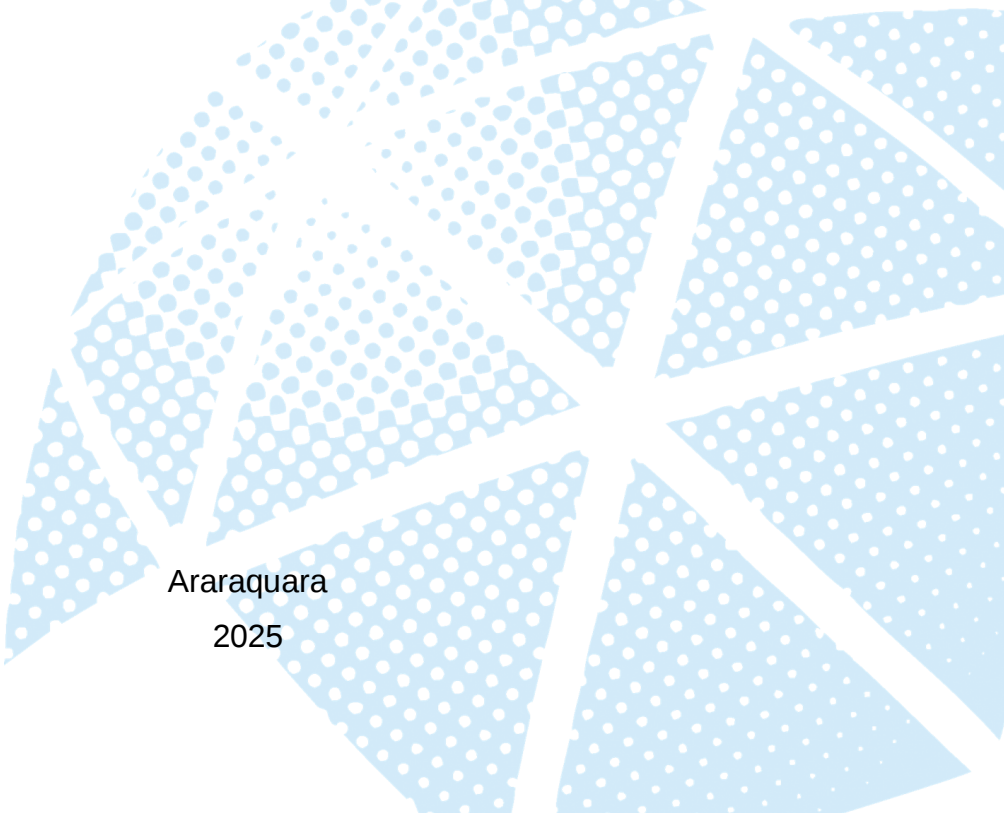


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

GABRIEL SILVA RIBEIRO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR DIGESTÃO ANAERÓBIA
COM RESÍDUO DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA BANANA USANDO
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Araraquara
2025



GABRIEL SILVA RIBEIRO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR DIGESTÃO ANAERÓBIA
COM RESÍDUO DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA BANANA USANDO
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Sandra Imaculada Maintinguer

Araraquara

2025

R484o Ribeiro, Gabriel Silva
Otimização da produção de hidrogênio por digestão anaeróbia com resíduo do processamento industrial da banana usando metodologia de superfície de resposta / Gabriel Silva Ribeiro. -- Araraquara, 2025
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

1. Hidrogênio. 2. Metano. 3. Digestão anaeróbia. 4. Otimização matemática. 5. Banana. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A produção de biogás a partir dos resíduos do processamento agroindustrial da banana apoia diversas ODS, destacando-se a ODS 7 (Energia Limpa e Acessível), ao gerar energia renovável; a ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao reduzir o desperdício; e a ODS 13 (Ação Climática), ao diminuir emissões de gases de efeito estufa.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The production of biogas from the residues of the agro-industrial processing of bananas supports several SDGs, particularly SDG 7 (Affordable and Clean Energy), by generating renewable energy; SDG 12 (Responsible Consumption and Production), by reducing waste; and SDG 13 (Climate Action), by decreasing greenhouse gas emissions.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Otimização da produção de hidrogênio por digestão anaeróbia com resíduo do processamento industrial da banana usando metodologia de superfície de resposta"

AUTOR: GABRIEL SILVA RIBEIRO

ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

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

Documento assinado digitalmente
SANDRA IMACULADA MAINTINGUER
Data: 30/01/2025 15:41:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
LORENA OLIVEIRA PIRES
Data: 30/01/2025 11:06:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a LORENA OLIVEIRA PIRES (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente
MARCUS CESAR AVEZUM ALVES DE CASTRO
Data: 30/01/2025 12:30:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCUS CESAR AVEZUM ALVES DE CASTRO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Geociências e Ciências Exatas - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 30 de janeiro de 2025

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	GABRIEL SILVA RIBEIRO 03/07/1999
Nacionalidade	brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Ribeiro, G. S.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Biotecnologia Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (11) 94042-8611
Currículo Lattes	https://wwws.cnpq.br/cvlattesweb/PKG_MENU.menu?f_cod=0926E5B3EF7D4F1904CB9BCA1399DE5F#
ORCID	
outro identificador	
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
67051	Engenharia Ambiental concedendo o título de engenheiro ambiental na UNESP
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
RIBEIRO, Gabriel Silva. Avaliação de pré-tratamentos em resíduos agroindustriais visando à geração de biogás em reatores anaeróbios em batelada. Trabalho de Formatura (Curso de Graduação em Engenharia Ambiental) - Rio Claro (SP), 2022. Orientadora: Prof(a). Dr(a). Sandra Imaculada Maintinguer	
PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES	
Bancas de trabalhos de conclusão	
Orientações	

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- a. “Aplicação de pré-tratamentos em resíduos agroindustriais de goiaba: efeitos na produção de biometano” por Gabriel Silva Ribeiro, Ivan Mangini Sandra Imaculada Maintinguer e;
- b. “Avaliação de pré-tratamentos térmico com adições de ácido acético em resíduos agroindustriais do processamento de goiaba para geração de biogás” por Isadora Caroline Barbosa, Gabriel Silva Ribeiro, Laura Gabriele de Souza e Sandra Imaculada Maintinguer, III workshop de Fruto-Refinaria, P&D na Unesp/IPBEN, junho de 2023.
- c. “Avaliação de pré-tratamentos térmico com adições de ácido acético em resíduos agroindustriais do processamento de goiaba para geração de biogás” por Isadora Caroline Barbosa, Gabriel Silva Ribeiro, Laura Gabriele de Souza e Sandra Imaculada Maintinguer - XXXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, 10 e 11 de outubro de 2023.
- d. “Effect of pretreatments applied in agro-industrial guava residues to methane generation” por Ribeiro Gabriel Silva, Mangini Ivan, Maintinguer Sandra Imaculada e;
- e. “Sustainable biohydrogen production from banana processing wastewater” por Freire Cintia Cristina da Costa, Marin Danieli Fernanda Canaver, Ribeiro Gabriel Silva, Maintinguer Sandra Imaculada. XIV Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. Queretaro, Mexico, 23 a 27 de outubro de 2023.
- f. “Application of Thermal and Acid Pretreatments in Guava Agro-Industrial Waste to Methane Generation in Anaerobic Batch Reactors” por Gabriel Silva Ribeiro e Sandra Imaculada Maintinguer e;
- g. “Application of Pre-Treatments with Acetic Acid in Agro-Industrial residues to biomethane production” por Isadora Caroline Barbosa, Sandra Imaculada Maintinguer, Gabriel Silva Ribeiro e Laura Gabriele de Souza VIII SIGERA – International Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management. Caxias do Sul, 06 a 10 de novembro de 2023.
- h. “Effect of pretreatments applied in agro-industrial guava residues to Methane generation” por Gabriel Silva Ribeiro e Sandra Imaculada Maintinguer, VII Workshop of Bioenergy, PhD na Unesp/IPBEN, 12 de dezembro de 2023.
- i. “Performance of autochthonous and allochthonous inocula for hydrogen production from banana waste” por Gabriel Silva Ribeiro e Sandra Imaculada Maintinguer, 18th IWA World Conference on Anaerobic Digestion (IWA AD18), Istambul, Turquia, 02 a 06 de junho de 2024.
- j. “Valorização de resíduos da banana na obtenção de biogás por digestão anaeróbia” por Isabella Cristina Abelar, Gabriel Silva Ribeiro e Sandra Imaculada Maintinguer e;
- k. “Avaliação de resíduos agroindustriais da banana pré-tratados com adições de ácidos nas gerações de hidrogênio e metano” por Isadora Caroline Barbosa, Gabriel Silva Ribeiro, Luiz Scaliante Bezerra e Sandra Imaculada Maintinguer - XXXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, 19 e 20 de setembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo número: 88887.834057/2023-00.

RESUMO

A fruticultura é um setor econômico importante, e o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas. A produção de banana se destaca no agronegócio, mas a geração de resíduos preocupa ambiental e economicamente. Uma solução é o aproveitamento desses resíduos para biogás via processos anaeróbios. Este estudo testou resíduos sólidos de banana (casca+polpa) e água residuária do processamento do doce de banana em reatores anaeróbios batelada para otimizar a produção de biogás. As etapas incluíram: 1) caracterização dos substratos e inóculo; 2) planejamento experimental com variações de temperatura, pH inicial e relação Substrato/Inóculo para produção de hidrogênio; 3) testes em reatores acidogênicos; 4) testes em reatores metanogênicos e metano direto; 5) avaliação com água residuária e análises metagenômicas. Na caracterização, verificou-se alta concentração de carboidratos. A modelagem matemática indicou condições ótimas de 41,8°C, pH 4,88 e S/I 2,48 ($R^2=99,75$). Nos reatores acidogênicos, obteve-se 2359 mL H_2 /L, com 91,52% de consumo de carboidratos e formação de ácidos graxos e etanol. Nos metanogênicos (37°C, pH 7, S/I 2,48), geraram-se 1903 mL CH_4 /Lr, com 96,31% de consumo de matéria orgânica. O tempo 80 foi de 9,75h para hidrogênio e 79,5h para metano. O rendimento energético foi de 4181,32 KJ Mol^{-1} para metano direto e 4334,44 KJ Mol^{-1} para biossistema integrado. Com água residuária, o consumo de carboidratos foi de 95%, com produção de 981,33 mL H_2 /Lr e metabólitos como etanol, ácido acético e butírico. O efluente removeu 86,87% da DQO inicial e gerou metano. A metagenômica revelou *Clostridium sensu stricto* 1 (hidrogênio) e *Methanosaeta* (metano via rota acetoclástica). As condições testadas otimizaram a produção de biogás e demonstraram alta eficiência no tratamento de matéria orgânica.

Palavras-chave: hidrogênio; metano; digestão anaeróbia; otimização matemática; banana.

ABSTRACT

Fruit farming is an important economic sector, with Brazil ranking as the third-largest fruit producer worldwide. Banana production stands out in agribusiness, but waste generation raises environmental and economic concerns. One solution is utilizing these residues for biogas production through anaerobic processes. This study tested solid banana waste (peel + pulp) and wastewater from banana sweet processing in batch anaerobic reactors to optimize biogas production. The stages included: 1) characterization of substrates and inoculum; 2) experimental planning with variations in temperature, initial pH, and Substrate/Inoculum ratio for hydrogen production; 3) tests in acidogenic reactors; 4) tests in methanogenic reactors and direct methane production; 5) evaluation with wastewater and metagenomic analyses. Characterization revealed a high carbohydrate concentration. Mathematical modeling indicated optimal conditions of 41.8°C, pH 4.88, and S/I 2.48 ($R^2 = 99.75$). In acidogenic reactors, 2359 mL H_2 /L was obtained, with 91.52% carbohydrate consumption and the formation of volatile fatty acids and ethanol. In methanogenic reactors (37°C, pH 7, S/I 2.48), 1903 mL CH_4 /Lr was produced, with 96.31% organic matter consumption. The T_{80} time was 9.75h for hydrogen and 79.5h for methane. The energy yield was 4181.32 KJ Mol^{-1} for direct methane and 4334.44 KJ Mol^{-1} for the integrated biosystem. With wastewater, carbohydrate consumption reached 95%, producing 981.33 mL H_2 /Lr and metabolites such as ethanol, acetic acid, and butyric acid. The effluent removed 86.87% of the initial COD and generated methane. Metagenomic analysis revealed *Clostridium sensu stricto* 1 (hydrogen production) and *Methanosaeta* (methane via the acetoclastic pathway). The tested conditions optimized biogas production and demonstrated high efficiency in organic matter treatment.

Keywords: hydrogen; methane; anaerobic digestion; mathematical optimization; banana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Quantidade produzida de banana (Toneladas x Mês).....	20
Figura 2 –	Processos de digestão anaeróbia.....	22
Figura 3 –	Fluxograma experimental das atividades realizadas.....	29
Figura 4 –	Ensaio de otimização da produção de hidrogênio.....	34
Figura 5 –	Digestão anaeróbia em dois estágios.....	39
Figura 6 –	Diagrama de pareto.....	47
Figura 7 –	Superfície de resposta dos efeitos com pH inicial fixado em 5,37.....	50
Figura 8 –	Superfície de resposta dos efeitos com S/I fixada em 1,925.....	50
Figura 9 –	Superfície de resposta dos efeitos com temperatura fixada em 33,5°C.....	51
Figura 10 –	Remoção de Carboidratos totais (em %) para as condições testadas (1 a 15) no ensaio realizado.....	52
Figura 11 –	Concentrações de metabólitos gerados durante operação dos reatores com resíduo sólido de banana.....	58
Figura 12 –	Concentração de Carboidrato Total durante a operação dos reatores.....	59
Figura 13 –	Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada para geração de hidrogênio em reatores anaeróbios operados com resíduo sólido de Banana.....	60
Figura 14 –	Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator otimizado com resíduo sólido de Banana.....	67
Figura 15 –	Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator maior observado com resíduo sólido de Banana.....	67
Figura 16 –	Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator ponto central com resíduo sólido de Banana.....	68
Figura 17 –	Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator menor observado com resíduo sólido de Banana.....	68
Figura 18 –	Remoção de DQO Total durante a operação dos reatores.....	69
Figura 19 –	Volume acumulado temporal metano em reator de segundo estágio e metano direto.....	70
Figura 20 –	Remoção de Carboidrato Total durante a operação dos reatores....	71

Figura 21 –	Remoção de DQO Total e Carboidratos (em %) para produção de H_2	72
Figura 22 –	Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada para geração de hidrogênio em reatores anaeróbios operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana.....	73
Figura 23 –	Proporções de metabólitos gerados durante operação água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana.....	77
Figura 24 –	Remoção de DQO Total durante a operação dos reatores.....	77
Figura 25 –	Remoção de DQO Total e Carboidratos (em %) para produção de CH_4	78
Figura 26 –	Volume acumulado temporal de biogás (Metano).....	79
Figura 27 –	Abundância relativa de gêneros para Bacteria e Archaea em reatores acidogênicos no início e fim da operação.....	83
Figura 28 –	Ideograma circular “Circos” na variação das abundancias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas no início e final do ensaio da fase acidogênica.....	84
Figura 29 –	Abundância relativa de gêneros para Bacteria e Archaea em reatores metanogênicos no início e fim da operação.....	87
Figura 30 –	Ideograma circular “Circos” na variação das abundancias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas no início e final do ensaio na fase metanogênica.....	88
Figura 31 –	Estimativa energética para reatores em biossistema integrado (hidrogênio + metano) e metano direto.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Volumes de solução de KHP usados na preparação de curva analítica.....	30
Tabela 2 –	Composição do esgoto doméstico sintético.....	31
Tabela 3 –	Composição do meio Del Nery com vitamina B12.....	33
Tabela 4 –	Montagem de reatores de acordo com a relação S/I.....	34
Tabela 5 –	Valores reais das variáveis e seus níveis codificados utilizadas no BBD.....	35
Tabela 6 –	Matriz de delineamento experimental das três variáveis investigadas e variáveis resposta.....	36
Tabela 7 –	Condições dos ensaios.....	39
Tabela 8 –	Caracterização do substrato e inóculo.....	44
Tabela 9 –	Matriz de delineamento experimental das três variáveis investigadas e variáveis resposta.....	47
Tabela 10 –	Análise de regressão.....	47
Tabela 11 –	ANOVA realizada para os dados obtidos para a produção de Hidrogênio.....	49
Tabela 12 –	Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 1 (pH inicial 4,25; temperatura 22; S/I de 1,92), 2 (pH inicial 4,25; temperatura 45; S/I de 1,92) 3 (pH inicial 6,5; temperatura 22; S/I de 1,92) e 4 (pH inicial 6,5; temperatura 45; S/I de 1,92).....	53
Tabela 13 –	Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 5 (pH inicial 5,37; temperatura 22; S/I de 0,65), 6 (pH inicial 5,37; temperatura 45; S/I de 0,65) 7 (pH inicial 5,37; temperatura 22; S/I de 3,2) e 8 (pH inicial 5,37; temperatura 45; S/I de 3,2).....	54
Tabela 14 –	Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 9 (pH inicial 4,25; temperatura 33,5; S/I de 0,65), 10 (pH inicial 6,5; temperatura 33,5; S/I de 0,65) 11 (pH inicial 4,25;	

	temperatura 33,5; S/I de 3,2) e 12 (pH inicial 6,5; temperatura 33,5; S/I de 3,2).....	55
Tabela 15	– Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 13 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92), 14 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92) e 15 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92).....	56
Tabela 16	– Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Hidrogênio em reatores com resíduo sólido de Banana.....	60
Tabela 17	– Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição otimizada operados com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.....	62
Tabela 18	– Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição maior observado operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.....	63
Tabela 19	– Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição ponto central operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.....	64
Tabela 20	– Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição menor observado operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.....	65
Tabela 21	– Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Metano.....	70
Tabela 22	– Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Hidrogênio em reatores com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana....	73
Tabela 23	– Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana durante produção de Hidrogênio.....	75
Tabela 24	– Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Metano.....	79

