; SILVA, L. V. ; MONTEIRO, V. F. ; SGARBOSA, E. C. ; BEGO, A. M. . Jogos didáticos e habilidades avaliadas pelo SARESP: relato de experiência de uma intervenção didático-pedagógica do PIBID. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. TORQUATO, L.; PACHIEGA, R.; VARELLA, C. R.; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I.. Produção Biológica de Hidrogênio a partir de lodos de diferentes sistemas de tratamento de esgotos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

8. Pachiega, R.; TORQUATO, L.; SAKAMOTO, I.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; SEQUINEL, R.; MAINTINGUER, S. I.. Diversidade de bactérias anaeróbias geradoras de H₂ a partir de sacarose. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. PACHIEGA, R.; MAINTINGUER, S. I.; SEQUINEL, R.; OLIVEIRA, J. E.; RODRIGUES, M. F.. Diversidade de Bactérias Produtoras de H₂ Proveniente de Águas Residuárias de Cervejaria. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

10. TORQUATO, L.; BRAHIM, G. E.; PACHIEGA, R.; SANTOS, D. V.; OLIVEIRA, J. E.; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I.. Produção biológica de H₂ a partir de consórcios anaeróbios advindos de sistemas de tratamento de esgotos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. PACHIEGA, R.; SAKAMOTO, I.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I.. Diversity of hydrogen producing bacteria from biologic treatment plants. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. PACHIEGA, R.; TORQUATO, L.; SAKAMOTO, I.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; SEQUINEL, R.; MAINTINGUER, S. I.. Diversidade microbiana de lodos de estação de tratamento aplicados na produção biológica de H₂. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. PACHIEGA, R.; SEQUINEL, R.; POZZI, E.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I.. Consortium of bacteria producing hydrogen from low sugars concentration. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. PACHIEGA, R.; MAINTINGUER, S. I.; SEQUINEL, R.; OLIVEIRA, J. E.; PRADELLI, A.. Obtenção de Consórcios bacterianos produtores de H₂ a partir de inóculo de sistema de tratamento industrial. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em eventos científicos

1. XVI Evento de Educação em Química, 2018.
2. XIII Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia – DAAL, 2018.
3. 6th International Conference on Energy Engineering and Environmental Engineering. Avaliador. 2018. (Congresso).
4. Semana Nacional de Ciência e Tecnologia de 2018. Mendeley como ferramenta gerenciadora de referências no auxílio à escrita acadêmica. 2018. (Seminário).
5. II Ciclo de Seminários PIBID/CAPEs. Educação Inclusiva e ensino de ciências. 2015. (Seminário).
6. II Ciclo de Seminários PIBID/CAPEs. Avaliação da aprendizagem. 2015. (Seminário).
7. II WorkShop Graduação. 2015. (Seminário).
8. 1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio. Diversidade Microbiana de Lodos de Estação de Tratamento Aplicados na Produção biológica de H₂. 2014. (Encontro).

9. 1° Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio. Produção Biológica de H₂ em Reatores Anaeróbios em Batelada Alimentados com Concentrações Crescentes de Sacarose. 2014. (Encontro).
10. II Workshop de Bioenergia -UNESP. Diversidade de Bactérias Anaeróbias Geradoras de H₂ a partir de Sacarose. 2014. (Encontro).
11. IV Seminário do Projeto Temático FAPESP " Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados". 2014. (Encontro).
12. XI Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Diversity of Hydrogen Producing Bacteria from Biologic Treatment Plants. 2014. (Congresso).
13. XI Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Produção Biológica de H₂ a partir de Consórcios Anaeróbios Advindos de Sistemas de Tratamento de Esgotos. 2014. (Congresso).
14. XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Diversidade de Bactérias Produtoras de H₂ proveniente de Águas Residuárias de Cervejaria. 2014. (Congresso).
15. 13th World Congress on Anaerobic Digestion. Consortium of Bacteria Producing Hydrogen from Low Sugars Concentration. 2013. (Congresso).
16. 43° Semana da Química. 2013. (Congresso).
17. XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Obtenção de Consórcios Bacterianos Produtores de H₂ a partir de Inóculo Sistema de Tratamento Industrial. 2013. (Congresso).
18. XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Obtenção de Consórcios Bacterianos Produtores de H₂ a partir de Inóculo Sistema de Tratamento Industrial. 2013. (Congresso).
19. 41° Semana da Química. 2011. (Encontro).
20. IX Evento de Educação em Química. 2011. (Congresso).

Organização de Eventos

1. GODOI, D. R. M.; BEGO, A. M.; VIVEIRO, A. A.; LOURES, B. F.; SILVA, L. V.; PACHIEGA, R.. XVI EVEQ - Evento de Educação em Química. 2018. (Congresso).
2. LOURES, B. F.; SOUZA, C.; MARQUES, J. A. C.; SILVA, L. V.; BOMBARDA, L.; SILVA, L. N.; ZANETTI, L. G.; COSSULIN, L. B.; DAMIHANI, M. R.; SILVA, R. V.; PACHIEGA, R. ; PAULETTI, T. R.; RODRIGUES, T.; SANTANA, W. M. O. S. ; BEGO, A. M.; VIVEIRO, A. A.; GODOI, D. R. M.; MASSI, L.; CARNIO, M. P.. XIV EVEQ - Evento de Educação em Química. 2016. (Congresso).

Dedico a mim mesmo. Isso mesmo. Passei por muita coisa durante esse período e dedico a mim esse trabalho. Por ter conseguido superar tudo e terminar mais essa etapa. Dedico à minha noiva Larissa, aos meus pais Rosângela e Carlos Alberto, especialmente a minha avó Vilma (*in memoriam*) que junto com meus pais me ensinou a não abaixar a cabeça e lutar pelo que acredito.

Com carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosângela e Carlos Alberto, por todo incentivo e companheirismo durante esse caminho trilhado. Sem o apoio recebido, não haveria saído pesquisa, graduação e nunca teria chegado até aqui. A eles devo minha vida e minha educação. Serei eternamente grato e espero poder passar aos seus netos ao menos um pouco do que me ensinaram.

A minha noiva Larissa, que me acompanhou desde meu primeiro dia na graduação, me incentivou, me fez estudar, compartilhou momentos ímpares comigo e me fez o homem que sou hoje. A ela devo quase tudo, principalmente, a minha paciência e perseverança na ciência e na pesquisa, mesmo quando algumas pessoas ao redor, tendem a agir sem ética profissional e mancham a imagem da ciência. A ela, o meu muito obrigado. Seguimos firmes na luta por uma sociedade mais justa e por um “fazer ciência” em que seja considerada a ética, o cooperativismo, o coletivismo e que a sociedade não seja excluída de sua produção. Eu te amo minha “godinha”.

A minha avó dedico minha vida. Sem seus ensinamentos e conversas quando criança e já depois de adulto, não sei o que seria. Graças a ela, defendo o que acredito e seguirei defendendo, mesmo que pessoas sem base e sem argumentos insistam em aparecer em minha vida. Muito obrigado minha “Branquinha”.

A minha orientadora Prof. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer, pela confiança em meu trabalho.

Ao Cempeqc, em especial ao Maurílio Nespeca que sempre esteve disposto a ajudar, pela disponibilidade para análises que foram de suma importância para a execução e desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de trabalho que de forma ímpar participaram da minha evolução enquanto cientista e na evolução significativa do meu conhecimento, como a Lilian, Abraham, Maurílio, Prof. Dra. Lorena, Prof. Dr^a Denise, Jandir, Caroline, Mateus, Daiana, Daniele, Luan, Shobit e Frank. Não menos importante, agradeço imensamente as minhas incríveis amigas do F13 do Condomínio Jardim dos Duques em Bauru. Gabriela, Aline e Juliana foram responsáveis por grandes mudanças em minha vida tanto pessoal quanto profissional. Agradeço também ao Prof. Dr. Amadeu Moura Bego pela ajuda durante essa etapa da minha vida acadêmica. Agradeço de coração.

Ao Instituto de Química, UNESP e ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN, Rio Claro.

A Capes, pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

*“A lot of people are afraid to say what they want.
That’s why they don’t get what they want.”*

Madonna

RESUMO

Devido à sua demanda mundial juntamente com os problemas ambientais causados pela queima dos derivados do petróleo, várias pesquisas estão sendo realizadas a fim de buscar fontes de energia renovável. Dentre tais possibilidades, o gás hidrogênio obtido por processos biológicos, como fermentação e fotofermentação, se mostra uma alternativa em potencial. Entretanto, poucos estudos são realizados em climas tropicais como o Brasil. Na região central do Estado de São Paulo, está localizada a denominada região do cinturão citrícola, a qual é responsável por cerca de 80% da produção de produtos cítricos do país, gerando cerca de 670 mil toneladas em resíduos orgânicos. Uma investigação do potencial de produção de gás hidrogênio a partir de resíduos citrícolas se mostra necessário, uma vez que além de tratar os resíduos de forma correta, ainda é possível fazer seu aproveitamento energético. Neste sentido, a presente pesquisa visou avaliar a produção de gás hidrogênio utilizando resíduos citrícolas sob condições mesofílicas. Foram avaliados a produção do biogás, a geração de ácidos graxos voláteis e álcoois durante os ensaios em reatores em batelada alimentados com resíduos citrícolas, além da identificação das bactérias anaeróbias presentes no consórcio produtor de gás hidrogênio. Foi aplicado tratamento ácido no inóculo para a inibição da metanogênese. Foram montados 11 ensaios com água residuária (Ensaio 1 e 2), vinhaça (Ensaio 6-10) e efluente bruto (Ensaio 11-14) como substratos. Os reatores alimentados com vinhaça citrícola apresentaram maior produção de H₂ (Ensaio 9) obtendo 210 mmol H₂ L⁻¹, enquanto que com os outros resíduos 15,88 mmol H₂ L⁻¹ (Ensaio 2) e 46,3 mmol H₂ L⁻¹ (Ensaio 14). Foi observada presença dos ácidos acético, butírico, capríco e dos álcoois etanol, metanol e butanol, durante os ensaios. A identificação filogenética demonstrou maior diversidade bacteriana nos reatores alimentados com efluente bruto do que os alimentados com vinhaça. Houve predomínio do gênero *Clostridium* (63,2%) nos reatores alimentados com efluente bruto e *Caproiciproducens* (64,9%) nos reatores alimentados com vinhaça. Essa pesquisa contribuiu para o conhecimento do grande potencial dos resíduos citrícolas, os quais são abundantes na região, como substrato na produção biológica de gás hidrogênio.

Palavras-chaves: Bioprodução de Hidrogênio. Consórcio Microbiano. Resíduo Citrícola

ABSTRACT

It is known that renewable sources of energy are a great option to petroleum derivative fuels. By its demand worldwide coupled with environment problems caused by the combustion of petroleum derivatives, many researches have been carried out aiming renewable sources of energy. Among possibilities, hydrogen gas obtained by biologic processes, as fermentation and photofermentation, has shown itself a potential alternative. In the centre region of São Paulo State is located the called citrus belt, which is responsible for 80% of all citrus products production, generating about 670 thousand tons of organic wastes. An investigation of potential of hydrogen gas generation using citrus wastes shows itself necessary, once for presenting a way to the correct treatment for the waste, and to permit the energetic exploitation. In this sense, the present research aims evaluate the hydrogen gas production using the citrus waste under mesophilic conditions. Was evaluated the biogas production, the volatile fatty acids and alcohols generation during the operation of the reactors fed with citrus wastes, allied to the identification of anaerobic bacteria present in the H₂ producing consortium. By the acid treatment of the inoculum, was observed the inhibition of methanogenesis among the reactors. Was built 11 assays with wastewater (Assays 1' and 2), vinasse (Assays 6-10) and crude effluent (Assays 11-14) as substrates. The reactors fed with citrus vinasse showed higher production of H₂ (Assay 9) obtaining 210 mmol H₂ L⁻¹, while the best productions of the other wastes 15,88 mmol H₂ L⁻¹ (Assay 2) and 46,3 mmol H₂ L⁻¹ (Assay 14). It was observed the presence of butyric, acetic, caproic acids allied to ethanol, methanol and butanol alcohols during the assays. The phylogenetic identification revealed higher bacteria diversity in the reactors fed with crude effluent than the ones fed with vinasse. There was predominance of *Clostridium* gender (63,2%) in the reactor fed with crude effluent and *Caproiciproducens* (64%) in reactors fed with vinasse. This research showed the great potential of these citrus wastes, which are abundant in the region, as substrates in the hydrogen gas biologic production.

Keywords: Hydrogen Bioproduction. Microbial Consortium. Citrus Wastes

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-1. Método de produção de gás hidrogênio.....	29
Figura 2.1-2. Biofotólise de uma alga verde ou cianobactéria.....	30
Figura 2.1-3. Processo de biofotólise indireta	30
Figura 2.1-4. Linha de produção para projetar um curto de H ₂ produzido via fermentação com capacidade de 50,000 kg por dia.....	31
Figura 2.1-5. Fermentação anaeróbia em microrganismo do gênero <i>Clostridium</i>	32
Figura 2.1-6. Fermentação ácida mista para produção de biohidrogênio com <i>E. coli</i>	33
Figura 2.2-1. Visão geral do “Cinturão Citrícola” em âmbito nacional	39
Figura 2.2-2. Cinturão Citrícola, no Estado de São Paulo, com suas medidas	40
Figura 4.1-1. Fluxograma experimental.....	46
Figura 4.8-1. Processo de enriquecimento celular	50
Figura 4.9-1. Procedimento de purificação de inóculo. Reator com inóculo pré-tratado no lado esquerdo e reatores de purificação celular à direita	51
Figura 4.12-1. Aparatos apresentados por Aquino <i>et al.</i> (2007).....	55
Figura 4.12-2. Sistema de deslocamento de volume	55
Figura 5.3-1. Crescimento bacteriano e carboidratos totais do ensaio 1 (2,0 g DQO L ⁻¹ AR +PYG)	65
Figura 5.3-2. Produção acumulada de H ₂ ajustada na função Gompertz modificada.....	65
Figura 5.3-3. Produção acumulada de H ₂ ajustada pelo método sigmoidal de Gompertz modificado	66
Figura 5.3-4. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H ₂ alimentados com água residuária.....	73
Figura 5.3-5. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H ₂ alimentados com vinhaça citrícola.....	73
Figura 5.3-6. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H ₂ alimentados com efluente bruto citrícola	74
Figura 5.3-7. Valores de pH inicial e final para os ensaios de 1'-14.....	75
Figura 5.3-8. Concentração de DQO de resíduo citrícola presente nos ensaios	76
Figura 5.3-9. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 1' (2 g DQO AR L ⁻¹).....	77

Figura 5.3-10. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 2 (4 g DQO AR L ⁻¹)	77
Figura 5.3-11. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 6 (12 g DQO VIN L ⁻¹)	78
Figura 5.3-12. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 7 (36 g DQO VIN L ⁻¹)	79
Figura 5.3-13. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 8 (55 g DQO VIN L ⁻¹)	79
Figura 5.3-14. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 9 (69 g DQO VIN L ⁻¹)	79
Figura 5.3-15. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 10 (77 g DQO VIN L ⁻¹)	80
Figura 5.3-16. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 11 (2 g DQO EB L ⁻¹)	80
Figura 5.3-17. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 12 (4 g DQO EB L ⁻¹)	81
Figura 5.3-18. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 13 (8 g DQO EB L ⁻¹)	81
Figura 5.3-19. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 14 (10 g DQO EB L ⁻¹)	82
Figura 5.4-1. Diagrama de Venn com as OTUs encontradas no consórcio presente nos reatores alimentados com VIN e EB	85
Figura 5.4-2. Curva de rarefação para o índice Shannon (H')	86
Figura 5.4-3. Curva de rarefação de acordo com as espécies observadas	86
Figura 5.4-4. GraphPlan de árvores de OTUs mostrando a diversidade presente no consórcio alimentado com VIN	88
Figura 5.4-5. GraphPlan de árvores de OTUs mostrando a diversidade presente no consórcio alimentado com EB	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-1. Valores de combustão inferiores e superiores para vários combustíveis	28
Tabela 2.2-1. Procura sistemática de literatura acerca de produção biológica de H ₂ associado a resíduo citrícola	41
Tabela 4.3-1. Caracterização prévia dos resíduos utilizados	48
Tabela 4.3-2. Caracterização da composição dos resíduos citrícolas.....	48
Tabela 4.11-1. Reatores em batelada produtores de H ₂	54
Tabela 5.1-1. Análise do biogás gerado após os pré-tratamentos impostos.....	61
Tabela 5.2-1. Produção de H ₂ em reatores anaeróbios em batelada sob condições- teste a, b, c e d durante 48 horas	63
Tabela 5.3-1. Parâmetros estimados pela função sigmoidal de Gompertz modificado	69
Tabela 5.3-2. Comparação dos resultados obtidos da Produção biológica de H ₂ em Reatores em Batelada	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.11-1. Condições de preparo do teste para meio diluente	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR Água residuária

°BRIX Quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose; 1°BRIX é igual a 1 g de açúcar em 100 g de solução

DQO Demanda química de oxigênio

EB efluente bruto

GHz Gigahertz

GT Gigatonelada

Hz Hertz

IEA *International Energy Agency*

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PYG *Petone Yeast Glucose Medium*

UASB *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

VIN Vinhaça

LISTA DE SÍMBOLOS

CO_3^- Ânion carbonato

HCO_3^- – Ânion bicarbonato

ADP Adenosina difosfato

atm Atmosferas

ATP Adenosina trifosfato

BESA *Bromoethanesulfonic acid*

BRIX Escala numérica de índice de refração

CaCl₂.6H₂O Cloreto de cálcio hexahidratado

CH₄ Metano

CO₂ Dióxido de Carbono

CoCl₂.2H₂O Cloreto de Cobalto II dihidratado

DNA Ácido desoxirribonucleico

F₄₂₀ Enzima envolvida em reações de oxido-redução em microrganismos metanogênicos

F₄₂₀H₂ Forma reduzida da enzima F₄₂₀

FeCl₃.6H₂O Cloreto de ferro III hexahidratado

FeSO₄.7H₂O Sulfato de ferro II heptahidratado

H₂ Gás Hidrogênio

HCl Ácido clorídrico

HClO₄ Ácido perclórico

HNO₃ Ácido nítrico

HSO₄ Ácido sulfúrico

K Kelvin

K₂Cr₂O₇ Dicromato de Potássio

K₂HPO₄ Bifosfato de potássio

KH₂PO₄

KOH Hidróxido de Potássio

L Litro

MCR Metil-coenzima M redutase

n número de mols

N₂ Gás Nitrogênio

Na₂HPO₄·H₂O Bifosfato de sódio monohidratado

NaCl Cloreto de sódio

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídio, coenzima hidrossolúvel na sua forma oxidada

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídio, coenzima hidrossolúvel na sua forma reduzida

NaOH Hidróxido de Sódio

NiSO₄·6H₂O Sulfato de níquel II hexahidratado

P Potencial de Produção de Hidrogênio (mmol L⁻¹)

P Pressão

R constante geral dos gases

R_m Taxa máxima de Produção de Hidrogênio (mmol L⁻¹ h)

rpm Rotações por minuto

SeO₂ Óxido de selênio

STV Sólidos totais voláteis

T Temperatura

THMPT *Tetrahydromethanopterin*

V Volume

λ Fase *lag* (h) de geração de H₂

e 2,718281828

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	O gás hidrogênio e o futuro da energia mundial	27
2.1.1	Pré-tratamentos e inativação da metanogênese	34
2.2	A citricultura e a produção de biohidrogênio	38
3	OBJETIVOS	44
3.1	Geral	44
3.2	Específicos.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Fluxograma Experimental	46
4.2	Fonte de Inóculo	47
4.3	Fonte de Carbono	47
4.3.1	Caracterização do Resíduo Citrícola	47
4.4	Análise de Carboidratos Totais	48
4.5	Análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO)	49
4.6	Análises de pH	49
4.7	Análise de Crescimento Bacteriano	49
4.8	Preparo e Enriquecimento Celular	49
4.9	Pré-tratamentos	50
4.10	Reativação e crescimento de biomassa	52
4.11	Reatores Anaeróbios em Batelada Produtores de H ₂	52
4.12	Análise da Geração de H ₂	54
4.13	Ajuste dos Dados Experimentais	56
4.14	Análise de Ácidos Graxos Voláteis e Álcoois.....	57
4.15	Análises Microbiológicas.....	57

4.15.1	Microscopia	57
4.15.2	Diversidade Bacteriana	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Reativação pré-tratamento de inóculo.....	61
5.2	Testes de montagem de ensaios produtores de H ₂	63
5.3	Reatores Anaeróbios em Batelada Produtores de H ₂	64
5.4	Análises Microbiológicas	82
5.4.1	Microscopia	82
5.4.2	Biologia Molecular e Bioinformática.....	84
6	CONCLUSÕES	91
7	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A- Obtenção das equações de carboidratos totais.....	99
	APÊNDICE B- Obtenção da curva para DQO	102
	APÊNDICE C- Determinação de ácidos e álcoois.....	103

"The world is indeed comic, but the joke is on mankind."

H. P. Lovecraft

1 INTRODUÇÃO

Em função do alto consumo energético mundial oriundo de combustíveis fósseis e de seus conhecidos malefícios, medidas mitigadoras vêm sendo estudadas para frear essas explorações energéticas e ações ambientais têm sido sugeridas na busca por novas fontes de energia renovável. Dentre as possibilidades estudadas globalmente, o gás hidrogênio se mostra uma alternativa em potencial, podendo ser utilizada como combustível energético do que os hidrocarbonetos. Seu elevado potencial energético (142 KJ g^{-1}) (SILVA *et al.*, 2018) é um dos pontos mais interessantes, quando comparado ao etanol ($27,3 \text{ KJ g}^{-1}$) e a gasolina ($51,6 \text{ kJ g}^{-1}$). Além disso, o gás hidrogênio é reciclável e de natureza não poluente, podendo ser obtido de várias formas como, por exemplo, pela eletrólise da água, reforma a vapor e de forma biológica, por meio da digestão anaeróbia (TAWFIK; EL-QELISH, 2014).

Grande parte da produção de hidrogênio se deve a reforma a vapor. Nos Estados Unidos da América, 95% do hidrogênio consumido é gerado a partir da reforma a vapor do gás natural (XIA *et al.*, 2016). Nesse aspecto a produção biológica do gás hidrogênio tem atraído grande atenção mundial.

A digestão anaeróbia se mostra promissora em relação às outras formas biológicas de obtenção de H_2 , na qual podem ser utilizados como substrato: águas residuárias agroindustriais, resíduos domésticos, efluentes industriais, entre outros (ZHANG *et al.*, 2017). Processos anaeróbios podem ser aplicados no tratamento desta carga orgânica e, como citado anteriormente, na recuperação bioenergética. Muitos carboidratos estão presentes nos efluentes industriais e domésticos, os quais podem ser utilizados como substratos, ou seja, possuem fontes de carbono para que a fermentação ocorra. Os carboidratos comumente encontrados em resíduos agroindustriais são as hexoses e pentoses, como por exemplo, glicose, xilose, frutose e sacarose. Para cada um desses substratos, estequiometrias específicas de rendimento da conversão fermentativa dos carboidratos a gás hidrogênio podem ocorrer nas rotas de geração dos ácidos acético, butírico e propiônico, assim como nas rotas de geração de álcoois, como butanol e etanol.

Várias fontes de inóculo têm sido testadas com eficiências confirmadas, na maioria das vezes, microrganismos isolados de famílias conhecidas como produtoras de gás hidrogênio, principalmente *Clostridiaceae* e *Enterobacteriaceae*, provenientes de amostras ambientais. Daí a importância de se trabalhar com

consórcios bacterianos na produção biológica de gás hidrogênio, focando, principalmente, na utilização de lodo de estações de tratamento de esgoto sanitário e de águas residuárias industriais, uma vez que em tais matrizes a diversidade de bactérias anaeróbias é elevada. Entretanto, no emprego de culturas mistas advindas de amostras ambientais é preciso inativar os microrganismos metanogênicos presentes que podem consumir gás hidrogênio na rota metabólica da geração de gás metano, resultando na aplicação de diversas técnicas de tratamento de inóculo. Ressalta-se que em climas tropicais como o Brasil onde as temperaturas médias anuais de 27°C podem favorecer o estabelecimento de consórcios de bactérias geradoras de H₂, torna possível a geração de gás hidrogênio em reatores ambientados apenas pelo clima. Assim como, tais temperaturas, favorecem o plantio e o cultivo da cultura citrícola no país.

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de cultura citrícola, com a produção de laranja em 2014, chegando a 16,9 milhões de toneladas, e em 2017/18, chegando a 16 milhões de toneladas, representando assim, 33% da produção mundial e 75% da exportação de suco de laranja mundialmente (USDA, 2018). O Estado de São Paulo representa 73% dessa produção. A agroindústria brasileira ocupa uma área de 28.840.726 ha, produzindo cerca de 597 milhões de toneladas de resíduos provenientes de vários tipos de cultura, entre eles a citrícola. No ano de 2014, foram geradas pelas indústrias citrícolas brasileiras 8,4 milhões de toneladas de resíduos de laranja (TORQUATO *et al.*, 2017b). Os resíduos citrícolas contêm carboidratos que podem ser utilizados como fontes de carbono por bactérias fermentativas. Glicose, frutose e sacarose estão entre esses carboidratos, os quais se apresentam em concentrações próximas às adequadas (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012) para que a produção de H₂ se torne viável. Além disso, a região central do Estado de São Paulo está localizada no denominado cinturão citrícola, que engloba os Estados de Minas Gerais e São Paulo e é responsável por cerca de 80% da produção do país (NEVES *et al.*, 2010).

Portanto, uma investigação do potencial de produção de gás hidrogênio utilizando resíduos da agroindústria citrícola, o qual é um recurso abundante no Brasil, pode resultar em uma possibilidade de sua utilização como fonte bioenergética, além de ser uma alternativa eficiente para tratamento adequado desses resíduos gerados.

“No need for X-ray vision to see that something is not right.”

Superman

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gás hidrogênio e o futuro da energia mundial

A economia mundial atual gira em torno do uso de combustíveis fósseis, os quais favorecem o aquecimento global, contribuindo com emissões de gases que aceleram o efeito estufa. Aliado a isso, a crescente demanda energética imposta eleva os preços dos combustíveis convencionais, os quais estão diminuindo, expondo a dependência de tais economias dessa fonte energética (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017). Países com grande demanda energética, apresentam as maiores emissões de gases do efeito estufa e de acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA, do inglês *International Energy Agency*) o setor de energia vai aumentar as emissões de CO₂ de 50% em 2030 para 80% em 2050 (DA SILVA VERAS *et al.*, 2017). Segundo os autores (*op. cit.*), é estimado que a população mundial chegará em 7,5 bilhões em 2025 e que tal feito aumentará o consumo de energia em 50-60% comparado com o atual consumo. De acordo com Nikolaidis & Poullikkas *et al.* (2017), as fontes energéticas necessitam se mostrar livres de emissões de carbono e renovável. Ainda apontado pelos autores, o maior desafio de tal busca é o desafio de estocar e manter essa energia estocada para quando precisemos e pelo tempo que seja necessário. A partir disso, várias pesquisas vêm sendo feitas para encontrar uma fonte energética que seja limpa e uma alternativa confiável aos tradicionais combustíveis fósseis. Gás hidrogênio e células combustíveis vêm sendo apontadas como uma tecnologia energética em potencial e apresenta uma transição a longo prazo para uma energia limpa e para o sistema de transportes (DA SILVA VERAS *et al.*, 2017). Entretanto, uma das desvantagens do H₂ é que essa fonte energética não está disposta livremente na natureza, entretanto, pode ser produzido a partir de uma fonte primária de energia, podendo ser utilizada na combustão direta ou em uma célula combustível, gerando somente água como coproduto (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017). Segundo os autores (*op. cit.*), aliado a seu alto poder energético (Tabela 2.1-1), o gás hidrogênio pode ter sua utilização doméstica facilitada pela tecnologia de armazenamento correta (gás sob alta pressão, líquido criogênico ou hidreto sólido), podendo ser transportada de modo convencional para abastecer células combustíveis.

