

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/10/2020.

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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.

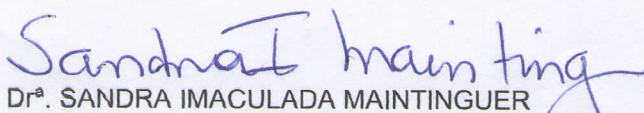
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

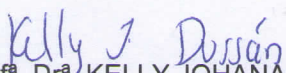
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção biológica de gás hidrogênio a partir de concentrações crescentes de resíduos citrícolas em reatores anaeróbios em batelada sob condições mesofílicas"

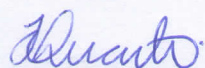
**AUTOR: RENAN PACHIEGA**

**ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER**

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

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

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

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. 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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>. 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>. 2014. (Encontro).

9. 1° Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio. Produção Biológica de H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> a partir de Inóculo Sistema de Tratamento Industrial. 2013. (Congresso).
18. XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Obtenção de Consórcios Bacterianos Produtores de H<sub>2</sub> 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<sup>a</sup> 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 cítricos 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 cítricos 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 cítricos, 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  $H_2$  (Ensaio 9) obtendo  $210 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$ , enquanto que com os outros resíduos  $15,88 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$  (Ensaio 2) e  $46,3 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$  (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 cítricos, os quais são abundantes na região, como substrato na produção biológica de gás hidrogênio.

**Palavras-chaves:** Bioprodução de Hidrogênio. Consórcio Microbiano. Resíduo Cítrico

## 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> (Assay 9) obtaining 210 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, while the best productions of the other wastes 15,88 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Assay 2) and 46,3 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (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 <sub>2</sub> 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 <sup>-1</sup> AR +PYG) .....	65
Figura 5.3-2. Produção acumulada de H <sub>2</sub> ajustada na função Gompertz modificada.....	65
Figura 5.3-3. Produção acumulada de H <sub>2</sub> ajustada pelo método sigmoidal de Gompertz modificado .....	66
Figura 5.3-4. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H <sub>2</sub> alimentados com água residuária.....	73
Figura 5.3-5. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H <sub>2</sub> alimentados com vinhaça citrícola.....	73
Figura 5.3-6. Consumo de carboidratos nos reatores anaeróbios produtores de H <sub>2</sub> 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 <sup>-1</sup> ).....	77

Figura 5.3-10. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 2 (4 g DQO AR L <sup>-1</sup> ) .....	77
Figura 5.3-11. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 6 (12 g DQO VIN L <sup>-1</sup> ) .....	78
Figura 5.3-12. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 7 (36 g DQO VIN L <sup>-1</sup> ) .....	79
Figura 5.3-13. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 8 (55 g DQO VIN L <sup>-1</sup> ) .....	79
Figura 5.3-14. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 9 (69 g DQO VIN L <sup>-1</sup> ) .....	79
Figura 5.3-15. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 10 (77 g DQO VIN L <sup>-1</sup> ) .....	80
Figura 5.3-16. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 11 (2 g DQO EB L <sup>-1</sup> ) .....	80
Figura 5.3-17. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 12 (4 g DQO EB L <sup>-1</sup> ) .....	81
Figura 5.3-18. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 13 (8 g DQO EB L <sup>-1</sup> ) .....	81
Figura 5.3-19. Ácidos graxos voláteis e álcoois quantificados no ensaio 14 (10 g DQO EB L <sup>-1</sup> ) .....	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> .....	54
Tabela 5.1-1. Análise do biogás gerado após os pré-tratamentos impostos.....	61
Tabela 5.2-1. Produção de H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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<sub>3</sub><sup>-</sup>** Ânion carbonato

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** – Ânion bicarbonato

**ADP** Adenosina difosfato

**atm** Atmosferas

**ATP** Adenosina trifosfato

**BESA** *Bromoethanesulfonic acid*

**BRIX** Escala numérica de índice de refração

**CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O** Cloreto de cálcio hexahidratado

**CH<sub>4</sub>** Metano

**CO<sub>2</sub>** Dióxido de Carbono

**CoCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O** Cloreto de Cobalto II dihidratado

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**F<sub>420</sub>** Enzima envolvida em reações de oxido-redução em microrganismos metanogênicos