Tabela 25 –	Abundâncias relativas (%) do Dominio Bacteria para taxonomias de Filo e de Gênero para as amostras no início e no final da operação dos reatores acidogênicos com resíduos sólidos da banana.....	82
Tabela 26 –	Abundâncias relativas (%) das taxonomias de Filo e de Gênero para o Dominio Archaea em amostras no início e no final da operação dos reatores metanogênicos operados com efluente dos reatores acidogênicos.....	86
Tabela 27 –	Cálculo do T80 para os reatores de Hidrogênio e Metano.....	89
Tabela 28 –	Comparação entre resíduos sólidos e água residuária.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Parâmetros, métodos e referências utilizadas.....	40
-------------------	---	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 –	Função Gompertz Modificada.....	41
Equação 2 –	Perspectivas de Reuso Energético Hidrogênio.....	42
Equação 3 –	Perspectivas de Reuso Energético Metano.....	42
Equação 4 –	Modelo Polinomial Quadrático.....	48
Equação 5 –	Fermentação do tipo acetato.....	57
Equação 6 –	Rota metabólica de n-butanol.....	66
Equação 7 –	Fermentação etanólica.....	67
Equação 8 –	Fermentação do tipo butirato.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS.....	189
3	REVISÃO BIBLIOGRAFIA.....	20
3.1	Resíduos agroindustriais de frutas	20
3.2	Digestão anaeróbia	21
3.3	Bactérias fermentativas	23
3.4	Archaeas metanogências	24
3.5	Lodo granular	25
3.6	Codigestão	26
3.7	Esgoto sanitário	26
3.8	Justificativa do presente estudo	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Etapa preliminar	29
4.2	Etapa 1 – Caracterização dos substratos e inóculo	30
4.3	Etapa 2 – Testes de Otimização da produção de hidrogênio em reatores operados com resíduos sólidos da banana	33
4.4	Etapa 3 – Testes para a confirmação da condição otimizada obtida nas gerações de hidrogênio em Biossistemas Integrados para produção de hidrogênio	36
4.5	Etapa 4 – Teste para a condição otimizada em Biossistemas Integrados para produção de metano e em Biossistema único para produção de metano	37
4.6	Etapa 5 – Ensaio da melhor condição obtida em reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana em Biossistemas integrados para produção de hidrogênio e de metano	38
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Etapa 1 – Caracterização dos substratos e inóculo	44
5.2	Etapa 2 – Testes de Otimização da produção de hidrogênio em reatores operados com resíduos sólidos da banana	45

5.3	Etapa 3 – Testes para a condição otimizada obtida nas gerações de hidrogênio em Biossistemas Integrados para produção de hidrogênio e de metano	58
5.4	Etapa 4 – Teste para a condição otimizada em Biossistema único para produção de metano	68
5.5	Etapa 5 – Ensaio da melhor condição obtida em reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana em Biossistemas integrados para produção de hidrogênio e de metano	71
6	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O descarte inadequado de resíduos sólidos orgânicos causa uma série de impactos ambientais. Uma quantidade significativa de resíduos sólidos orgânicos, provenientes de materiais de origem vegetal, são rejeitados, descartados ou dispostos de forma inadequada, principalmente os advindos do processamento industriais de frutas como a banana e seus derivados como purês, sucos, licores, farinhas e balas (PEREIRA NETO et al., 2007).

A banana é um dos mais importantes produtos subtropicais comercializados com produção anual global superior 120 milhões de toneladas (Manhongo, 2022). Embora geralmente seja consumido in natura, diversos derivados da banana, como balas, salgadinhos, frutos secos, compotas e vinhos de banana, entre outros, ganharam espaço no mercado, o que demonstra a grande versatilidade e valorização desta fruta e seus derivados processados (Aurore, 2009).

A constituição dos resíduos gerados a partir do processamento industrial da banana são ricos em celulose e lignina, proveniente das cascas, que podem reter a liberação de açúcares como glicose e frutose e assim serem facilmente degradáveis por processos biológicos anaeróbios, com consequente geração de metano.

O biogás surge como uma fonte energética alternativa por ser energia reciclável, renovável e limpa que pode ser utilizada diretamente como combustível. O uso de biogás está em desenvolvimento no mundo como um todo porque apresenta vantagens únicas, como conversão de energia, redução da emissão de gases de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global, além de questões sociais. Entretanto, o biogás pode ser obtido de diversas fontes. Os resíduos orgânicos facilmente degradáveis como os da agroindústria, principalmente do processamento de frutas, podem ser utilizados na digestão anaeróbia para obtenção de biogás (GAO et al., 2019).

Esgoto sanitário também pode ser utilizado em codigestão pois permite um equilíbrio de nutrientes que reduz a possibilidade de inibição, além de apresentar alcalinidade que faz com que seja suportado substratos com alta quantidade de matéria orgânica facilmente degradável (MATA-ALVAREZ et al., 2014).

Estudos de superfície de resposta podem ser utilizados para avaliar a influência das condições operacionais e demais fatores na digestão anaeróbia, a partir de resíduos do processamento industrial da banana e assim obter a condição ideal ótima para gerações elevadas de biogás.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar eficiência na geração de biogás (Hidrogênio e Metano), em reatores anaeróbios em batelada no tratamento de resíduos do processamento industrial da banana em dois estágios sequenciais (acidogênico e metanogênico), co-digeridos em esgoto sanitário, otimizados previamente em estudo de superfície de resposta.

Específicos:

- Avaliar os efeitos das variações de pH, temperatura e relação S/I (Substrato/Inoculo) na produção de Hidrogênio;
- Identificar a condição ótima para a produção de Hidrogênio;
- Avaliar a condição ótima em relação aos reatores observados durante o planejamento experimental na produção de hidrogênio;
- Avaliar a produção de metano a partir da fração líquida da fase acidogênica na condição ótima para a produção de Hidrogênio;
- Avaliar a produção de metano direto;
- Avaliar a remoção de carboidratos totais na operação dos reatores acidogênicos e remoção de matéria orgânica em reatores metanogênicos;
- Avaliar condição otimizada para produção de hidrogênio e o uso de seu efluente para produção de metano;
- Identificar os consórcios de bactérias e archaeas presentes durante a operação dos reatores acidogênicos e metanogênicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE FRUTAS

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, ficando atrás somente de Índia, China e Indonésia, beneficiado pelas suas condições climáticas favoráveis. No ano de 2024 o volume mensal estimado da produção nacional de banana superou a marca de 6,8 milhões de toneladas (Figura 1). Além disso, o volume de exportação nacional em maio de 2024 chegou a 5,73 mil toneladas da fruta (Comex Stat).

De acordo com os dados do IBGE, a safra 2021/22 foi de cerca de 7 milhões de toneladas, em uma área de 453.273 hectares. Um mercado que movimenta mais de R\$ 13,8 bilhões por ano (IBGE 2023).

Parte dessa produção é destinada ao mercado externo. Segundo a Secretaria de Comércio Exterior (Secex), no ano de 2022, foram embarcadas 83 mil toneladas, com receita de U\$S 37 milhões. Os maiores importadores foram a União Europeia e os países do Mercosul.

A Figura 1 ilustra a produção de banana no Brasil até agosto de 2024, com produções médias mensais de 6882548 toneladas. Entretanto, parte dos frutos (casca + polpa) é descartado por estar impróprio para a comercialização em varejões e supermercados. Pesquisa realizada na Central Estadual de Abastecimento S/A - Ceasa de Recife, para quantificar perdas na comercialização, registrou perda de 21,5% no entreposto e de 16,5% nas feiras livres. A pesquisa demonstrou que no triênio 1990-1992 as perdas pós-colheita foram da ordem de US\$ 500 milhões (CORTEZ et al., 2002).

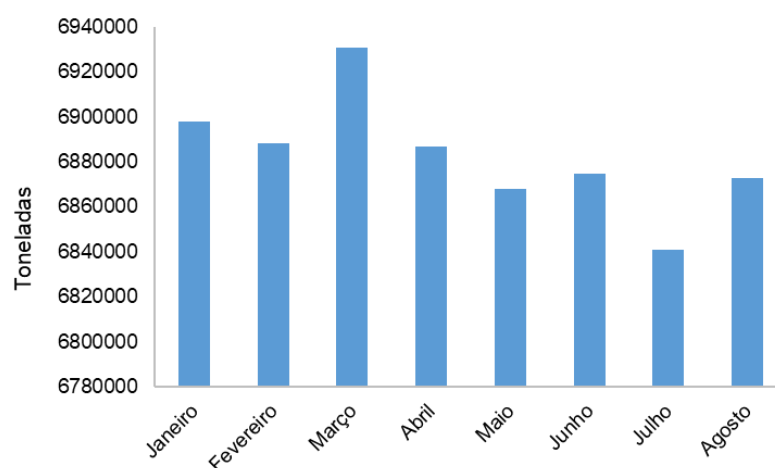


Figura 1 - Quantidade produzida de banana (Toneladas x Mês)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O processamento das frutas é uma atividade agroindustrial importante devido a possibilidade de agregar valor econômico, além de minimizar perdas nos casos de consumo no período entressafra e de utilização de frutas as quais não se adequem ao padrão ideal de consumo in natura. Entretanto, parte da fruta é rejeitada ao longo de seu processamento, com carga orgânica elevada que, quando não tratados, geram um passivo ambiental, que por sua vez acabam dispostos em aterros sanitários ou descartados em lugares inadequados (DE CARVALHO JÚNIOR; MAINTINGUER 2022).

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

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

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

3.2 Digestão anaeróbia

A geração de biogás tem sido aplicada a partir de resíduos orgânicos por digestão anaeróbia onde são convertidos substratos orgânicos tais como ácidos graxos voláteis, álcoois, os gases Hidrogênio, Dióxido de Carbono e Metano. Esta atividade é decorrente da ação de microrganismos na ausência de oxigênio, dividida em 4 fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na hidrólise, os polímeros complexos são reduzidos em moléculas dissolvidas menores, que assim

podem atravessar a parede celular dos microrganismos fermentativos para seus metabolismos. Dessa forma são transformados lipídios em ácidos graxos, proteínas em aminoácidos, além de polissacarídeos em açúcares menores (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005).

Em seguida, na acidogênese, os produtos solúveis oriundos da hidrólise são metabolizados e convertidos em diversos compostos mais simples, que então serão excretados pelas células, a exemplo dos ácidos graxos voláteis, alcoóis, cetonas, gás carbônico e hidrogênio. A seguir, na acetogênese ocorre a oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para as archaeas metanogênicas (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005).

Finalmente, na metanogênese os compostos orgânicos (acetato, gás carbônico e hidrogênio) são sintetizados em metano, através da ação das archaeas metanogênicas (VON SPERLING; CHERNICHARO, 2005) (Figura 2).

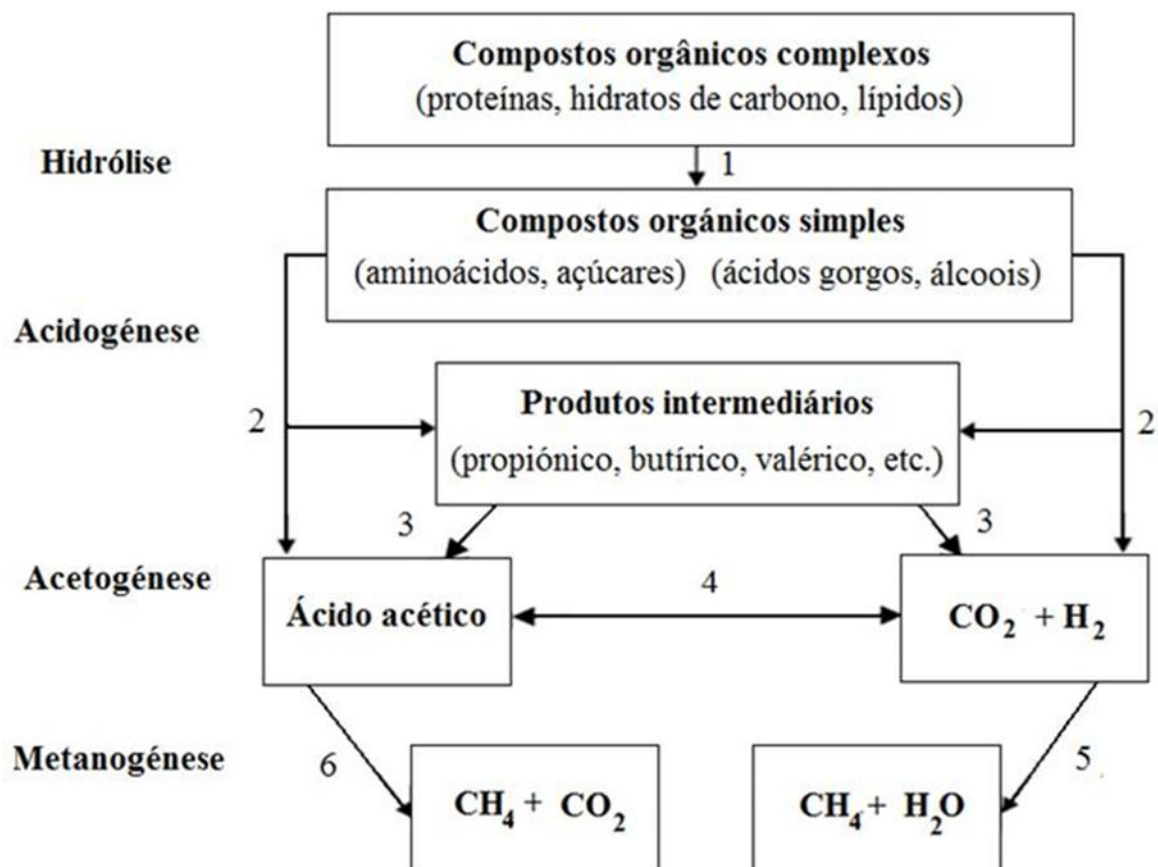


Figura 2 - Processos de digestão anaeróbia

Fonte: Suárez (2014).

Tipos de bactérias: (1) fermentativas, (2) acidogênicas, (3) acetogênicas produtoras de hidrogênio, (4) homoacetogênicas, (5) metanogênicos hidrogenotróficos, (6) metanogênicos metilotróficos.

3.3 Bactérias fermentativas

Na digestão anaeróbia, é possível obter outros produtos de interesse biotecnológico como por exemplo, os ácidos orgânicos voláteis e álcoois produzidos na etapa acidogênica e acetogênica, além do biogás. Os ácidos orgânicos comumente formados nestas etapas são os seguintes: acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, láctico, crotônico e caproico, além dos principais álcoois, tais como metanol, etanol e isobutanol. A formação destes produtos depende de diversos fatores, dentre eles a temperatura, tipo de substrato, pH do meio reacional e principalmente a origem do inóculo, uma vez que as populações microbianas presentes podem determinar as rotas metabólicas predominantes (Kunz et al., 2019).

Miceli et al. (2016) relacionaram a diferentes doadores de elétrons (glicose, sacarose, lactato e melaço) com os principais metabólitos produzidos (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, hidrogênio e metano) e as populações microbianas predominantes no processo. Os autores concluíram que o doador de elétrons é um dos principais fatores no estabelecimento dessas populações nos reatores anaeróbios.

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

Uma vez que, tanto a obtenção de hidrogênio, quanto de ácidos orgânicos consiste em uma etapa intermediária da digestão anaeróbia. Quando o objetivo do processo é a obtenção de um destes produtos finais, a reação deve ser interrompida nesta fase, caso contrário haverá consumo destes produtos como substrato para a metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica, respectivamente. Para tanto, é

importante que as condições operacionais sejam bem estabelecidas e controladas, o que justifica a importância do estudo das faixas ideais de temperatura, pH, condições nutricionais do meio, entre outros (DE CLERCQ et al., 2017).

Em relação às principais populações envolvidas na fermentação, bactérias fermentativas acidogênicas como *Clostridium* sp. são produtoras de hidrogênio, muito estudadas, devido ao seu caráter ubíquo e diversidade metabólica. Entretanto, gêneros como *Bacillus* sp., *Klebsiella* e *Enterobacter* também podem estar associados ao processo de obtenção de produtos de interesse biotecnológico incluindo ácidos graxos voláteis e álcoois por meio de processos anaeróbios (MAINTINGUER et al., 2017; RABELO et al., 2018a; MAZARELI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

3.4 Archaeas metanogênicas

A metanogênese é a última etapa do processo de degradação anaeróbia e realizada por microrganismos do Domínio Archaea, que são anaeróbios estritos, cujo produto final é o gás metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), sendo um processo essencial para o ciclo do carbono. As archaeas metanogênicas podem ser encontradas em diversos ambientes anaeróbios e limitados em relação à luminosidade, nitrato e sulfato, mas com disponibilidade de compostos orgânicos complexos, como fontes termais, sedimentos de água doce, digestor anaeróbio e no intestino de animais de sangue quente e rúmen (DEPPENMEIER, 2002).

A obtenção de metano ocorre ao final da digestão anaeróbia por consórcio microbiano, de hidrólise, acidogênese, acetogênese, para que finalmente a matéria orgânica seja convertida em biogás na etapa de metanogênese, sendo que do total de biogás formado, geralmente 50-80% é metano (WALTER et al., 2016). A metanogênese pode ser acetoclástica, ou seja, realizada a partir do acetato gerado durante a acetogênese ou hidrogenotrófica, a partir do Hidrogênio e CO_2 (DEPPENMEIER, 2002; ZHENG et al., 2014).