Tabela 2.1-1. Valores de combustão inferiores e superiores para vários combustíveis

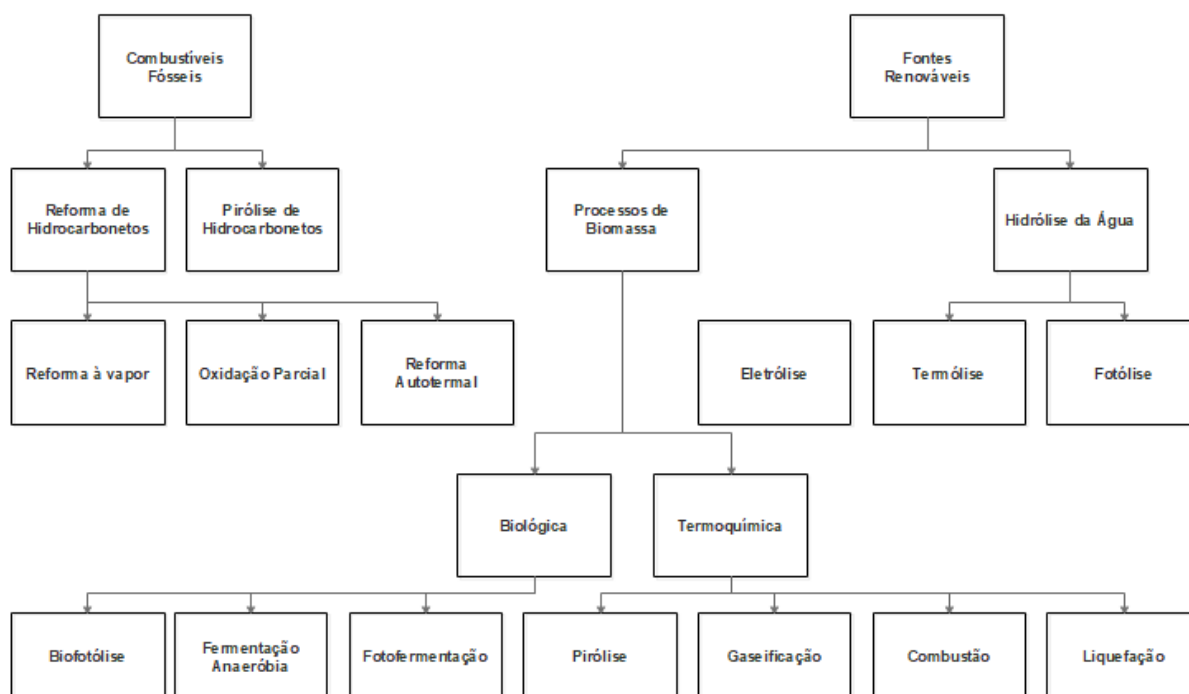
Combustível	Estado a temperatura e pressão ambiente	Valor de combustão superior (MJ kg⁻¹)	Valor de combustão inferior (MJ kg⁻¹)
Gás hidrogênio	Gás	142	120
Gás metano	Gás	55,5	50
Gás etano	Gás	52	48
Gasolina	Líquido	48	45
Diesel	Líquido	45	43
Metanol	Líquido	20	18

Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS, 2017

Atualmente a produção de H₂ está em torno de 0,1 GT, dos quais a maioria é consumida localmente e pouco é usado como combustíveis de veículos, visando uso de geração de aquecimento domésticos e industriais em um futuro próximo (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

Governos já vêm fundando projetos, leis de incentivo e estudos na chamada “Economia do gás hidrogênio”, favorecendo o uso mais eficiente desse combustível em cadeias locais de produção (DA SILVA VERAS *et al.*, 2017). Os processos de obtenção de H₂ podem ser divididos em dois grandes grupos, tecnologias convencionais e tecnologias renováveis (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017) como mostrado na Figura 2.1-1.

Figura 2.1-1. Método de produção de gás hidrogênio

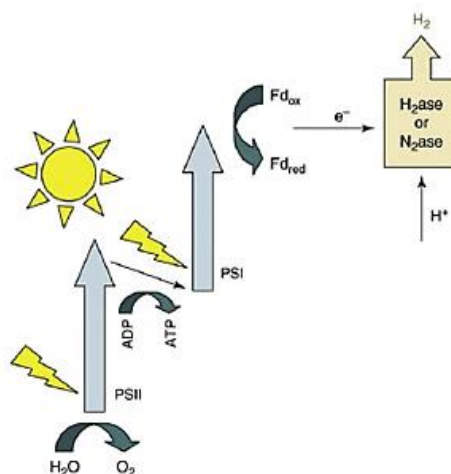


Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS (2017)

As formas biológicas se mostram mais renováveis e mais baratas uma vez que microrganismos podem converter água em H_2 pela biofotólise, biofotólise indireta e ainda pela fotofermentação (DA SILVA VERAS *et al.*, 2017). Segundo os autores (*op. cit.*), a biofotólise direta pode ser realizada a partir de um sistema de fotossíntese com microalgas, que convertem energia solar em energia química na forma de H_2 , de acordo com a equação 1 e com a Figura 2.1-2.



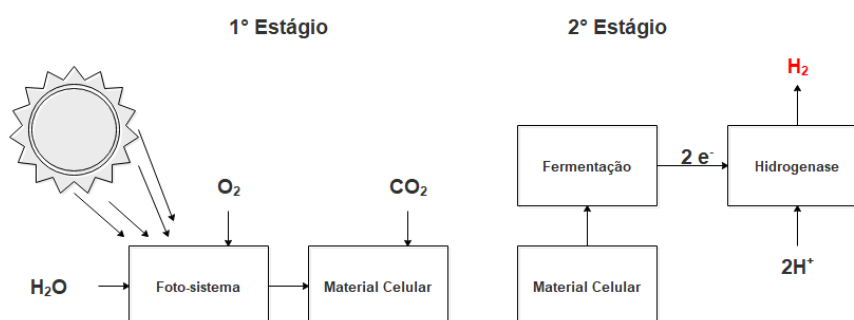
Figura 2.1-2. Biofotólise de uma alga verde ou cianobactéria



Fonte: DA SILVA VERAS *et al.*, 2017

Para a biofotólise indireta, cianobactérias são adicionadas ao sistema, fazendo com que acetato seja produzido durante o processo de fermentação adicional e posteriormente convertido a H_2 (Figura 2.1-3). Entre os dois processos a biofotólise indireta destaca-se com um custo menor de $135 \text{ \$ m}^{-2}$, estimando $1,42 \text{ \$ kg}^{-1}$ de H_2 , em contrapartida, a biofotólise tem um custo aproximado de $2,13 \text{ \$ kg}^{-1}$ de H_2 .

Figura 2.1-3. Processo de biofotólise indireta



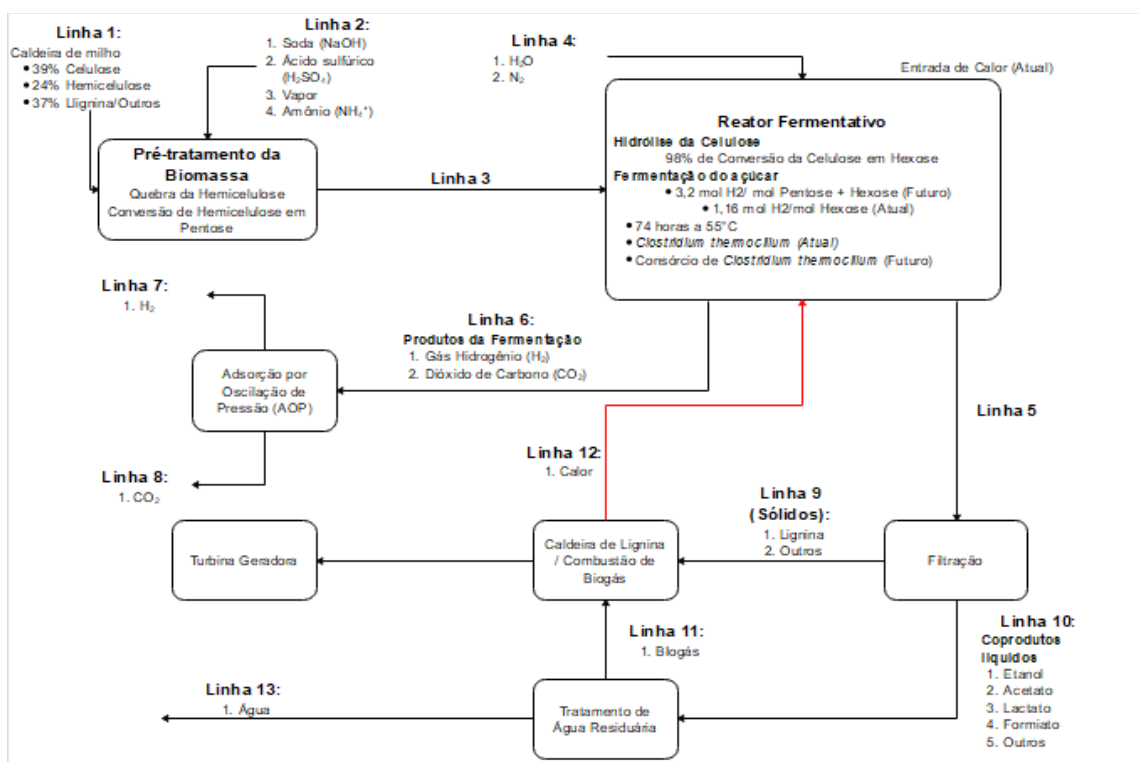
Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS (2017)

A fermentação no escuro é a conversão fermentativa de substrato orgânico, incluindo resíduos orgânicos e biomassa para produção de gás hidrogênio, sob ausência total de oxigênio e luz. A glicose, substrato preferido nesse caso, é cara e

não está disponível no ambiente de forma bruta. Entretanto, esse substrato pode ser obtido a partir de resíduos de agricultura e outros. O valor de pH tido como ótimo para tal processo está entre 5 e 6, fazendo com o que rendimento da produção de gás hidrogênio esteja intimamente ligado a tal valor (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017) pela questão seletiva do meio como tratado mais a adiante nos pré-tratamentos. O processo fermentativo apresenta várias vantagens frente a fotofermentação e a biofotólise, principalmente no que diz respeito a rendimento de produção, simplicidades do processo, pouco gasto de energia, uso de resíduos, e por continuar produzindo de forma contínua sem a presença de luz (DA SILVA VERAS *et al.*, 2017). A fermentação no escuro ainda ganha no quesito de espaço, uma vez que em poucos metros é possível produzir H_2 em um reator.

James; Desantis; Saur (2016), trazem um esquema que representa toda uma planta de biogeração de H_2 (Figura 2.1-4) e acrescenta que o gás gerado seria utilizado para combustão em turbinas geradoras de eletricidade e que o excesso de tal produção poderia retornar a empresa por 11,93 dólares por kg de H_2 e 8,19 dólares pelo kg de H_2 produzido.

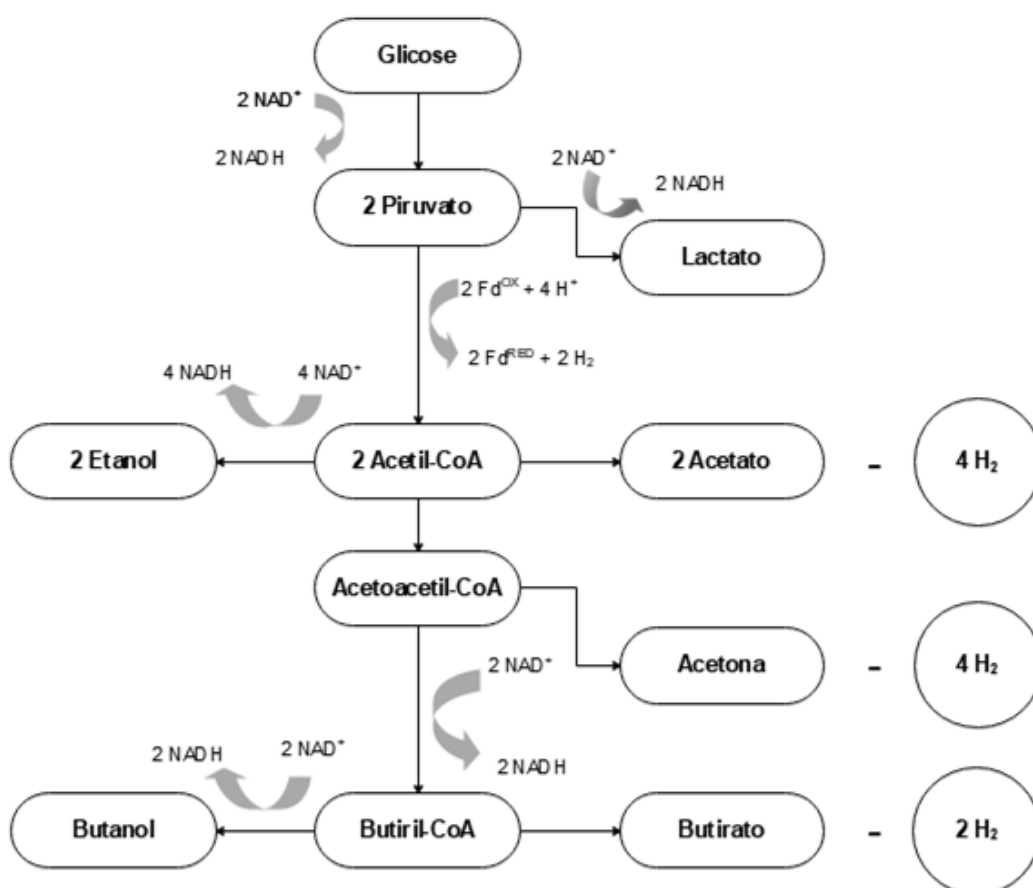
Figura 2.1-4. Linha de produção para projetar um curto de H_2 produzido via fermentação com capacidade de 50,000 kg por dia



Fonte: Adaptado de JAMES; DESANTIS; SAUR, 2016

Do ponto de vista bioquímico, a produção de H_2 nos processos biológicos é realizado por meio de enzimas como [FeFe]-hidrogenase, [NiFe]-hidrogenase e nitrogenase (MATHEWS; WANG, 2009), por exemplo no *C. acetobutylicum*, microrganismo pertencente ao gênero *Clostridium*, que tem alto potencial de geração de H_2 . A Figura 2.1-5, mostra de forma simplificada o processo metabólico de produção de gás hidrogênio pelas bactérias anaeróbias estritas.

Figura 2.1-5. Fermentação anaeróbia em microrganismo do gênero *Clostridium*



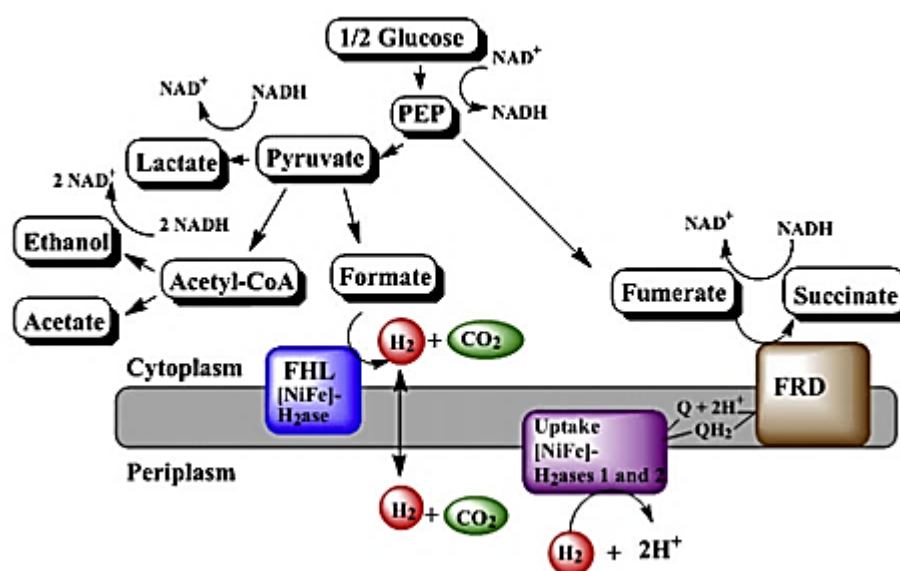
Fonte: Adaptado de MATHEWS; WANG, 2009

No processo de fermentação anaeróbia, a glicose é convertida à piruvato, que por sua vez é convertido a Acetil-CoA, o qual pode ser convertido a acetato, gerando 4 mols de H_2 ; convertido a acetona e gerar 4 mols de H_2 ; ou ainda convertido a Butiril-CoA, que por sua vez é convertido a butirato, gerando 2 mols de H_2 (MATHEWS; WANG, 2009). Segundo os autores (*op. cit.*), a enzima [FeFe]-

hidrogenase é dez vezes mais ativa, tornando a principal responsável pela produção enzimática de H_2 .

Como em consórcios não há, muitas das vezes, somente microrganismos anaeróbios estritos, é preciso saber um pouco sobre como microrganismos anaeróbios facultativos se comportam e produzem H_2 (Figura 2.1-6).

Figura 2.1-6. Fermentação ácida mista para produção de biohidrogênio com *E. coli*



Fonte: MATHEWS & WANG (2009)

Na Figura 2.1-6 pode-se observar que a maioria do piruvato gerado na fermentação é convertido pela piruvato-formato-liase produzindo formiato e Acetil-CoA, sendo o Acetil-CoA convertido em acetato e etanol; dependendo das condições uma porção de piruvato pode ser convertida em lactato; aliado a isso, a célula produz succinato. A ausência de receptores de elétrons como oxigênio e nitrato, requer alternativas na geração de NAD^+ . Nas condições anaeróbias os produtos gerados durante a fermentação estão em sua forma reduzida e ajudam a célula a manter o suplemento de NAD^+ constante durante a glicólise. O formiato produzido sob condições anaeróbias pode ser quebrado em gás hidrogênio e dióxido de carbono sob condições ácidas, mantendo o valor de pH do meio fermentativo e diminuindo a concentração de formiato na célula. Microrganismos como a *E. coli*, podem produzir H_2 por meio da redução da quinona aliada a oxidação do hidrogênio e por meio da evolução do hidrogênio ao longo fermentação ácida mista (MATHEWS; WANG, 2009).

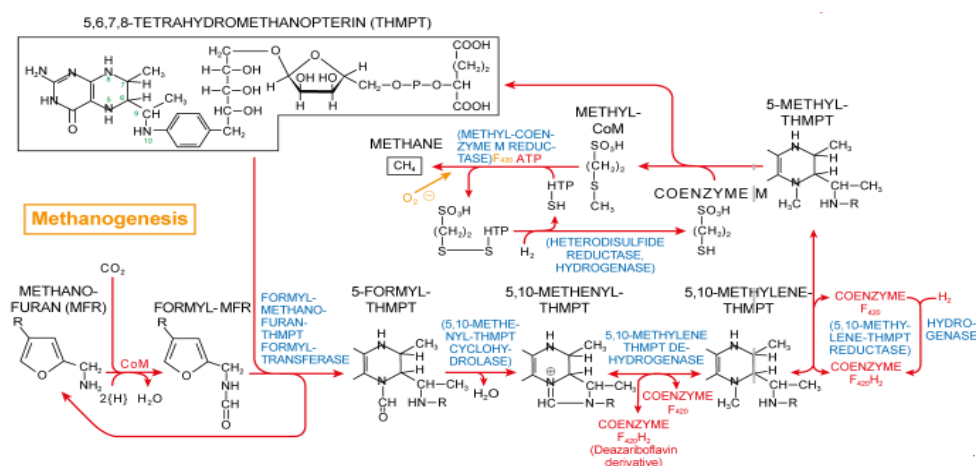
Para que o processo de produção de H_2 ocorra é preciso inativar ou inibir o processo natural da cadeia metanogênica e estes métodos serão melhor explicados na próxima seção.

2.1.1 Pré-tratamentos e inativação da metanogênese

O fato de a produção biológica de hidrogênio apresentar um baixo custo comparado aos demais processos, faz com que essa área de pesquisa seja mais explorada a cada dia. Na literatura têm-se muito sobre as pesquisas realizadas com microrganismos isolados e que já tenham seus potenciais de produção de H_2 reconhecidos pela comunidade científica. Entretanto, isolar um microrganismo não é uma tarefa fácil, pelo contrário, é extremamente árdua. Mais árduo ainda é manter tais microrganismos isolados, uma vez que o simples fato de um efluente entrar em contato com os microrganismos presentes em um reator já altera toda sua microbiota. Por esse motivo e, aliado à diversidade metabólica do consórcio, inúmeras pesquisas vêm trabalhando com consórcios bacterianos mistos a partir de diversos lodos como fonte principal. Tal estratégia tem em sua principal vantagem a exclusão do processo de isolamento bacteriano e, aliado a isso, temos a chance de sua utilização como está disposto na natureza. Entretanto, medidas devem ser tomadas visando a inibição da oxidação total da matéria orgânica, uma vez que a reação completa produz gás metano. Esse gás tem grande importância mundial e se apresenta como uma fonte alternativa de energia na atualidade e para o futuro.

A rota metabólica da metanogênese é mostrada na Figura 2.1.1-1.

Figura 2.1.1-1. Rota metabólica da metanogênese



Fonte: ROCHE (2014)

O processo de redução do CO₂ para metano utiliza elétrons provenientes da oxidação de H₂ (WELANDER; METCALF, 2005). Logo no início da rota metabólica, o CO₂ gerado durante o processo fermentativo reage com o Metano-furano e com dois prótons provenientes da quebra hidrogenotrófica da molécula de H₂. Mais à frente na rota, a coenzima F₄₂₀ sofre redução para a forma F₄₂₀H₂, que por sua vez transporta esses elétrons para a 5-Metil THMPT. Há consumo de H₂ no processo em que a enzimas Hidrogenase e a Heterodissulfeto Redutase auxiliam na formação da Coenzima M, essencial na formação de CH₄. São necessários 4 mols de H₂ para a formação de um mol de CH₄ (Equação 2). Por apresentar um $\Delta G'$ negativo, a reação é tida como espontânea e ocorrerá na natureza.



Para que se possa produzir somente gás hidrogênio, é preciso interromper a cadeia metanogênica. Evitando assim, o consumo de H₂ gerado durante a etapa fermentativa. Para efetuar essa quebra da cadeia, pré-tratamentos são utilizados visando a inativação de microrganismos capazes de capturar esse H₂ produzido e transformá-lo em gás metano. As *Archaeas* metanogênicas são as principais responsáveis por tal processo. Outros microrganismos como bactérias homoacetogênicas, produtoras de ácido láctico, produtoras de propionato e redutoras de sulfeto também estão entre os microrganismos que devem ser inativados (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). A inativação ou até mesmo inibição desses microrganismos é realizada com base em sua fisiologia, metabolismo e morfologia. Os microrganismos tidos como produtores de H₂ como *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. e *Enterobacter* spp. (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016) possuem a capacidade de produzir uma espécie de capsula protetora em torno de seu material genético (endósporo), possibilitando que, caso sofra algum estresse ambiental e fisiológico, seja capaz de sobreviver quando as condições voltarem a ser favoráveis. Os microrganismos consumidores de H₂ em sua grande maioria não possuem tal capacidade de esporulação. Portanto, qualquer estresse mais efetivo no ambiente em que estão inseridos pode levar a uma seleção e consequente inativação ou até mesmo inibição dessas espécies.

Vários pré-tratamentos podem ser aplicados no consórcio bacteriano, como por exemplo: alterações na alcalinidade e acidez do meio, tratamentos por

irradiação, por adição de compostos químicos inibidores, tratamento térmico, congelamento e descongelamento, secagem e desidratação (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018; ROSSI *et al.*, 2011; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015). A escolha do pré-tratamento ideal varia de acordo com a disponibilidade de material, custo e, após efetuado o processo, se houve ou não a produção de gás metano.

O processo térmico ou choque térmico é o mais utilizado e amplamente difundido dentre as pesquisas na produção de H₂ tendo açúcares como substrato e também com amostras complexas aplicadas como substrato. Microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos são extremamente sensíveis ao aquecimento, assim como os produtores de ácido lático, os quais são inibidos com temperatura acima de 50°C (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). De acordo com a literatura a duração e intensidade do pré-tratamento térmico são cruciais para o sucesso na inativação dos microrganismos indesejados. Períodos muito curtos e temperatura mais amenas não tem efeito inibitório na maioria dos consumidores de H₂. Entretanto, temperaturas muito elevadas podem afetar os microrganismos produtores de gás hidrogênio, fazendo com que o rendimento e produção final sejam mínimas. A variação de temperatura é de 65-100°C e a duração varia entre 15 minutos à 2 horas de exposição a essa condição (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2016). O processo de secagem e desidratação é considerado um tratamento térmico (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015), portanto, o tempo de secagem e de desidratação deve ser testado exaustivamente para encontrar condições ótimas para o tratamento. Por ser um dos métodos mais baratos, o tratamento térmico é amplamente utilizado e sua eficácia na inibição pode ser comprovada através das concentrações de metabólitos gerados durante o processo fermentativo, como por exemplo, a baixa produção dos ácidos lático e propiônico. Portanto, grande parte dos microrganismos consumidores de H₂ permanecem inativados. Entretanto, a longo prazo, tal processo de inativação se mostra ineficaz, sendo necessária a repetição do tratamento térmico periodicamente (SHANMUGAM *et al.*, 2016).

Aeração também pode ser apontado como um tratamento, teoricamente, eficaz. Sabe-se que microrganismos consumidores de H₂ são estritamente anaeróbios e muito sensíveis a presença de gás oxigênio, portanto, o processo de se borbulhar gás oxigênio no inóculo apresenta um grande potencial de inativação desses microrganismos (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). Entretanto, existem apenas alguns poucos artigos relatando tal tratamento e outro ponto que

se faz pertinente, é o baixo rendimento de H_2 quando comparado a outros tratamentos de inóculo. Rafieenia; Lavagnolo; Pivato (2018) ainda explicitam que tal método não tem uma longa duração quando comparado ao tratamento térmico, por exemplo, o que o torna problemático.

Os tratamentos alcalino e ácido atuam da mesma forma que os demais aqui apresentados com exceção de que a alteração no valor de pH altera também a permeabilidade e concentração de cargas ao longo da membrana celular, fazendo com que as enzimas acabem perdendo suas funções, ocasionando assim, a morte do microrganismo (WANG; YIN, 2017). A sensibilidade dos microrganismos não-esporulantes faz com que a alteração dos valores de pH sejam uma grande ferramenta em sua inativação. Entre os ácidos mais utilizados para tal tratamento temos HCl, $HClO_4$, H_2SO_4 e HNO_3 ; entre as bases temos NaOH e KOH. Rafieenia; Lavagnolo; Pivato (2018) apontam que a eficácia dos tratamentos ácidos e alcalinos dependem intimamente das condições impostas e também da origem do inóculo. Os autores também afirmam que tais tratamentos apresentam produções e rendimentos menores na produção de gás hidrogênio, assim como a necessidade de repetição do tratamento para manter o consórcio produtor de H_2 . Outro fator apontado pelos autores seria a implantação de tal método em escalas maiores, o que necessitaria de materiais específicos para construções de tais reatores e de um alto custo de manutenção.