**F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>** Forma reduzida da enzima F<sub>420</sub>

**FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O** Cloreto de ferro III hexahidratado

**FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** Sulfato de ferro II heptahidratado

**H<sub>2</sub>** Gás Hidrogênio

**HCl** Ácido clorídrico

**HClO<sub>4</sub>** Ácido perclórico

**HNO<sub>3</sub>** Ácido nítrico

**HSO<sub>4</sub>** Ácido sulfúrico

**K** Kelvin

**K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>** Dicromato de Potássio

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** Bifosfato de potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

**KOH** Hidróxido de Potássio

**L** Litro

**MCR** Metil-coenzima M redutase

**n** número de mols

**N<sub>2</sub>** Gás Nitrogênio

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O** Bifosfato de sódio monohidratado

**NaCl** Cloreto de sódio

**NAD<sup>+</sup>** Nicotinamida adenina dinucleotídeo, coenzima hidrossolúvel na sua forma oxidada

**NADH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo, coenzima hidrossolúvel na sua forma reduzida

**NaOH** Hidróxido de Sódio

**NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O** Sulfato de níquel II hexahidratado

**P** Potencial de Produção de Hidrogênio (mmol L<sup>-1</sup>)

**P** Pressão

**R** constante geral dos gases

**R<sub>m</sub>** Taxa máxima de Produção de Hidrogênio (mmol L<sup>-1</sup> h)

**rpm** Rotações por minuto

**SeO<sub>2</sub>** Óxido de selênio

**STV** Sólidos totais voláteis

**T** Temperatura

**THMPT** *Tetrahydromethanopterin*

**V** Volume

**λ** Fase *lag* (h) de geração de H<sub>2</sub>

*e* 2,718281828

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
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
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
3.1	Geral .....	44
3.2	Específicos.....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
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 <sub>2</sub> .....	52
4.12	Análise da Geração de H <sub>2</sub> .....	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
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
5.1	Reativação pré-tratamento de inóculo.....	61
5.2	Testes de montagem de ensaios produtores de H <sub>2</sub> .....	63
5.3	Reatores Anaeróbios em Batelada Produtores de H <sub>2</sub> .....	64
5.4	Análises Microbiológicas .....	82
5.4.1	Microscopia .....	82
5.4.2	Biologia Molecular e Bioinformática.....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A- Obtenção das equações de carboidratos totais.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE B- Obtenção da curva para DQO .....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE C- Determinação de ácidos e álcoois.....</b>	<b>103</b>

*“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 ( $142 \text{ KJ g}^{-1}$ ) (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  $\text{H}_2$ , 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 H<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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