Os organismos metanogênicos são diversos, tanto geneticamente quanto morfológicamente (DEPPENMEIER, 2002). Os principais gêneros associados à metanogênese em condições mesofílicas são *Methanobacterium*, *Methanocaldococcus* e *Methanosarcina* e, em condições termofílicas, os gêneros mais frequentes são *Methanothermobacter* e *Methanoculleus*, além da espécie *Methanosarcina thermophilus* (CHAPLEUR et al., 2016).

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

3.5 Lodo granular

Dentro do processo de digestão anaeróbia, a escolha do inóculo e a definição da quantidade ideal a ser usada é importante para que haja o bom desempenho na remoção de substrato e nas gerações de biogás, durante a operação de biorreatores alimentados com resíduos orgânicos. O inóculo adequado na operação de reatores evita inibição dos processos indesejados, além de favorecer a operação de biorreatores alimentados com resíduos orgânicos e aplicados na geração de biogás (CREMONEZ et al., 2021).

Durante o processo de formação do grânulo, as bactérias hidrolíticas e acidófilas colonizam as camadas externas. Por sua vez, as archaeas metanogênicas se limitam à parte central dos grânulos, os quais possuem cavidades com função de canal de transporte de gases, substratos e metabólitos (LIM; KIM, 2014)

O lodo granular anaeróbio proveniente de reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket – reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente) apresenta grande eficiência no tratamento de efluentes e resíduos orgânicos visando à geração de biogás; principalmente aqueles advindos de biorreatores tratando resíduos orgânicos como a vinhaça; resíduos do abate avícola, de cervejarias, dentre outros. Tal inóculo tem sido comumente testado com sucesso nas gerações de biohidrogênio e biometano, em escala laboratorial a partir de resíduos tais como: borra de café; glicerol bruto, lácteos, citrícolas, dentre outros (Canaver et al. 2025; Rodrigues et al 2024; Silva et al. 2023; Adames et al. 2022). Essa capacidade e adaptação elevadas nas gerações de biogás a partir de resíduos orgânicos, principalmente os advindos da agroindústria nacional tem impulsionado pesquisas com sua aplicação, justificando testes com os resíduos sólidos da banana.

3.6 Codigestão

A codigestão corresponde à digestão simultânea de uma mistura homogênea de dois ou mais substratos com características complementares entre si, a fim de fornecer nutrientes em quantidades equilibradas, permitindo dessa forma uma fermentação estável (MARAGKAKI et al., 2017; SILVA et al., 2018). Codigerindo resíduos orgânicos de difícil degradação com outros resíduos facilitaria, portanto, o seu consumo pelos microrganismos (Rodrigues et al, 2016).

A codigestão de resíduos de frutas, como águas residuárias provenientes do processamento industrial da banana e resíduos sólidos da banana (polpa e cascas) descartados em varejões, pode ser feita por meio de biossistemas em dois estágios sequenciais: fermentação seguida de metanogênese. Na fermentação, a produção de H_2 é sempre acompanhada pela geração de ácidos graxos voláteis, tais como os ácidos acético, butírico e propiônico, por exemplo, além de gerar álcoois como etanol, butanol e propanol. Nestes biossistemas integrados, a fração líquida proveniente da fermentação é utilizada como substrato ideal para a produção de CH_4 no 2º estágio, otimizando o uso da matéria orgânica remanescente do 1º estágio (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; SILVA et al., 2018).

Assim, a disposição desses resíduos em aterros, além de ser dispendiosa, pode aumentar a geração de CH_4 , causando graves impactos ambientais (Adames et al, 2022).

3.7 Esgoto sanitário

Esgotos sanitários podem ser um substrato utilizado em codigestão anaeróbia, pois contêm nutrientes essenciais para a digestão anaeróbia, principalmente nitrogênio e fósforo, além de ser constituído de 99,99% de água, podendo agir como diluente em resíduos orgânicos do processamento de frutas. Além disso, o esgoto sanitário apresenta alcalinidade, o que faz com que seja suportado substratos com quantidade de matéria orgânica elevada facilmente degradável, que poderiam ser inibidoras se tratadas isoladamente, como a sacarose das frutas, por exemplo. Assim, a codigestão de resíduos orgânicos com esgoto sanitário pode ser uma estratégia adequada para diminuir a sobrecarga orgânica ocorrida na monodigestão, ainda mais quando se considera a elevada quantidade de esgoto que é produzida (ADAMES et al., 2022; MATA-ALVAREZ et al., 2014).

3.8 Justificativa do presente estudo

A codigestão dos resíduos da banana e esgoto sanitário pode representar alternativa atraente para a redução concomitante destes, bem como a geração de produtos com valor agregado como etanol, butanol, ácido acético e, ácido butírico, além do biogás H_2 e CH_4 . Além disso, associar a codigestão dos resíduos da banana ricos em glicose com o uso de culturas mistas podem melhorar a geração de metabólitos secundários, bem como elevar a geração de bioenergia. Assim, a adição do esgoto sanitário poderá suprir as necessidades de nitrogênio e fósforo que auxiliarão na digestão anaeróbia de tais resíduos, conforme descrito anteriormente.

Dessa forma, a investigação da condição ideal obtida em planejamentos experimentais em reatores direciona na obtenção de gerações mais elevadas de hidrogênio e metano numa possível aplicação desses resíduos de maneira sustentável.

Sendo assim, o presente estudo testou resíduos da banana advindo de supermercados locais co-digeridos em esgoto sanitário, em biossistemas integrados, visando o consumo elevado de tais substratos com consequente geração de biocombustíveis hidrogênio e metano em reatores anaeróbios em batelada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biossistemas para Bioenergia no Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) – Unesp de Rio Claro, e fez parte de 2 Projetos financiados pela Fapesp: 1) Temático 2017/22401-8 “Fruto-Refinaria: Processos de Obtenção, métodos de caracterização e geração de produtos oriundos de resíduos da fruticultura” e 2) Regular 2022/15706-5 “valorização de resíduos agroindustriais na obtenção de biocombustíveis e produtos de valor agregado por digestão anaeróbia. A pesquisa foi dividida em etapas, conforme descrito a seguir. (Figura 3).

As etapas realizadas foram:

- Etapa Preliminar Calibragem de equipamentos;
- Etapa 1 – Caracterização dos substratos e inóculo;
- Etapa 2 – Testes de Otimização da produção de hidrogênio em reatores operados com resíduos sólidos da banana;
- Etapa 3 – Testes para a confirmação da condição otimizada obtida nas gerações de hidrogênio em Biossistemas Integrados para produção de hidrogênio;
- Etapa 4 – Teste para a condição otimizada em Biossistemas Integrados para produção de metano e em Biossistema único para produção de metano;
- Etapa 5 – Ensaio da melhor condição obtida em reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana em Biossistemas integrados para produção de hidrogênio e de metano.

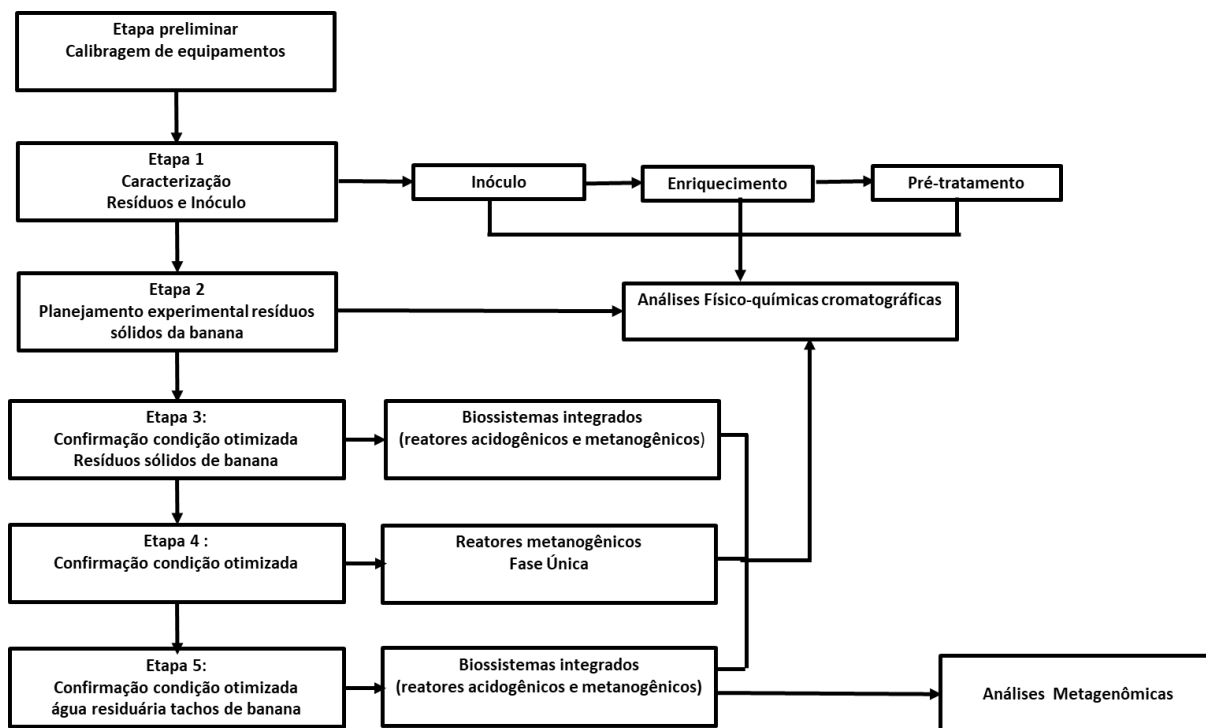


Figura 3 - Fluxograma experimental das atividades realizadas

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.1 Etapa preliminar:

Primeiramente foi realizada a calibragem dos equipamentos a serem utilizados no desenvolvimento do presente projeto de pesquisa, com a realização de curvas de calibração, que contemplaram: espectrofotômetro; cromatógrafos gasosos para análises de ácidos graxos voláteis e álcoois; hidrogênio, metano e dióxido de carbono.

Para a calibragem do espectrofotômetro foi realizada curva analítica de Demanda Química de Oxigênio (DQO) com o preparo de solução padrão de Hidrogenoftalato de Potássio (KHP). A solução mãe foi feita com 425 mg de Hidrogenoftalato de Potássio diluída em 50 ml de água ultrapura, que equivale a DQO de 1000 mg/L. A seguir, foram realizadas diluições em balão de 10 ml, de acordo com APHA, AWWA, WPCF (2005) (Tabela 1).

Tabela 1 - Volumes de solução de KHP usados na preparação de curva analítica

Concentração (mg/L)	Volume da solução mãe (µL)
Branco	0,0
50	50
100	100
200	200
400	400
600	600
800	800

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Curvas de calibração de validação para determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis (Ácido acético, Ácido Propiônico, Ácido Isobutírico, Ácido Butírico, Ácido Isovalérico, Ácido Valérico e Ácido Capróico), Álcoois (Metanol, Etanol e n-Butanol) e Acetona foram realizadas por Cromatografia Gasosa e Injeção automática Via *Headspace*, em cromatógrafo gasoso Shimadzu CG 2030, de acordo com Adorno et al. (2014), com as especificações descritas na seção “Análises de dados”.

As equações da reta ($Y = aX + b$) de cada um dos Ácidos Orgânicos Voláteis e Álcoois e seus respectivos R^2 , garantiram 98% de confiabilidade.

Foram realizados testes em reatores anaeróbios alimentados com glicose em equipamento automático de medição de biogás ANKOM, em treinamento específico fornecido pelo fabricante.

4.2 Etapa 1 – Caracterização dos substratos e inóculo

Substratos:

1) Resíduo sólido da banana, cedido por supermercado local (Rio Claro, São Paulo, Brasil), sendo constituído por bananas com cascas que seriam descartadas devido a reposição de frutas que excederam o seu período de maturação (casca + polpa). O resíduo foi coletado em frascos plásticos e homogeneizado em liquidificador industrial; armazenado em frascos plásticos tampados e mantidos a -20°C até sua utilização.

2) Água residuária da lavagem dos tachos na fabricação de doces de banana, cedida por indústria localizada em Tapiratiba, São Paulo, Brasil. A água residuária foi

coletada, transportada e armazenada em garrafas plásticas e mantida a -20 °C até sua utilização.

3) Esgoto sanitário sintético foi preparado segundo Martín et al. (2010) e utilizado como diluente em processos de codigestão na montagem de reatores anaeróbios em batelada (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição do esgoto doméstico sintético.

Solução de macronutrientes			Solução de micronutrientes	
Composto	Fonte	[mg/L]	Composto	[mg/L]
Glicose	C-Carboidratos	200	FeCl ₃ .4H ₂ O	1000
Albumina	C-Proteína	21	CoCl ₂ 6H ₂ O	1000
Ureia	N	13,0	MnCl ₂ .4H ₂ O	250
KP ₂ PO ₄	P	5,26	CuCl ₂ .2H ₂ O	15
CaCl ₂ .2H ₂ O	Ca	22,05	ZnCl ₂	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	Mg	0,43	H ₃ BO ₃	25
KCl	K	21,3	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	45
NaHCO ₃	Na	8,76	NaSeO ₃ .H ₂ O	50
Extrato de levedura		100	NiCl ₂ .6H ₂ O	35
Micronutrientes		1,0*	EDTA	500
			HCl 36%	1 (1)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

(1) Quantidade expressa em mL/L.

Os parâmetros utilizados para a caracterização dos substratos foram a DQO, sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SV), pH, carboidratos totais; ácidos graxos voláteis (AGVs) e álcoois, descritos posteriormente no item análises de dados (Quadro 1).

Fonte de Inóculo:

1) In natura: Lodo granular proveniente de reator anaeróbio UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) que trata resíduos do abate de aves (Avícola Dacar – Tietê – SP). Tal inóculo foi usado nos reatores metanogênicos.

Os parâmetros utilizados para caracterização do inóculo foram os valores de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SV), descritos posteriormente no item análises de dados (Quadro 1).

2) Pré-tratado: Foi aplicado pré-tratamento térmico no inóculo in natura (100°C por 15 minutos), de acordo com Maintinguer et al. (2008), para inibição de microrganismos consumidores de hidrogênio presentes. Tal inoculo foi usado nos reatores acidogênicos.

A seguir, o inóculo pré-tratado foi enriquecido previamente em reator anaeróbio em batelada de 5 litros, contendo 1000 gramas de lodo e 2 litros de meio de cultivo PYG (Peptone, Yeast Extract, Glucose), específico para a fermentação, preparado de acordo com Torquato et al. (2017) (PYG: glicose, 10 g/L; extrato de levedura, 5 g/L; extrato de carne, 5 g/L; peptona, 5 g/L), em pH inicial de 5,7, por período de 48 a 72 horas. O *headspace* de 40% foi preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante durante 15 minutos.

Da mesma forma, o inóculo in natura (sem pré-tratamento) foi enriquecido previamente em reator anaeróbio em batelada de 5 litros, contendo 1000 gramas de lodo e 2 litros de meio de cultivo específico para a metanogênese, preparado de acordo com Del Nery (1987), com modificações, utilizando 5 mL/L das soluções A, B, C e D (Tabela 3), com adições de 5 mL/L de solução de Vitamina B12 (40 g/L); glicose (1,6 g/L), acetato de sódio (1,6 g/L), lactato de sódio (1,6 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), peptona (2,0 g/L) e vitamina B12 preparada segundo Widdel e Pfennig (1984) (tabela 3). O reator foi operado com pH inicial de 7, por 7 dias. O *headspace* de 40% foi preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante por 15 minutos.

Tabela 3 - Composição do meio Del Nery com vitamina B12

Reagente	Concentração g/L
Vitamina B12	40
Solução A	
(NiSO ₄ .6H ₂ O)	0,50
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,50
Cloreto Férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,25
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂)	0,04
Solução B	
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	2,06
Solução C	
Óxido de Selênio (SeO ₂)	0,14
Solução D	
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	5,36
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,30
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	2,76

Fonte: adaptado de Del Nery (1987); Widdel e Pfennig (1984).

4.3 Etapa 2 – Testes de Otimização da produção de hidrogênio em reatores operados com resíduos sólidos da banana

O ensaio de otimização da produção de hidrogênio com codigestão anaeróbia foi realizado com auxílio do Sistema de Medição da Produção de Gás ANKOMRFS (Figura 4).

Duplicatas de reatores (250 ml) foram operados em batelada, com *headspace* (75 ml) preenchido com N₂ 99,99%, sob fluxo constante, por 10 minutos. Foram adotados 3 níveis diferentes para relação S/I (Substrato/Inóculo), pH inicial e temperatura. As proporções S/I adotadas foram de 0,65, 1,925 e 3,2, fixando 15 g DQO/L para o resíduo (10,19 g do resíduo sólido da banana) e variando de 23,07; 7,79 e 4,68 g SV/L de lodo pré-tratado e enriquecido previamente, em valores entre 12,45 e 61,28 g de lodo.



Figura 4 - Ensaio de otimização da produção de hidrogênio

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para a codigestão foi utilizado esgoto sanitário sintético concentrado (4 ml do concentrado/L de água destilada, Tabela 2) até completar o volume reacional de 175 ml nos reatores. Para tamponamento, foram adicionados 5 g/L de NaHCO_3 (ANGELIDAKI et al., 2009) (Tabela 4). O pH inicial foi de 4,25; 5,37 e 6,5. Os reatores foram mantidos em incubadora em etapas diferentes devido a necessidade de 3 diferentes temperaturas sendo elas 22,0; 33,5 e 45°C. Foram monitorados produção de biogás e sua quantificação, consumo de carboidratos e produção de metabólitos gerados na fase líquida.