O processo de irradiação é considerado uma nova tecnologia no que diz respeito aos tratamentos para seleção de comunidades bacterianas. Micro-ondas, ultrassom, radiação gama e irradiação infra-vermelho são técnicas incluídas nesse pré-tratamento. O processo por ultrassom utiliza ondas sonoras para criar altas temperaturas e pressão no meio. Por meio deste processo, radicais altamente reativos são formados, o que pode causar a ruptura da parede celular (WANG; YIN, 2017). O processo por meio de micro-ondas, cria altas temperaturas e fricção em líquidos polares pelo uso de ondas eletromagnéticas com frequências de 300MHz a 300GHz (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). A radiação gama ocasiona a mudança física, química e biológica das propriedades celulares, criando assim, radicais livres com DNA não-esporulantes (YIN; HU; WANG, 2014). A irradiação por infra-vermelho, por meio da sua radiação com frequência maior que a de micro-ondas, causa a quebra da parede celular de microrganismos mais sensíveis, ocasionando sua morte e inibição.

O pré-tratamento por congelamento e descongelamento consiste em vários ciclos ou em um longo ciclo de congelamento e descongelamento do inóculo a temperatura ambiente. Em decorrência da grande flutuação de temperatura, cristais de gelo podem ser criados dentro da célula e causando também um inchaço celular, o que, conseqüentemente, leva a danos celulares e ruptura dos agregados celulares (WANG; YIN, 2017). Os tratamentos por inibidores químicos também podem ser feitos em ciclos ou em ciclo único.

Os inibidores químicos podem ser muito seletivos em sua atividade inibitória, deixando intactos os microrganismos produtores de gás hidrogênio. Os compostos comumente utilizados para tal processo incluem o ácido bromometano sulfônico (BESA, do inglês), clorofórmio, iodopropano e ácidos graxos. Foi verificado que a Metil-Coenzima M redutase é a principal enzima responsável pela produção de gás metano e essa enzima sofre uma inibição na presença de BESA em determinadas concentrações: a produção acetoclástica de gás metano é totalmente inibida por 1 mmol BESA e o bloqueio da redução de H₂ pode ser atingida com 50 mmol BESA. O Clorofórmio bloqueia a função de enzimas corrinoides e inibe a MCR (Metil-coenzima M Redutase) (WANG; YIN, 2017).

Todos os pré-tratamentos aqui apresentados influenciam diretamente nos metabólitos produzidos ao longo da fermentação. Entretanto, as condições de operação, fonte de inóculo e tipo de substrato podem interferir nos metabólitos produzidos concomitantemente aos pré-tratamentos aplicados no consórcio. Portanto, os pré-tratamentos são essenciais na inibição da metanogênese, mas também deve-se conhecer bem o substrato em que esse consórcio será inserido. O substrato é de suma importância, pois toda fonte de nutrientes envolvidos no metabolismo de sobrevivência do consórcio bacteriano quanto no metabolismo de produção de H₂ desejado é retirado dele. No item a seguir, discutiu-se sobre o substrato utilizado na presente pesquisa.

2.2 A citricultura e a produção de biohidrogênio

No ramo da citricultura, principalmente focando na cadeia produtiva do suco de laranja, o Brasil representa 34% da produção de laranja e 3/4 da produção de suco mundialmente (USDA, 2018). Nosso país consegue incríveis 76% de

participação na produção de suco de laranja no mundo. Essa produção gera um produto interno bruto (PIB) de US\$ 6,5 bilhões percorrendo todos os pontos da cadeia produtiva e gera cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos. O impacto proveniente de tal cadeia é direto no que diz respeito à economia de mais de 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro, também conhecido como “Cinturão Citrícola” (Figura 2.2-1).

Figura 2.2-1. Visão geral do “Cinturão Citrícola” em âmbito nacional

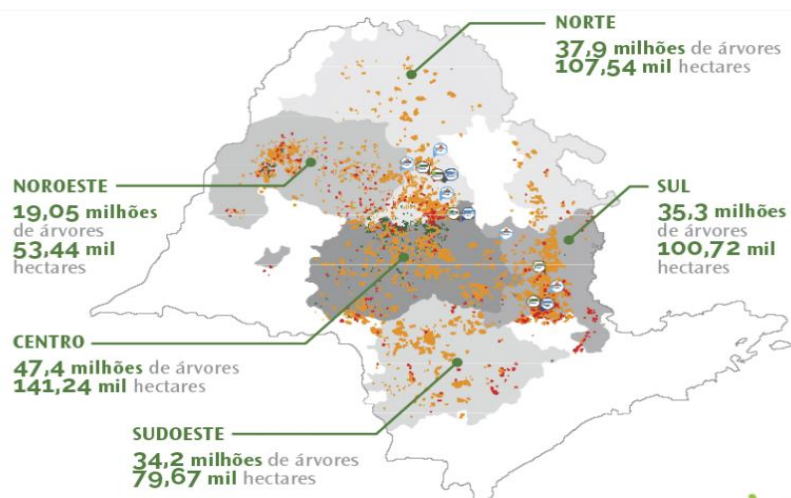


Fonte: SOUZA *et al.*, (2013)

Como resultados temos altos índices de IDH (Índice de Desenvolvimento Humano com escala de 0,000 à 1) em cidade citrícolas como Araraquara (0,815), Botucatu (0,800), Bebedouro (0,780), Limeira (0,775) e Matão (0,773) (NEVES; TROMBIN, 2017), todas localizadas dentro do “Cinturão” no Estado de São Paulo (Figura 2.2-2).

O volume das exportações aumentou 14,42% em 2018 (CITRUSBR, 2019), o que resulta em maior resíduo sendo gerado. Entretanto, tais dados de geração de resíduos são obscuros e pouco divulgados.

Figura 2.2-2. Cinturão Citrícola, no Estado de São Paulo, com suas medidas



Fonte: AGR11, (2016)

Torquato *et al.*, (2017b) afirma que em 2014 foram gerados cerca de 8,4 milhões de toneladas de resíduos provenientes da indústria citrícola. Esses resíduos, em sua maioria, contêm componentes como carboidratos em concentrações favoráveis para sua reutilização como substrato para fermentação, como apontado por Rezzadori, Benedetti e Amante (2012).

Águas residuárias são dispostas no corpo receptor da cidade em que a indústria citrícola se localiza. Dessa forma, esse resíduo normalmente é direcionado ao sistema de tratamento de água da indústria para, então, ser despejado no rio. Outro resíduo gerado é o efluente bruto citrícola que por apresentar coloração escura, quase preta, deve ser, provavelmente, proveniente do processo de limpeza e do processo de produção, ou seja, um resíduo misto. Entretanto, apresenta características próximas a água residuária como por exemplo Demanda Química de oxigênio (DQO), valor de pH e concentração de carboidratos. Outro resíduo gerado nesses processos é a vinhaça citrícola, que devido as suas características físicas, como viscosidade e coloração, e químicas, apresenta maior concentração de carboidratos, ácidos graxos voláteis e álcoois em sua composição. Provavelmente, a vinhaça é proveniente do meio do processo de fabricação do suco de laranja, pois ainda possui uma alta concentração de carboidratos, a qual poderia ser aproveitada em uma etapa futura do processo industrial. Esses resíduos citrícolos aliados à digestão anaeróbia podem resultar em uma utilização viável para a produção de H₂.

Como citado anteriormente, a região em que a presente pesquisa foi realizada se localiza no “Cinturão Citrícola”, e visa, apoiado em Torquato *et al.*,

(2017b) mostrar o uso de resíduos citrícolas como substrato da produção biológica de H₂. Entretanto, pouco tem se estudado sobre tal substrato abundante em nossa região, aplicado na produção de biogás. A Tabela 2.2-1 mostra a quantidade de trabalhos encontrados em duas bases de dados, Science Direct e Scielo, envolvendo resíduos de citricultura e a produção de gás hidrogênio. Os descritores utilizados nas buscas também são mostrados, enfatizando a baixa investigação e interesse por um resíduo abundante em nossa região.

Tabela 2.2-1. Procura sistemática de literatura acerca de produção biológica de H₂ associado a resíduo citrícola

Fonte	Descritor	Trabalhos Encontrados	Trabalho pertinentes
	Citrus + biohydrogen	73	2
	Orange + biohydrogen	208	0
SCIENCE DIRECT	Citrus wastes +biohydrogen	71	0
	Orange wastes +biohydrogen	165	2
	Citric wastes + biohydrogen	219	0
	Citrus + biohydrogen	0	0
	Orange + biohydrogen	0	0
SCIELO	Citrus wastes +biohydrogen	0	0
	Orange wastes +biohydrogen	0	0
	Citric wastes + biohydrogen	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor

Os artigos encontrados são, em sua maioria, artigos internacionais que se baseiam no uso de resíduos sólidos de laranja aplicados à produção de biocombustíveis (TAGHIZADEH-ALISARAEI *et al.*, 2017); ou então, focados em apresentar vários possíveis usos e aplicações dos resíduos provenientes da laranja (RAFIQ *et al.*, 2016; REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012; SHARMA *et al.*, 2017). Somente um artigo esteve intimamente relacionado com a produção de gás hidrogênio, especificamente, Torquato *et al.* (2017b). Os autores utilizaram vinhaça e água residuária citrícola como substratos para produção biológica de gás hidrogênio em reatores anaeróbios em batelada, tendo como inóculo um consórcio bacteriano proveniente de lodo tratando esgoto doméstico.

Há trabalhos que mostram a produção biológica de H₂ utilizando substratos que podem estar presentes em água residuárias industriais provenientes da citricultura. Carboidratos como frutose, sacarose, glicose, entre outros mono e

polissacarídeos, são apontados como constituintes do resíduo citrícola (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012). A frutose por ser o carboidrato presente nas frutas em geral, apresenta um grande potencial de produção de H₂ quando aplicado como substrato (MAINTINGUER *et al.*, 2017; PACHIEGA *et al.*, 2018a). A frutose por evitar uma etapa na via glicolítica pode ser consumido mais facilmente no processo fermentativo, enfatizando seu grande potencial de conversão energética. A sacarose pode ser adicionada no processo de preparo do produto, principalmente, no que tange adoçamento de sucos por exemplo. Entretanto, com as políticas de produtos naturalmente adoçados, ou seja, somente com o açúcar contido na fruta, essa fonte energética pode sofrer uma queda quanto a presença delas nos resíduos. Por outro lado, caso haja polissacarídeos maiores, pelo processo de hidrólise é possível que haja a geração desse carboidrato nos produtos, possibilitando a sua utilização no processo fermentativo para produção biológica de H₂. Vários trabalhos apontam que essa fonte energética possui um grande potencial de conversão (PACHIEGA *et al.*, 2018a, 2018b; SALEM *et al.*, 2018; TORQUATO *et al.*, 2017a; YIN; WANG, 2017), uma vez que por meio do favorecimento da rota de produção de ácido acético, gera-se 8 mol de H₂ por mol de carboidrato consumido. A glicose, por ser um dos monossacarídeos mais presentes nos polissacarídeos, potencialmente está presente em quase todos os resíduos provenientes da indústria de alimentos em geral. Sua rota de consumo é extremamente conhecida e já tem seu potencial de produção de H₂ comprovado por vários autores (ALY *et al.*, 2018; CAROSIA *et al.*, 2017; MAINTINGUER *et al.*, 2017; MARONE *et al.*, 2014; PACHIEGA *et al.*, 2018a; PATTRA *et al.*, 2008; SUBUDHI *et al.*, 2013).

Por este motivo a presente pesquisa se mostra de suma importância para nossa região, para a indústria citrícola e para as futuras pesquisas que venham a se interessar por esse resíduo tão abundante e com um grande potencial de uso em vários setores.

*"We stopped checking for monsters under our bed
when we realized they were inside us."*

The Joker

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a produção biológica de gás hidrogênio utilizando resíduos provenientes de agroindústria citrícola como substrato em reatores anaeróbios em batelada.

3.2 Específicos

Comparar e analisar pré-tratamentos no lodo granular proveniente de reator UASB mesofílico, tratando resíduo de avicultura, para inativar microrganismos geradores de gás metano;

Testar os consórcios de bactérias anaeróbias geradores de H₂ na produção de gás hidrogênio em reatores em batelada para concentrações crescentes de resíduos citrícolas e;

Comparar a produção de H₂ em diferentes resíduos citrícolas;

Identificar o consórcio de bactérias anaeróbias geradoras de H₂.

“If you kill a killer, the number of killers in the room remains the same.”

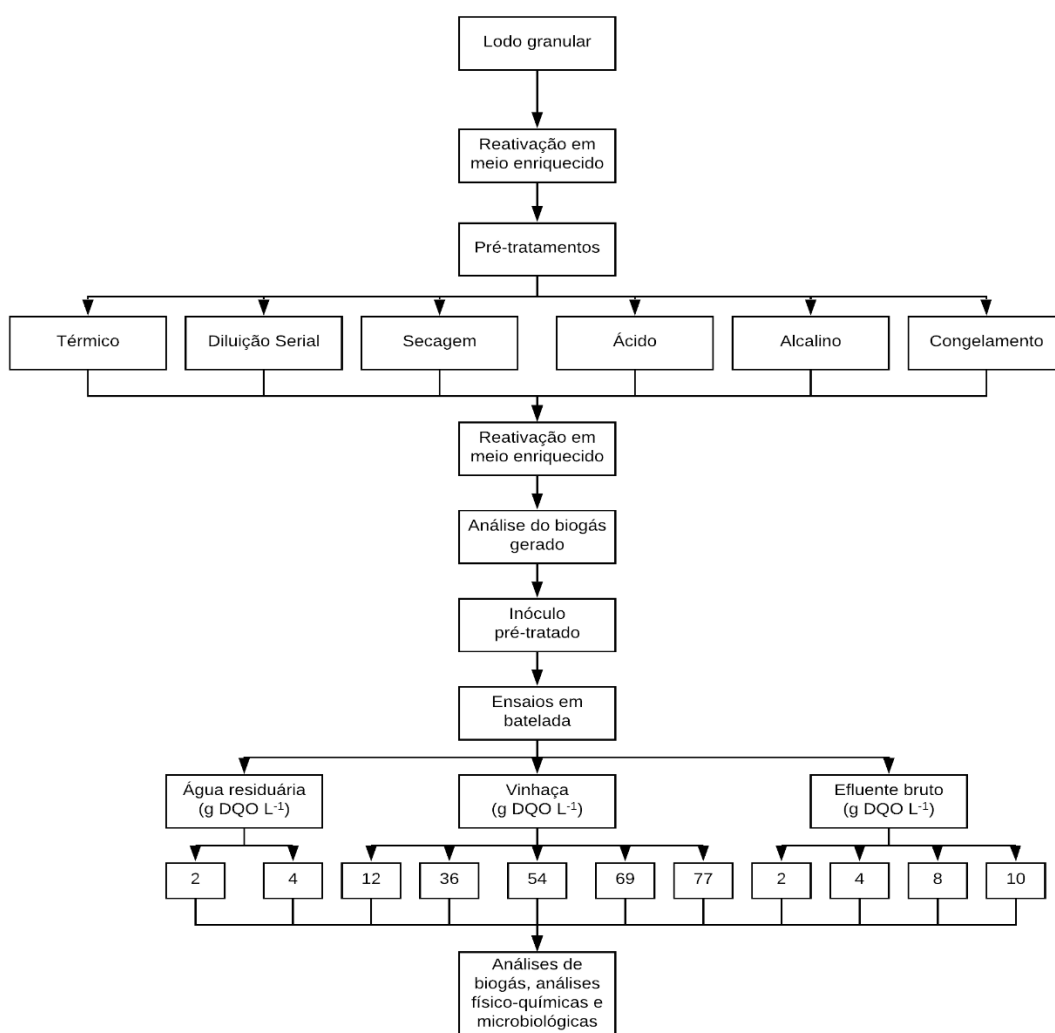
Batman

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma Experimental

A princípio o lodo granular foi macerado e reativado em meio enriquecido e submetido aos pré-tratamentos Térmico, Diluição Serial, Secagem, Acido, Alcalino e Congelamento. Após os pré-tratamentos aplicados; o inoculo foi reativado em meio enriquecido e teve o biogás gerado analisado. O inoculo pré-tratado em que foram obtidos os melhores resultados de geração de gás hidrogênio e inibição da metanogênese foi então, utilizado nos ensaios com reatores anaeróbios em batelada produtores de H_2 , nos quais foram realizadas análises físico-químicas, de biologia molecular e bioinformática (Figura 4.4-1).

Figura 4.1-1. Fluxograma experimental



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Fonte de Inóculo

O inóculo utilizado foi o lodo granular proveniente de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) de estação de tratamento de efluentes de abatedouro de aves, cedido pela avícola Dacar (Tietê –SP) contendo 31,94 g STV (Sólidos Totais Voláteis) L⁻¹.

4.3 Fonte de Carbono

Foram utilizados como fonte de carbono os resíduos citrícolas: água residuária (AR), vinhaça (VIN) e efluente bruto (EB). Os resíduos AR e EB foram coletados em localidades diferentes (Matão e Araras, respectivamente) e a nomenclatura aqui empregada é a mesma empregada na indústria parceira. A água residuária seria o resíduo final, após todo o processo industrial de produção de suco de laranja. Por outro lado, sobre o efluente bruto, não foram ditas maiores informações sobre em que parte do processo industrial ele se origina. Esses resíduos foram cedidos por uma indústria citrícola localizada em Matão, na região central de São Paulo, no cinturão citrícola. Os resíduos foram acondicionados em frascos plásticos de 1L de volume, fechados e mantidos a -20°C até sua utilização.

4.3.1 Caracterização do Resíduo Citrícola

Os resíduos citrícolas (água residuária, vinhaça) tiveram alguns parâmetros (pH, °BRIX, porcentagem de sólidos voláteis) previamente caracterizados na própria indústria; e no laboratório, o efluente bruto caracterizado, com exceção do °BRIX e porcentagem de sólidos voláteis. Análises de DQO foram realizadas nos resíduos no início de 2018, poucas semanas antes do uso nos reatores. Foram utilizadas 4 amostras escolhidas ao acaso dentre as acondicionadas a -20°C.

A caracterização de compostos presentes nos resíduos, como carboidratos, ácidos graxos voláteis e álcoois, foi realizada previamente a presente pesquisa de acordo com Adorno; Hirasawa; Varesche (2014) e APHA (2005). Entretanto, o resíduo efluente bruto (EB) não teve esses compostos caracterizados. A caracterização está apresentada nas Tabela 4.3-1 e 4.3-2.

Tabela 4.3-1. Caracterização prévia dos resíduos utilizados

Parâmetros	Água		
	Residuária (AR)	Vinhaça (VIN)	Efluente Bruto (EB)
pH	11,92	4,07	11,12
DQO (Demanda Química de oxigênio)	10,70	117,60	14,70
BRIX	0,99	8,94	---
% sólidos totais suspensos	0,60	6,00	----

°BRIX: quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose; 1°Bx = 1 g de açúcar em 100 g de solução.

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4.3-2. Caracterização da composição dos resíduos citrícolas

Composto	Água Residuária (mg L ⁻¹)	Vinhaça (mg L ⁻¹)
Glicose	12454,0	41016,0
Frutose	3862,0	0,0
Ácido cítrico	1603,0	3655,0
Ácido málico	0,0	0,0
Ácido succínico	0,0	249,0
Ácido láctico	0,0	0,0
Ácido fórmico	0,0	10005,0
Ácido acético	0,0	306429,0
Ácido propiônico	612,0	210,0
Ácido isobutírico	0,0	0,0
Ácido butírico	20114,0	283045,0
Ácido isovalérico	12388,0	0,0
Ácido valérico	0,0	17487,0
Ácido capróico	8504,0	8394,0

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Análise de Carboidratos Totais

As atividades foram iniciadas pela elaboração de curvas padrão para determinações de carboidratos totais (glicose, sacarose, xilose e frutose). As curvas dos açúcares foram feitas seguindo o procedimento de determinação de concentração de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956). O método apresenta um limite de quantificação até 200 mg L⁻¹ sob comprimento de onda de 490 nm. Foram utilizadas concentrações crescentes, partindo de 10 até 200 mg L⁻¹ para a

elaboração das curvas padrão. As curvas e suas respectivas equações são mostradas no APÊNDICE A.

4.5 Análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A curva padrão da demanda química de oxigênio (DQO) foi preparada de acordo com APHA (2005). Preparou-se os padrões e a amostra de referência para construção da curva padrão, conforme procedimento para determinação de DQO. As medidas de DQO seguiram o mesmo protocolo e os valores de absorvância obtidos foram substituídos na equação da curva padrão. Portanto, o intervalo de trabalho adotado para esta análise está no intervalo entre 10 e 600 mg L⁻¹ de DQO. Os valores obtidos e a curva padrão são mostradas no APÊNDICE B.

4.6 Análises de pH

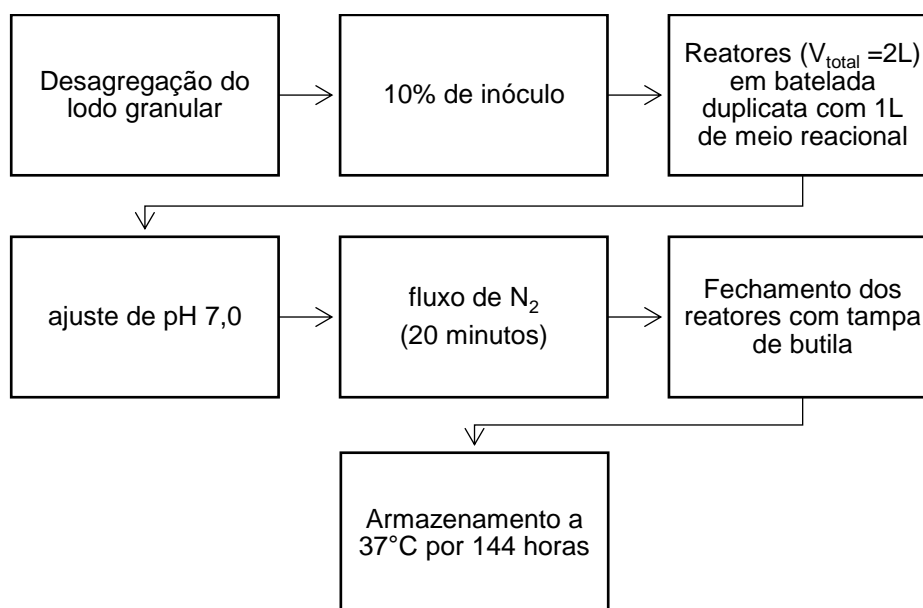
Os ajustes iniciais de valor de pH foram realizados utilizando HCl (4M) e NaOH (4M) e, assim como final realizadas ao final de cada ensaio, foram feitos de acordo com APHA (2005).

4.7 Análise de Crescimento Bacteriano

Análises de crescimento bacteriano foram feitas por turbidimetria em espectrofotômetro (Biosepectro® Digital Faixa 325-1000 NM) sob comprimento de onda de 600 nm (APHA, 2005).

4.8 Preparo e Enriquecimento Celular

O enriquecimento foi elaborado como mostrado na Figura 4.8-1 em meio de cultivo PYG (*Peptone Yeast Glucose*) (Em g L⁻¹: glicose, 10; extrato de levedura, 5; extrato de carne, 5; e peptona de carne, 5). Silicone acético foi aplicado para garantir a vedação, evitando o vazamento do biogás produzido. Esse processo foi repetido até que os reatores de produção de H₂ a partir de resíduos citrícolas fossem montados, objetivando assim, o aumento de biomassa bacteriana e que a atividade do consórcio bacteriano fosse mantida.

Figura 4.8-1. Processo de enriquecimento celular

Fonte: Elaborado pelo autor

4.9 Pré-tratamentos

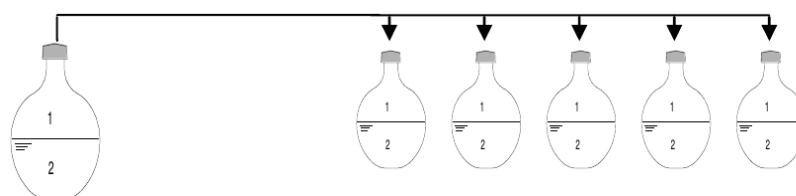
Ao todo foram reativados 12 reatores contendo 1L de meio reacional e 1L de volume de *headspace*, possibilitando que 2 reatores fossem utilizados como fonte de biomassa para cada pré-tratamento, o que permitiu a obtenção de uma boa quantidade de biomassa pré-tratada. Foram aplicados 6 diferentes pré-tratamentos com objetivo de inativar os microrganismos metanogênicos, os quais consomem gás hidrogênio para produção de metano. Foram eles: (I) térmico, (II) diluições seriais, (III) secagem, (IV) ácido, (V) alcalino e (VI) congelamento.

(I) Térmico: o inóculo foi aquecido a 100°C por 10 minutos em béquer aberto na capela, tendo a temperatura medida por um termômetro imerso no lodo. Uma vez aquecido o inóculo foi submetido a banho de gelo e monitorado até que sua temperatura atingisse 25°C. Após esse período o lodo foi reativado em meio PYG com pH ajustado em 5,5 e 7,0 (MAINTINGUER *et al.*, 2015).

(II) Diluições seriais: foram montados reatores anaeróbios em batelada, semelhantemente ao ensaio de reativação celular (2 L). Após 24 horas, alíquotas contendo inóculo e meio de cultivo (100 mL) foram adicionadas em novo meio de cultivo (Figura 4.9-1). Essa operação foi realizada diversas vezes até a diluição de 10⁻⁵. Um outro tipo de diluição serial foi realizada concomitantemente, porém, para este procedimento não se esperou 24 horas para o repique. Em reatores de 100 mL

foram colocados 50 mL de meio reacional e foi fluxionado N_2 , mantendo assim, o ambiente de anaerobiose. Os reatores tiveram 10 mL de solução (meio de cultivo + inóculo) para o reator seguinte. O processo foi repetido até a diluição de 10^{-5} . Após esse período o lodo foi reativado em meio PYG com pH ajustado em 5,5 e 7,0. Como houve duas montagens de diluições seriais, a diluição com tempo de repique de 24 horas é classificada como II e a diluição com tempo de repique menor de II' (ROSSI *et al.*, 2011).

Figura 4.9-1. Procedimento de purificação de inóculo. Reator com inóculo pré-tratado no lado esquerdo e reatores de purificação celular à direita



Fonte: Elaborado pelo autor

(III) Secagem: o lodo reativado foi aquecido a $100^{\circ}C$ por 12 horas em estufa. Após o processo de secagem, o lodo foi macerado em almofariz e armazenado em geladeira, em frascos tampados e na ausência de luz. O lodo foi reativado sob as mesmas condições exceto pelo pH, ajustado em 5,5 e 7,0 (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

(IV) Ácido: o lodo reativado foi inoculado (20% m/v) em reator de 2 L de volume total (1 L de volume reacional de meio PYG) sob pH 3,0 e mantido por 24 em estufa à $37^{\circ}C$. Após esse período o lodo foi reativado sob as mesmas condições exceto pelo pH, ajustado em 5,5 e 7,0 (ROSSI *et al.*, 2011).

(V) Alcalino: o lodo reativado foi inoculado (20% m/v) em 1 reator de 2 L de volume total (1 L de volume reacional de meio PYG) sob pH 10,0 e mantido em estufa à $37^{\circ}C$. Após esse período o lodo foi reativado sob as mesmas condições exceto pelo pH, ajustado em 5,5 e 7,0 (ROSSI *et al.*, 2011).