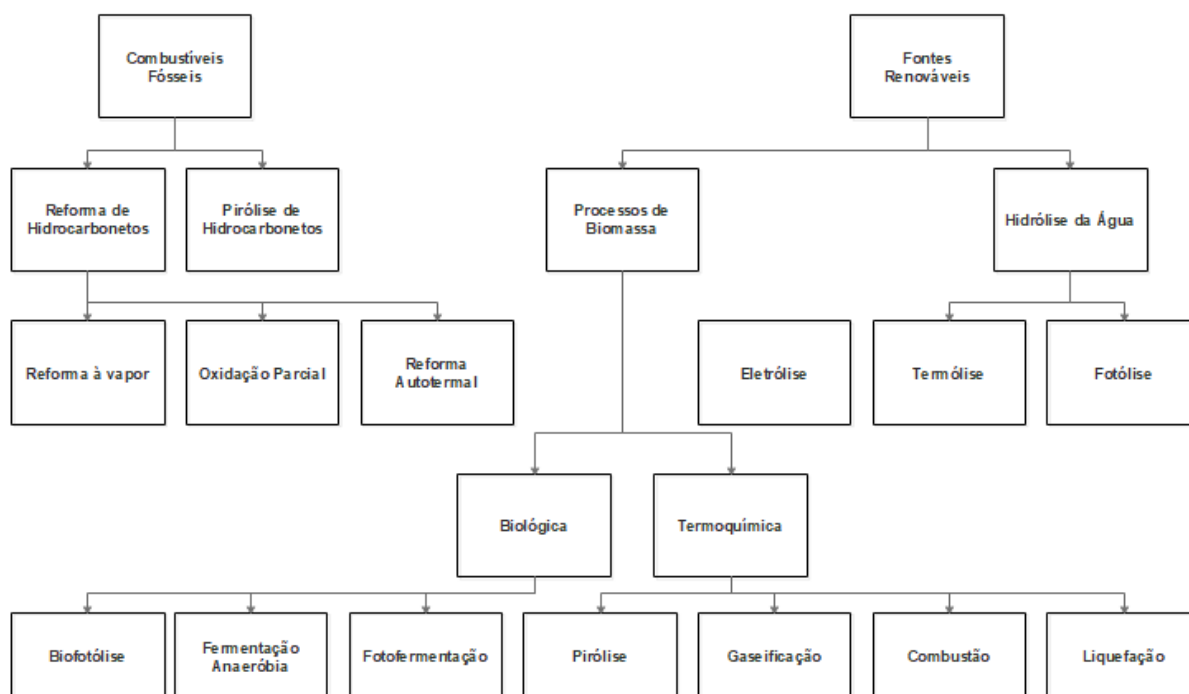
<b>Combustível</b>	<b>Estado a temperatura e pressão ambiente</b>	<b>Valor de combustão superior (MJ kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor de combustão inferior (MJ kg<sup>-1</sup>)</b>
Gás hidrogênio	Gás	142	120
Gás metano	Gás	55,5	50
Gás etano	Gás	52	48
Gasolina	Líquido	48	45
Diesel	Líquido	45	43
Metanol	Líquido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

Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS, 2017

Atualmente a produção de H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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

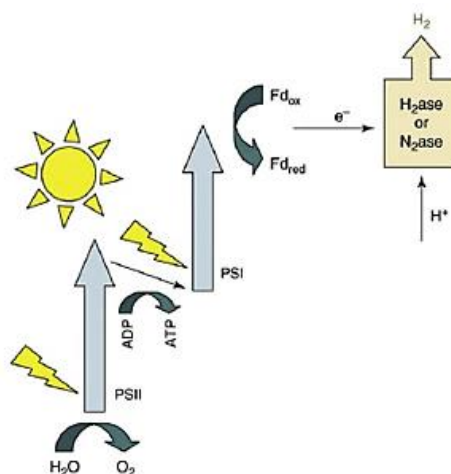


Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS (2017)

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.



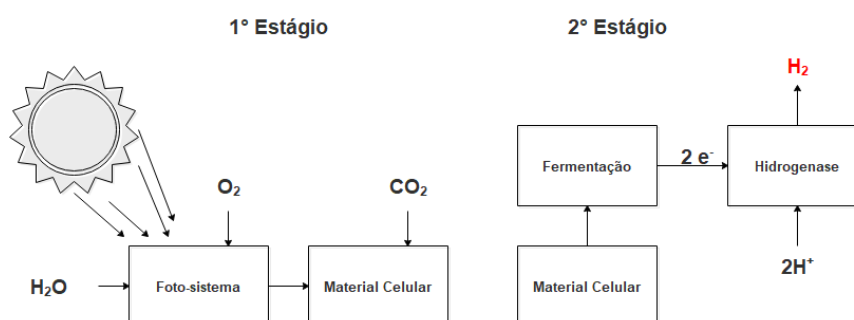
**Figura 2.1-2.** Biofotólise de uma alga verde ou cianobactéria