Tabela 4 - Montagem de reatores de acordo com a relação S/I.

Reator	Lodo (g)	Substrato (g)	NaHCO_3 (g)	Esgoto concentrado (mL)	Água (mL)
1	12,45	10,19	0,87	0,61	153
0	20,69	10,19	0,87	0,58	145
-1	61,28	10,19	0,87	0,42	104

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A produção de hidrogênio foi avaliada em vários níveis de temperatura, pH inicial relação S/I aplicando a MSR (Metodologia de Superfície de Resposta), visando obter as condições ótimas para a fermentação dos resíduos sólidos da banana.

O planejamento experimental realizado foi o Box-Behnken Design (BBD), combinado com a MSR e aplicado para analisar os efeitos das variáveis

independentes: temperatura (X_1), pH inicial (X_2) e S/I (X_3) na produção de bioHidrogênio (Y_1), que foi escolhida como resposta (variável dependente).

Os níveis utilizados e as condições experimentais estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores reais das variáveis e seus níveis codificados utilizadas no BBD.

Variável	Código	(-1)	0	(+1)
Temperatura (°C)	X_1	22	33,5	45
pH inicial	X_2	4,25	5,37	6,5
S/I (g/g)	X_3	0,65	1,925	3,2

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A seleção dos níveis de temperatura (22–45 °C), pH inicial (4,25–6,5) e S/I (0,65–3,2) foi realizada de acordo com (MAIESKI, 2011) (GANG WANG; YANG MU; HAN-QING YU, 2005) (NEVES; OLIVEIRA; ALVES, 2004), considerando os limites experimentais.

Os resultados experimentais foram analisados a um nível de confiança de 95% utilizando o software Statistica® (versão 8.0).

A porção fatorial do BBD possui doze corridas únicas, que contém todas as combinações possíveis, dentro dos níveis definidos das variáveis investigadas, formando um “padrão de caixa” (corridas 1-12), ao redor dos pontos centrais (corridas 13-15), resultando em quinze ensaios realizados, em ordem aleatória (Tabela 6).

Os efeitos das variáveis independentes na produção de hidrogênio foram examinados por meio da análise de variância (ANOVA). Os valores de significância (p-valor) e o coeficiente de determinação múltipla (R^2) foram usados para avaliar a adequação do modelo. O teste F foi utilizado para a avaliação da significância estatística dos coeficientes de regressão para obtenção do modelo polinomial, além da obtenção da confiabilidade dos experimentos pela análise do valor de p ($<0,05$). Foi verificado ainda o coeficiente de determinação (R^2) para avaliar a consistência entre os dados reais e preditos como de acordo com Wheelan (2016).

Tabela 6 - Matriz de delineamento experimental das três variáveis investigadas e variáveis resposta.

Ensaio	Variáveis independentes		
	X ₁	X ₂	X ₃
	Temperatura (°C)	pH inicial	S/I
1	-1 (22)	-1 (4,25)	0 (1,925)
2	1 (45)	-1 (4,25)	0 (1,925)
3	-1 (22)	1 (6,5)	0 (1,925)
4	1 (45)	1 (6,5)	0 (1,925)
5	-1 (22)	0 (5,37)	-1 (0,65)
6	1 (45)	0 (5,37)	-1 (0,65)
7	-1 (22)	0 (5,37)	1 (3,2)
8	1 (45)	0 (5,37)	1 (3,2)
9	0 (33,5)	-1 (4,25)	-1 (0,65)
10	0 (33,5)	1 (6,5)	-1 (0,65)
11	0 (33,5)	-1 (4,25)	1 (3,2)
12	0 (33,5)	1 (6,5)	1 (3,2)
13	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)
14	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)
15	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.4 Etapa 3 – Testes para a confirmação da condição otimizada obtida nas gerações de hidrogênio em Biossistemas Integrados para produção de hidrogênio

A partir do planejamento experimental na produção de hidrogênio foi realizado a etapa de confirmação, sendo ela necessária devido ao fato de, em projetos de otimização, a relação de ótimo obtida pelo cálculo matemático, exigir a validação.

Dessa forma, para essa validação com os resíduos sólidos de banana, foram selecionados, juntamente com as condições otimizadas, as condições dos reatores com maior e menor gerações de hidrogênio e seus pontos centrais, que foram: 1) pH inicial 4,88, temperatura 41,8°C e relação S/I de 2,48 (2,48 g DQO do substrato para 1 g SV de inóculo), para a condição otimizada; 2) pH inicial 5,37, temperatura 45°C e relação S/I de 3,2 (3,2 g DQO do substrato para 1 g SV de inóculo), para a condição com maior produção observada; 3) pH inicial 5,37, temperatura 22°C e relação S/I de

3,2 (3,2 g DQO do substrato para 1 g SV de inóculo), para a condição com menor produção observada e; 4) pH inicial 5,37, temperatura 33,5°C e relação S/I de 1,92 (1,92 g DQO do substrato para 1 g SV de inóculo), para a condição de ponto central.

Dessa forma foram montados biossistemas integrados operados em dois estágios (acidogênese e metanogênese) em reatores anaeróbios em batelada, para obtenções de hidrogênio e metano.

Montagem dos Reatores Acidogênicos:

Os ensaios foram montados em triplicata de reatores anaeróbios (1L) e com headspace (0,4L) preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante por 10 minutos, de forma a garantir a anaerobiose. As proporções S/I (substrato/inóculo) adotadas foram de 1,92; 2,48; e 3,2, representando respectivamente 70,95; 55,07; e 42,68 g de inóculo pré-tratado e enriquecido proveniente em meio de cultivo para fermentação, conforme descrito anteriormente. A DQO inicial foi fixada em 15 g DQO/L em todos os reatores, enquanto o esgoto sanitário sintético foi utilizado para completar o volume reacional de 0,6L. Para tamponamento foram adicionados 5 g/L de NaHCO₃ (ANGELIDAKI et al., 2009). Os reatores foram mantidos em incubadora, sob modo estático em temperaturas de 22°; 33,5°; 41,8°; e 45° por 24 horas. Foram monitorados produção de Hidrogênio, remoções de DQO e de carboidratos durante a operação dos reatores, ácidos graxos voláteis e álcoois. O efluente gerados nos reatores acidogênicos foi o substrato que alimentou os reatores metanogênicos, conforme descrito a seguir na etapa 4.

Variável	Otimizado	Maior observado	Menor observado	Ponto central
Temperatura (°C)	41,80	45,00	22,00	33,50
pH inicial	4,88	5,37	5,37	5,37
S/I (g/g)	2,48	3,20	3,20	1,92

4.5 Etapa 4 – Teste para a condição otimizada em Biossistemas Integrados para produção de metano e em Biossistema único para produção de metano

Devido ao volume retirado para amostragem das análises físico-químicas realizadas durante a etapa 3, foi necessário ajustar o volume dos reatores para 0,5L, além da montagem de reatores para produção direta de metano a partir do resíduo sólido da banana, para comparação.

Desta forma, o ensaio foi realizado em triplicata em condições de anaerobiose e os reatores operados em batelada (1L), com headspace (0,5L) preenchido com N₂ 99,99%, sob fluxo constante, por 15 minutos. A proporção S/I se manteve em 2,48, representando para os reatores de segundo estágio, 454,11 ml do efluente dos reatores de primeiro estágio e 45,89 g de inóculo in natura.

Para os reatores operados para gerações de metano direto, a proporção de 2,48 representou o uso de 29,11 g do substrato e 45,89 g de inóculo, para completar o volume reacional foi utilizado 425 mL de esgoto sanitário sintético.

Em todos os reatores foi usado inóculo que foi enriquecido previamente em meio de cultivo para a metanogênese, conforme descrito anteriormente. Para tamponamento, foram adicionados 5 g/L de NaHCO₃ (ANGELIDAKI et al., 2009). O pH inicial foi de 7,0 e os reatores foram mantidos em incubadora a 37°C, sob agitação constante de 120 rpm por 11 dias. Foram monitoradas a produção de biogás, além de consumo de DQO e carboidratos.

4.6 Etapa 5 – Ensaio da melhor condição obtida em reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana em Biossistemas integrados para produção de hidrogênio e de metano

O planejamento experimental na produção de Hidrogênio foi realizado em projeto iniciado por Freire et al (2023), para resíduos agroindústrias provenientes da lavagem dos tachos do doce de banana e foram de: pH inicial 5,7, temperatura 37,5°C e relação S/I de 2,3 (2,3 g DQO do substrato para 1 g SV de inóculo).

Biossistemas integrados (reatores acidogênicos e reatores metanogênicos) foram operados em reatores anaeróbios em batelada, em dois estágios, para obtenções de hidrogênio e metano.

Os ensaios foram montados em triplicata de reatores anaeróbios (1L) e com headspace (0,3L) preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante por 10 minutos, de forma a garantir a anaerobiose (Figura 5). O efluente do 1º. Estágio (Reatores Acidogênicos) foi o substrato que alimentou os reatores do 2º estágio (Reatores Metanogênicos).

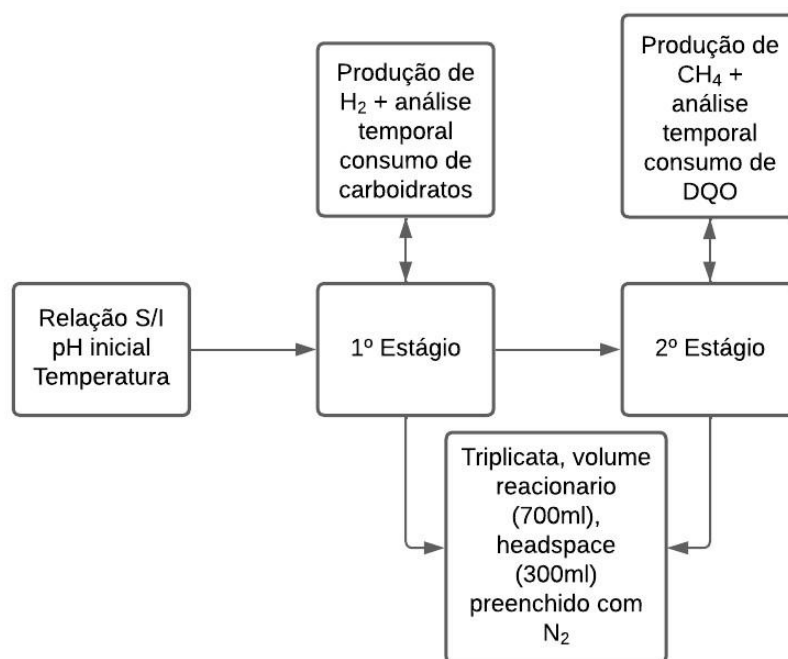


Figura 5 - Digestão anaeróbia em dois estágios

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

As condições dos ensaios; substrato (resíduo da água residuária) e inóculo, estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições dos ensaios

Estágio	Relação S/I	Resíduo (g)	Inóculo (g)	Tampão (g)	pH	Temperatura (°)
1º	2,3	487,86	212,15	3,50	5,75	37,5
2º		418,00	182,00	3,05	7,00	37,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

1º. Estágio- Ensaio de geração de hidrogênio em reatores acidogênicos

Triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (1 L) foram operados, com *headspace* (0,30L) preenchido com N₂ 99,99%, sob fluxo constante, por 10 minutos, para garantir as condições anaeróbias. A relação S/I adotada foi de 2,3, representando 487,86 g da água residuária de lavagem dos tachos na fabricação de doces de banana (fixando 14,88 g DQO/L) e 212,15 g de inóculo pré-tratado e enriquecido proveniente em meio de cultivo para fermentação, conforme descrito

anteriormente e esgoto sanitário sintético. Para tamponamento foram adicionados 5 g/L de NaHCO_3 (ANGELIDAKI et al., 2009). O pH inicial foi de 5,75 e os reatores foram mantidos em incubadora a 37,5°C, sob modo estático por 49 horas. Foram monitorados produção de Hidrogênio, remoções de DQO e de carboidratos, além da produção de ácidos graxos voláteis e álcoois durante a operação dos reatores.

2º. Estágio - Ensaio de geração de metano em reatores metanogênicos

Devido ao volume retirado para amostragem durante o primeiro estágio foi necessário ajustar o volume dos reatores para 0,6L. Desta forma, o ensaio de segundo estágio foi realizado em triplicata em condições de anaerobiose e os reatores operados em batelada (1L), com headspace (0,40L) preenchido com N_2 99,99%, sob fluxo constante, por 15 minutos. A proporção S/I se manteve em 2,3, representando 418,00 ml do efluente dos reatores de primeiro estágio e 182,00 g de inóculo in natura, que foi enriquecido previamente em meio de cultivo para a metanogênese, conforme descrito anteriormente. Para tamponamento, foram adicionados 5 g/L de NaHCO_3 (ANGELIDAKI et al., 2009). O pH inicial foi de 7,0 e os reatores foram mantidos em incubadora a 37°C, sob agitação constante de 120 rpm por 16 dias. Foram monitoradas a produção de biogás, além de consumo de DQO e carboidratos.

Análises físico-químicas cromatográficas e metagenômicas

O quadro 1 apresenta as análises realizadas durante a pesquisa.

Parâmetro	Método	Referência
DQO	Colorimétrico	APHA (2005)
Carboidratos	Colorimétrico	Dubois et al. (1956)
Sólidos	Gravimétrico	APHA (2005)
pH	Potenciométrico	APHA (2005)
Composição do biogás	Cromatográfico	Maintinguer et al. (2008)
Quantificação do biogás	Deslocamento Volumétrico	Aquino et al. (2007)
Composição metabólitos gerados (ácidos graxos voláteis e alcóois)	Cromatográfico	Adorno et al. (2014)

Quadro 1 - Parâmetros, métodos e referências utilizadas

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

O volume de biogás gerado nos reatores foi avaliado pelo método de deslocamento de volume adaptado de Aquino et al. (2007) o qual foi utilizado duas colunas de NaOH 15% para que o CO₂ fosse absorvido com melhor eficiência deixando apenas o hidrogênio na primeira fase e o metano na segunda fase para serem quantificados.

A análise de composição do biogás Hidrogênio, Metano, N₂ e CO₂ foi realizada por cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás Shimadzu® (GC-2014) equipado com detector de condutividade térmica (DTC) e coluna Carboxen 1010 PLOT. O fluxo da coluna foi de 5,0 mL min⁻¹ com argônio ultrapuro como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 °C e 230 °C, respectivamente. A rampa de temperatura da coluna foi de 120 °C (1 min), 40 °C/min até 200 °C (3 min) e 50 °C/min até 230 °C (0,5 min), com um tempo total de execução de 7,1 minutos (MAINTINGUER et al., 2008).

No cálculo da porcentagem de cada gás no biogás produzido, a quantidade de N₂ foi desconsiderada, pois essa era a composição inicial do *headspace* dos reatores.

Para os metabólitos solúveis (ácidos graxos voláteis (AGVs) e álcoois) foram determinados utilizando um GC CHAPTER II 50 (Shimadzu® GC-2030) equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar HP-INNOWAX (30m x 0,25mm x 0,25 µm) e amostrador automático AOC 6000 Plus (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios de geração de hidrogênio (Reatores acidogênicos) e de metano (Reatores metanogênicos) foram ajustados para os valores médios obtidos das triplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statística® (versão 8.0).

A taxa máxima de produção de biogás foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada (LAY, LI e NOIKE, 1998), indicada pela Equação 1, onde: P é o potencial de produção de Hidrogênio ou Metano (mL do biogás L⁻¹ de reator), R_m é a taxa máxima de produção de Hidrogênio ou Metano (mL do biogás L⁻¹ de reator h), λ é a duração da fase de início da geração de Hidrogênio ou Metano (h), t é o período de operação (h) e e é o número de Euler.

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

Também se obtiveram as taxas de rendimento de hidrogênio e metano, em mLH₂/gSV mLCH₄/gSV, respectivamente, além das produções de hidrogênio e de metano, em ml/L reator, de acordo com Zhang et al. (2007).

Foi feita análise do T80 que é um parâmetro técnico que indica o tempo necessário para produzir 80% do hidrogênio e do metano durante o processo de incubação em reatores de digestão anaeróbia. Conforme Camarena-Martínez et al. (2020).

Para a estimativa energética foram analisadas as Perspectivas de Reuso Energético (PRE) nos ensaios de produção otimizada de hidrogênio, reator de metano em segundo estágio e reator de metano direto. Os valores de PRE foram obtidos conforme as equações (2) e (3), considerando o conteúdo energético de 284 kJ/mol para o H₂ e 882,2 kJ/mol para o CH₄ (RODRIGUES et al., 2020b).

$$\text{PRE (H}_2\text{)} = (\text{mol H}_2 \text{ produzido / L de sustrato}) \times (284,0 \text{ kJ / mol}) \quad (2)$$

$$\text{PRE (CH}_4\text{)} = (\text{mol CH}_4 \text{ produzido / L de sustrato}) \times (882,2 \text{ kJ / mol}) \quad (3)$$

Análise metagenômica

As amostras para extração do DNA genômico foram coletadas no início e no final da operação dos reatores da etapa 5. Aproximadamente 50 mL do meio líquido de cada um dos reatores foram coletados e transferidos para tubos Falcon e centrifugados a 9000 rpm, em microcentrífuga, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado em tampão fosfato- salino (PBS) (NaCl 8%, KCl 0,2%, Na₂HPO₄ 1,44%, KH₂PO₄ 0,24%) (GREEN; SAMBROOK, 2012) e utilizado nas etapas posteriores. O DNA foi extraído utilizando o kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (Mpbio, São Caetano do Sul, SP), seguindo as recomendações do fabricante, com quantificação por fluorimetria segundo Haendiges et al. (2020). Para a verificação da qualidade do DNA extraído foi feito eletroforese em gel de agarose segundo Schaefer (2006) com visualização em marcador molecular de 1kb da Jena Bioscience.