(VI) Congelamento: o lodo reativado foi congelado em freezer à $-20^{\circ}C$ por 24 horas. Após esse processo o lodo foi submetido ao descongelamento natural até atingir a temperatura de ambiente ($25^{\circ}C$) e reativado em meio PYG com pH 5,5 e 7,0 (ROSSI *et al.*, 2011).

Após a realização dos seis pré-tratamentos, alíquotas de inóculo pré-tratado foram reativadas em reatores com meio PYG, com valor de pH ajustado em 5,5 e

7,0, conforme descrito anteriormente, os reatores foram mantidos a 37°C em estufa por 72 horas.

Após este período, novas reativações foram realizadas seguindo o mesmo procedimento, em duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (100 mL) contendo 50 mL de meio de cultivo PYG (10 g L⁻¹), pH inicial 5,5 e 7,0, mantidos à 37°C por 168 horas. Posteriormente, o biogás gerado foi analisado por cromatografia gasosa no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Universidade de São Paulo, unidade São Carlos. Essa análise foi de vital importância para o restante da pesquisa, uma vez que o lodo pré-tratado com melhor rendimento na produção de gás hidrogênio seria escolhido para ser o inóculo fonte para os ensaios com resíduos citrícolas reais

4.10 Reativação e crescimento de biomassa

Nesse sentido, o inóculo que foi submetido ao pré-tratamento com melhor produção de H₂ foi adotado para as próximas fases dessa pesquisa. O inoculo foi enriquecido em meio de cultivo PYG com valor de pH inicial igual a 7,0. A seguir foi realizado o enriquecimento celular, por diluições seriadas de 10⁻¹ à 10⁻⁵.

Escolheu-se para os ensaios de crescimento de biomassa o reator de diluição 10⁻⁴ por ter apresentado um bom crescimento, fornecendo uma boa quantidade inicial de inóculo. O inóculo foi então, ressuspendido e inoculado em triplicatas de reatores (1 L) contendo 500 mL de meio reacional PYG modificado contendo frutose como substrato (10 g L⁻¹), sob pH 5,5 e *headspace* preenchido com N₂ sob fluxo constate durante 20 minutos. Os reatores foram mantidos a 37°C por 168 horas. Como o objetivo era o aumento da biomassa bacteriana, após o período de incubação, os inóculos dos reatores foram ressuspendidos e novamente reativados, agora, em 2 reatores contendo 1 L de meio reacional PYG com frutose como substrato (10 g L⁻¹). O mesmo processo foi realizado durante 30 dias.

4.11 Reatores Anaeróbios em Batelada Produtores de H₂

Reatores anaeróbios em batelada (2 L) continham 1 L de meio reacional e 1 L de *headspace*. O meio reacional foi selecionado a partir de teste preliminar com o resíduo citrícola (água residuária - AR, diluída a 2 g L⁻¹) adicionada sob 4 condições sem autoclavar o substrato (Quadro 4.11-1).

Quadro 4.11-1. Condições de preparo do teste para meio diluente

Condição		Reator	Substrato	Diluyente
A	Estático	Batelada ($V_{total} = 2L$) com 1 L de meio reacional	AR	Meio PYG
B	Estático		AR	H ₂ O
C	Estático		AR	H ₂ O + Vitamina B ₁₂
D	Estático		AR	Meio Del Nery (1987)

Fonte: Elaborado pelo autor

O meio del Nery foi preparado como descrito ($mg L^{-1}$): Solução A - NiSO₄.6H₂O (0,50); FeSO₄.7H₂O (2,50); FeCl₃.6H₂O (0,25); CoCl₂.2H₂O (0,04); Solução B - CaCl₂.6H₂O (2,06); Solução C - SeO₂ (0,14); Solução D - KH₂PO₄ (5,36); K₂HPO₄ (1,30); Na₂HPO₄.H₂O (2,76). A montagem do reator anaeróbico contendo esse meio de cultivo (Quadro 4.10-2) se dá como a seguir: peptona 1000 $mg L^{-1}$, ureia 40 $mg L^{-1}$ e soluções ($ml L^{-1}$): A - 2,0; B - 2,0; C - 2,0; D - 2,0; soluções de vitaminas, em mL: (1) 2,0; (2) 2,0 e N₂ adicionado ao *headspace*. O valor de pH foi ajustado para 5,5.

O valor de pH foi ajustado para 5,5 para todos os ensaios em batelada produtores de H₂ com o objetivo de manter inativo microrganismos como as arqueias metanogênicas, as quais poderiam dar seguimento a cadeia metanogênica e que poderiam ter resistido ao pré-tratamento imposto. Portanto, a imposição de um valor de pH igual a 5,5 atuou como uma margem de segurança para que esses microrganismos permanecessem inativos caso estivessem presentes no consórcio bacteriano produtor de gás hidrogênio.

A partir dos resultados obtidos no teste citados anteriormente (a, b, c e d), a condição que apresentou melhor produção de H₂ foi escolhida para ser utilizada nos reatores produtores de gás hidrogênio com resíduos citrícolos.

A seguir, triplicatas de reatores anaeróbicos em batelada (2 L) foram preparadas com 10% (v/v) de inóculo, 1 L de meio reacional, sendo mantidos por 20 minutos sob fluxo contínuo de N₂, a fim de promover a troca gasosa e a manutenção de anaerobiose. Os reatores foram fechados com tampa de borracha e tampa de rosca com abertura central. Silicone acético foi adicionado para que uma película de vedação extra fosse formada, evitando o vazamento do biogás. O valor de pH inicial

foi ajustado para 5,5, utilizando soluções de NaOH 4M e HCl 4M. Os reatores foram mantidos a 37°C e monitorados até que fosse observada ausência de produção de gás hidrogênio.

A princípio, 10 ensaios foram propostos com os resíduos citrícolas (água residuária- AR; e vinhaça – VIN). Em decorrência do esgotamento da água residuária, alguns ensaios não puderam ser realizados. O resíduo efluente bruto (EB) foi adicionado a pesquisa e foram realizados mais quatro ensaios com esse resíduo, uma vez que suas características se assemelhavam a água residuária. Portanto, mais quatro ensaios foram planejados (Quadro 4.11-3).

Tabela 4.11-1. Reatores em batelada produtores de H₂

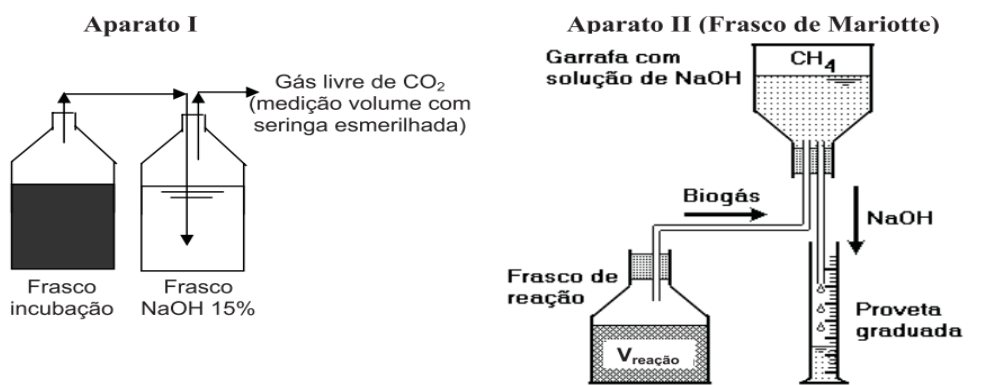
Ensaio	Reator	Substrato	Concentração (g DQO L ⁻¹)
1'		AR	2
2		AR	4
6	Batelada (V _{total} =2 L) com 1 L de meio reacional; pH 5,5; 37°C; atmosfera de N ₂ ; sob cultivo estático	VIN	12
7		VIN	36
8		VIN	54
9		VIN	69
10		VIN	77
11		EB	2
12		EB	4
13		EB	8
14		EB	10

Fonte: Elaborado pelo autor

4.12 Análise da Geração de H₂

A produção de gás hidrogênio foi analisada por meio do método de deslocamento de volume adaptado de Aquino *et al.* (2007). Os autores apresentam duas preparações do aparato experimental (Figura 4.12-1).

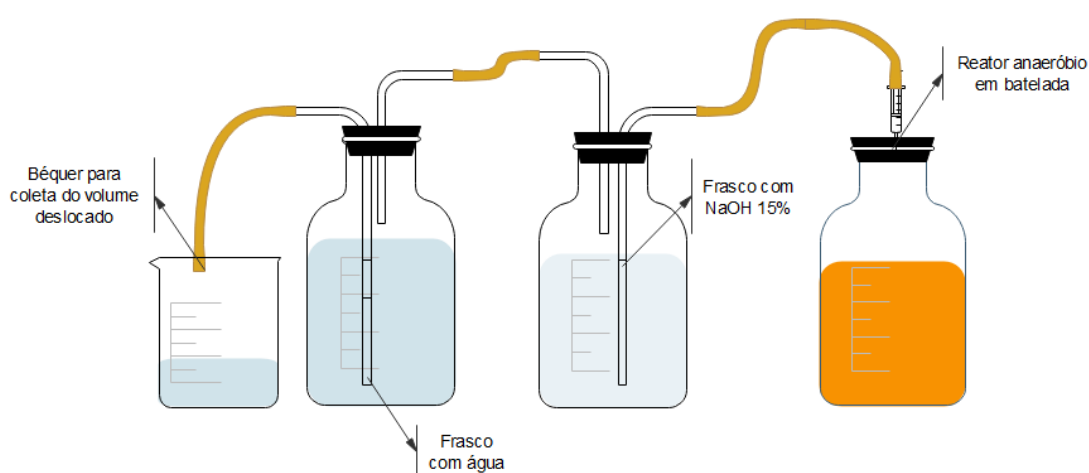
Figura 4.12-1. Aparatos apresentados por Aquino *et al.* (2007)



FONTE: AQUINO *et al.* (2007)

O presente trabalho testou três construções experimentais para o sistema de deslocamento de volume, os dois apresentados por Aquino *et al.* (2007) e um terceiro em que a ligação entre o reator e o sistema é feito por uma agulha (Figura 4.12-2), o que facilita a manutenção e estocagem do reator sob temperatura controlada e não em banho aquecido, podendo ser retirado somente no momento da medida de deslocamento de volume. O terceiro sistema tinha todas as suas junções vedadas com silicone para evitar o vazamento do gás. O sistema escolhido foi o que possibilitou melhores resultados na obtenção dos dados (Figura 4.12-2).

Figura 4.12-2. Sistema de deslocamento de volume



Fonte: Elaborado pelo autor

O princípio do método por deslocamento de volume está descrito a seguir. O gás gerado no *headspace* do reator passa pelo condutor até ser borbulhado em uma

solução 15% de NaOH, na qual o CO₂ presente no biogás gerado reage e forma HCO₃⁻ e CO₃⁻, não interferindo no volume final deslocado. O gás hidrogênio gerado, o qual não reage com a solução, é transferido para um frasco contendo água, que é deslocada e coletada em um béquer, devido ao aumento da pressão dentro do recipiente. O volume de água deslocada refere-se ao volume de gás hidrogênio gerado no reator. A produção de H₂ é convertida em mmol de H₂ por meio da equação geral dos gases (Equação 3).

$$P.V = n. R.T \quad (3)$$

Na qual P é a pressão (atm); V é o volume deslocado (L); n é o número de mols gerado; R é a constante universal dos gases (0,082 atm L / mol⁻¹ K⁻¹), e T é a temperatura (K). Dividindo o valor de mmol gerado por 1000 mL temos a produção em mmol H₂ L⁻¹.

Devido a todas as rotas metabólicas ocorrendo praticamente em conjunto no processo fermentativo, se torna muito difícil conseguir calcular um rendimento para a produção de H₂. Portanto, na presente pesquisa preferiu-se adotar o valor de produção em mmol H₂ L⁻¹. Muitos autores apresentam suas produções de diferentes formas o que dificulta a comparação entre os trabalhos e pesquisas.

4.13 Ajuste dos Dados Experimentais

Com os dados de produção de H₂ em mmol H₂ L⁻¹, é possível calcular por meio do ajuste dos valores médios obtidos das triplicatas dos reatores em batelada, utilizando o software Statistica[®], a taxa máxima de produção de hidrogênio, o valor máximo de produção estimado e o tempo estimado da fase *lag*. Tais parâmetros são obtidos pelo ajuste sigmoidal não linear da função de Gompertz modificado (LAY, J.Y.; LI, Y.Y.; NOIKE, 1998). Apoiado em Torquato *et al.*, (2017b) que aponta a confiabilidade de tal modelo (Equação 4) em reatores operados com resíduos citrícolas.

$$H = P. \exp. \{-\exp. [(Rm. e) / P(\lambda - t) + 1]\} \quad (4)$$

Em que P é o potencial de produção de hidrogênio (mmol L^{-1} cultura), R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$), λ é a fase lag (h) de geração de H_2 e e vale 2,718281828.

4.14 Análise de Ácidos Graxos Voláteis e Álcoois

A análise dos subprodutos provenientes do processo fermentativo dos reatores, como ácidos graxos voláteis e álcoois, foi realizada de acordo como método de referência apresentado por NESPECA *et al.* (2017). A determinação de tais compostos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama. A biomassa foi previamente removida das amostras por centrifugação ($12,8 \times g$, -4°C) e o sobrenadante foi reservado a -20°C . As amostras descongeladas a temperatura ambiente até total fusão do sobrenadante, no dia da análise. Foi transferido uma alíquota de 2 mL de amostra para *vial* de 22 mL com adição de 1 g de NaCl, para promover o efeito *salting-out*. Esse processo foi efetuado para todas as amostras. A concentração dos compostos (acetona, metanol, etanol, 1,3-propanodiol, butanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido capróico e ácido isocapróico) foi medida por CG (Shimadzu, modelo 2010), equipado com amostrador de *headspace* (AOC-5000 Plus), injetor *split/splitless*, detector de indução por chama e uma coluna capilar de sílica fundida 30 m x 0,32 mm x 3,0 m (Restek, RTX-1). As amostras foram aquecidas até 100°C e agitadas por 15 min. Pelo amostrador antes da injeção. Ambos, injetor e detector, permaneceram a 250°C . Gás hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ($51,6 \text{ cm s}^{-1}$). A temperatura do forno foi programada inicialmente a 45°C por 1 min seguida de uma rampa de aquecimento de $50^\circ\text{C min}^{-1}$ até a temperatura final de 250°C , mantida por 3 min. Os compostos foram quantificados por método de calibração externo.

4.15 Análises Microbiológicas

4.15.1 Microscopia

Foram realizadas análises da morfologia dos consórcios de bactérias anaeróbias presentes nos reatores por microscopia óptica de luz comum e técnica de coloração de Gram (MADIGAN *et al.*, 2016).

4.15.2 Diversidade Bacteriana

Foram realizadas análises de Biologia Molecular para as amostras retiradas dos reatores dos ensaios 9 e 14, alimentados com vinhaça citrícola (69 g DQO L⁻¹) e efluente bruto citrícola (10 g DQO L⁻¹), respectivamente.

4.15.2.1 Extração de DNA

O processo de extração do DNA foi realizado com fenol clorofórmio de acordo com metodologia de Griffiths; Whiteley; O'Donnell (2000) modificada usando fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v). Após o processo de extração a amostra foi seca em temperatura ambiente por 24 h em capela e posteriormente armazenada a -20°C.

Em seguida realizou-se a PCR (reação em cadeia da polimerase) para o prosseguimento das análises de identificação em larga escala e análises de bioinformática. Anteriormente ao envio das amostras foram realizados testes de verificação da integridade no qual a concentração do DNA (2µL do *High DNA Mass Ladder Invitrogen*) foi corrido em eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando 5 µL do produto da PCR homogeneizado com 1 µL de loading buffer 6x. As condições de corrida da eletroforese foram as seguintes: 75 V (6 V/cm) constante por 30 minutos. Após a corrida o gel foi transferido para câmara de trans-iluminador UV (*Stratagene – Eagle Eye II*) para observação das imagens das bandas do gel. A qualidade do DNA também foi verificada pela proporção de 260/280 nm > 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE).

4.15.2.2 Bioinformática

As amostras de DNA extraído foram enviados para o GENONE® (Rio de Janeiro-RJ, Brasil) para que o processo de identificação e bioinformática fosse realizado, utilizando a plataforma NGS Illumina MiSeq (SI *et al.*, 2015).

A amplificação por PCR do DNA enviado se deu por meio da utilização do primer 515F (5'-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), para amplificar as regiões V4 do gene 16S RNA ribossômico por meio do GeneAmp PCR System (ABI *company*, USA). As amostras contendo entre 400-450 pares de base (de acordo com o gel de agarose) foram

escolhidas para as etapas seguintes. Tais amostras foram então misturadas e purificadas com o Kit de extração em gel Qiagen (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas geradas com o Kit NEBNext®Ultra™DNA e quantificadas via Qubit e Q-PCR, foram analisadas pela plataforma Illumina Miseq.

As sequências tiveram os primers e *barcodes* retirados e foram cortadas. A mescla de tais sequências foi realizada por meio da ferramenta FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>), uma ferramenta muito rápida e precisa, que foi projetada para mesclar as leituras de final-emparelhado, quando pelo menos algumas das leituras sobrepõe-se à leitura gerada na extremidade oposta do mesmo fragmento do DNA, e as sequências de processamento foram denominadas *tags* brutas. O refinamento de tais *tags* foi realizada sob condições específicas para resultar em *tags* limpas de alta qualidade de acordo com processo de qualidade Qiime® (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html). As *tags* foram comparadas um banco de dado referência Gold Database (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html), utilizando o algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) para detecção de quimeras (http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera_formation.html). Após esse processo as sequências caracterizadas como quimeras foram removidas e as *tags* efetivas foram obtidas.

A análise das sequências foram realizadas pelo software Uparse® (Uparse v7.0.1001 <http://drive5.com/uparse/>) utilizando todas as *tags* efetivas. Sequências com similaridade $\geq 97\%$ foram agrupadas na mesma OTU (do inglês, Operational Taxonomic Unit). A sequências representativas para cada OTU foram lidas por meio do software Mothur® apoiado na base de dados SSUrRNA do banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) para anotação das espécies para eixo taxonômico (Threshold:0.8~1) (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie). Para obter a relação filogenética entre todas as sequências representativas das OTUs, a ferramenta MUSCLE® (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) foi utilizada para comparar as múltiplas sequências rapidamente. A abundância de informações sobre as OTUs foram normalizadas usando um número de sequências padrão correspondente a amostra com as menores sequências. Um diagrama de Venn e um *GraphPlan* também foram elaborados.

“Em sua loucura, quis incendiar o mundo, mas esqueceu que as cinzas voltam à face de quem as soprou.”

Hugo Canuto

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reativação pré-tratamento de inóculo

Na Tabela 5.1-1 pode-se observar que somente houve produção de gás hidrogênio nos pré-tratamentos: térmico (I), ácido (IV) e alcalino (V) (Tabela 5.1-1).

Tabela 5.1-1. Análise do biogás gerado após os pré-tratamentos impostos

Pré-Tratamentos	Reativação em diferentes valores de pH	Média de Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
(I) Térmico	5,5	----
	7,0	0,67±0,12
(II) Diluição Serial (24 h)	5,5	----
	7,0	----
(II') Diluição Serial (2 min)	5,5	----
	7,0	----
(III) Secagem	5,5	----
	7,0	----
(IV) Ácido	5,5	----
	7,0	10,83±4,3
(V) Alcalino	5,5	----
	7,0	2,90±0,14
(VI) Congelamento	5,5	----
	7,0	----

Fonte: Elaborado pelo autor

Nos pré-tratamentos (II) Diluição Serial, (III) Secagem e (VI) Congelamento não houve a produção de gás hidrogênio, assim como não houve a produção de gás metano. Portanto, a inativação de microrganismos metanogênicos foi eficiente, entretanto, houve também a inativação de comunidades bacterianas produtoras de H₂.

Alguns parâmetros podem ser apontados como cruciais para uma efetiva seleção de microrganismos. No tratamento térmico, dois parâmetros são cruciais, a temperatura a qual o lodo é submetido e o período de tempo imposto para essa

condição (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). Segundo os autores, baixas temperaturas ou períodos de exposição muito curtos, podem não garantir uma efetiva inativação dos microrganismos consumidores de H₂. Entretanto, os autores também alertam que temperaturas e tempos de exposição muito elevados, podem fazer com que até os microrganismos geradores de gás hidrogênio sejam inativados, resultando em baixo rendimento ou em casos extremos, nenhum rendimento na produção do biogás. Quando se comparou o pré-tratamento (I) térmico e (IV) ácido, percebeu-se uma discrepância elevada no valor de rendimento, o qual foi respectivamente, 0,67 e 10,83 mmol H₂ L⁻¹. Mesmo assim, tais pré-tratamentos são amplamente utilizados (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2018). Microrganismos hidrogenotróficos e não-formadores de esporos não resistem às condições extremas impostas por valores de pH muito ácidos e/ou muito alcalinos, resultando assim, na inativação de tais microrganismos. Por outro lado, microrganismos como *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp., são resistentes a tais condições e selecionados por este tipo de tratamento (WONG; WU; JUAN, 2014).

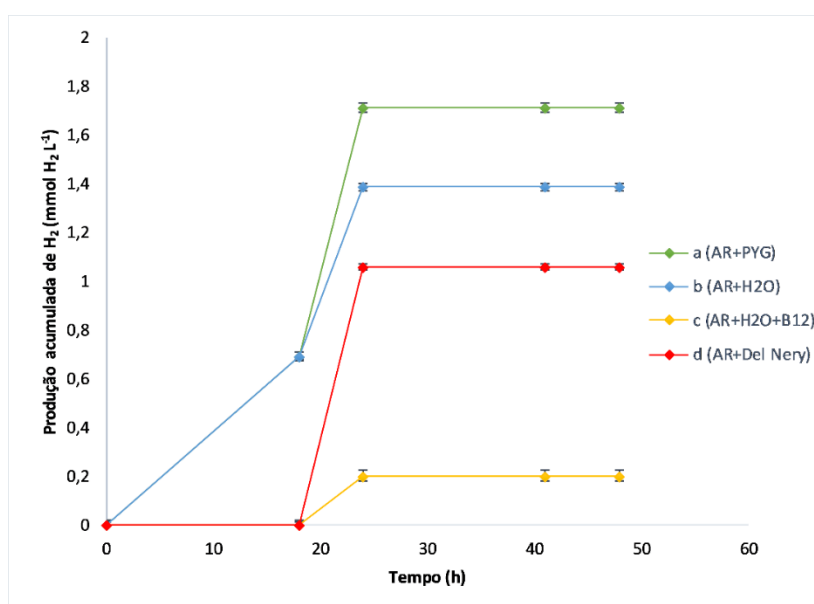
Com relação aos pré-tratamentos, os quais não foram observadas produções de H₂ e de metano, concluiu-se que foram extremamente intensos para o lodo testado. O processo de secagem (SIQUEIRA; REGINATTO, 2015), se mostrou eficiente na inativação de microrganismos produtores de metano, porém, como apontado por Rafieenia; Lavagnolo; Pivato (2018), parâmetros como temperatura e tempo de exposição podem ser cruciais, ressaltando a tênue linha existente entre a inativação parcial ou total da cultura mista em questão. Liu *et al.* (2009) reportou uma diminuição de 15% no rendimento na produção de H₂ após o pré-tratamento por congelamento e descongelamento. Os autores submeteram o inóculo ao congelamento a -25°C por 24 horas seguido de 5 horas de descongelamento até 25°C. Hu; Chen (2007) apontaram que alguns pré-tratamentos podem prejudicar as bactérias produtoras de gás hidrogênio enquanto favorece as consumidoras, como observado por Dong *et al.* (2010). Os autores, após um pré-tratamento por congelamento e descongelamento, observaram a presença de propionato como subproduto da fermentação, deixando indícios de que microrganismos consumidores ainda estavam presentes no inóculo utilizado para geração de H₂. No pré-tratamento por diluições seriais, acredita-se que tenha ocorrido o favorecimento de microrganismos não produtores de H₂, assim como os que produzem metano, uma vez que foi observada a ausência de ambos os gases.

5.2 Testes de montagem de ensaios produtores de H₂

Partindo do princípio de que várias concentrações foram propostas no projeto, os resíduos citrícolas necessitavam de diluição. Para tais diluições seria necessária uma solução (meio nutricional ou não) para que se atingisse a concentração desejada.

A condição na qual houve maior produção de biogás foi a condição a) AR + meio PYG, tendo como segunda melhor condição a condição b) AR + água destilada (Figura 5.2-1). Sendo assim, a condição a) foi escolhida para ser utilizada nos ensaios com os reatores produtores de gás hidrogênio com resíduos citrícolas.

Tabela 5.2-1. Produção de H₂ em reatores anaeróbios em batelada sob condições-teste a, b, c e d durante 48 horas



Fonte: Elaborado pelo autor

Outros três testes foram realizados para obter a melhor estruturação experimental dos ensaios de produção de H₂ por deslocamento de volume. Os reatores A e B foram testados conforme modelos apresentados por Aquino *et al.* (2007) (Figura 4.12-1) e se mostraram ineficientes em nossa realidade, uma vez que os banhos presentes no laboratório não mantinham o reator na temperatura de 37°C pelo tempo desejado, apresentando uma irregularidade muito grande nas medições de temperatura, e conseqüentemente, na manutenção do processo fermentativo. Como resultado, nenhum volume de água proveniente da produção biogás foi

observado. O reator C foi mantido fechado em estufa a 37°C. Medidas de deslocamento de volume em intervalos controlados foram realizadas. Produção de biogás foi observada e o volume coletado. Como a terceira estrutura possuía várias junções (Figura 4.12-2), era passível de vazamento de biogás. Portanto, silicone acético foi aplicado em todas as junções entre as canaletas de vidro e as mangueiras de borracha. A análise de vazamento era feita diariamente por meio da aplicação de espuma em suas junções. Uma vez localizado o vazamento, nova vedação era providenciada e novo teste de vazamento feito. Uma vez que o terceiro teste apresentou resultados satisfatórios de produção e nenhum vazamento de biogás, esse foi escolhido como o modelo a ser utilizado para o sistema de deslocamento de volume durante o restante da pesquisa.

5.3 Reatores Anaeróbios em Batelada Produtores de H₂

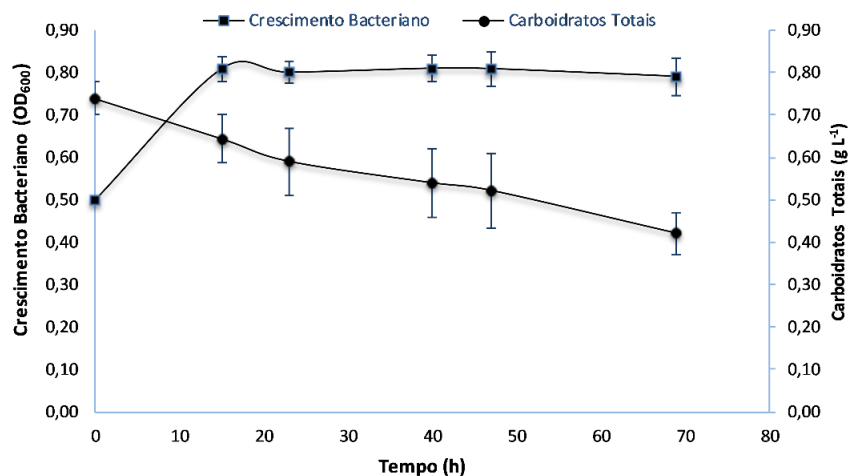
O ensaio 1 (2,0 g DQO L⁻¹ AR +PYG) foi mantido em estufa por 69 horas e observou-se um crescimento máximo após 15 horas, não havendo variação após esse período (Figura 5.3-1). Todos os ensaios em reatores em batelada produtores de H₂ foram feitos em triplicatas, ou seja, três reatores para cada ensaio foram preparados (R1, R2, R3).