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



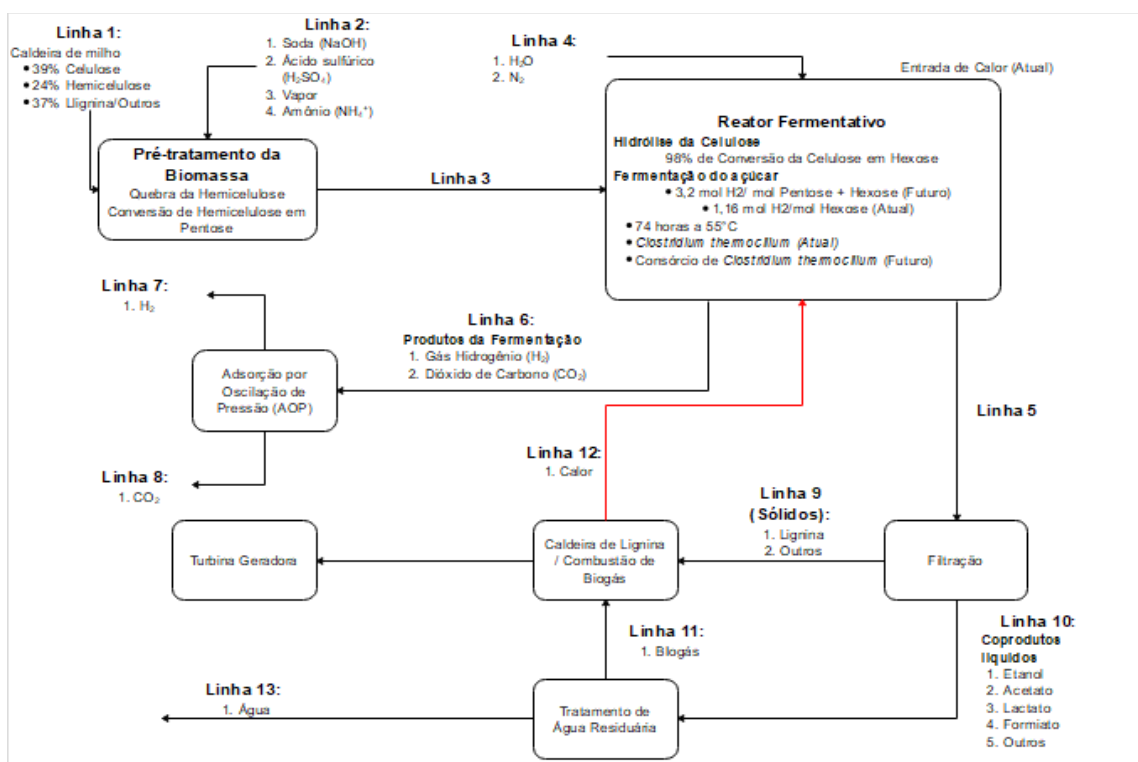
Fonte: Adaptado de NIKOLAIDIS & POULLIKKAS (2017)

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<sub>2</sub> em um reator.

James; Desantis; Saur (2016), trazem um esquema que representa toda uma planta de biogeração de H<sub>2</sub> (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<sub>2</sub> e 8,19 dólares pelo kg de H<sub>2</sub> produzido.

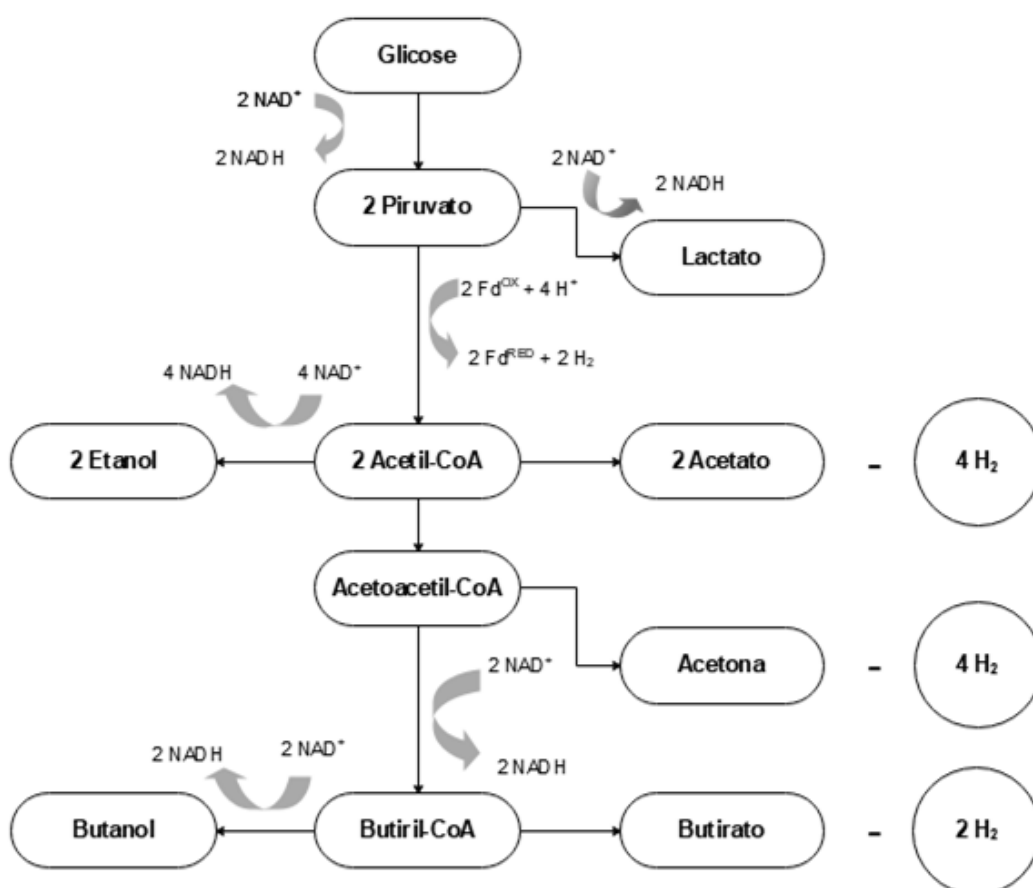
**Figura 2.1-4.** Linha de produção para projetar um curto de H<sub>2</sub> produzido via fermentação com capacidade de 50,000 kg por dia