A caracterização microbiana por sequenciamento massivo foi realizada pela instalação NGS “Soluções Genômicas” localizada em Piracicaba (SP, Brasil) (<https://ngsgenomica.com.br/>), na plataforma Illumina HiSeq PE250. Os primers para as regiões de 16S rRNA V3V4 e Ar915Af/Ar1386R foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR). As sequências foram montadas e filtradas para remover

sequências que apresentavam bases de baixa qualidade (QPhred ≥ 33), bem como detectar e remover quimeras via pipeline DADA2 (Callahan et al., 2016) em ambiente R, como a classificação taxonômica de Amplicon Sequence Variants (ASVs), que foi realizada em sequências com similaridade $\geq 97\%$.

5 RESULTADOS

5.1 Etapa 1 – Caracterização dos substratos e inóculo

Os resultados obtidos a partir da caracterização físico-química da água residuária do processamento industrial da banana, resíduo sólido, esgoto e lodo granular estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização do substrato e inóculo.

Parâmetro	Unidade	Água Residuária	Resíduo sólido (casca+polpa)	Esgoto sanitário sintético	Lodo Granular
pH	-	4,3 ± 0,06	4,47 ± 0,05	0,25*	7,03 ± 0,02
ST	g ST/L	10,40 ± 0,05	178,00 ± 0,03	-	0,07 ± 0,001
SV	g SV/L	10,1 ± 0,03	153,50 ± 0,02	0,32*	0,065 ± 0,001
Cinzas	g cinzas/L	0,30 ± 0,01	-	0,24*	0,01± 0,0001
Carboidratos totais	g CT/L	9,60 ± 0,56	870,00 ± 0,66	-	n.d.
DQO	g DQO/L	14,88 ± 0,05	1,6781 ± 0,02	-	n.d.
Etanol	g DQO/L	0,495 ± 0,08	-	-	n.d.
Acetato	g DQO/L	0,06 ± 0,012	-	-	n.d.
Butirato	g DQO/L	0,02 ± 0,01	-	-	n.d.
Propionato	g DQO/L	0,02 ± 0,02	-	-	n.d.
Lactato	g DQO/L	1,89 ± 2,76	-	-	n.d.
Isobutirato	g DQO/L	0	-	-	n.d.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

* Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média dos resultados em triplicata. n.d - não detectado

A caracterização da DQO total do resíduo sólido da banana foi de 1,6781 g O₂/g SV, sendo este valor próximo a outros resíduos industriais do processamento de frutas, como polpa de pêra (1,33 g O₂/g SV) e polpa de maçã (1,64 g O₂/g SV) (PERIMENIS et al., 2018). Além disso, foi verificada concentração elevada de carboidratos (870 mg/g SV) quando comparada com a quantidade apresentada por PERIMENIS et al. (2018) que obtiveram 75,69 mg/g SV e 102,92 mg/g SV para as polpas de pêra e maçã, respectivamente.

No esgoto sanitário sintético foram verificados 0,32 g/L para sólidos totais e 0,24 g/L para sólidos voláteis totais. A DQO total foi de 252,72 mg O₂/L. Tais valores são comumente verificados em esgotos sanitários reais como nas águas residuárias da estação de tratamento em Rio Claro (São Paulo, Brasil), com 250 mg/L de DQO e 0,24 g/L de sólidos voláteis (DE CARVALHO JÚNIOR; MAINTINGUER 2022). Tais resultados comprovaram a possibilidade do uso desse resíduo como diluente em processos de co-digestão e assim elevar as eficiências nas degradações de tais substratos com consequente geração de biogás.

5.2 Etapa 2 – Testes de Otimização da produção de hidrogênio em reatores operados com resíduos sólidos da banana

Os níveis definidos das variáveis investigadas formaram “padrão de caixa” (corridas 1-12) ao redor dos pontos centrais (corridas 13-15), resultando em quinze ensaios realizados em ordem aleatória, com gerações de hidrogênio no *headspace* dos reatores. (Tabela 9)

Tabela 9 - Matriz de delineamento experimental das três variáveis investigadas e variáveis resposta.

Ensaio	Variáveis independentes			Experimental
	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ pH inicial	X ₃ S/I	Y ₁ Produção de H ₂ (mL)
1	-1 (22)	-1 (4,25)	0 (1,925)	367,99
2	1 (45)	-1 (4,25)	0 (1,925)	459,10
3	-1 (22)	1 (6,5)	0 (1,925)	356,68
4	1 (45)	1 (6,5)	0 (1,925)	422,63
5	-1 (22)	0 (5,37)	-1 (0,65)	405,36
6	1 (45)	0 (5,37)	-1 (0,65)	446,59
7	-1 (22)	0 (5,37)	1 (3,2)	339,26
8	1 (45)	0 (5,37)	1 (3,2)	468,77
9	0 (33,5)	-1 (4,25)	-1 (0,65)	450,17
10	0 (33,5)	1 (6,5)	-1 (0,65)	441,68
11	0 (33,5)	-1 (4,25)	1 (3,2)	432,45
12	0 (33,5)	1 (6,5)	1 (3,2)	404,02
13	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)	459,40
14	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)	456,72
15	0 (33,5)	0 (5,37)	0 (1,925)	459,25

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Efeitos da temperatura, pH inicial e S/I na produção de Hidrogênio

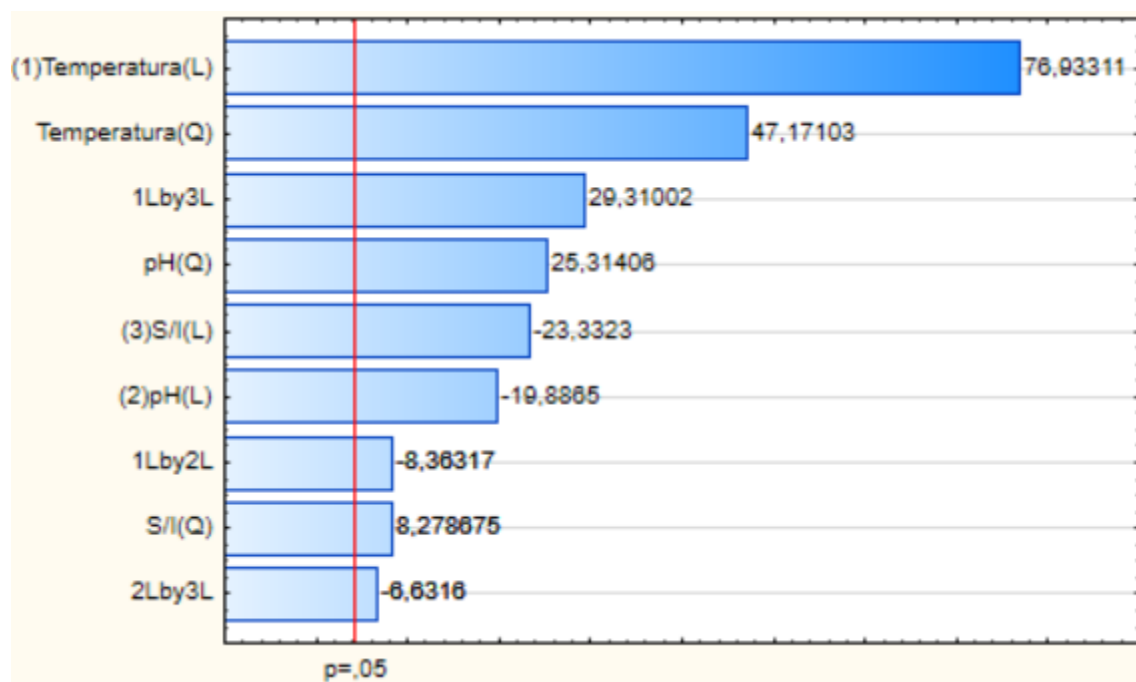
Para avaliar os efeitos das variáveis estudadas no rendimento da produção de hidrogênio a partir do resíduo da banana, os dados experimentais foram submetidos a uma análise de regressão (Tabela. 10).

Tabela 10 - Análise de regressão.

Nome	Coefficiente	Erro padrão	t-calculado	p- valor
Média	416,2135	0,434724	957,4192	0,000001
x_1	40,9613	1,064856	76,9331	0,000168
x_1^2	18,4841	0,783709	47,1710	0,000449
x_2	-10,5880	1,064851	-19,8865	0,002519
x_2^2	9,9194	0,783712	25,3140	0,001556
x_3	-12,4227	1,064856	-23,3323	0,001831
x_3^2	3,2440	0,783709	8,2786	0,014279
$x_1 \cdot x_2$	-6,2971	1,505919	-8,3631	0,013997
$x_1 \cdot x_3$	22,0693	1,505927	29,3100	0,001162
$x_2 \cdot x_3$	-4,9933	1,505919	-6,6315	0,021991

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Todas as variáveis independentes (Temperatura, pH inicial e relação S/I) influenciaram no rendimento de produção de Hidrogênio, confirmados estatisticamente ($p\text{-valor} < 0,05$) (Figura. 6).

**Figura 6** - Diagrama de pareto.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Ou seja, o modelo de regressão matemática medido pela análise de variância (ANOVA) indicou a adequação e significância a um nível acima de 90%, conforme recomendado por Rodrigues e Lemma (2014), devido a utilização em processos biológicos, representando alta variabilidade das atividades microbianas. Portanto, o parâmetro estatístico (valor p) confirmou a significância dos fatores estudados quando $p < 0,1$, como também verificado por Gomes et al. (2021) para a otimização estatística da produção de metano a partir de grãos usados em cervejarias utilizando o design composto central (DCC).

A intensidade da influência das variáveis seguiu a ordem decrescente: temperatura (X_1) > S/I (X_3) > pH inicial (X_2). A partir da reparametrização da equação, o modelo polinomial quadrático que representa a produção de hidrogênio foi construída (Equação 4):

$$Y = 416,2135 + 40,9614x_1 - 10,5881x_2 - 12,4228x_3 + 18,4842x_1^2 + 9,9195x_2^2 + 3,2440x_3^2 - 6,2971x_1x_2 + 22,0694x_1x_3 - 4,9933x_2x_3 \quad (4)$$

Onde Y é a Produção de hidrogênio (mL), x_1 é a temperatura, x_2 o pH inicial e x_3 a S/I.

Os efeitos das variáveis independentes na produção de hidrogênio (análise de variância ANOVA), mostraram que o coeficiente de regressão (R^2) de 99,75% é estatisticamente significativo, uma vez que confirmaram a adequação do modelo matemático a 99,75% das respostas da produção de hidrogênio.

De acordo com a literatura, a variação do R^2 entre 75 e 100 indica uma boa modelagem estatística (Reungsang et al., 2012; Kainthola et al., 2019). Portanto, neste estudo o valor ficou acima de 90, o que é considerado muito bom, e pode explicar a maioria das variações nas respostas da produção de hidrogênio (Burkert et al., 2004). Além disso, o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9975$) forneceu a consistência entre os dados reais e preditos. Isso confirmou que o modelo estabelecido se ajustou bem e que apenas 0,25% da variação total não é explicada pelo modelo. (Tabela 11)

Tabela 11 - ANOVA realizada para os dados obtidos para a produção de Hidrogênio.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
X ₁ L+Q	18468,66	2	9234,332	4071,904	0,000245
X ₂ L+Q	2356,99	2	1178,498	519,662	0,001920
X ₃ L+Q	1390,02	2	695,011	306,467	0,003252
X ₁ * X ₂	158,61	1	158,617	69,942	0,013997
X ₁ * X ₃	1948,22	1	1948,229	859,077	0,001162
X ₂ * X ₃	99,73	1	99,734	43,978	0,021991
Falta de Ajuste	53,99	3	17,999	7,936	0,113950
Erro Puro	4,53	2	2,267		
Total	23973,11	14			

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O modelo polinomial previsto foi usado para gerar gráficos de superfície de resposta tridimensionais. As superfícies de resposta foram plotadas em função de 2 fatores por vez (Temperatura; pH; Relação S/I) mantendo outros fatores em nível zero, utilizando-se a Equação 4.

Foi verificado que as superfícies de resposta possuíam um pico claro indicando que as condições ótimas estão dentro das limitações do delineamento experimental sendo temperatura (22° - 45°), pH (4,25 – 6,5) e relação S/I (0,65 – 3,2) (Figura 7, Figura 8 e Figura 9).

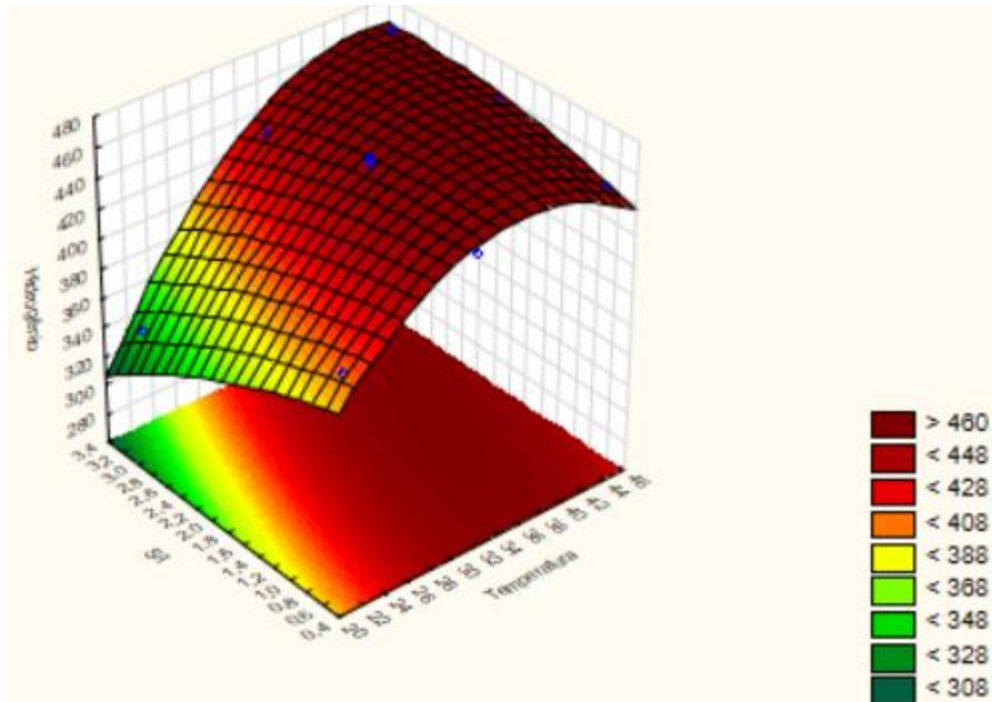


Figura 7 - Superfície de resposta dos efeitos com pH inicial fixado em 5,37

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

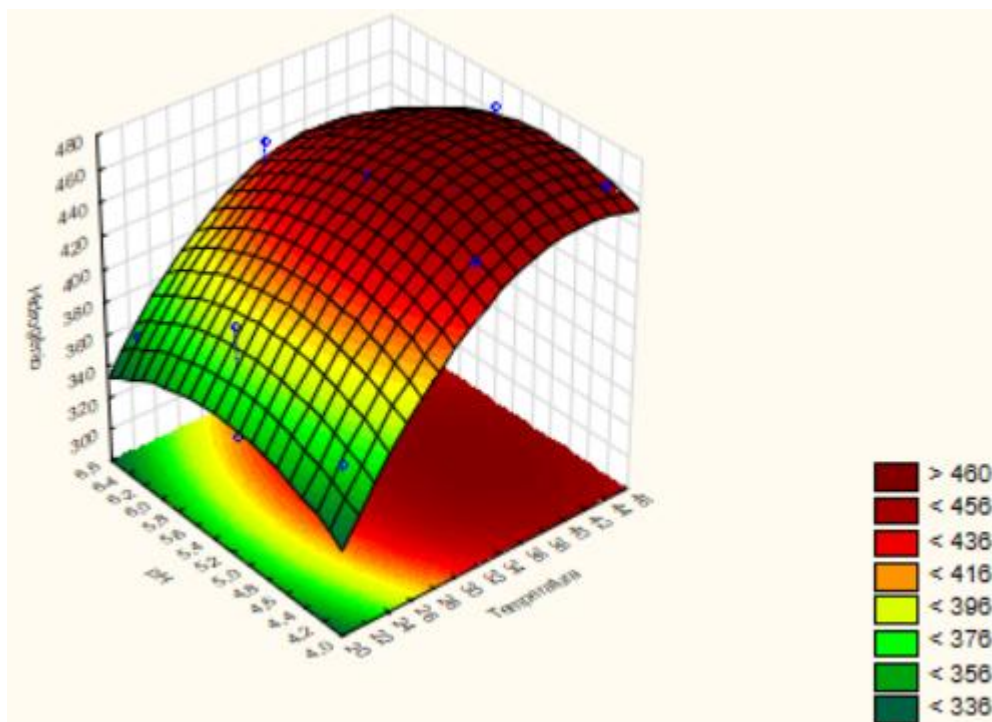


Figura 8 - Superfície de resposta dos efeitos com S/I fixada em 1,925

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

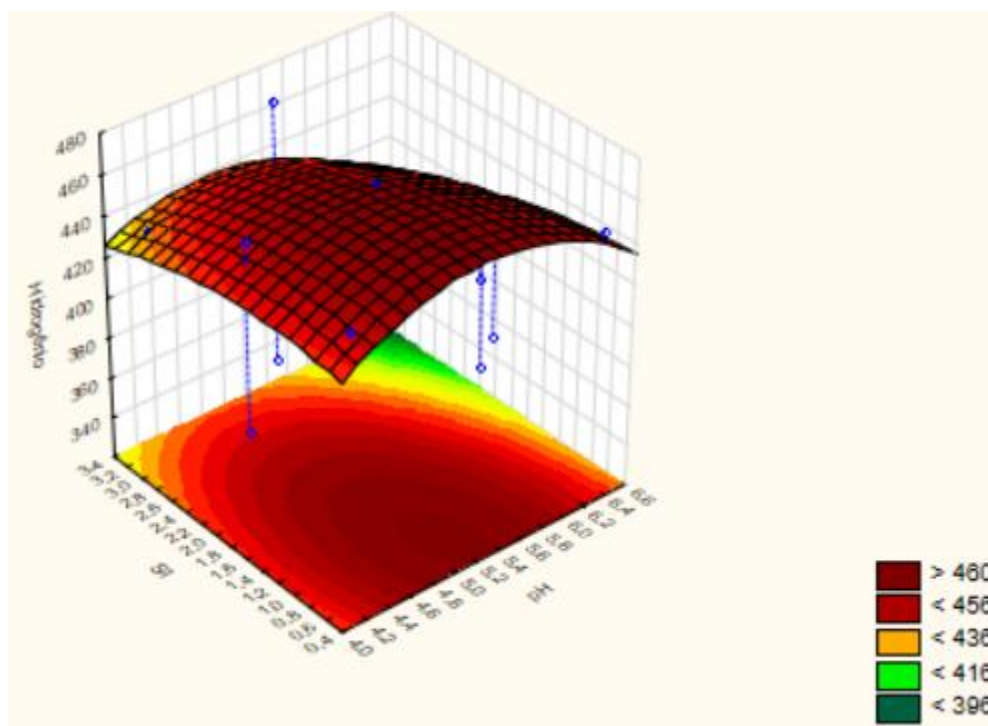


Figura 9 - Superfície de resposta dos efeitos com temperatura fixada em 33,5°C

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A partir dessas superfícies de resposta, foi possível determinar os pontos ótimos com o máximo de produção de hidrogênio a partir de resíduos sólidos da banana (casca + polpa) na temperatura de 41,8°C, S/I de 2,48 e pH inicial de 4,88, sendo essas as condições determinadas para os próximos testes.