Segundo o mesmo comportamento, a produção acumulada de H₂, ajustada pela equação de Gompertz modificada, cessou após 20 horas. Segundo os parâmetros estimados pelo ajuste sigmoidal, após 11,6 horas, foi iniciada a produção de H₂ com 0,8 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ e produção máxima estimada de 2,5 mmol H₂ L⁻¹. A linha presente na Figura 5.4-1, demonstra um possível comportamento do que ocorreu dentro do reator. Após 20 horas de incubação, o crescimento bacteriano se estabilizou. No entanto, o consumo de carboidratos continuou até atingir o valor máximo de 56% de consumo em 69 horas a 37°C.

De acordo com os resultados obtidos, foi concluído que o ensaio ocorreu muito rapidamente, com ausência de algumas coletas de dados que seriam de vital importância para se avaliar o comportamento do reator. Portanto, o meio PYG, que é considerado um meio rico por favorecer fortemente o crescimento bacteriano, foi descartado como meio diluente dos resíduos citrícolas, pois promoveu o crescimento com uma taxa acelerada e não possibilitou o acompanhamento do ensaio. Salienta-

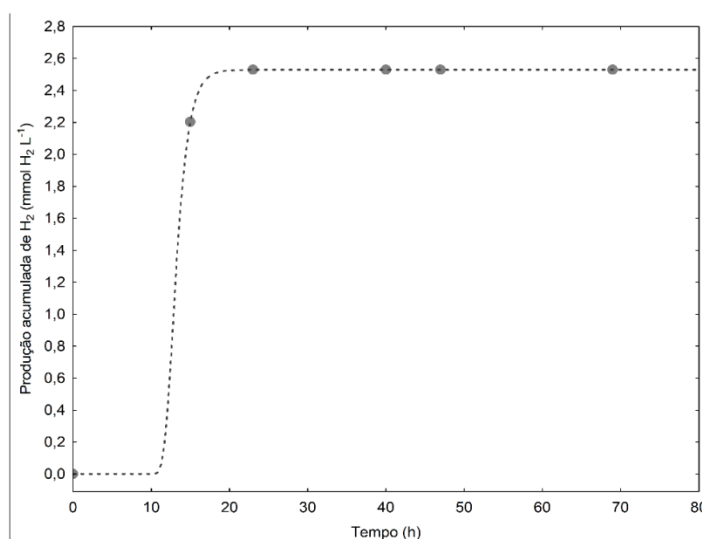
se, o baixo consumo de carboidratos em meio que favorece o crescimento bacteriano.

Figura 5.3-1. Crescimento bacteriano e carboidratos totais do ensaio 1 (2,0 g DQO L⁻¹ AR +PYG)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-2. Produção acumulada de H₂ ajustada na função Gompertz modificada



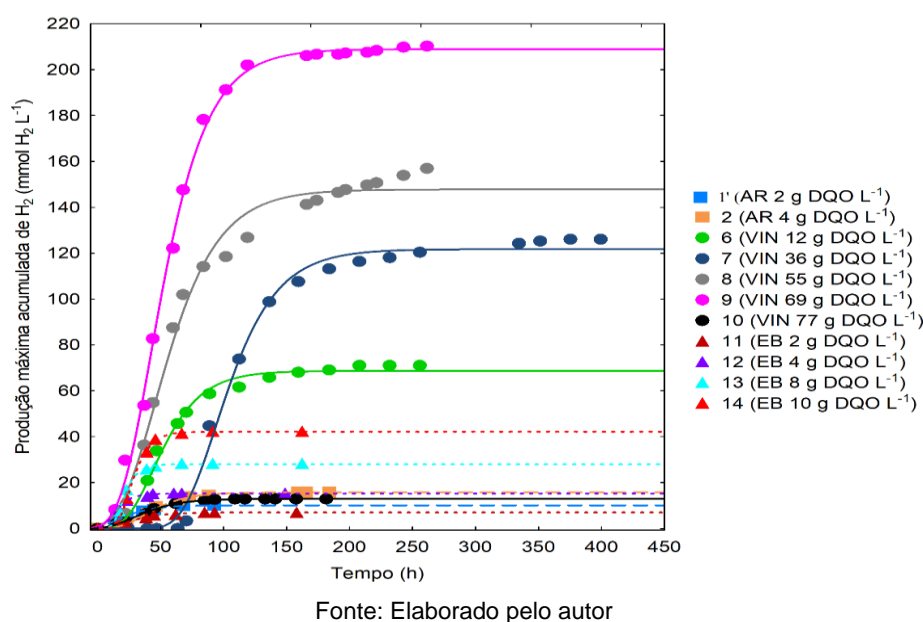
Fonte: Elaborado pelo autor

Novo ensaio foi proposto com as mesmas condições de pH, temperatura e concentração de DQO, mudando apenas o meio diluente para H₂O, visando aplicabilidade econômica sem a adição de reagentes e vitaminas. Esse ensaio foi denominado Ensaio 1'. Cabe salientar que na presente pesquisa não houve um reator controle utilizando somente o inóculo. Como os resíduos apresentavam materiais dispersos não houve como medir o crescimento do consórcio bacteriano nos ensaios por espectrofotometria. Dessa forma, como o objetivo era utilizar o

resíduo praticamente bruto, esses materiais dispersos foram mantidos, tornando impossível a análise de crescimento celular por turbidimetria durante os ensaios. Análise de massa seca poderia ter sido feita, entretanto, não pôde ser realizada.

Nos demais ensaios, de acordo com o apresentado na Figura 4.10-3, tendo água como meio diluente, foram verificados melhores resultados na produção de gás hidrogênio (Figura 5.4-4) e o acompanhamento pôde ser feito.

Figura 5.3-3. Produção acumulada de H₂ ajustada pelo método sigmoidal de Gompertz modificado



Dentre os ensaios operados com água residuária (AR), ensaios 1' e 2, a maior produção de H₂ foi obtida no ensaio 2, o qual continha uma concentração teórica de 4 g DQO L⁻¹. A produção máxima acumulada foi de 15,88 mmol H₂ L⁻¹, enquanto no ensaio 1' a produção máxima se estabilizou em 10,21 mmol H₂ L⁻¹. Nesses reatores foi observado uma relação diretamente proporcional e crescente entre a concentração de DQO e a produção acumulada de gás hidrogênio. O mesmo comportamento, diretamente proporcional, se deu nos ensaios alimentados com vinhaça e nos ensaios alimentados com efluente bruto. Este fato se deve ao aumento na concentração de carboidratos presentes nos reatores como fonte de carbono para a fermentação.

Os ensaios 6, 7, 8 e 9, alimentados com vinhaça, tinham concentrações de 12,0; 36,0; 54,0 e 69,0 g DQO VIN L⁻¹, respectivamente. A maior produção acumulada foi observada no ensaio 9 e foi de 210,19 mmol H₂ L⁻¹, enquanto nos ensaios 8, 7 e 6 a produção máxima foi de 156,90; 126,05; e 71,06 mmol H₂ L⁻¹.

Muito mais acentuado do que nos ensaios com AR, a produção do ensaio 7 foi praticamente o dobro do obtido no ensaio 6 (Figura 5.4-4), quando se dobrou a concentração de DQO e, conseqüentemente, aumentou-se a concentração de carboidratos totais. A partir do ensaio 8 tal relação não foi observada, mesmo com o aumento na concentração. Entretanto, a produção máxima observada no ensaio 9 foi praticamente o triplo da produção acumulada de H₂ para o ensaio 6 (Figura 5.4-4). O ensaio 10 não apresentou o mesmo comportamento que os ensaios anteriores e sua produção máxima acumulada estabilizou em 12,83 mmol H₂ L⁻¹. Pode-se inferir que, rotas metabólicas foram favorecidas e/ou um limite tanto de DQO quanto de compostos, como ácidos graxos voláteis (Quadro 4.3-2), presentes no resíduo, foram críticos, tornando assim, o meio tóxico aos microrganismos produtores de H₂. Na análise dos ácidos graxos voláteis e álcoois foi observada produção de metanol durante o ensaio 10. Por sua característica tóxica, este composto pode ter sido crítico, causando assim, menor rendimento e produção de H₂. Os ensaios alimentados com efluente bruto (EB) se mostraram muito similares aos com água residuária obtendo 7,0; 15,3; 28,3; e 46,3 mmol H₂ L⁻¹, para os ensaios 11, 12, 13 e 14, alimentados com, respectivamente, 2,0; 4,0; 8,0 e; e 10,0 g DQO L⁻¹. Este fato pode ser atribuído às suas características físico-químicas, uma vez que este resíduo se mostrava muito similar a água residuária coletada em Matão. Apesar de terem sido coletados em localidades distintas, apresentavam muitas similaridades.

Montoya-Pérez; Durán-Herrera (2017) avaliaram a produção de H₂ utilizando um biorreator em batelada com agitação (5 L) alimentado com coração de abacaxi (5 g glicose L⁻¹) com proporção de lodo de 50% (v/v), proveniente de reator UASB de uma planta de tratamento de águas residuárias de uma indústria de alimentos da Costa Rica. O reator foi operado com 21,0 g DQO L⁻¹, por 30 horas sob pH inicial 5,5 e mantido a 37°C. Os autores obtiveram uma produção máxima de 41,2 mmol H₂ L⁻¹, valores inferiores ao resultado apresentado no presente trabalho para os reatores alimentados com vinhaça (71,1 mmol H₂ L⁻¹ e 126,1 mmol H₂ L⁻¹) para os ensaios 6 (12,0 g DQO VIN L⁻¹) e 7 (36,0 g DQO VIN L⁻¹), respectivamente, em concentrações de matéria orgânica bem similares às apresentadas pelos autores. Outro ponto pertinente, é que o valor obtido pelos autores é cinco vezes inferior ao observado no ensaio de maior produção deste trabalho, o ensaio 9 (210,2 mmol H₂ L⁻¹) alimentado com vinhaça e com concentração, em DQO, três vezes maior (69,0 g DQO VIN L⁻¹). Cabe salientar também que no ensaio 14 (10,0 g DQO L⁻¹), alimentado com efluente

bruto, foi observada uma produção similar ($46,3 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) com concentração 50% inferior ao experimento dos autores apresentados.

Rafieenia; Pivato; Lavagnolo, (2018) operaram reatores em batelada (500 mL) com 5,0 g de sólidos voláteis por litro de resíduos de alimentos, inoculados com lodo granular proveniente de reator UASB tratando resíduos de cervejaria, previamente tratado. Os reatores foram mantidos em pH 5,5 e a 37°C . Os autores obtiveram produção máxima acumulada de gás hidrogênio para o inóculo pré-tratado com óleo de fritura (solução saponificada de óleo de fritura), o qual apresentou $15,5 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$, seguido pelo reator com inóculo pré-tratado a quente (90°C por 30 minutos) com $10,97 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Os ensaios realizados com AR neste trabalho apresentaram produções máximas superiores (Ensaio 2 - $15,8 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e semelhantes (Ensaio 1' - $10,2 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) aos apresentados pelos autores. Os ensaios 12, 13 e 14, alimentados com EB, também foram similares (Ensaio 12- $15,3 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e superiores (Ensaio 13 - $28,3 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$; Ensaio 14 - $46,3 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$). Se compararmos com os ensaios alimentados com VIN, esses resultados ficam ainda mais discrepantes, substanciando o potencial da utilização dos resíduos citrícolas em reatores produtores de H_2 .

Mahmod; Jahim; Abdul (2017) operaram reatores alimentados com efluentes de óleo de palma. O óleo bruto foi hidrolisado com ácido fosfórico e ácido nítrico. O inóculo utilizado foi um lodo digerido de um reator em batelada termofílico tratando efluente de óleo de palma. Reatores com 80 mL de volume reacional foram mantidos com pH inicial 5,8 e nitrogênio fluxionado, a fim de manter a anaerobiose, e a 60°C sob agitação de 150 rpm por 72 horas. Os valores máximos na produção acumulada H_2 obtidos pelos autores foram encontrados nos reatores alimentados com óleo de palma tratado com ácido fosfórico ($22,0 \text{ g L}^{-1}$ - $1,12 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e com ácido nítrico ($24,15 \text{ g L}^{-1}$ - $1,21 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$). Tais resultados foram inferiores aos obtidos no presente estudo tanto pelos ensaios alimentados com AR quanto pelos ensaios alimentados VIN. Mesmo em ensaios com concentrações menores do que os apresentados pelos autores, como o ensaio 2 ($4,0 \text{ g DQO AR L}^{-1}$) com $15,9 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ e com concentrações próximas, como o ensaio 6 ($12 \text{ g DQO VIN L}^{-1}$) com $71,1 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada, os parâmetros estimados do início da produção de H_2 (L), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), são apresentados na Tabela 5.4-1. Todos os resultados são condizentes com os dados obtidos experimentalmente. Os coeficientes de

determinação (R^2), obtidos também pelo modelo adotado representa efetivamente bem os dados obtidos experimentalmente.

Tabela 5.3-1. Parâmetros estimados pela função sigmoidal de Gompertz modificado

Ensaio	Parâmetros	R^2
Ensaio 1	P	10,08
	Rm	0,235
	L	0,0
Ensaio 2	P	15,72
	Rm	0,31
	L	18,11
Ensaio 6	P	68,69
	Rm	1,18
	L	22,42
Ensaio 7	P	121,75
	Rm	1,67
	L	67,30
Ensaio 8	P	147,77
	Rm	1,95
	L	17,74
Ensaio 9	P	208,92
	Rm	3,10
	L	17,75
Ensaio 10	P	12,94
	Rm	0,24
	L	8,89
Ensaio 11	P	6,99
	Rm	0,16
	L	6,16
Ensaio 12	P	15,12
	Rm	0,73
	L	4,15
Ensaio 13	P	27,99
	Rm	1,49
	L	11,77
Ensaio 14	P	42,17
	Rm	1,70
	L	15,75

P=produção máxima ($\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$), Rm= taxa de produção ($\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e L= fase lag (h)

Fonte: Elaborado pelo autor

Dentre os ensaios apresentados neste trabalho, percebe-se uma relação diretamente proporcional entre o Rm, a taxa de produção por hora, e a produção máxima, P. Quanto maior a produção máxima estimada pelo modelo de Gompertz,

maior a taxa de produção de H₂ por hora. Quanto à fase de início da geração de H₂, este comportamento não é observado devido a condições experimentais. Por exemplo, do ensaio 2 para o ensaio 6, foi utilizado o mesmo inóculo, ou seja, os microrganismos já estariam ambientados com a produção de gás hidrogênio tendo água residuária como substrato. Esse processo se deu para todos os ensaios. O inóculo inicial foi ressuspendido e inoculado no ensaio seguinte, sem tempo de reativação. Entretanto, quando o substrato passou a ser a vinhaça, um tempo de ambientação foi exigido pelos microrganismos para que o crescimento microbiano começasse a ocorrer e, conseqüentemente, o processo fermentativo. Não só este parâmetro, fonte de substrato, foi responsável pelos diferentes tempos estimados de início de geração, há também a concentração de substrato e de compostos presentes no resíduo. Observando a Tabela 5.3-1, notou-se que maiores fases de tempo de início da geração de H₂ foram verificadas nos ensaios contendo vinhaça como substrato, ou seja, maiores concentrações de carboidratos e ácidos voláteis, como apresentado na caracterização anteriormente, favoreceram os microrganismos a se ambientarem por mais tempo para que o processo de crescimento celular e o processo fermentativo começasse de fato ocorrer.

O modelo de Gompertz é amplamente utilizado para se estimar o comportamento de crescimento bacteriano e, conseqüentemente, estima com grande eficiência o que ocorre dentro de um reator produtor de H₂.

Eker; Erkul (2018) operaram reatores alimentados com beterraba sacarina em cubos, com concentração de carboidratos totais variando de 5,0 a 60,0 g L⁻¹ e com inóculo proveniente da fase acidogênica de estação de tratamento anaeróbia de uma indústria de levedura. Os reatores em batelada foram mantidos a 37°C, sob pH inicial de 6,8 por cerca de 150 horas. Por meio do ajuste sigmoidal de Gompertz modificado, os autores obtiveram maior produção acumulada para os reatores operado com 60,0 g L⁻¹, obtendo P (78,6 mmol H₂ L⁻¹), R_m (0,93 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) e L (16,36 horas). A taxa de produção obtida pelos autores de 0,93 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ é menor, por exemplo, do que a taxa obtida no ensaio 6 de 1,18 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹. Entretanto, sua produção acumulada de 78,6 mmol H₂ L⁻¹ é maior do que a estimada no ensaio 6 (68,68 mmol H₂ L⁻¹), mostrando que, em algumas situações, menores taxas de produção de H₂ podem resultar em produções máximas significativas, fazendo com que certas relações observadas no modelo se tornem casos particulares para cada reator, não podendo ser generalizada para outras condições.

Salem *et al.* (2018) operaram reatores anaeróbios em batelada com 250 mL de meio reacional, utilizando como substratos resíduos de batata (13,3 g DQO L⁻¹) e resíduos de feijão (11,3 g DQO L⁻¹). O inóculo utilizado foi proveniente de uma estação de tratamento de resíduos, localizada na Alemanha, pré-tratado termicamente (100°C por 2 horas) para o favorecimento das bactérias produtoras de gás hidrogênio. Os reatores foram operados a 35°C e com pH inicial 5,5. Para aumentar a produção de gás hidrogênio, os autores aplicaram vários tratamentos nos resíduos (térmico, básico, ácido, ultrassom, peróxido e termo-ácido), obtendo as maiores produções acumuladas, com o ajuste sigmoidal de Gompertz modificado, no tratamento por peróxido de hidrogênio para o resíduo de batata ($P=38,79$ mmol H₂, $Rm=0,25$ mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ e $L=2$ horas) e para o resíduo de feijão ($P=19,17$ mmol H₂ L⁻¹), $Rm=0,16$ mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ e $L=2$ horas). Com os dados obtidos por esses autores, verificou-se uma relação entre a taxa estimada no reator alimentado com resíduo de batata e o reator alimentado com resíduo de feijão. Aliado a isso, concluiu também que, assim como nos dados obtidos na presente pesquisa, os autores apresentaram uma produção de H₂ maior com concentrações mais elevadas de matéria orgânica no reator. Esses dados demonstraram que alguns inóculos são capazes de suportar cargas orgânicas mais elevadas do que outros, influenciando na produção máxima de gás hidrogênio. Salienta-se ainda que o ensaio 6 (12,0 g DQO VIN L⁻¹) apresentou 71,9 mmol H₂ L⁻¹ com concentração similar às apresentadas pelos autores.

Um ponto que também pode ser observado é que em nenhum momento, com exceção do ensaio 10 (77,0 g DQO VIN L⁻¹), a concentração crescente de resíduo e carboidratos tenha se mostrado inibitória ao crescimento celular e ao processo de fermentação. Por meio do aumento da taxa de produção (Rm) e pela estimativa de produção máxima (P) podemos confirmar essa suposição. A Tabela 5.3-2, mostra a comparação da presente pesquisa com a literatura aqui apresentada.

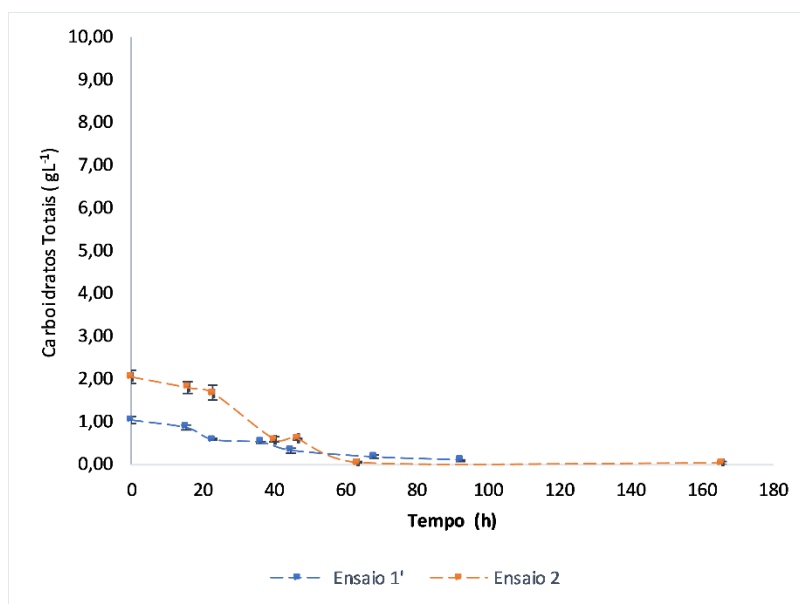
Tabela 5.3-2. Comparação dos resultados obtidos da Produção biológica de H₂ em Reatores em Batelada

Pré-tratamento do inóculo	Fonte de carbono	pH inicial	T inicial (°C)	DQO (g DQO L ⁻¹)	P (mmol H ₂ L ⁻¹)	Rendimento (mmol H ₂ g DQO ⁻¹)	Tempo (h)	Referência
Térmico (90°C, 30 min.)	Coração de abacaxi	5,5	37	21	41,2	1,96	30	MONTOYA-PÉREZ; DURÁN-HERRERA, (2017)
Térmico	Beterraba sacarina	6,8	37	60	78,6	1,31	150	EKER; ERKUL, (2018)
Térmico (100°C, 2 horas)	Resíduo de batata	5,5	35	13,3	38,79	2,91	200	SALEM <i>et al.</i> , (2018)
	Resíduo de feijão			11,3	19,17	1,70	200	
	Água			2	10,21	5,10	92,5	
	residuária			4	15,88	3,97	165,5	
	citrícola			12	71,88	5,99	256	
				36	126,05	3,50	399,5	
Ácido (pH 3, 24 horas)	Vinhaça citrícola	5,5	37	54	156,90	2,91	221,5	Presente Pesquisa
				69	210,19	3,05	221,5	
				77	12,83	0,16	181,5	
	2			7,00	3,50	158		
	Efluente Bruto			4	15,27	3,82	149	
	Citrícola			8	28,26	3,53	162,5	
	10	42,33	4,23	162,5				

FONTE: Elaborado pelo autor

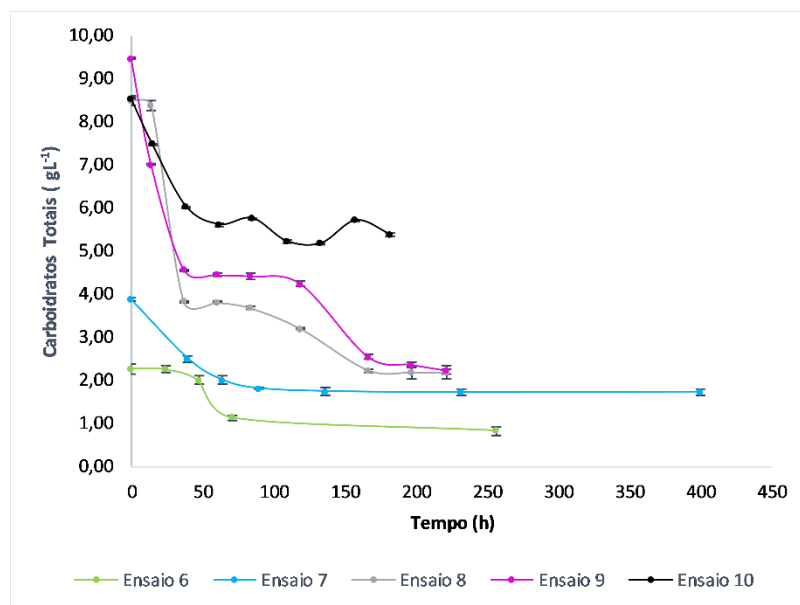
Com o aumento nas concentrações dos resíduos citrícolos propostos na pesquisa, foram observados também concentrações mais elevadas de carboidratos totais presentes nos reatores. Foram verificadas variações na concentração de carboidratos totais entre os ensaios com AR, EB e os ensaios alimentados com VIN. Os ensaios 1' e 2, alimentados com AR, tiveram praticamente todos os seus carboidratos consumidos, resultando em 94% e 99% de consumo, respectivamente. Assim como nos ensaios alimentados com EB, os quais apresentaram um consumo elevado de carboidratos obtendo 75%, 99%, 89% e 90%, para os ensaios 11, 12, 13 e 14, respectivamente. No entanto, nos ensaios 6, 7, 8, 9 e 10, alimentados com VIN, o consumo obtido foi de 36%, 44%, 74,5%, 76,6 e 37,1%, respectivamente. O consumo dos carboidratos totais pode ser visto nas Figura 5.3-4 – 5.3-6.

Figura 5.3-4. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H₂ alimentados com água residuária



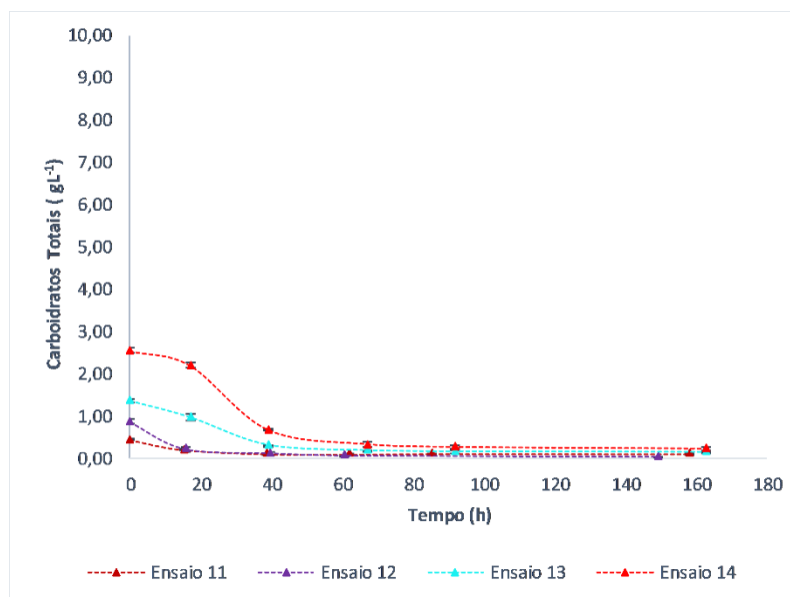
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-5. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H₂ alimentados com vinhaça citrícola



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-6. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H₂ alimentados com efluente bruto citrícola



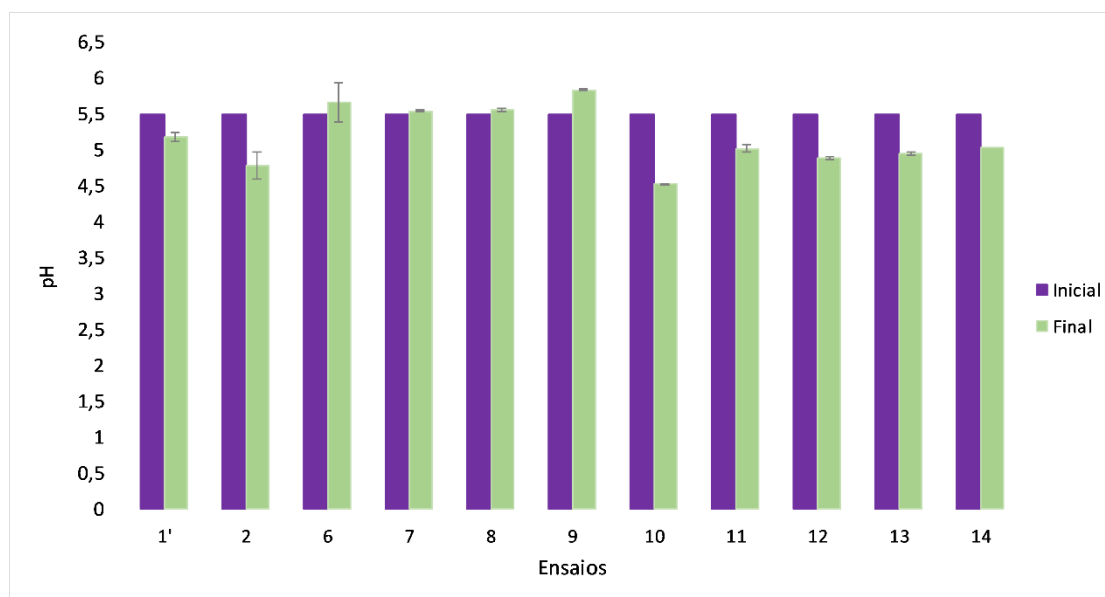
Fonte: Elaborado pelo autor

Grande parte da fonte de carbono ainda permaneceu no final dos ensaios alimentados com VIN, tomando por base a carga orgânica elevada presente no reator e a alta quantidade de materiais particulados do resíduo, os quais podem representar endocarpos e vesículas de laranja maceradas durante o processo industrial de produção de suco de laranja.