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*



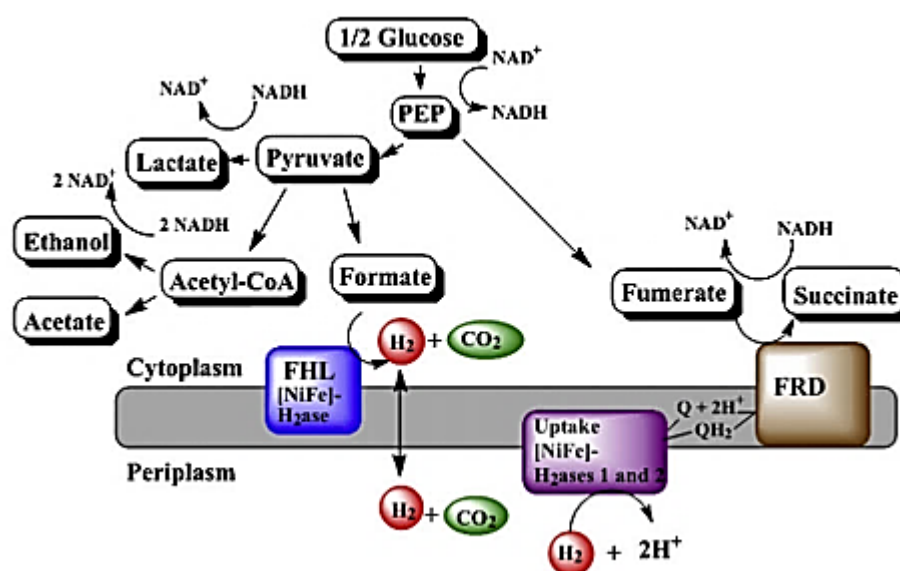
Fonte: Adaptado de MATHEWS; WANG, 2009

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<sup>+</sup>. Nas condições anaeróbias os produtos gerados durante a fermentação estão em sua forma reduzida e ajudam a célula a manter o suplemento de NAD<sup>+</sup> 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).