Análises físico-químicas

Elevados consumos de carboidratos totais foram verificados, apresentando uma média de 5000 ml carboidratos/L no início da operação dos reatores e no final foram observados variações entre 672 ml carboidratos/L e 389 ml carboidratos/L, representando remoções totais de 86,56% (reator 1) e 92,22% (reator 12), respectivamente (Figura 10). Tais resultados foram superiores aos verificados por Mari et al. (2020) que operaram reatores com águas residuárias de mandioca em reatores anaeróbios sequenciais de batelada, com diferentes concentrações de efluente (3,2; 4,2; 4,7 e 5.0 gCarb/L).

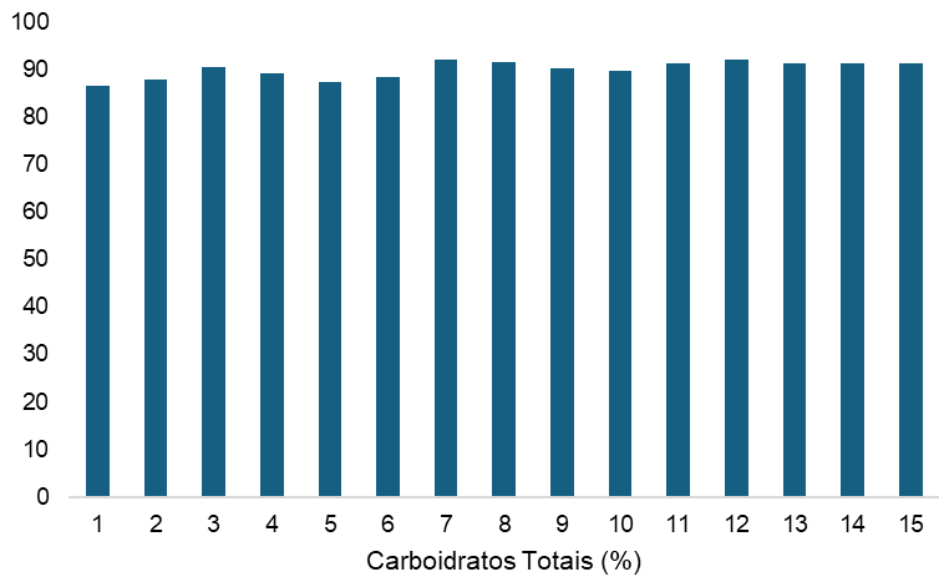


Figura 10 - Remoção de Carboidratos totais (em %) para as condições testadas (1 a 15) no ensaio realizado.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

As produções e consumos de metabólitos, em todos os reatores, foi realizada por cromatografia gasosa, em retiradas de amostras no início e no fim da operação dos reatores. Os resultados da média das duplicatas estão apresentados na Tabela 12 para as condições 1, 2, 3 e 4; Tabela 13 para as condições 5, 6, 7 e 8; Tabela 14 para as condições 9, 10, 11 e 12; Tabela 15 para as condições 13, 14 e 15.

Tabela 12 - Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 1 (pH inicial 4,25; temperatura 22; S/I de 1,92), 2 (pH inicial 4,25; temperatura 45; S/I de 1,92) 3 (pH inicial 6,5; temperatura 22; S/I de 1,92) e 4 (pH inicial 6,5; temperatura 45; S/I de 1,92).

Condição	1	1	2	2	3	3	4	4
Metabólito (mg/L)	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
Acetona	2,28	3,23	1,74	2,91	1,55	3,91	1,68	3,99
Metanol	61,95	86,42	27,66	49,56	58,51	96,27	52,45	61,32
Etanol	113,97	236,63	95,44	181,50	111,03	228,11	103,47	338,68
n-Butanol	11,11	12,83	10,90	12,64	11,28	12,57	10,98	14,58
Ác. Acético	13,52	151,59	9,44	91,17	8,58	99,51	5,43	57,38
Ác. Propiônico	15,44	15,25	15,20	14,39	15,43	15,42	15,38	15,76
Ác. Isobutírico	8,77	8,08	6,48	9,13	7,09	6,07	7,53	6,62
Ác. Butírico	0,36	0,77	1,67	0,34	0,40	0,34	2,60	0,30
Ác. Isovalérico	1,12	1,63	1,46	0,74	1,41	1,28	1,73	1,47
Ác. Valérico	0,00	3,34	0,00	1,66	0,00	3,32	0,00	3,26
Ac. Capróico	4,60	4,02	5,97	4,36	6,30	6,55	9,17	2,49

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 13 - Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 5 (pH inicial 5,37; temperatura 22; S/I de 0,65), 6 (pH inicial 5,37; temperatura 45; S/I de 0,65) 7 (pH inicial 5,37; temperatura 22; S/I de 3,2) e 8 (pH inicial 5,37; temperatura 45; S/I de 3,2).

Condição	5		6		7		8	
Metabólito (mg/L)	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
Acetona	3,95	1,83	4,43	2,23	1,39	4,48	0,61	4,61
Metanol	52,60	99,31	59,93	51,77	52,85	65,21	59,46	42,35
Etanol	136,48	188,38	137,35	302,42	101,08	228,62	113,88	561,03
n-Butanol	11,54	14,23	10,40	15,93	10,87	12,18	10,93	21,08
Ác. Acético	2,21	29,17	1,10	21,53	22,14	167,29	17,35	81,48
Ác. Propiônico	8,44	15,82	15,60	15,59	16,02	16,00	15,68	15,84
Ác. Isobutírico	5,47	5,49	5,49	4,73	7,85	7,94	7,36	7,32
Ác. Butírico	0,10	0,15	2,89	0,15	0,60	0,67	0,23	0,55
Ác. Isovalérico	1,60	1,73	2,06	1,93	0,97	1,18	1,50	0,95
Ác. Valérico	1,60	1,90	1,60	3,26	0,00	3,40	0,00	0,00
Ac. Capróico	9,22	2,68	9,17	1,17	4,61	6,50	9,18	3,09

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 14 - Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 9 (pH inicial 4,25; temperatura 33,5; S/I de 0,65), 10 (pH inicial 6,5; temperatura 33,5; S/I de 0,65) 11 (pH inicial 4,25; temperatura 33,5; S/I de 3,2) e 12 (pH inicial 6,5; temperatura 33,5; S/I de 3,2).

Condição	9		10		11		12	
Metabólito	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
mg/L								
Acetona	0,88	2,29	2,64	2,73	1,36	4,99	1,77	4,49
Metanol	48,79	68,94	59,04	87,65	55,89	66,48	54,83	62,33
Etanol	129,97	222,20	140,06	244,25	101,31	202,11	102,47	244,87
n-Butanol	10,71	14,37	10,73	16,25	10,84	10,91	10,82	12,37
Ác. Acético	3,94	61,43	3,34	32,15	19,50	88,44	23,79	127,48
Ác. Propiônico	15,41	14,81	15,58	15,66	15,17	15,49	7,64	15,04
Ác. Isobutírico	4,93	8,16	5,49	4,39	7,33	8,18	7,52	7,07
Ác. Butírico	0,04	0,31	0,05	0,20	4,85	0,58	0,36	0,83
Ác. Isovalérico	1,16	1,39	1,28	1,26	0,74	1,71	0,41	0,72
Ác. Valérico	0,00	3,29	0,00	3,30	0,00	2,46	0,00	0,00
Ac. Capróico	9,23	2,67	9,23	1,73	9,19	2,96	0,00	1,74

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 15 - Variação de metabólitos gerados durante a produção de biogás para as condições 13 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92), 14 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92) e 15 (pH inicial 5,37; temperatura 33,5; S/I de 1,92).

Condição Metabólito mg/L	13 inicial	13 final	14 inicial	14 final	15 inicial	15 final
Acetona	2,10	3,73	2,29	4,02	2,19	4,87
Metanol	70,12	71,81	46,02	67,18	56,86	60,15
Etanol	140,38	297,31	102,79	254,01	125,01	234,48
n-Butanol	10,87	14,75	5,53	13,87	10,82	13,68
Ác. Acético	23,33	102,85	5,94	87,64	26,36	92,10
Ác. Propiônico	14,65	15,01	1,50	15,49	15,03	15,71
Ác. Isobutírico	5,67	5,96	4,52	6,96	6,40	7,57
Ác. Butírico	0,41	0,58	4,59	0,32	7,73	0,85
Ác. Isovalérico	1,08	0,09	0,42	0,64	1,01	0,53
Ác. Valérico	0,00	3,30	0,00	0,00	0,00	3,31
Ac. Capróico	0,00	3,68	2,78	4,29	0,00	9,23

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De modo geral, foram observadas variações nas quantidades de metanol, etanol e ácido acético, no final da operação, sendo o seu acúmulo esperado para a fase acidogênica, conforme verificado por Mari et al. (2020) em reatores sequenciais de dois estágios em batelada para a produção de hidrogênio e metano a partir da água residuária da mandioca.

Considerando a produção significativa de Ácido Acético presentes nas amostras, a rota metabólica predominante assumida pode ser representada pela

equação 5 onde 4 mols de hidrogênio são produzidos a partir de 1 mol de glicose em fermentação do tipo acetato.



Dentre todos os metabólitos podemos ressaltar a produção de etanol verificada em todos os reatores com destaque ao final da operação do reator 8. A presença desse metabólito se justificou através de que, materiais ricos em sacarose e glicose, são ideais para produzir biocombustíveis como etanol e hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia em cultura mista (LEE et al., 2014).

Importante salientar que inúmeros microrganismos são capazes de crescer em meio contendo açúcares como glicose e sacarose, utilizando como fontes de energia presentes nesses compostos para seus processos metabólicos. Alguns trabalhos relatam que o gênero *Clostridium*, juntamente com *Enterobacter* e *Thermoanaerobacterium* são predominantes durante a fase de hidrólise e acidogênese de açúcares simples (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009; ELSHARNOUBY et al., 2013), conforme verificado no presente estudo. Provavelmente bactérias fermentativas hábeis nos consumos de substratos ricos em açúcares como as pertencentes aos gêneros supracitados estiveram envolvidas nas gerações de hidrogênio, etanol e ácido acético a partir de resíduos sólidos da banana, conforme verificado no presente estudo (Figura 11).

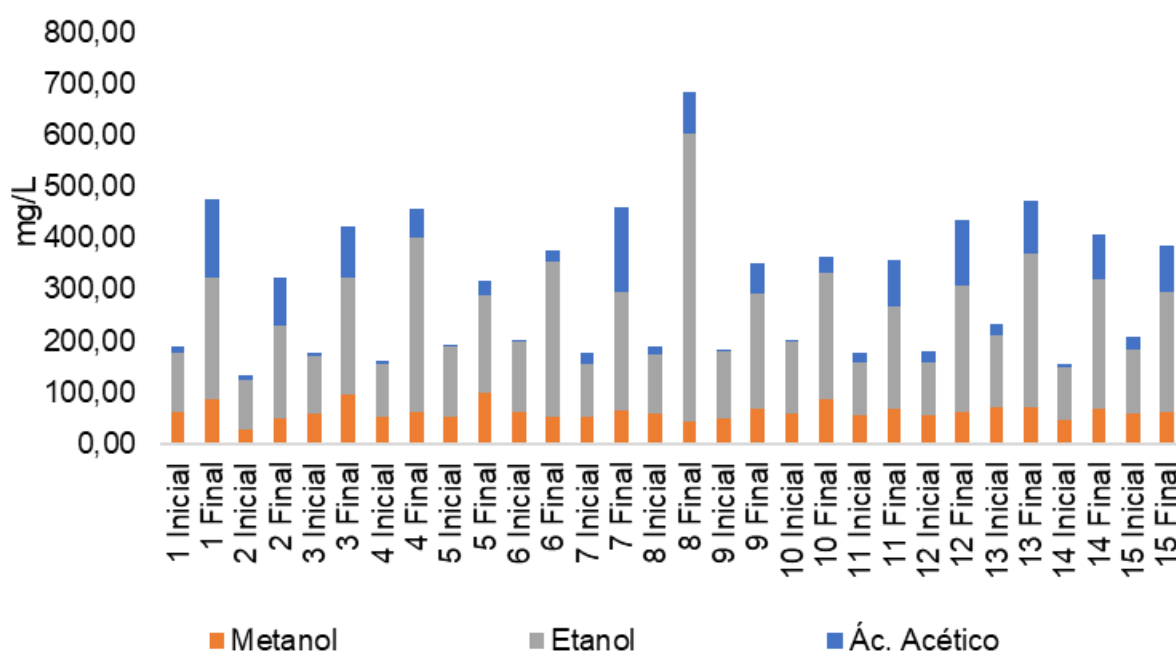


Figura 11 - Conentrações de metabólitos gerados durante operação dos reatores com resíduo sólido de banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.3 Etapa 3 – Testes para a condição otimizada obtida nas gerações de hidrogênio em Biossistemas Integrados para produção de hidrogênio e de metano

Foram registrados elevados consumos de carboidratos totais. Entre início e o final da operação dos reatores, os valores observados foram, respectivamente: para o reator de ótimo, 7260 mg/L e 615 mg/L; para o maior observado, 7400 mg/L e 375 mg/L; para o ponto central, 7600 mg/L e 505 mg/L; e para o menor observado, 9720 mg/L e 210 mg/L, representando consumos de 91,52%, 94,93%, 93,35% e 97,83%, respectivamente. (Figura 12)

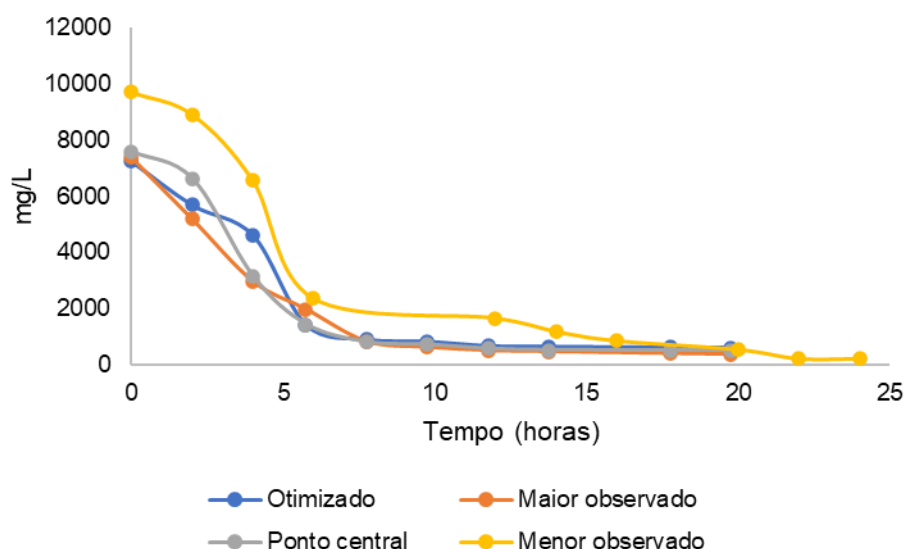


Figura 12 - Concentração de Carboidrato Total durante a operação dos reatores.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os consumos de DQO total apresentaram uma baixa redução esperada entre o início e o final da operação. Os valores observados foram, respectivamente: para o reator de ótimo, 323,7 mg/L e 239,8 mg/L; para o maior observado, 270 mg/L e 210,1 mg/L; para o ponto central, 313,8 mg/L e 244,7 mg/L; e para o menor observado, 279,3 mg/L e 249,6 mg/L. Esses resultados confirmam a degradação do substrato em ácidos orgânicos e álcoois que permaneceram na fase líquida dos reatores, sendo semelhantes aos encontrados por Mari et al. (2020), que operaram reatores anaeróbios sequenciais de batelada com águas residuais de mandioca e diferentes concentrações de efluente (3,2; 4,2; 4,7 e 5,0 gCarb.L⁻¹).