A produção de gás hidrogênio está intimamente ligada a(s) rota(s) metabólica(s) favorecidas ou não durante o período de fermentação dos reatores. Todos os reatores alimentados com AR, EB e VIN foram montados com pH inicial de 5,5, conforme descrito anteriormente e, ao final de cada ensaio, as médias dos valores de pH das triplicatas foram medidas. Novamente, dois comportamentos distintos foram observados. Nos reatores alimentados com AR e EB, ensaios 1', 2, 11, 12, 13 e 14, o pH final, em média, foi menor do que o inicial resultando em 5,18 e 4,78, 5,02, 4,88, 4,95 e 5,03, respectivamente. Ainda sobre os ensaios 1' e 2, foi possível observar uma relação entre a DQO do resíduo citrícola e o pH final. Quanto maior a concentração de matéria orgânica, menor o valor de pH final, o qual mostrou que haviam mais carboidratos disponíveis, resultando em um processo fermentativo mais acentuado e uma produção de ácidos graxos voláteis em maiores concentrações. Nos reatores alimentados com EB esse comportamento não foi notado, tendo os valores finais de pH se mantendo na faixa, independente da

concentração de carboidratos nos reatores. Nos ensaios alimentados com VIN, esse comportamento não foi observado, uma vez que o valor de pH final, em média, nos reatores subiu para 5,66; 5,55; 5,56; 5,84; para os ensaios 6, 7, 8 e 9, respectivamente. O único ensaio tendo vinhaça como substrato, o qual apresentou um decréscimo no valor de pH foi o ensaio 10 (77,0 g DQO VIN L⁻¹), apresentando um valor de 4,53, como pode ser visto na Figura 5.3-7. Portanto, concluiu-se que nos reatores alimentados com vinhaça, provavelmente, um agente tamponante favoreceu o controle do valor de pH dentro do reator, o qual, possivelmente, favoreceu a produção de gás hidrogênio. Contrariamente, esse agente tamponante não se mostrou eficiente ou não foi produzido no ensaio 10, fazendo com que reduzisse a produção de H₂ e o consumo de carboidratos. Por meio da análise de ácidos graxos voláteis e álcoois, notou-se a presença de metanol ao final do ensaio 10, o que pode ter mudado todo o comportamento do consórcio dentro do reator, tornando o meio tóxico e diminuindo a produção de H₂.

Figura 5.3-7. Valores de pH inicial e final para os ensaios de 1'-14



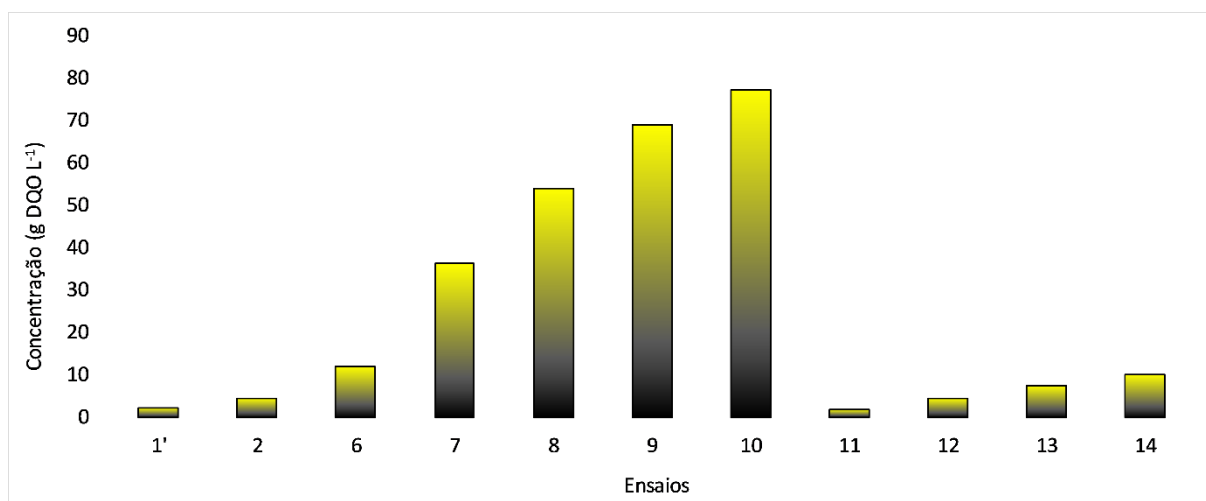
Fonte: Elaborado pelo autor

A fim de se confirmar a concentração real de DQO de resíduo inicial de cada reator, análises de DQO foram realizadas nas primeiras amostras. Os reatores alimentados com vinhaça apresentaram DQO menores do que as estipuladas teoricamente com base na caracterização obtida anteriormente (10,7; 117,6 e 14,70 g DQO para AR VIN e EB, respectivamente). Tais resultados foram diferentes dos

apresentados por Torquato *et al.* (2017). Os autores encontraram valores máximos de DQO em torno de 19,45 g e 77,70 g DQO para AR e VIN, respectivamente, para os mesmos resíduos trabalhados na presente pesquisa.

Os valores de DQO reais (Figura 5.3-8) obtidas pelas análises realizadas com as primeiras amostras retiradas dos ensaios elucidaram a concentração real dentro dos reatores. Para os ensaios alimentados com AR, a concentração ficou próxima do previsto, resultando em 2,24 g DQO L⁻¹ para o ensaio 1' e 4,38 g DQO L⁻¹ para o ensaio 2. Quanto aos reatores alimentados com VIN, o ensaio 6 teve uma concentração real de 11,71 g DQO L⁻¹, o ensaio 7 foi operado com 36,22 g DQO L⁻¹, o ensaio 8 com 54,02 g DQO L⁻¹, o ensaio 9 com 68,83 g DQO L⁻¹ e o ensaio 10 com 77,01 g DQO L⁻¹, respectivamente. Para os ensaios operados com EB foram encontrados valores de 1,9; 4,36; 7,52; e 10,07 g DQO L⁻¹, para os ensaios 11, 12, 13 e 14 respectivamente. Concentrações essas estiveram intimamente ligadas a quantidade de carboidratos totais presentes no reator e outros compostos presentes nos resíduos e, conseqüentemente à produção de H₂.

Figura 5.3-8. Concentração de DQO de resíduo citrícola presente nos ensaios



Fonte: Elaborado pelo autor

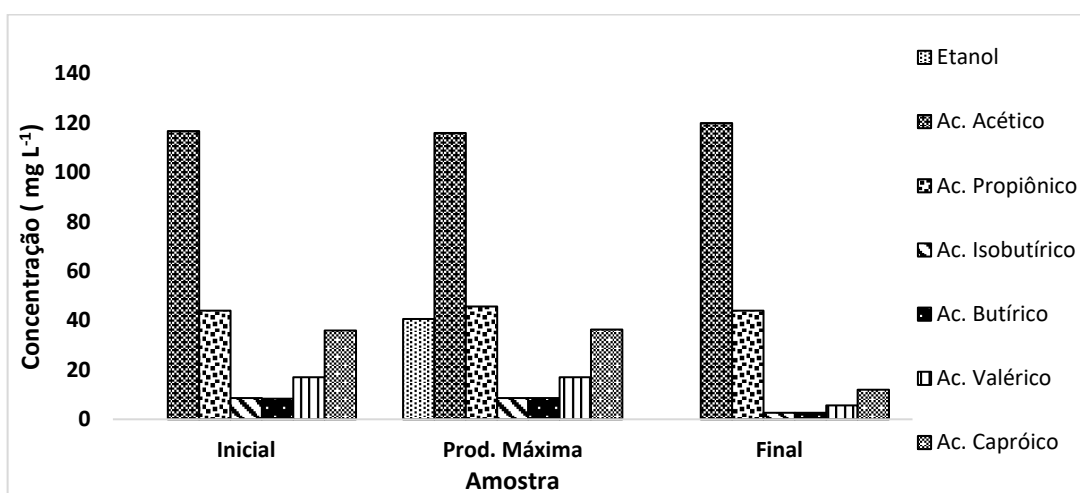
Uma hipótese provável é que por se tratar de resíduos estocados por longos períodos em diversos recipientes (diversas garrafas fechadas individualmente), as concentrações de matéria orgânica eram diferentes.

Na análise de ácidos graxos voláteis e álcoois foram observadas presenças de ácido acético, butírico, propiônico, isobutírico, valérico, capríco, etanol, metanol,

butanol, propanol para os diferentes ensaios (Figura 5.3-9 – 5.3-19). Não foi observada produção de acetona, 1,3-propanodiol, isobutanol e ácido isovalérico.

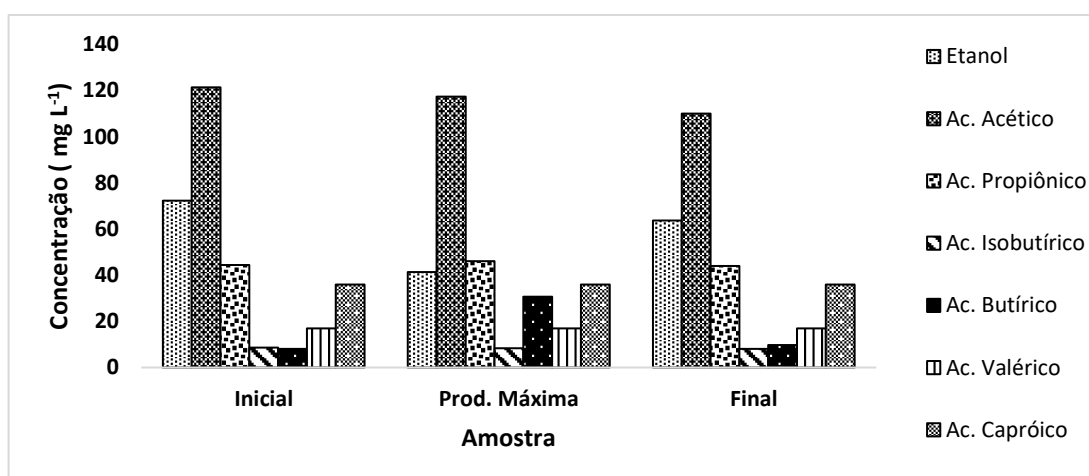
Para os ensaios alimentados com AR (Figuras 5.3-9 e 5.3-10) foi notado predomínio de ácido acético em ambas as condições (2,0 e 4,0 g DQO L⁻¹). Entretanto, quando se dobrou a concentração de DQO, houve uma produção de ácido butírico relevante no ensaio 2 (Figura 5.3-10). Em ambos os casos, dos ensaios 1' e 2, houve produção de ácido propiônico, o que evidenciou consumo de H₂ nos reatores.

Figura 5.3-9. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 1' (2 g DQO AR L⁻¹)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-10. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 2 (4 g DQO AR L⁻¹)



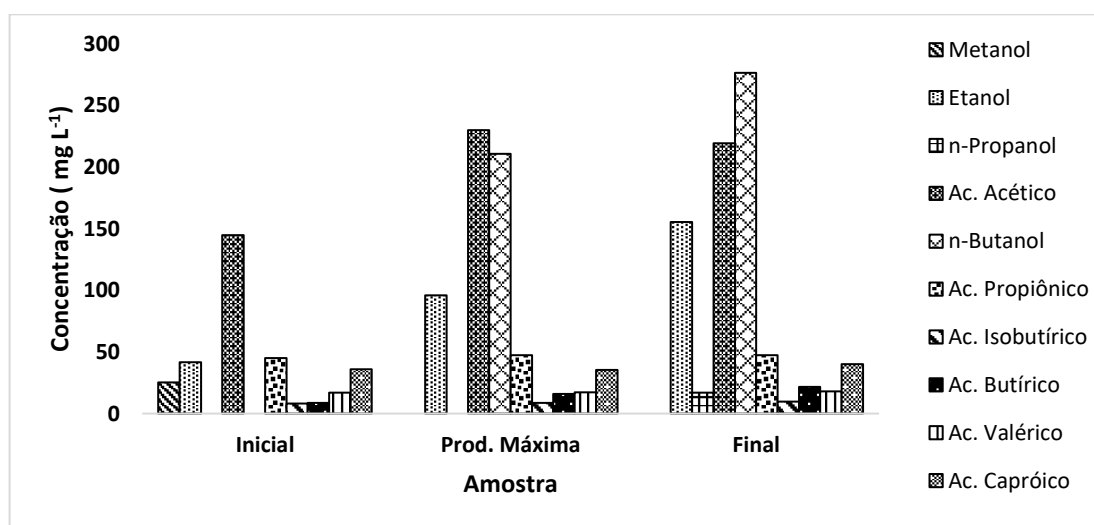
Fonte: Elaborado pelo autor

Para ambos os ensaios, foi observada a produção de ácido butírico e isobutírico, mostrando que as rotas que apresentam maior rendimento na produção

de H₂ estavam ativas no consórcio bacteriano. Também é possível notar que alguns compostos estavam presentes desde o início dos ensaios e permaneceram, com algumas variações de concentração, até o final.

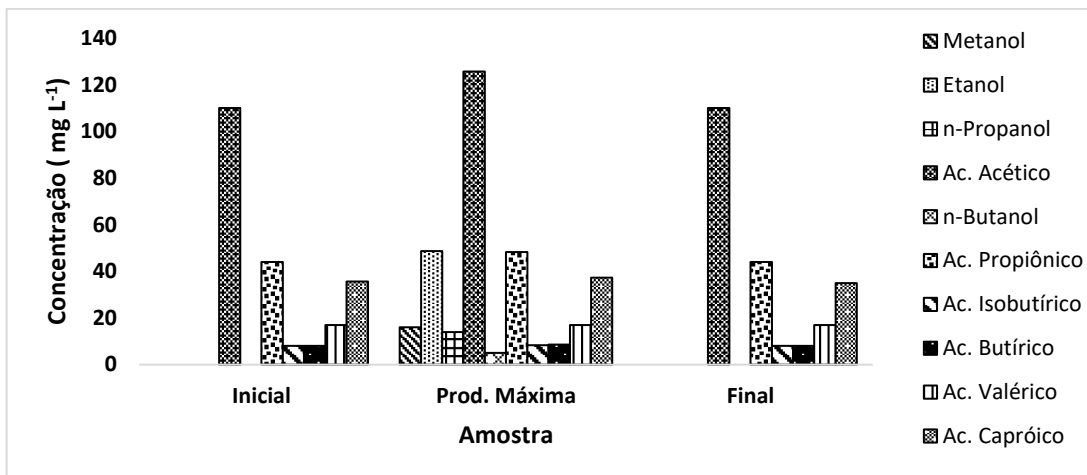
Nos ensaios de 6 a 10, alimentados com VIN (Figuras 5.3-12 – 5.3-16), houve uma diversidade maior de coprodutos da fermentação. No ensaio 6, por exemplo, houve produção de n-butanol, seguido por ácido acético e etanol. Nos ensaios seguintes, 7-9 (Figuras 5.3-12 – 5.3-15) ocorreu um comportamento distinto. Com o aumento da concentração de DQO, houve uma mudança no perfil dos metabólitos, havendo assim, ausência de n-butanol nos resultados observados. No ensaio 7 vemos a predominância da produção de ácido acético, assim como no ensaio 8. Entretanto, no ensaio 9, que apresentou maior produção acumulada de H₂, o principal metabólito produzido foi o etanol, seguido pelo ácido acético. Este fato mostrou que a rota metabólica favorecida foi alterada conforme a concentração de substrato era elevada. O ensaio 10 (Figura 5.3-15) foi o que apresentou a menor produção acumulada de H₂ dentre todos os ensaios realizados. Um fato que pode explicar esse comportamento foi a presença de metanol. Em todos os ensaios alimentados com vinhaça o metanol se fez presente, entretanto, nos ensaios de 6 a 9, o metanol era consumido e não estava presente no fim do ensaio. Em contrapartida, no ensaio 10, não havia metanol no início, mas no final do ensaio. Portanto, houve uma produção de metanol ao longo do ensaio, apesar de ser observado a produção de ácido acético e etanol no reator.

Figura 5.3-11. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 6 (12 g DQO VIN L⁻¹)



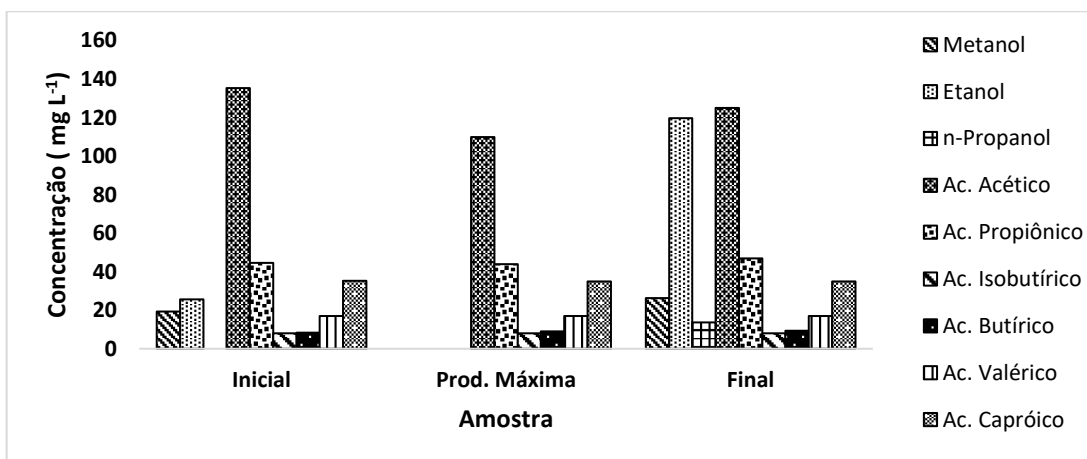
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-12. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 7 (36 g DQO VIN L⁻¹)



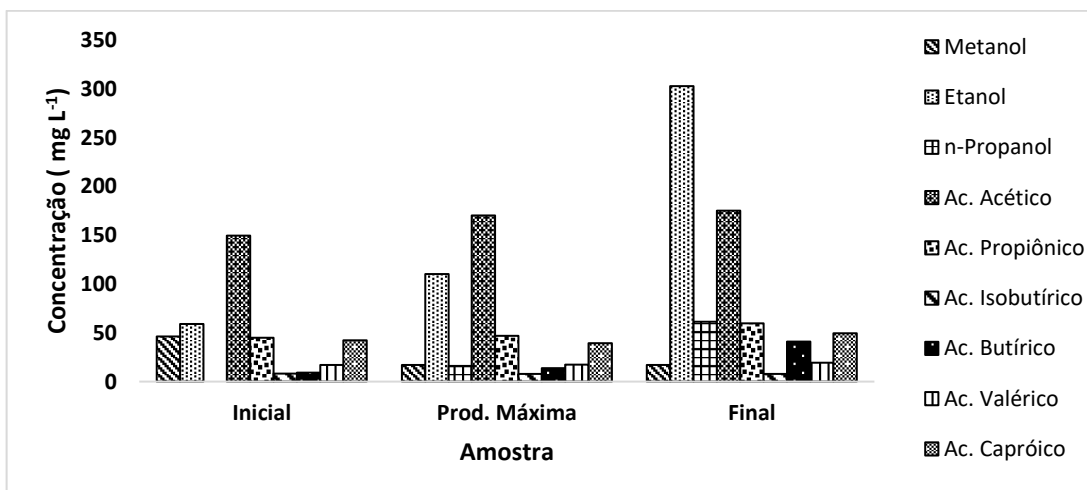
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-13. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 8 (55 g DQO VIN L⁻¹)



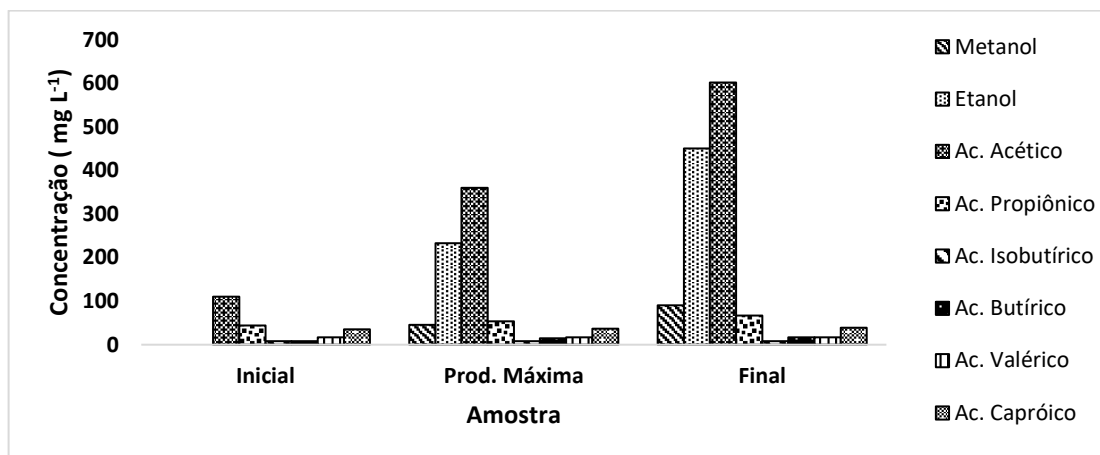
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-14. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 9 (69 g DQO VIN L⁻¹)



Fonte: Elaborado pelo autor

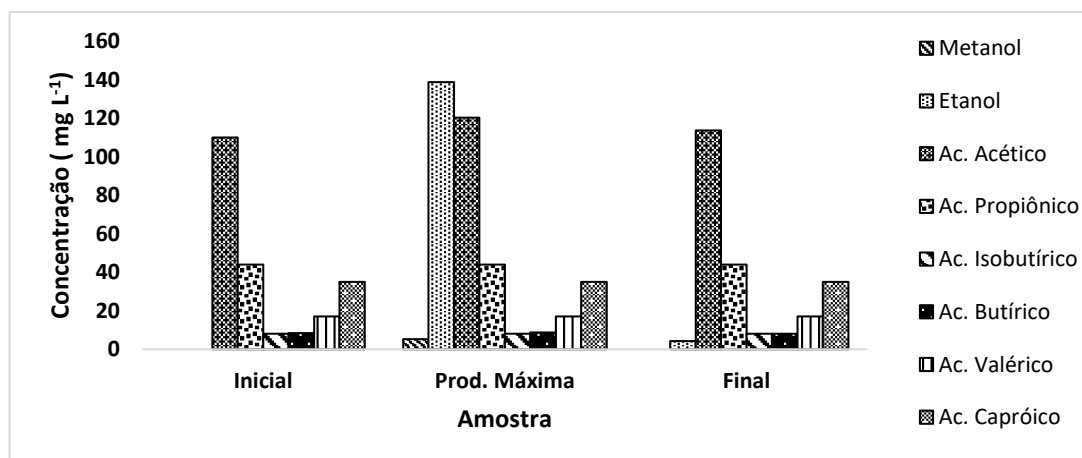
Figura 5.3-15. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 10 (77 g DQO VIN L⁻¹)



Fonte: Elaborado pelo autor

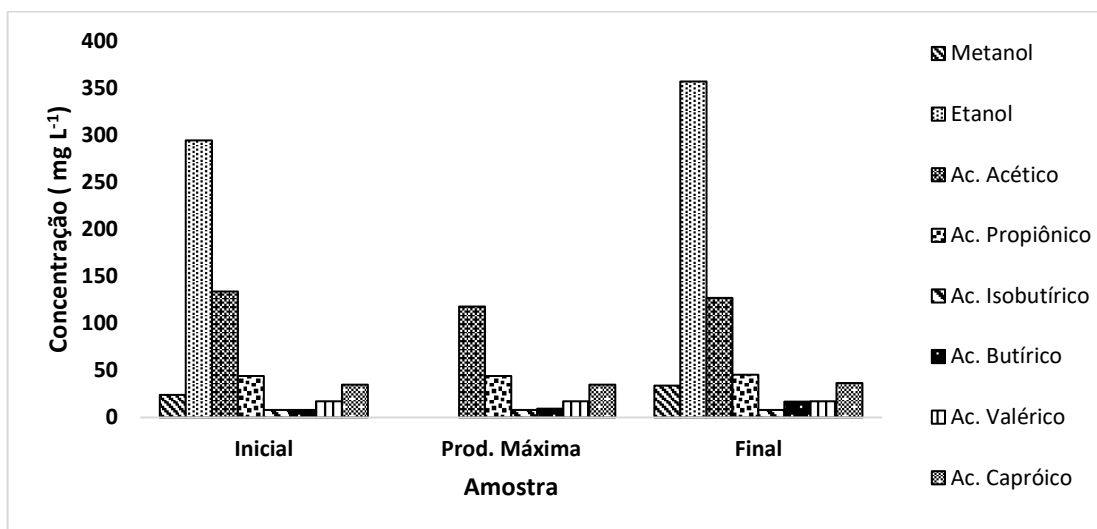
Nos reatores alimentados com EB (Ensaio 11-14), houve predomínio da produção de etanol, seguido pela produção de ácido acético, propiônico, butírico e isobutírico. Houve o favorecimento da rota de fermentação etanólica (Figuras 5.3-16 – 5.3-19). Este resíduo foi escolhido por apresentar algumas similaridades com a AR, entretanto, no resíduo dos ensaios 1' e 2, a rota metabólica favorecida foi a de produção de ácido acético. Isso nos mostra que por mais que os resíduos apresentem características similares, os microrganismos podem usá-los de maneiras diferentes.