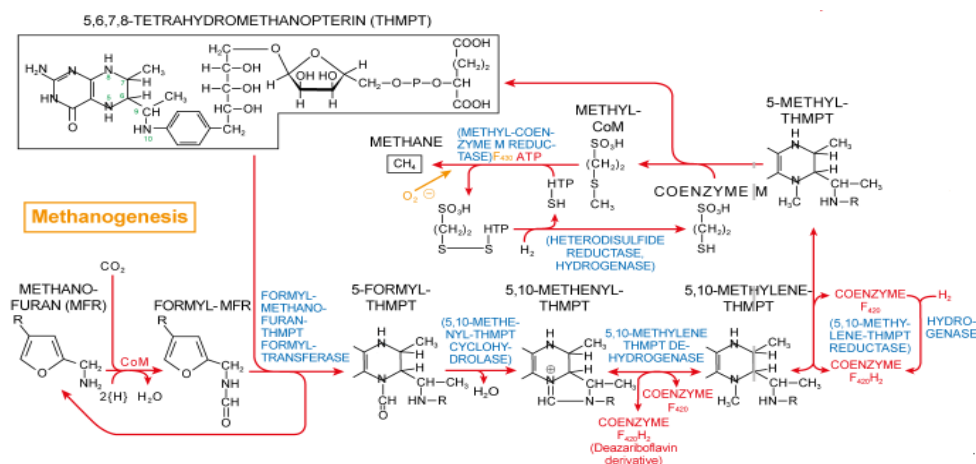
Para que o processo de produção de  $H_2$  ocorra é preciso inativar ou inibir o processo natural da cadeia metanogênica e estes métodos serão melhor explicados na próxima seção.

### 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 CO<sub>2</sub> para metano utiliza elétrons provenientes da oxidação de H<sub>2</sub> (WELANDER; METCALF, 2005). Logo no início da rota metabólica, o CO<sub>2</sub> gerado durante o processo fermentativo reage com o Metano-furano e com dois prótons provenientes da quebra hidrogenotrófica da molécula de H<sub>2</sub>. Mais à frente na rota, a coenzima F<sub>420</sub> sofre redução para a forma F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>, que por sua vez transporta esses elétrons para a 5-Metil THMPT. Há consumo de H<sub>2</sub> no processo em que a enzimas Hidrogenase e a Heterodissulfeto Redutase auxiliam na formação da Coenzima M, essencial na formação de CH<sub>4</sub>. São necessários 4 mols de H<sub>2</sub> para a formação de um mol de CH<sub>4</sub> (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 H<sub>2</sub> gerado durante a etapa fermentativa. Para efetuar essa quebra da cadeia, pré-tratamentos são utilizados visando a inativação de microrganismos capazes de capturar esse H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 láctico, 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 H<sub>2</sub>. 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 láctico e propiônico. Portanto, grande parte dos microrganismos consumidores de H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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

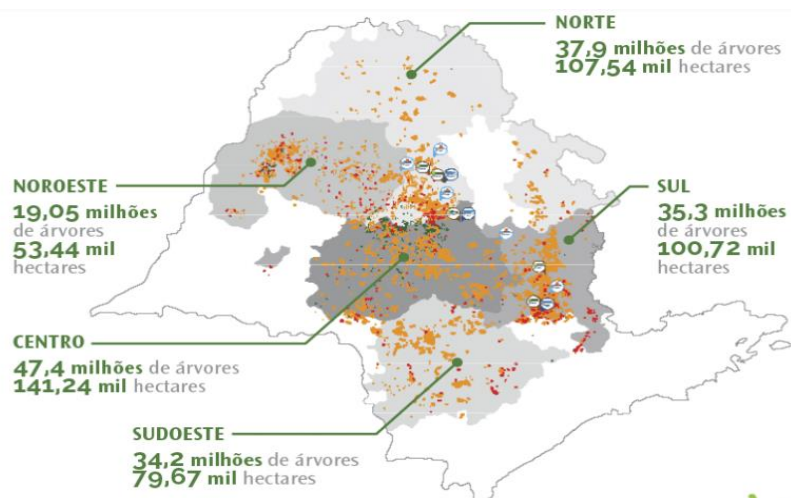


Fonte: SOUZA *et al.*, (2013)

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 H<sub>2</sub>.

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 H<sub>2</sub>. 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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  $H_2$  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  $H_2$ . 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  $H_2$  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  $H_2$  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*

*“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 H<sub>2</sub>. O tratamento ácido se mostrou mais eficiente e favoreceu uma maior produção de H<sub>2</sub>.

O consórcio anaeróbio gerado a partir do inóculo com pré-tratamento ácido mostrou potencial mais elevado na produção biológica de H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> para o ensaio 9, realizado com vinhaça a 69 g DQO L<sup>-1</sup>, resultando em 210, 19 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>. **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.