Na Figura 13, os resultados da produção acumulada de hidrogênio em 24 horas de operação nos reatores, com inóculo previamente enriquecido em meio de cultivo específico para fermentação (PYG), são apresentados e ajustados pela função de Gompertz modificada. (Figura 13, Tabela 16).

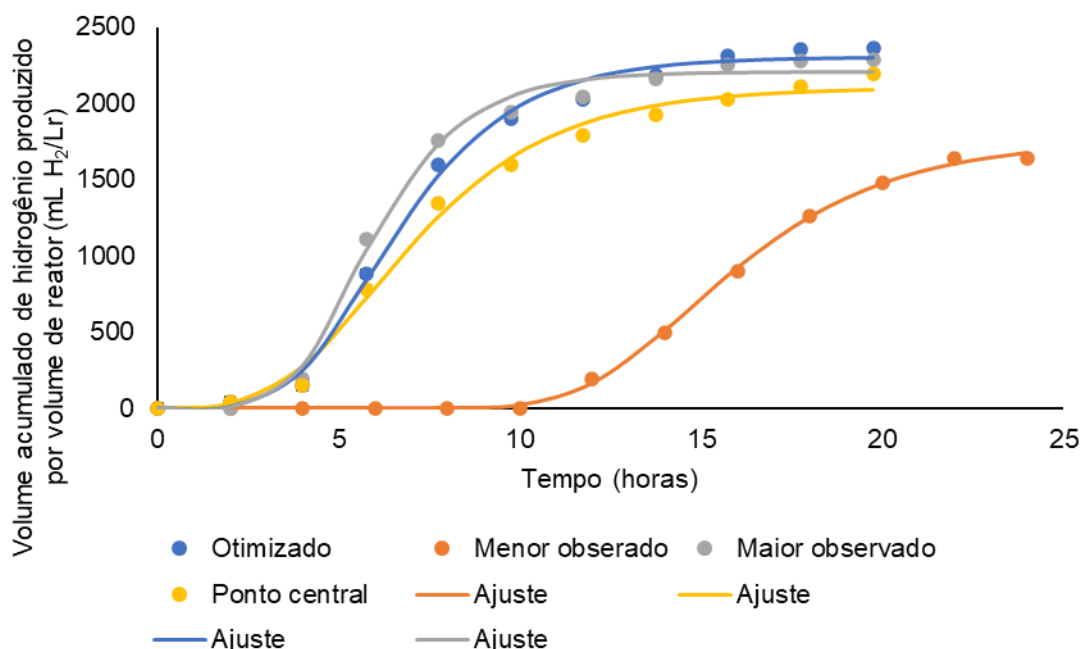


Figura 13 - Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada para geração de hidrogênio em reatores anaeróbios operados com resíduo sólido de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 16 - Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Hidrogênio em reatores com resíduo sólido de Banana.

Reator	Produção acumulada (mL H ₂ /Lr)	Estabilidade (Horas após início da operação)	Potencial de produção (mL H ₂ /Lr)	Taxa máxima de produção (mL H ₂ /Lr/h)
Otimizado	2359	13,75	2303,76	382,16
Maior observado	2285	11,75	2209,00	465,92
Ponto central	2191,5	15,75	2105,75	285,13
Menor observado	1639	22	1757,91	210,32

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Não foi verificada diferença significativa entre todos os reatores da triplicata, indicando a confiabilidade da média feita entre eles, além da ausência na produção de metano nos reatores acidogênicos, o que comprovou a eficiência do pré-tratamento

térmico aplicado ao lodo granular, assim como verificado por WANG & WAN, (2008a) sendo o melhor pré-tratamento para o inóculo, além de sua fácil aplicabilidade.

Apesar do tempo total de 24 horas de operação dos reatores, foi confirmado que os parâmetros otimizados elevaram a produção com potencial de produção em 2303,76 mL H₂/Lr. Porém, levando em consideração que a temperatura foi o parâmetro mais influente na operação dos reatores, foi possível verificar que quanto mais elevada foi a sua temperatura, maior foi a velocidade de produção seguindo a ordem decrescente de reator maior observado (45°C), reator otimizado (41,8°C), reator de ponto central (33,5°C) e reator menor observado (22°C), os reatores também apresentaram a mesma ordem decrescente do tempo necessário para sua estabilização.

Em todos os reatores ocorreu fase lag para a produção de H₂ nos reatores: otimizado (3,57 horas), maior observado (3,54 horas) e ponto central (3,23 horas). Foi verificado ainda que o reator “menor observado” que operou em 22°C foram necessárias 11,60 horas para adaptação dos microrganismos, salientando a importância da temperatura nos ensaios.

As produções e consumos de metabólitos foi realizada por cromatografia gasosa, em retiradas de amostras durante toda a operação dos reatores. Os resultados da média das triplicatas estão apresentados na Tabela 17 para a otimização, Tabela 18 para o maior observado, Tabela 19 para o ponto central e Tabela 20 para o menor observado.

Tabela 17 - Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição otimizada operados com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.

Horas de operação (mg/L)	0	2	4	5,75	7,75	9,75	11,75	13,75	17,75	19,75
Acetona	0,83	0,71	0,81	2,58	2,52	1,84	1,99	0,76	1,62	0,31
Metanol	50,33	45,16	42,48	50,68	47,82	42,45	45,90	62,78	71,71	53,17
Etanol	70,80	109,24	179,88	529,81	504,98	512,03	505,40	726,83	708,39	692,93
n-Butanol	9,00	11,66	12,40	15,05	14,70	16,55	16,67	40,90	72,41	74,42
Ác. Acético	6,44	9,99	14,50	48,35	34,38	39,22	39,54	33,02	34,67	52,67
Ác. Propiônico	15,59	15,74	15,89	15,09	15,53	15,45	15,37	15,65	15,68	14,81
Ác. Isobutírico	9,15	8,70	7,62	7,04	6,73	5,93	6,04	8,35	8,18	4,26
Ác. Butírico	3,74	6,29	4,36	12,19	26,41	69,69	69,96	0,23	38,62	0,20
Ác. Isovalérico	1,39	2,02	2,09	2,39	2,57	2,54	2,60	2,36	2,51	2,01
Ác. Valérico	3,46	3,29	3,28	3,29	2,92	3,28	3,28	1,99	3,28	3,30
Ac. Capróico	7,49	3,27	6,29	2,03	1,61	1,60	1,60	9,19	1,62	1,22

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 18 - Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição maior observado operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.

Horas de operação (mg/L)	0	2	4	5,75	7,75	9,75	11,75	13,75	17,75	19,75
Acetona	1,52	7,66	1,58	1,34	2,74	1,61	1,95	0,99	0,92	1,08
Metanol	39,07	43,91	43,26	55,38	50,72	56,62	47,28	64,00	62,28	59,81
Etanol	56,86	117,70	319,04	420,79	457,15	520,99	458,74	623,13	627,80	591,17
n-Butanol	11,04	11,61	13,79	15,04	7,85	15,42	14,91	25,89	51,84	54,12
Ác. Acético	6,77	10,08	24,90	60,36	49,59	43,95	45,99	40,37	51,36	68,71
Ác. Propiônico	15,46	16,01	16,10	15,52	16,01	15,99	15,89	15,67	15,57	15,10
Ác. Isobutírico	13,44	11,15	10,54	7,88	8,48	7,75	9,37	9,78	6,56	6,56
Ác. Butírico	6,89	8,70	6,52	65,01	39,77	0,17	83,01	0,35	0,29	0,27
Ác. Isovalérico	1,71	2,16	2,61	2,40	2,65	2,72	2,67	2,34	2,32	2,07
Ác. Valérico	3,40	3,25	3,27	3,28	3,27	3,26	3,25	3,28	3,29	3,28
Ac. Capróico	9,07	7,02	9,21	5,64	2,60	1,49	1,66	2,03	5,29	2,04

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 19 - Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição ponto central operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.

Horas de operação (mg/L)	0	2	4	5,75	7,75	9,75	11,75	13,75	17,75	19,75
Acetona	1,20	0,84	0,73	0,88	1,11	1,02	1,36	0,74	0,77	1,46
Metanol	44,86	47,96	45,39	52,70	47,11	51,66	48,95	67,82	57,56	56,77
Etanol	70,72	148,52	408,04	682,89	789,16	811,42	848,31	983,43	1039,09	954,83
n-Butanol	11,30	12,56	13,60	15,70	7,91	15,67	17,40	20,12	33,87	48,75
Ác. Acético	5,69	6,37	18,64	28,02	27,98	32,25	44,12	26,95	24,65	24,90
Ác. Propiônico	15,38	16,01	15,63	15,45	15,19	14,81	14,42	14,92	14,93	15,01
Ác. Isobutírico	8,48	9,46	6,27	7,84	4,58	5,49	5,00	6,67	5,87	4,48
Ác. Butírico	3,27	9,29	1,70	15,07	39,56	24,65	0,15	0,26	37,99	0,15
Ác. Isovalérico	1,57	2,42	2,39	2,58	2,41	2,46	2,36	2,39	2,43	2,23
Ác. Valérico	3,32	3,25	3,27	3,26	3,29	3,30	1,91	3,32	3,32	3,31
Ac. Capróico	6,30	2,46	5,38	1,37	1,13	0,89	1,23	1,23	1,72	1,37

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 20 - Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores de condição menor observado operado com resíduo sólido da Banana durante produção de Hidrogênio.

Horas de operação (mg/L)	0	2	4	6	12	14	16	18	20	22	24
Acetona	1,01	1,03	0,53	0,68	4,22	2,37	1,11	1,54	1,04	3,02	2,74
Metanol	52,93	55,96	57,66	44,04	34,82	31,68	43,75	42,50	53,29	39,11	37,85
Etanol	90,50	102,03	151,95	155,14	549,83	728,13	1118,17	1265,51	1707,45	1433,74	1099,86
n-Butanol	10,17	11,38	11,61	11,32	11,44	11,85	12,64	12,51	13,78	12,61	11,12
Ác. Acético	12,20	0,75	3,98	11,16	13,78	40,60	30,13	53,37	33,56	56,46	33,25
Ác. Propiônico	15,66	15,90	16,30	16,04	16,06	14,89	15,46	14,53	14,75	14,74	15,37
Ác. Isobutírico	10,24	13,78	9,76	8,93	12,42	9,18	8,77	7,19	5,38	10,76	8,24
Ác. Butírico	3,49	0,26	0,30	0,28	0,34	1,71	0,03	6,82	10,87	11,59	0,19
Ác. Isovalérico	1,80	2,31	2,40	2,31	2,51	2,14	2,35	2,19	2,20	2,37	2,43
Ác. Valérico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,29	3,26	3,27	3,30	3,28	3,30
Ac. Capróico	9,18	9,18	9,24	9,20	9,22	9,22	2,25	4,17	4,19	3,93	3,77

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

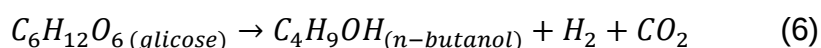
Devido às temperaturas impostas aos reatores otimizados, maior observado e ponto central e que foram de 41,8°C; 45°C e 33,5°C, respectivamente, foi verificado produção de metabólitos até 5,75 horas de operação, com rota metabólica de geração de hidrogênio. Entretanto, a partir de 5,75 horas de operação, as quantidades de metabólitos permaneceram estáveis enquanto o hidrogênio aumentava. Já em relação ao reator de menor observado tivemos uma produção simultânea de metabólitos e de hidrogênio, porém como as principais rotas metabólicas se dividiram, foi observado uma menor produção do biogás em comparação aos outros reatores. Desta forma temos como as principais rotas metabólicas possíveis, a fermentação acética e a fermentação etanólica assim como descrito por Ren et al. (2007) na produção de hidrogênio em reatores de fluxo contínuo, representado pela equação 5 para a

transformação de glicose em ácido acético e equação 7 para a transformação de glicose em etanol.

Dentre os metabólitos analisados, levando em consideração que os reatores otimizados, maior observado e ponto central estabilizaram a sua produção de metabólitos com 5,75 horas de operação, foi observado o aumento da concentração de álcoois e ácidos graxos voláteis até o determinado momento, como o Etanol (529,81 mg/L reator otimizado; 420,79 mg/L reator maior observado; 682,89 mg/L reator ponto central) e Ácido Acético (48,35 mg/L reator otimizado; 60,36 mg/L reator maior observado; 28,02 mg/L reator ponto central), sendo o seu acúmulo esperado para a fase acidogênica, conforme verificado por Freire et al. (2023) em reatores acidogênicos em batelada para a produção de hidrogênio a partir da água residuária do processamento da banana. Ao final da operação foram obtidos 692,93 mg/L; 591,17 mg/L; 954,83 mg/L e 1099,86 mg/L de etanol para os reatores otimizado, maior observado, ponto central e menor observado, respectivamente, representando um aumento variado entre 878% e 1250% em relação ao início, resultados superiores aos encontrados por Mazareli et al. (2019) na produção de hidrogênio a partir do resíduo sólido de banana com bactéria isolada.

Considerando a produção de Ácido Acético presentes nas amostras, a rota metabólica predominante assumida pode ser representada pela equação 5 a qual 4 mols de hidrogênio são produzidos a partir de 1 mol de glicose em fermentação do tipo acetato (descrito anteriormente).

Na fase estacionária de geração de Hidrogênio, assim como esperado, nos reatores otimizados, maior observado e ponto central, foi observada a rota metabólica de n-butanol (74,42 mg/L; 54,12 mg/L; 48,75 mg/L), respectivamente. (Equação 6)



No reator menor observado tivemos uma grande diferença em como se procedeu a rota metabólica, a qual deu preferência para a fermentação etanólica (Equação 7), que apesar de ser uma fermentação competidora com a produção de hidrogênio, é possível ter a produção simultânea. Segundo Barros (2012), a explicação para essa produção simultânea é baseada no favorecimento em reatores operados entre 20°C e 25°C (Figura 14, Figura 15, Figura 16 e Figura 17).

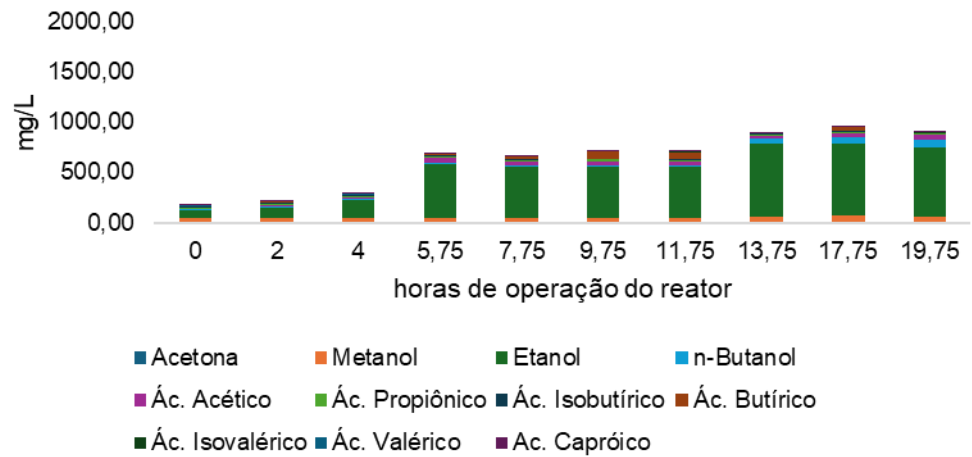
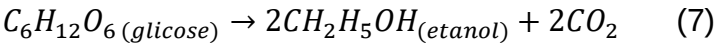


Figura 14 - Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator otimizado com resíduo sólido de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

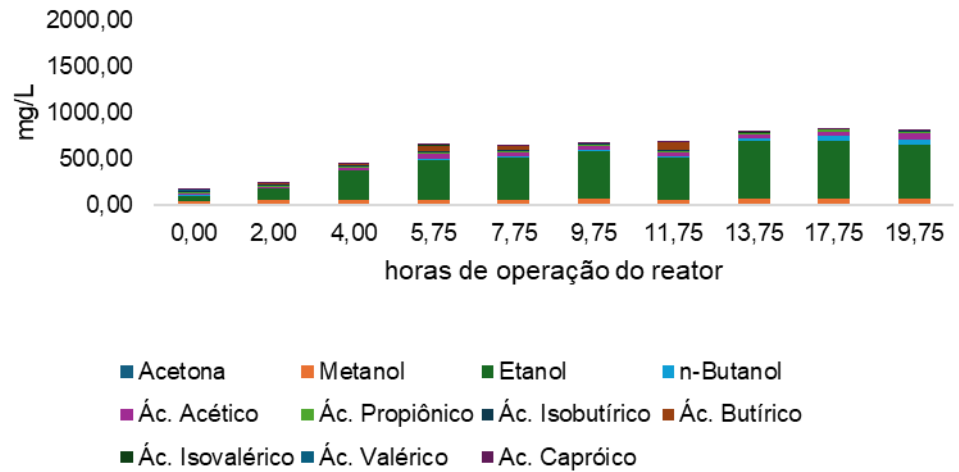


Figura 15 - Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator maior observado com resíduo sólido de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