Figura 5.3-16. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 11 (2 g DQO EB L⁻¹)



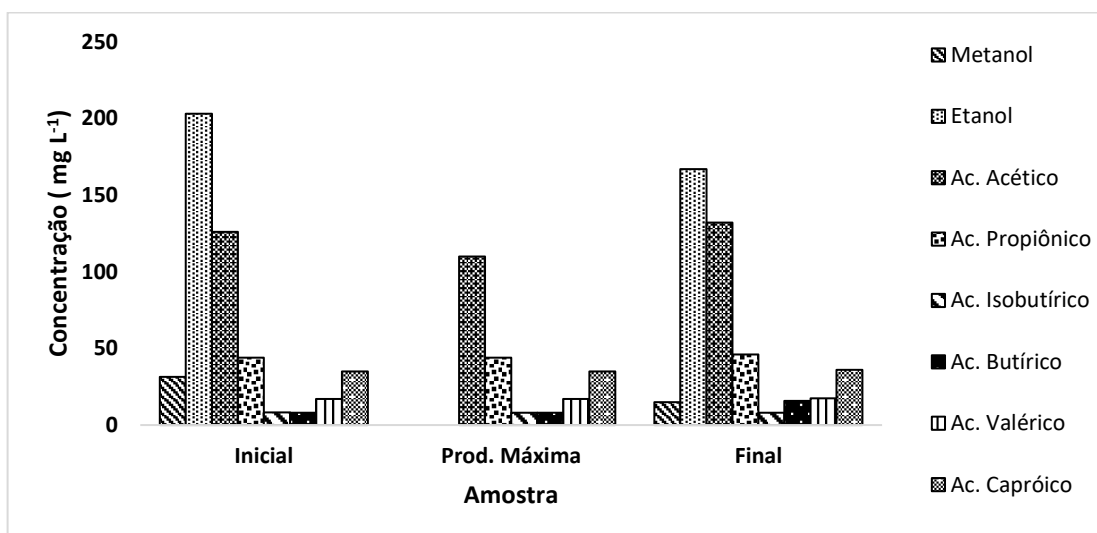
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-17. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 12 (4 g DQO EB L⁻¹)



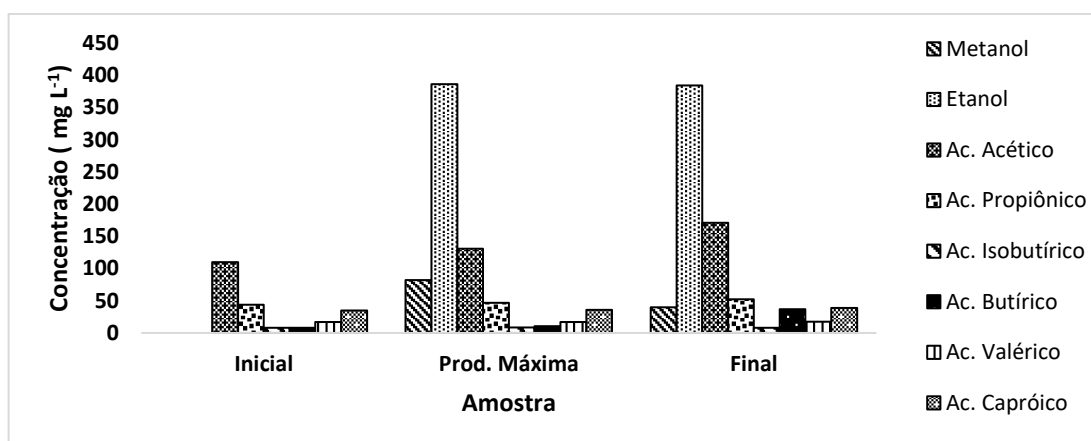
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-18. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 13 (8 g DQO EB L⁻¹)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.3-19. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 14 (10 g DQO EB L⁻¹)



Fonte: Elaborado pelo autor

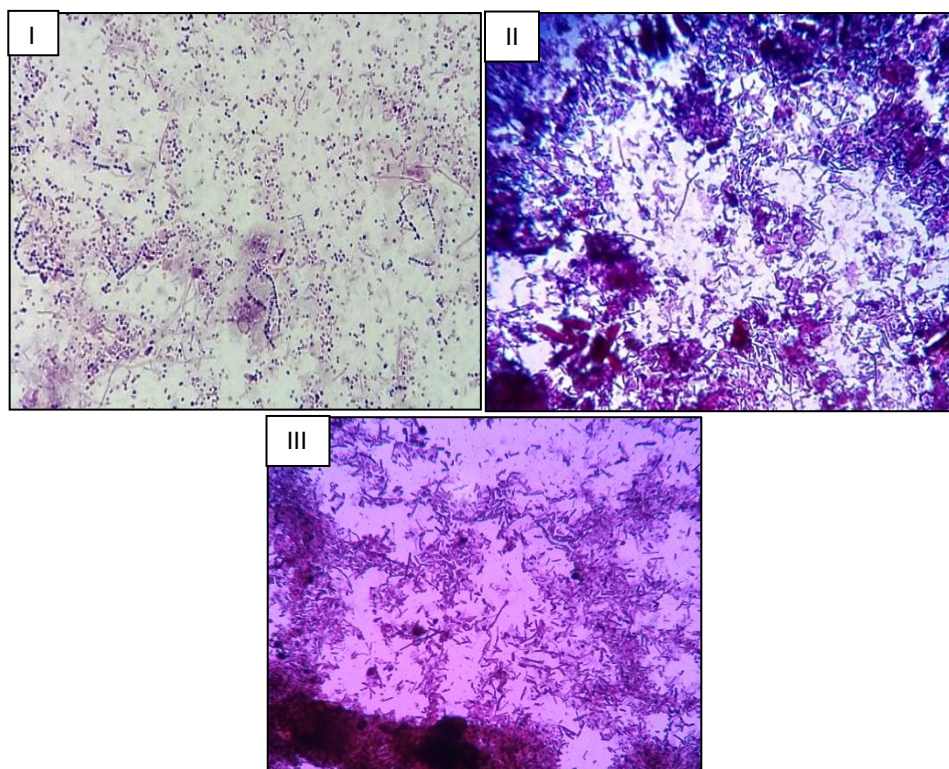
Os resultados obtidos nas análises cromatográficas, assim como os desvios entre os reatores em triplicatas, para a análise de ácidos graxos voláteis e álcoois estão disponíveis no APÊNDICE C.

5.4 Análises Microbiológicas

5.4.1 Microscopia

Por meio da técnica de coloração de Gram (Figura 5.4.1-1) observou-se o predomínio de bactérias Gram positivas em ambas as condições de substrato, água residuária e vinhaça. Essas análises foram realizadas ao final do ensaio com maior produção de H₂ (mmol H₂ L⁻¹) para cada resíduo trabalhado.

Figura 5.4.1-1. Microscopias ópticas da técnica de coloração de Gram com aumento de 1000X referente as amostras nos ensaios alimentados com I - Água residuária (2 g DQO L⁻¹), II – Vinhaça (69 g DQO L⁻¹) e III – Efluente Bruto (10 g DQO L⁻¹)



Fonte: Acervo pessoal

Nos reatores alimentados com água residuária a predominância morfológica foi de cocos e estreptococos Gram positivos, além de bacilos Gram negativos (Figura 5.4.1-1 I).

Etchebere *et al.* (2016) aponta que, em decorrência da análise por pirosequenciamento da comunidade bacteriana de 20 reatores de produção de hidrogênio diferentes, microrganismos do gênero *Streptococcus* apresentam um baixo potencial de produção de H₂. Esses microrganismos são anaeróbios facultativos e, provavelmente, as morfologias de cocos observadas podem ter sido responsáveis pelo menor rendimento de produção de H₂ nos reatores alimentados com AR, somado às menores concentrações de DQO impostas no início da operação dos reatores.

Todavia, nos reatores alimentados com vinhaça e efluente bruto, foi observada a predominância de bacilos Gram positivos, os quais podem ser microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* (Figura 5.4.1-1 II e 5.4.1-1 III).

Etchebere *et al.* (2016) e Valdez-Vazquez; Poggi-Varaldo (2009) apontam que este gênero de microrganismos possui alto potencial de produção de gás hidrogênio e vários estudos com microrganismos desse gênero (ALY *et al.*, 2018; AN

et al., 2018; HAMILTON *et al.*, 2018; YIN; WANG, 2017) corroboram o fato de que microrganismos do gênero *Clostridium* são grandes produtores de H₂.

5.4.2 Biologia Molecular e Bioinformática

Por meio do sequenciamento do 16S e posterior identificação do consórcio bacteriano foi possível corroborar algumas hipóteses levantadas pelas microscopias de coloração de Gram. Não foi possível fazer o sequenciamento e identificação da amostra do consórcio presente nos reatores alimentados com água residuária. Como o inóculo sempre era transferido ao ensaio seguinte, a primeira amostra do inóculo, que foi retirada ao término do ensaio 1' e 2, foi inutilizada.

Na microscopia apresentada para o consórcio presente nos reatores alimentados com VIN (Figura 5.4.1-1 II) foi possível observar bacilos Gram positivos, os quais foram identificados como pertencentes, em sua maioria, à classe *Clostridia* (71,8%) (Figura 5.4.2-1). Nos reatores com VIN a maior abundância foi de bactérias do gênero *Caiprociproducens* (64,9%), as quais produzem ácido capróico. Foi obtida maior produção desse ácido (45,9 mg L⁻¹) no ensaio 9 (69 g DQO L⁻¹).

Para os reatores alimentados com VIN foi verificada abundância relativa do Dominio Bacteria para os gêneros: *Enterobacter* (0,020%), *Pediococcus* (0,082%), *Clostridium* (6,88%), *Lactobacillus* (25%) e *Caproiciproducens* (64,9%).

Para os reatores alimentados com EB foi verificada maior diversidade com abundância relativa do Dominio Bacteria para os gêneros: *Pediococcus* (0,014%), *Bacillus* (0,016%), *Lactobacillus* (4,95%), *Enterobacter* (1,24%) *Caproiciproducens* (18,9%) e *Clostridium* (63,2%).

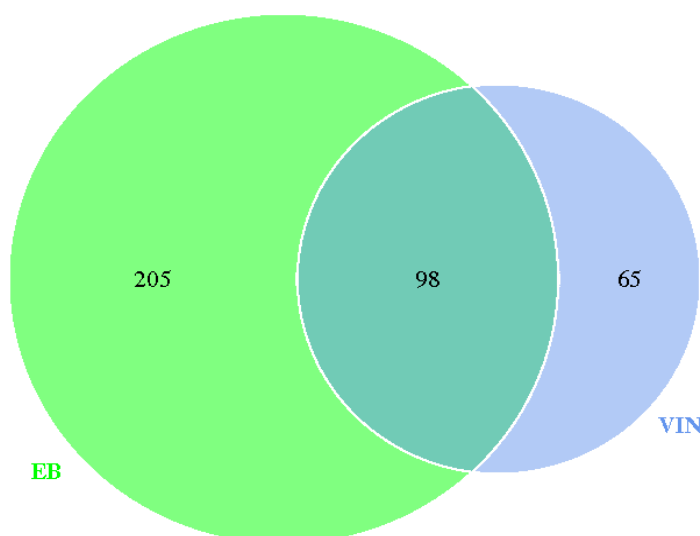
Nos reatores alimentados com EB (ensaios 10-14), assim como os alimentados VIN, foi constatado predomínio de bacilos Gram positivos. A identificação filogenética apresentou predomínio de bactérias pertencentes a classe *Clostridia* (82%), sendo que 57,8% foram relacionados com *Clostridium beijerinckii* (Figura 5.5.2-2). Essa espécie de bactéria é reportada como produtora de H₂ e também pode produzir como co-produto em sua fermentação o butanol (WU *et al.*, 2017), aliado a isso, os microrganismos desse gênero apresentam potencial de produção de H₂ elevado, como reportado anteriormente neste trabalho. Butanol não foi observado nos ensaios realizados com EB, entretanto, no ensaio 6 tendo VIN como substrato tal co-produto foi constatado. Uma pequena porcentagem (0,60%)

da diversidade presente nos reatores alimentados com VIN eram referentes a *Clostridium beijerinckii*, substanciando a presença de n-butanol nos reatores.

Em ambas as condições o gênero *Enterobacter* contribuiu com uma baixa porcentagem de abundância de 0,020% e 1,24%, respectivamente para os reatores alimentados com VIN e EB.

Ao todo, 368 OTUs foram encontradas a partir do consórcio bacteriano. Grande parte presente tanto nos reatores alimentados com VIN quanto nos reatores alimentados com EB, como é possível de observar pelo diagrama de Venn (Figura 5.4.2-3). Isso era esperado, uma vez que o inóculo inicial que foi utilizado nos primeiros ensaios realizados com AR como substrato, foi sendo ressuspendido e inoculado diretamente nos ensaios seguintes alimentados com VIN e EB.

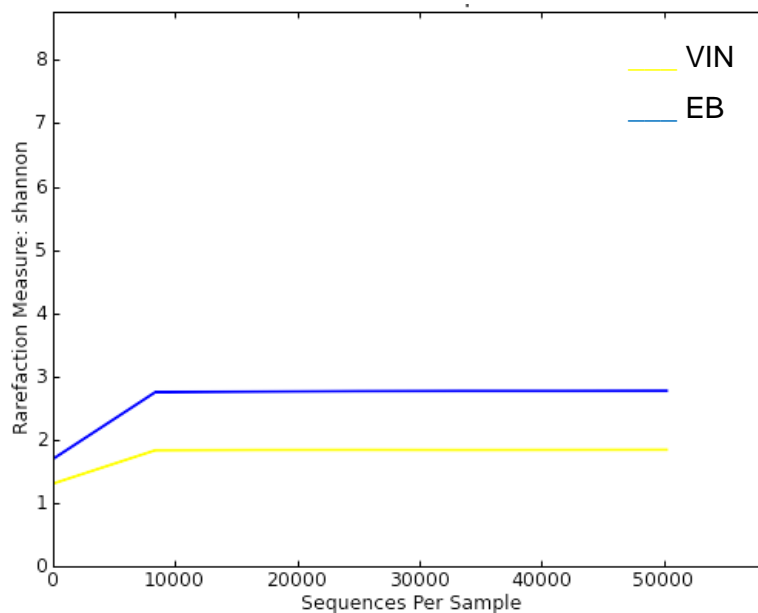
Figura 5.4-1. Diagrama de Venn com as OTUs encontradas no consórcio presente nos reatores alimentados com VIN e EB



Fonte: Elaborado pelo autor

Uma seletividade pôde ser observada ao longo dos reatores e ensaios (1'-14). Isso fica claro tanto pelas microscopias (Figura 5.4.1-1) que mostraram três diferentes predomínios morfológicos durante os ensaios quanto pelas curvas de rarefação com os índices de Shannon (Figura 5.4.2-4) e de espécies observadas (Figura 5.4.2-5).

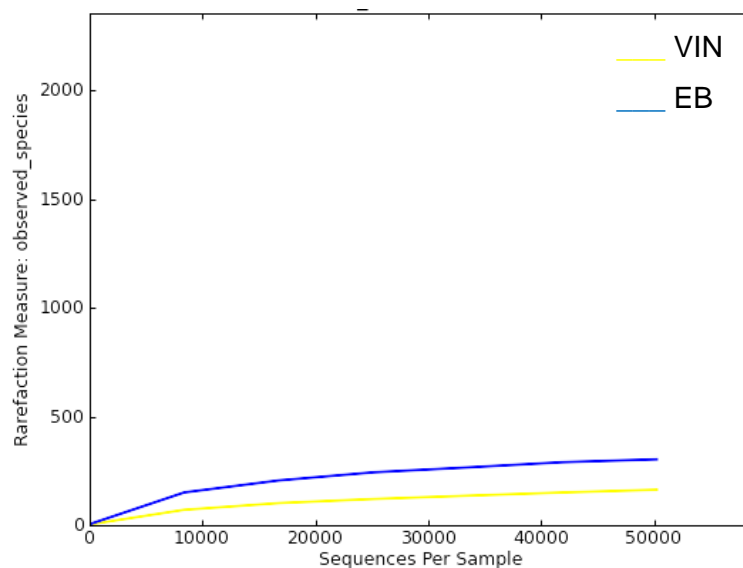
Figura 5.4-2. Curva de rarefação para o índice Shannon (H')



Fonte: Elaborado pelo autor

O índice de Shannon mostrou que o consórcio presente nos reatores alimentados com EB apresentaram maior diversidade do que os alimentados com VIN, com índice H' de 2,61 e 1,76, respectivamente. Semelhante aos resultados do índice de Shannon, a curva de rarefação (Figura 5.4.2-5) revelou maior presença de espécies no consórcio dos reatores alimentados com EB do que nos alimentados com VIN, que foram respectivamente, 303 e 171.

Figura 5.4-3. Curva de rarefação de acordo com as espécies observadas



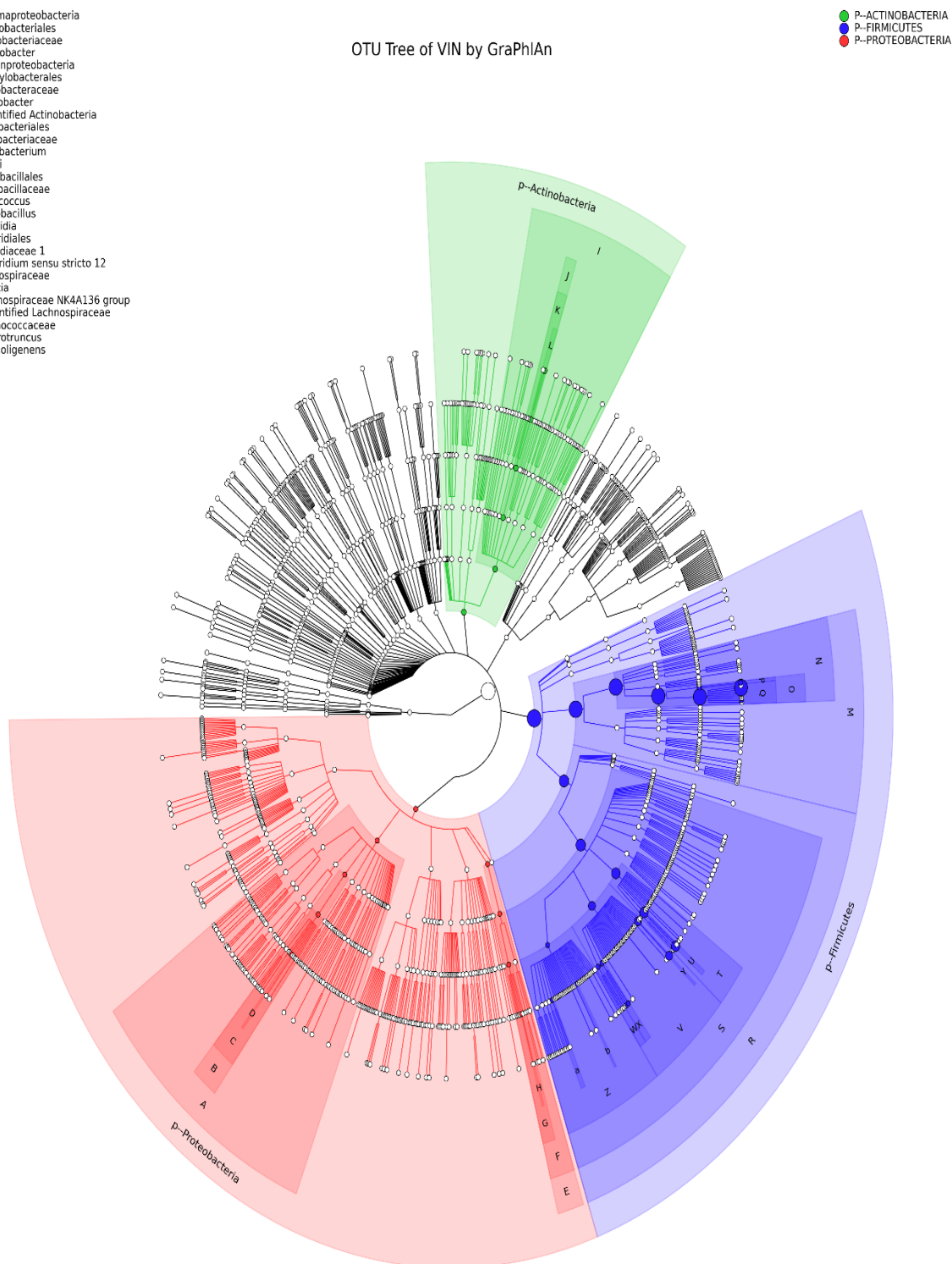
Fonte: Elaborado pelo autor

Também foi observado pela elaboração de um GraphPlan da árvore de OTUs (Figuras 5.4.2-6 e 5.4.2-7) a diferença nos grupos presentes no consórcio bacterianos dos reatores alimentados com VIN e com EB. Ressalta-se que os resíduos não foram autoclavados. A vinhaça citrícola como substrato, foi mais seletiva quanto aos microrganismos (Figura 5.4.2-3), o que pode ser explicado devido a quantidade de compostos (ácidos succínico, fórmico, acético, propriônico, butírico, valérico, capróico) presentes na amostra bruta. Como não foi realizada a caracterização do efluente bruto citrícola, não foi possível afirmar sua composição. Entretanto, nos reatores alimentados com tal resíduo, houve uma maior diversidade bacteriana (Figura 5.4.2-4). Provavelmente, a diversidade bacteriana observada nos reatores alimentados com VIN se relaciona com as produções de gás hidrogênio mais elevadas. Portanto, houve uma seleção de bactérias anaeróbias produtoras de gás hidrogênio para essa condição, o que certamente determinou sua diversidade mais reduzida.

Figura 5.4-4. GraphPlan de árvores de OTUs mostrando a diversidade presente no consórcio alimentado com VIN

A:c--Gammaproteobacteria
 B:o--Enterobacterales
 C:f--Enterobacteriaceae
 D:g--Enterobacter
 E:i:c--Epsilonproteobacteria
 F:o--Campylobacterales
 G:f--Helicobacteraceae
 H:g--Helicobacter
 I:c--unidentified Actinobacteria
 J:o--Bifidobacterales
 K:f--Bifidobacteriaceae
 L:g--Bifidobacterium
 M:c--Bacilli
 N:o--Lactobacillales
 O:f--Lactobacillaceae
 P:g--Pediococcus
 Q:g--Lactobacillus
 R:c--Clostridia
 S:o--Clostridiales
 T:f--Clostridiaceae 1
 U:g--Clostridium sensu stricto 12
 V:f--Lachnospiraceae
 W:g--Blautia
 X:g--Lachnospiraceae NK4A136 group
 Y:g--unidentified Lachnospiraceae
 Z:f--Ruminococcaceae
 a:g--Anaerotruncus
 b:g--Ethanoligenens

OTU Tree of VIN by GraPhIA



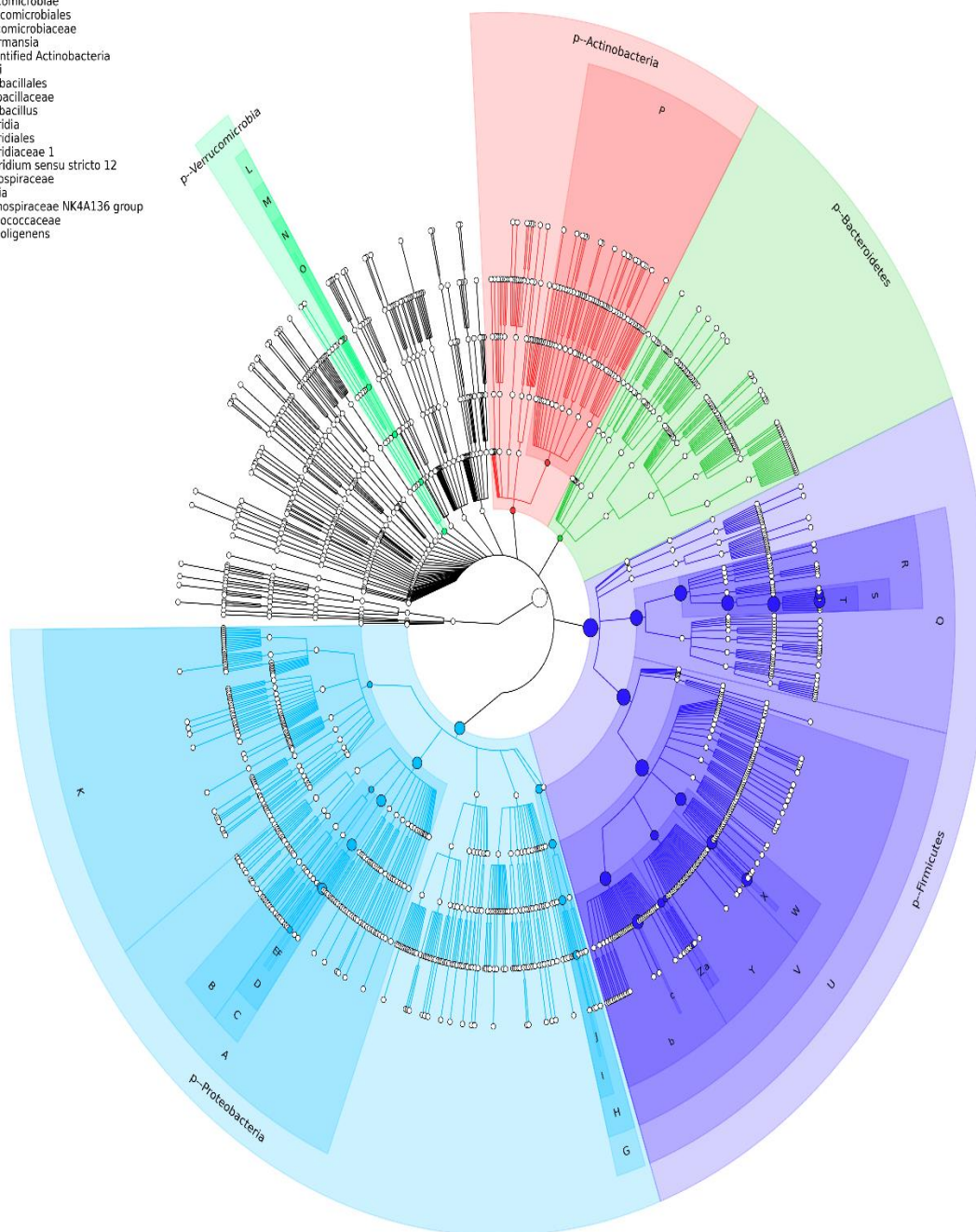
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5.4-5. GraphPlan de árvores de OTUs mostrando a diversidade presente no consórcio alimentado com EB

A:c--Gammaproteobacteria
 B:o--Pseudomonadales
 C:o--Enterobacteriales
 D:f--Enterobacteriaceae
 E:g--Escherichia-Shigella
 F:g--Enterobacter
 G:c--Epsilonproteobacteria
 H:o--Campylobacteriales
 I:f--Helicobacteraceae
 J:g--Helicobacter
 K:c--Alphaproteobacteria
 L:c--Verrucomicrobiae
 M:o--Verrucomicrobiales
 N:f--Verrucomicrobiaeaceae
 O:g--Akkeermansia
 P:c--unidentified Actinobacteria
 Q:c--Bacilli
 R:o--Lactobacillales
 S:f--Lactobacillaceae
 T:g--Lactobacillus
 U:c--Clostridia
 V:o--Clostridiales
 W:f--Clostridiaceae 1
 X:g--Clostridium sensu stricto 12
 Y:f--Lachnospiraceae
 Z:g--Blautia
 a:g--Lachnospiraceae NK4A136 group
 b:f--Ruminococcaceae
 c:g--Ethanoligenens

OTU Tree of EB by GraPhlAn

● P--ACTINOBACTERIA
 ● P--BACTEROIDETES
 ● P--FIRMICUTES
 ● P--PROTEOBACTERIA
 ● P--VERRUCOMICROBIA



Fonte: Elaborado pelo autor

“And in my soul, I swear, until my dream of a world where dignity, honour and justice become the reality we all share, I will never stop fighting. Never!”

Superman

6 CONCLUSÕES

Os pré-tratamentos realizados no lodo granular foram eficientes para inibição da metanogênese. Entretanto, alguns (diluição serial, congelamento e sacagem) foram inativaram também os microrganismos produtores de H₂. O tratamento ácido se mostrou mais eficiente e favoreceu uma maior produção de H₂.

O consórcio anaeróbio gerado a partir do inóculo com pré-tratamento ácido mostrou potencial mais elevado na produção biológica de H₂ a partir de resíduos citrícolas como substrato, apresentando resultados bastante expressivos e que poderão embasar pesquisas futuras na utilização desses resíduos para obtenção de bioenergia.

Foi observado maior produção de H₂ para o ensaio 9, realizado com vinhaça a 69 g DQO L⁻¹, resultando em 210, 19 mmol H₂ L⁻¹ em 221,5 horas. Foi verificado o favorecimento da rota de produção de etanol em praticamente todos os ensaios, assim como a geração de metanol, o que evidencia a presença de pectina nos resíduos citrícolas testados.

Foram identificados predomínios de microrganismos pertencentes a classe *Clostridia* presentes nos consórcios dos reatores alimentados com VIN e EB. Para o consórcio alimentado com efluente bruto foi majoritária a presença da bactéria *Clostridium Benjirinckii*, classificada como produtora de H₂ e o principal gênero de bactérias produtoras de gás hidrogênio. Vale ressaltar que o consórcio presente nos reatores alimentados com EB apresentaram maior diversidade bacteriana do que os alimentados com VIN, reforçando a hipótese de que compostos presentes na vinhaça citrícola tenham um potencial elevado de seletividade.

"If you want to make the world a better place, take a look at yourself, and then make a change."

Michael Jackson

7 REFERÊNCIAS

- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 07, p. 406–414, 2014.
- AGRI1. **Cinturão citrícola**. Disponível em: <<https://agri1.com.br/cinturao-citricola/>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- ALY, S. S. et al. Identification of factors that accelerate hydrogen production by *Clostridium butyricum* RAK25832 using casamino acids as a nitrogen source. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 10, p. 5300–5313, 2018.
- AN, Q. et al. Investigation on hydrogen production from paper sludge without inoculation and its enhancement by *Clostridium thermocellum*. **Bioresource Technology**, v. 263, n. March, p. 120–127, 2018.
- APHA, A. AND W. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th editi ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F. . et al. Metodologias para Determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Engenharia sanitaria ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- CAROSIA, M. F. et al. Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9600–9610, 2017.
- CITRUSBR. **Volume das exportações de suco aumentou em 2018**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312644>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- DA SILVA VERAS, T. et al. Hydrogen: Trends, production and characterization of the main process worldwide. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 4, p. 2018–2033, 2017.
- DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 1987.
- DONG, L. et al. Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 15, p. 8234–8240, 2010.

- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- EKER, S.; ERKUL, B. Biohydrogen production by extracted fermentation from sugar beet. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1–10, 2018.
- ETCHEBEHERE, C. et al. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3371–3384, 2016.
- F. HOFFMAN - LA ROCHE LTD. **Biochemical Pathways**. Disponível em: <<http://biochemical-pathways.com/#/map/1>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A. G. Rapid Method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.
- HAMILTON, C. et al. Effect of the nitrogen source on the hydrogen production metabolism and hydrogenases of *Clostridium butyricum* CWBI1009. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 11, p. 5451–5462, 2018.
- HU, B.; CHEN, S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 15 SPEC. ISS., p. 3266–3273, 2007.
- JAMES, B. D.; DESANTIS, D. A.; SAUR, G. **Hydrogen Production Pathways Cost Analysis (2013 – 2016)**. Arlington: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/1346418>>.
- LAY, J.Y.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor. **Water Research**, v. 32, p. 3673–3679, 1998.
- LIU, H. et al. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 24, p. 9696–9701, 2009.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. [s.l.] Artmed, 2016.
- MAHMUD, S. S.; JAHIM, J. M.; ABDUL, P. M. Pretreatment conditions of palm oil mill effluent (POME) for thermophilic biohydrogen production by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27512–27522, 2017.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 8, p.

3180–3190, 2015.

MAINTINGUER, S. I. et al. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 1, p. 152–160, 2017.

MARONE, A. et al. Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. **Renewable Energy**, v. 68, p. 6–13, 2014.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404–7416, 2009.

MONTOYA-PÉREZ, L.; DURÁN-HERRERA, J. E. Producción de Hidrógeno a partir de la fermentación de residuos agroindustriales de la piña Hydrogen production from the fermentation of pineapple agroindustrial wastes. **Tecnología en Marcha**, v. 30, p. 106–118, 2017.

NESPECA, M. G. et al. Determination of alcohols and volatile organic acids in anaerobic bioreactors for H₂ production by near infrared spectroscopy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 32, p. 20480–20493, 2017.

NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. p. 138, 2010.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da Citricultura 2017**. [s.l: s.n.].

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 597–611, 2017.

PACHIEGA, R. et al. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1–9, 2018a.

PACHIEGA, R. et al. Obtaining and Characterization of Mesophilic Bacterial Consortia from Tropical Sludges Applied on Biohydrogen Production. **Waste and Biomass Valorization**, 2018b.

PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5256–5265, 2008.

RAFIEENIA, R.; LAVAGNOLO, M. C.; PIVATO, A. Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. **Waste Management**, v. 71, p. 734–748, 2018.

RAFIEENIA, R.; PIVATO, A.; LAVAGNOLO, M. C. Effect of inoculum pre-treatment on mesophilic hydrogen and methane production from food waste using two-stage

- anaerobic digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 2–11, 2018.
- RAFIQ, S. et al. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 606–614, 2012.
- ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.
- SALEM, A. H. et al. Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 10, p. 4856–4865, 2018.
- SHANMUGAM, S. R. et al. Long term impact of stressing agents on fermentative hydrogen production: Effect on the hydrogenase flux and population diversity. **Renewable Energy**, v. 88, p. 483–493, 2016.
- SHARMA, Y. C. et al. Ethanol steam reforming for hydrogen production: Latest and effective catalyst modification strategies to minimize carbonaceous deactivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. April 2016, p. 89–103, 2017.
- SI, B. et al. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 35, p. 11414–11421, 2015.
- SILVA, F. M. S. et al. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, 2018.
- SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109–116, 2015.
- SIVAGURUNATHAN, P. et al. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 6, p. 3820–3836, 19 fev. 2016.

- SOUZA, C. D. DE et al. Estudo bibliométrico da produção científica do setor citrícola no Brasil: Análise de publicações na Web of Science (2000-2010). **Liinc em Revista**, v. 9, n. 1, p. 28–46, 2013.
- SUBUDHI, S. et al. Impact of regulated pH on proto scale hydrogen production from xylose by an alkaline tolerant novel bacterial strain, *Enterobacter cloacae* DT-1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 6, p. 2728–2737, 2013.
- TAGHIZADEH-ALISARAEI, A. et al. Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, n. September, p. 1100–1112, 2017.
- TAWFIK, A.; EL-QELISH, M. Key factors affecting on bio-hydrogen production from co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and kitchen wastewater. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 106–111, 2014.
- TORQUATO, L. D. DE M. et al. Thermal characterization of anaerobic sludges from wastewater treatments applied to biological generation of H₂. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1267–1275, 2017a.
- TORQUATO, L. D. M. et al. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. **Waste Management**, v. 59, p. 181–193, 2017b.
- USDA. **Citrus: World Markets and Trade** National Agriculture Statistics Service. Washington, D.C.: [s.n.]. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 5, p. 1000–1013, 2009.
- WANG, J.; YIN, Y. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4804–4823, 2017.
- WELANDER, P. V.; METCALF, W. W. Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 30, p. 10664–10669, 2005.
- WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014.

WU, H. et al. Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 10, p. 6547–6555, 2017.

XIA, A. et al. Fermentative bio-hydrogen production from galactose. **Energy**, v. 96, p. 346–354, 2016.

YIN, Y.; HU, J.; WANG, J. Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13550–13556, 2014.

YIN, Y.; WANG, J. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 17, p. 12173–12180, 2017.

ZHANG, J. et al. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion of food waste and waste activated sludge by biological co-pretreatment. **Energy**, v. 135, p. 479–486, 2017.

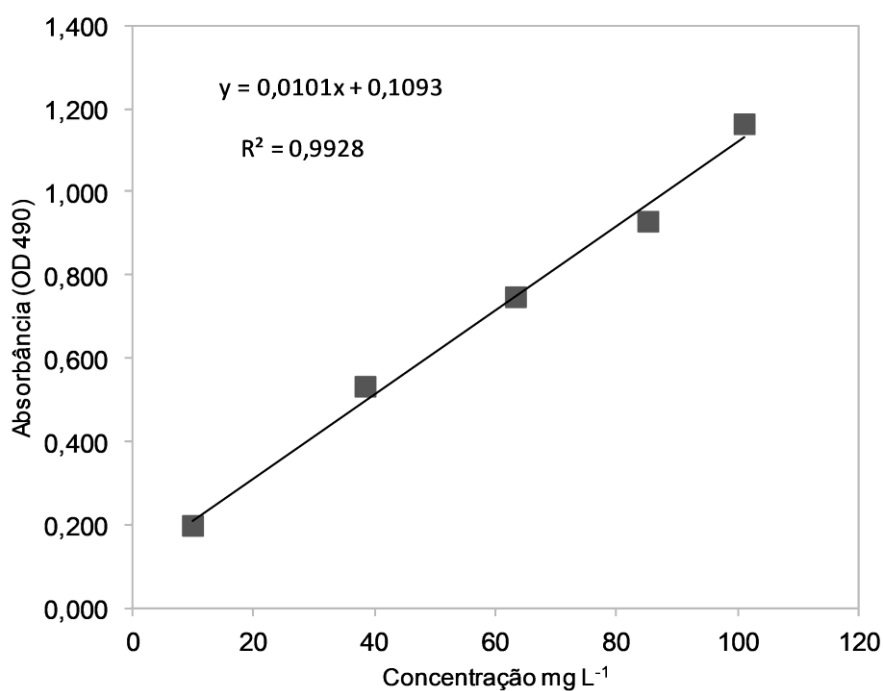
APÊNDICE A- Obtenção das equações de carboidratos totais

Tabela A-1. Concentrações reais e medidas de absorvância da curva de sacarose

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração real (mg L ⁻¹)	Absorbância (490 nm)			Média
10	10	0.209	0.167	0.211	0.196
40	38.4	0.354	0.358	0.37	0.361
60	63.2	---	0.529	0.534	0.532
80	85.2	---	0.717	0.776	0.747
100	101.2	0.87	0.95	0.964	0.928

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura A-1. Curva padrão de sacarose para análise de carboidratos totais

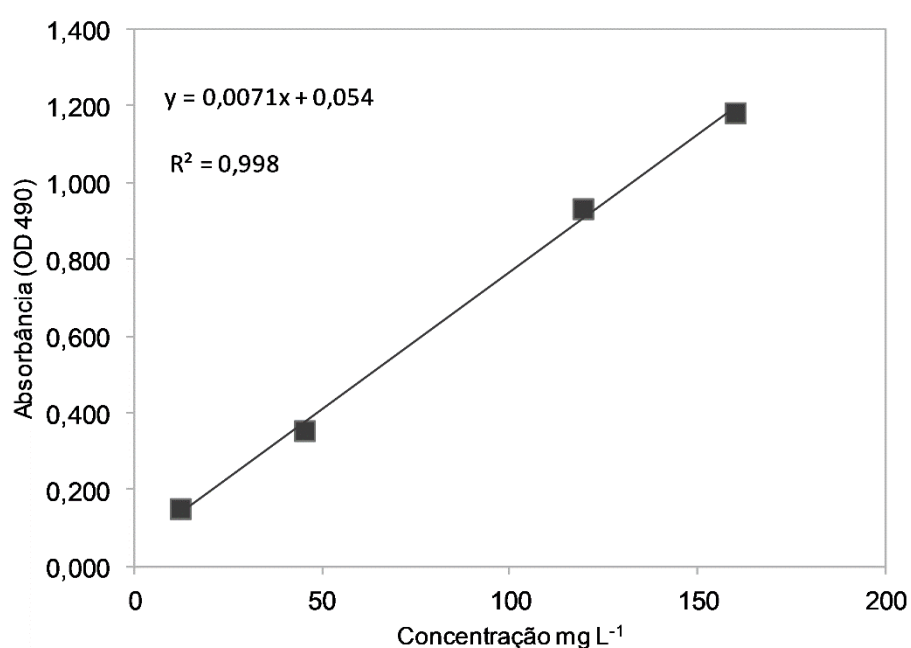


Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela A-2. Concentrações reais e medidas de absorvância da curva de glicose

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração real (mg L ⁻¹)	Absorvância (490 nm)			Média
10	12.4	0.142	0.144	0.171	0.152
40	45.2	0.366	0.356	0.341	0.354
100	119.6	0.972	0.943	0.881	0.932
150	160	1.213	1.221	1.108	1.181
200	224.4	1.457	1.441	1.453	1.450

Fonte: Elaborado pelo autor

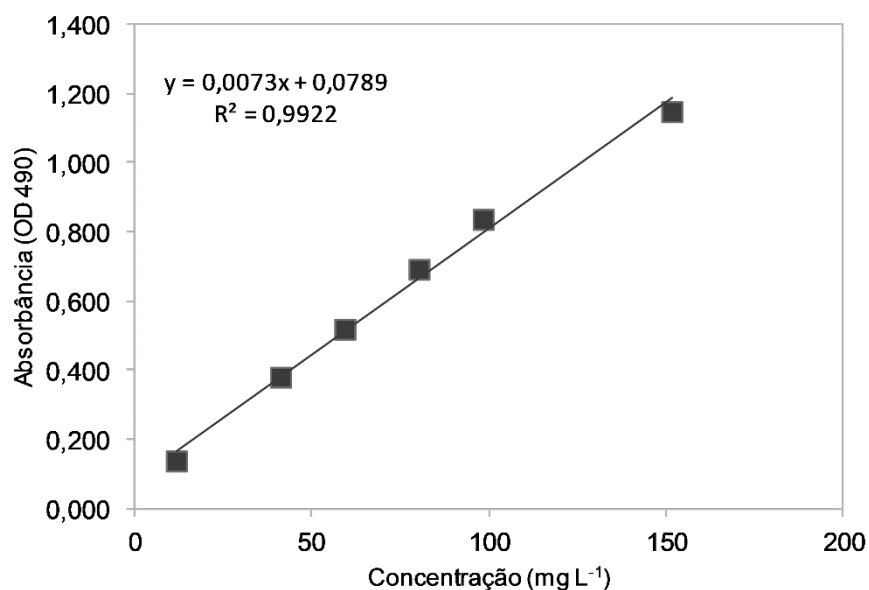
Figura A-2. Curva padrão de glicose para análise de carboidratos totais

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela A-3. Concentrações reais e medidas de absorvância da curva de frutose

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração real (mg L ⁻¹)	Absorvância (490 nm)			Média
10	12	0.127	0.132	0.143	0.134
40	41.2	0.391	0.374	0.371	0.379
60	59.6	0.512	0.526	---	0.519
80	80.4	0.616	0.674	0.781	0.690
100	98.4	0.76	---	0.912	0.836
150	152	---	1.207	1.086	1.147

Fonte: Elaborado pelo autor

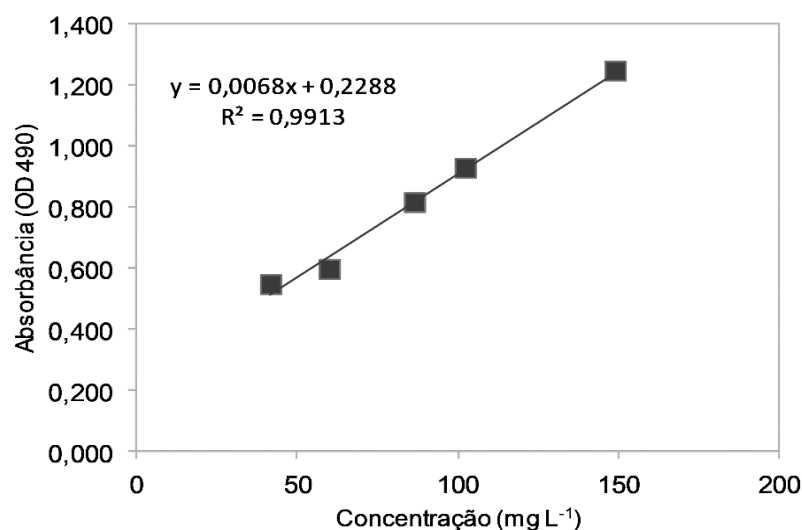
Figura A-3. Curva padrão de frutose para análise de carboidratos totais

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela A-4. Concentrações reais e medidas de absorbância da curva de xilose

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração real (mg L ⁻¹)	Absorbância (490 nm)			Média
40	41.6	0.535	0.553		0.544
60	60	0.604	0.589	0.595	0.596
80	86	0.818	0.814	0.802	0.811
100	102	0.939		0.916	0.928
150	148.4	1.232	1.27	1.225	1.242

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura A-4. Curva padrão de xilose para análise de carboidratos totais

Fonte: Elaborado pelo autor

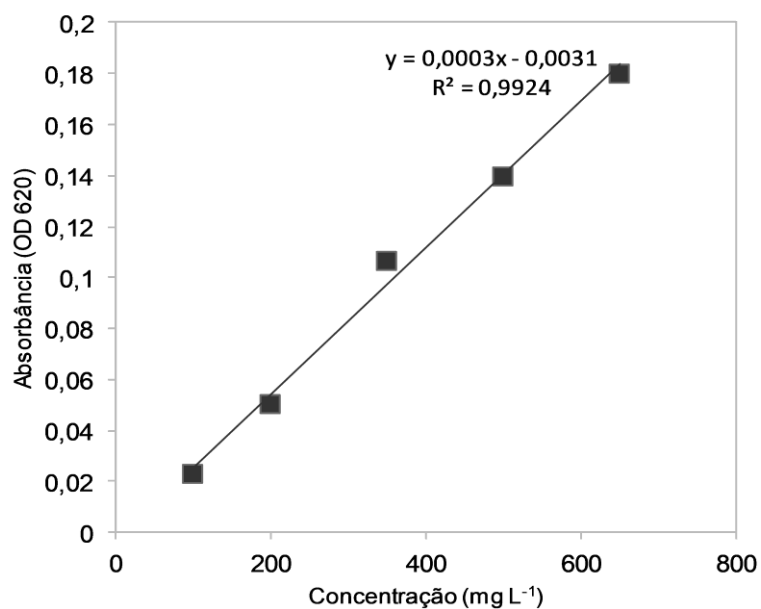
APÊNDICE B- Obtenção da curva para DQO

Tabela B-1. Valores de absorvância para elaboração da curva padrão de DQO

Concentrações (mg L ⁻¹)	Absorbâncias (620nm)		Média	Desvio Padrão
100	0.025	0.022	0.0235	0.21%
200	0.054	0.047	0.0505	0.49%
350	0.111	0.103	0.107	0.57%
500	0.14	0.14	0.14	0.00%
650	0.18	0.18	0.18	0.00%

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura B-1. Curva padrão de DQO



Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE C- Determinação de ácidos e álcoois

Tabelas com os dados da análise de ácidos graxos voláteis e álcoois presentes nas triplicatas de cada ensaio. (M=média; D= desvio padrão)

Ensaio 1'																			
Ácido Isobutírico				Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico							
R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	
9	9	8,7	0,57	9	8	8	8,3	0,57	17	17	17	17	0	0	36	36	36	36	0
9	9	8,7	0,57	8	9	9	8,7	0,57	17	17	17	17	0	0	36	37	36,3	0,57	
0	8	2,7	4,62	0	8	8	2,7	4,62	0	0	17	5,7	9,81	0	0	36	12	20,78	

Ensaio 1'															
Etanol				Ácido Acético				Ácido Propiónico							
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1
0	0	0	0	0	116	116	118	116,7	1,15	44	44	44	44	0	8
0	122	0	40,6	70,4	118	120	110	116	5,29	45	48	44	45,6	2,08	8
0	0	0	0	0	0	0	120	40	69,28	0	0	44	14,7	25,40	0

Ensaio 2

Ácido Isobutírico		Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico									
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
8	9	9	8,7	0,57	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	36	36	36	36	0
8	8	9	8,3	0,57	8	21	63	30,7	28,75	17	17	17	17	0	36	36	36	36	0
8	8	8	8	0	10	9	10	9,7	0,57	17	17	17	17	0	36	36	36	36	0

Etanol		Ácido Acético				Ácido Propiónico								
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
26	0	191	72,3	103,5	119	127	118	121,3	4,93	44	44	45	44,3	0,58
0	43	81	41,3	40,53	114	118	120	117,3	3,06	44	45	49	46	2,64
151	0	40	63,7	78,23	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0

Ensaio 6

Ácido Isobutírico		Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico									
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
8	8	8	8	0	9	9	8	8,7	0,57	17	17	17	17	0	36	36	36	0	
9	8	9	8,7	0,57	17	15	16	16	1	17	17	18	17,3	0,57	35	35	36	35,3	0,57
10	9	10	9,7	0,58	24	16	25	21,7	4,93	17	18	18	18	1	47	36	37	40	6,08

n - Butanol		Etanol				Ácido Acético				Ácido Propiónico									
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
0	0	0	0	0	41	44	40	41,7	2,09	146	146	142	144,7	2,31	45	45	45	45	0
337	132	163	210,7	110,5	164	52	96	96	59,73	199	194	297	230	58,08	49	48	45	47,3	2,08
258	307	264	276,3	26,73	152	181	133	155,3	24,17	274	202	182	219,3	48,39	48	47	47	47,3	0,58

Metanol

R1	R2	R3	M	D
26	26	24	25,3	1,15
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Ensaio 7

Ácido Isobutírico		Ácido Butírico						Ácido Valérico						Ácido Capróico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	36	36	35	35,7	9,58
8	9	8	8,7	0,57	9	9	8	8,7	0,57	17	17	17	17	0	40	36	36	37,3	2,31
8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0

n - Butanol		Etanol						Ácido Acético						Ácido Propiónico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0
15	0	0	5	8,66	0	146	0	48,7	84,30	157	110	110	110	27,1	57	44	44	48,3	7,51
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0

Metanol						n - Propanol					
R1	R2	R3	M	D		R1	R2	R3	M	D	
0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
48	0	0	16	27,71		42	0	0	14	24,25	
0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	

Ensaio 8

Ácido Isobutírico		Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico									
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
8	8	8	8	0	9	8	8	8,3	0,57	17	17	17	17	0	36	35	35	35,3	0,58
8	8	8	8	0	11	8	8	9	1,73	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0
8	8	8	8	0	8	11	9	9,3	1,53	17	17	17	17	0	25	25	25	35	0

n - Propanol		Etanol				Ácido Acético				Ácido Propiónico									
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
0	0	0	0	0	77	0	0	25,7	44,46	186	110	110	135,3	43,88	46	44	44	44,7	1,15
0	0	0	0	0	0	0	0	40,6	70,4	110	110	110	0	5,29	44	44	44	44	0
0	0	41	13,7	23,70	0	0	359	119,7	207,2	110	110	155	125	25,98	44	44	53	47	5,20

7

Metanol					
R1	R2	R3	M	D	
58	0	0	19,3	33,49	
0	0	0	0	0	
0	0	79	26,3	45,61	

Ensaio 9

		Ácido Isobutírico			Ácido Butírico			Ácido Valérico			Ácido Capróico								
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D					
8	9	8	8,3	0,57	10	9	9	9,3	0,57	17	17	17	17	0	55	36	36	42,3	10,97
8	8	8	8	0	9	9	23	13,7	8,08	17	17	18	17,3	0,58	36	35	47	39,3	6,66
8	8	8	8	0	9	64	50	41	28,58	17	20	21	19,3	2,09	36	57	56	49,7	11,85

		Etanol			Ácido Acético			Ácido Propiónico												
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D						
0	0	0	0	0	0	0	177	59	102,2	110	110	229	149,7	68,71	44	44	44	47	45	1,73
0	0	48	16	27,71	0	0	331	110,3	191,1	110	110	291	170,3	104,5	44	44	44	53	47	5,20
0	116	68	61,3	58,28	0	501	408	303	266,5	110	199	217	175,4	57,30	44	71	64	59,7	214,0	

Metanol					
R1	R2	R3	M	D	
0	0	139	46,3	80,25	
0	0	51	17	29,44	
0	32	19	17	16,09	

Ensaio 11

		Ácido Isobutírico				Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
8	8	8	8	0	9	8	8	8,3	0,57	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0
8	8	8	8	0	8	8	10	8,7	1,55	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0
8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0

		Metanol				Etanol				Ácido Acético				Ácido Propiónico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0
16	0	0	5,3	9,24	228	0	188	138,7	121,7	128	110	123	120,3	9,29	44	44	44	44	0
0	0	0	0	0	0	0	13	4,3	7,51	110	110	121	113,7	6,35	44	44	44	44	0

Ensaio 12

		Ácido Isobutírico						Ácido Butírico						Ácido Valérico						Ácido Capróico								
		R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D		
8	8	8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0	35	35	35	35	0		
8	8	8	8	8	8	0	12	8	8	9,3	2,31	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0	35	35	35	35	0		
8	8	8	8	8	8	0	13	19	18	16,7	3,21	17	17	17	17	0	36	37	37	36,7	0,58	36	37	37	36,7	0,58		
		Metanol																										
		Etanol												Ácido Acético						Ácido Propiónico								
		R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D		
9	63	0	24	0	34,07	433	0	0	0	294,3	255,0	144	147	110	133,7	1,15	44	44	44	44	0	44	44	44	44	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	133	110	110	117,7	13,28	44	44	44	44	0	44	44	44	44	0		
25	35	41	33,7	8,08	312	363	396	357	42,3	125	130	126	127	127	2,64	45	45	45	45	45,3	0,58	45	46	45	45,3	0,58		

Ensaio 13

		Ácido Isobutírico				Ácido Butírico				Ácido Valérico				Ácido Capróico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
8	9	8	8,3	0,57	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0
8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0
8	8	8	8	0	8	8	31	15,7	13,30	17	17	18	17,3	0,58	35	35	38	36	1,73

		Metanol				Etanol				Ácido Acético				Ácido Propiónico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D
9	94	0	31,3	54,27	0	609	0	203	351,6	110	158	110	126	27,71	44	44	44	44	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0
0	0	45	15	25,98	0	0	501	157	289,3	110	110	176	132	38,11	44	44	50	46	3,45

Ensaio 14

		Ácido Isobutírico						Ácido Butírico						Ácido Valérico						Ácido Capróico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	
8	8	8	8	0	8	8	8	8	0	17	17	17	17	0	35	35	35	35	0	35	35	35	35	0	
8	8	9	8,3	0,58	8	8	16	10,7	4,61	17	17	17	17	0	35	35	37	35,7	1,15	35	35	37	35,7	1,15	
8	8	8	8	0	53	50	8	37	25,16	18	18	17	17,7	0,58	41	41	35	39	3,46	41	41	35	39	3,46	

		Metanol						Etanol						Ácido Acético						Ácido Propiónico					
R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	R1	R2	R3	M	D	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	110	110	110	110	0	44	44	44	44	0	44	44	44	44	0	
0	0	247	82,3	142,6	0	0	1159	386,3	669,1	110	110	173	131	36,37	44	44	52	46,7	4,62	44	44	52	46,7	4,62	
74	45	0	39,7	37,29	656	498	0	384,7	342,4	189	214	110	171	54,29	56	57	44	52,3	7,23	56	57	44	52,3	7,23	