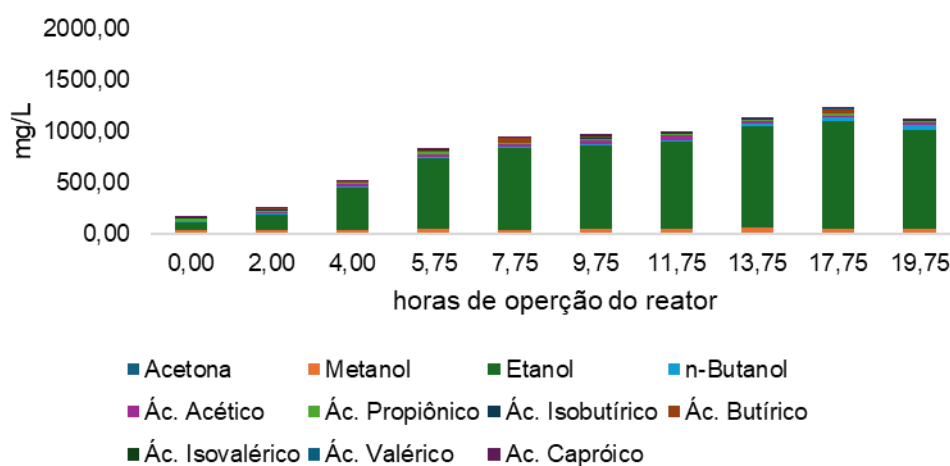


Figura 16 - Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator ponto central com resíduo sólido de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

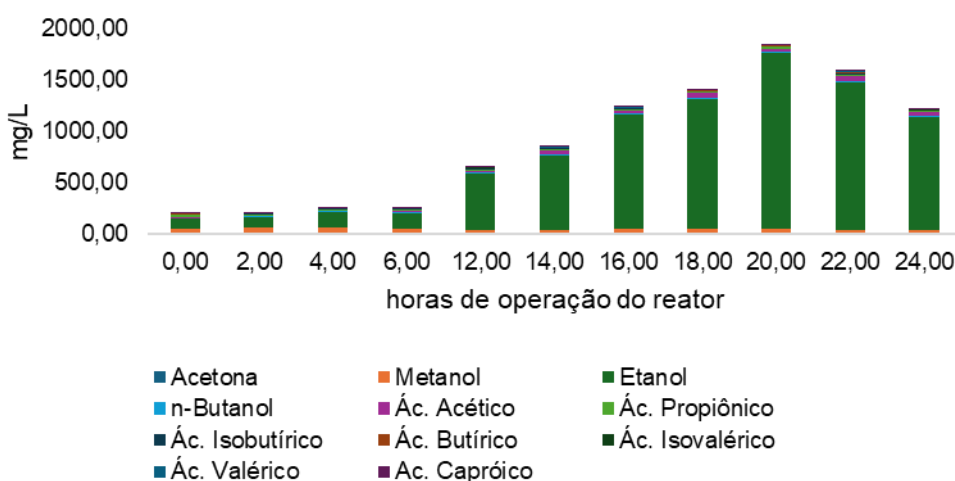


Figura 17 - Proporções de metabólitos gerados durante operação de reator menor observado com resíduo sólido de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5.4 Etapa 4 – Teste para a condição otimizada em Biossistema único para produção de metano

Foram observadas remoções de DQO total nos reatores, o que era esperado, dado que a matéria orgânica, representada pela DQO presente na fase líquida, é degradada em biogás (metano e dióxido de carbono) por meio de processos biológicos anaeróbios (Chernicharo, 1997) (Figura 18).

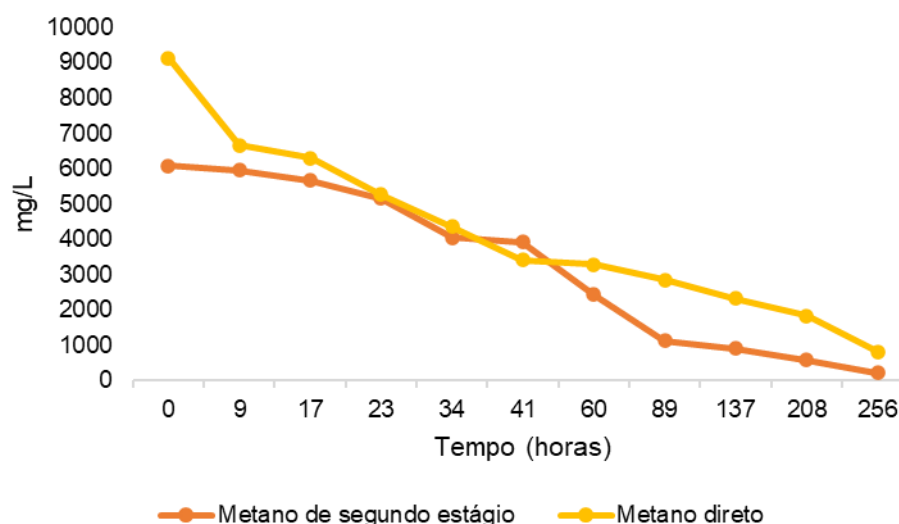


Figura 18 - Remoção de DQO Total durante a operação dos reatores.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Foram registrados elevados consumos de DQO total nos reatores. No início da operação, os valores foram de 6080 mg/L no reator de segundo estágio e 9141 mg/L no reator direto, enquanto ao final da operação restaram apenas 223,8 mg/L e 815,5 mg/L, respectivamente. Esses valores correspondem a remoções totais de 96,31% e 91,07% das concentrações iniciais, superando os resultados obtidos por El-Kamah et al. (2010) para a sua melhor condição testada no tratamento de águas residuárias da produção de suco de fruta com reatores UASR com valores de DQO inicial semelhante.

Quanto ao consumo de carboidratos totais, o reator de metano direto apresentou um consumo de 95,70%, enquanto no reator de segundo estágio o consumo foi de 73,98%. É importante destacar que, no reator de segundo estágio, foi utilizado o efluente da produção de hidrogênio, uma etapa caracterizada por alto consumo de carboidratos, resultando em uma concentração inicial mais baixa de carboidratos no efluente (615 mg/L). Ao final da operação, as concentrações finais foram de 160 mg/L e 170 mg/L para os reatores de segundo estágio e metano direto, respectivamente.

No primeiro estágio, os carboidratos são convertidos em hidrogênio e metabólitos como etanol (EtOH), acetato (HAc), butirato (HBu), lactato (HLa) e propionato (HPr), enquanto a DQO permanece, justificando a necessidade de um segundo estágio para o tratamento completo (SIVAGURUNATHAN et al., 2018).

Na Figura 19 estão apresentados os resultados da produção acumulada de metano, em 11 dias de operação nos reatores de segundo estágio e metano direto com inóculo enriquecido em meio de cultivo para a metanogênese, ajustados pela função de Gompertz modificada (Figura 19, Tabela 21).

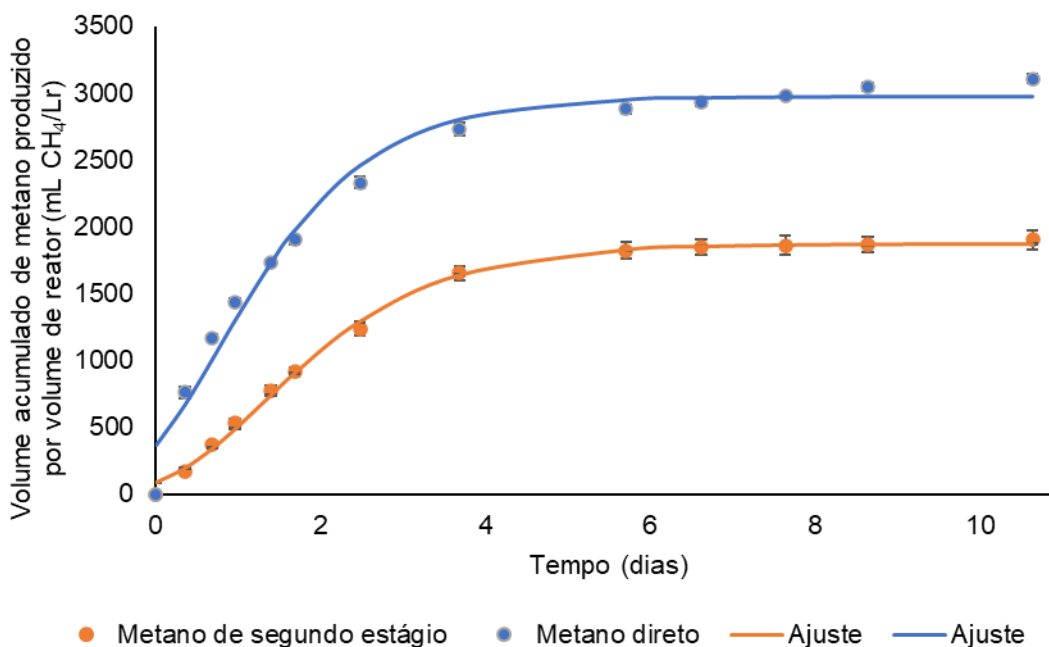


Figura 19 - Volume acumulado temporal metano em reator de segundo estágio e metano direto.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 21 - Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Metano.

Reator	Produção acumulada (mL CH ₄ /Lr)	Estabilidade (Dias após início da operação)	Potencial de produção (mL CH ₄ /Lr)	Taxa máxima de produção (mL CH ₄ /Lr/H)
Segundo estágio	1903	4	1874,01	584,14
Direto	3106,5	4	2970,87	1057,03

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A análise realizada por meio do teste de ANOVA e Tukey mostrou que não houve diferença significativa entre os reatores da triplicata. Embora o tempo total de operação tenha sido de 11 dias, observou-se que as produções se estabilizaram nos

primeiros 4 dias. Assim como no ensaio com ajuste pela equação de Gompertz, foi demonstrada a adaptação dos microrganismos nos reatores em 2,88 horas (segundo estágio) e 6,48 horas (metano direto) de operação, com remoções expressivas de DQO nos primeiros dias, conforme descrito.

5.5 Etapa 5 – Ensaio da melhor condição obtida em reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana em Biossistemas integrados para produção de hidrogênio e de metano

1º. Estágio: Ensaio de geração de hidrogênio em reatores acidogênicos

Elevados consumos de carboidratos totais foram verificados. No início e no final da operação dos reatores foram observados, respectivamente, 6237,33 mg carboidratos/L e 308,66 mg carboidratos/L, representando 95,05% de seu consumo (Figura 20), sendo este consumo sem diferença significativa aos 91,52% do estudo de otimização realizado com resíduo sólido da banana, com diferencial da quantidade inicial (7260 mg/L) e final (615 mg/L) de carboidratos.

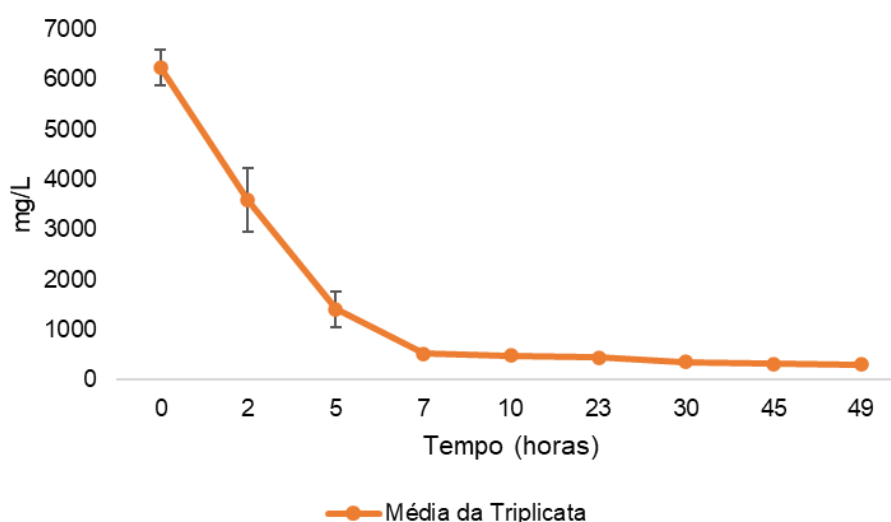


Figura 20 - Remoção de Carboidrato Total durante a operação dos reatores

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os consumos de DQO total foram reduzidos, assim como esperado, entre o início (12220 mg/L) e o final (11933,33 mg/L) da operação, confirmando a degradação do substrato a ácidos orgânicos e álcoois que permaneceram na fase líquida dos

reatores, representando um consumo de 2,34% e com diferença significativa à otimização a partir do resíduo sólido da banana (25,91%). Tais resultados foram inferiores aos encontrados por Mari et al. (2020) que operaram reatores com águas residuais de mandioca em reatores anaeróbios sequenciais de batelada com diferentes concentrações de efluente (3,2; 4,2; 4,7 e 5.0 gCarb.L⁻¹) (Figura 21).

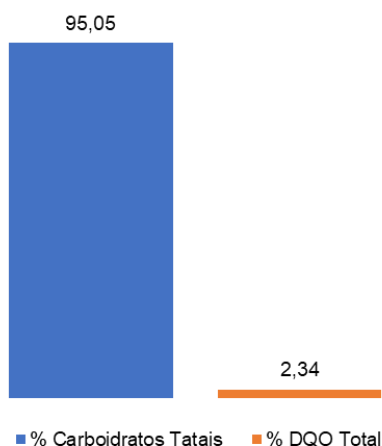


Figura 21 - Remoção de DQO Total e Carboidratos (em %) para produção de H₂.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Na Figura 22 estão apresentados os resultados da produção acumulada de hidrogênio, em 49 horas de operação nos reatores com inóculo enriquecido previamente em meio de cultivo específico para a fermentação (PYG), ajustados pela função de Gompertz modificada (Figura 22, Tabela 22).

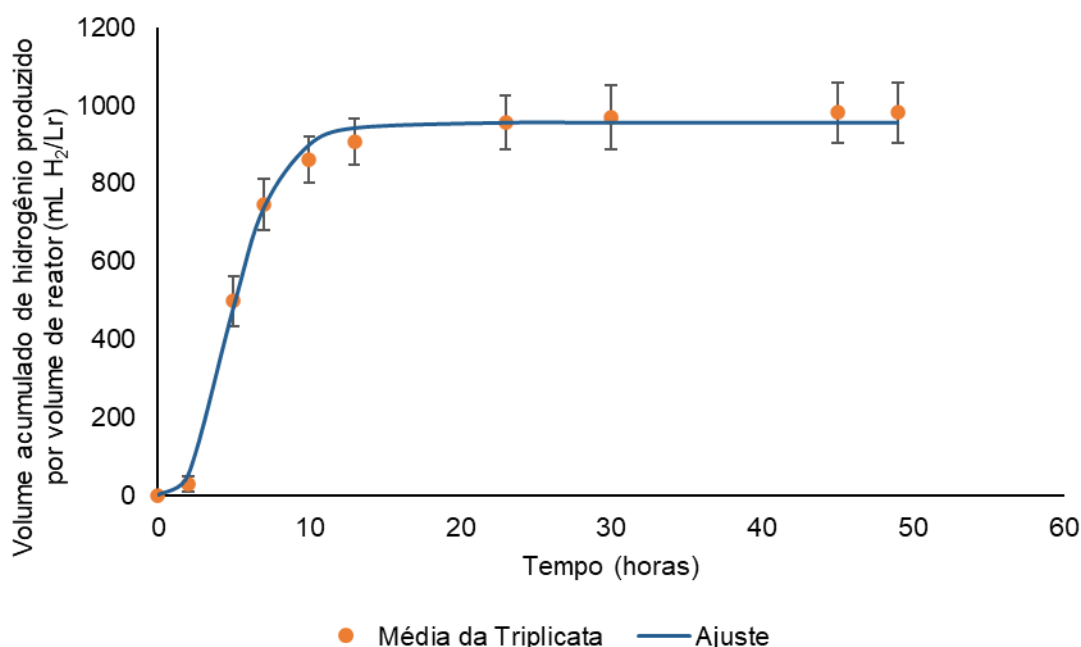


Figura 22 - Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada para geração de hidrogênio em reatores anaeróbios operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 22 - Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Hidrogênio em reatores com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana.

Reator	Produção acumulada (mL H ₂ /Lr)	Estabilidade (Horas após início da operação)	Potencial de produção (mL H ₂ /Lr)	Taxa máxima de produção (mL H ₂ /Lr/H)
H ₂	981,33	13	957,05	169,53

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Não foi verificada diferença significativa entre todos os reatores da triplicata, indicando a confiabilidade da média feita entre eles, além da ausência na produção de metano nos reatores acidogênicos, o que comprovou a eficiência do pré-tratamento térmico aplicado ao lodo granular, assim como verificado por WANG & WAN, (2008a) sendo o melhor pré-tratamento para o inóculo, além de sua fácil aplicabilidade.

Apesar do tempo total de 49 horas de operação dos reatores, foi observado que sua produção se deu quase inteiramente nas 13 primeiras horas com as duas horas iniciais de fase lag, demonstrando uma grande rapidez do processo e semelhança com a produção de hidrogênio otimizada a partir do resíduo sólido da banana (13,75 horas com fase lag de 3,57 horas), isso ocorre devido à natureza de fácil consumo dos carboidratos disponíveis em ambos os casos, entretanto, o resíduo sólido apresentou maior eficiência na conversão de carboidratos em hidrogênio com produção de 0,35 ml/H₂/g carboidrato, enquanto para água residuária foi de 0,16 ml/H₂/g carboidrato.

As produções e consumos de metabólitos foi realizada por cromatografia gasosa, em retiradas de amostras durante toda a operação dos reatores. Os resultados da média das triplicatas estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Variação temporal de metabólitos gerados durante operação de reatores operados com água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana durante produção de Hidrogênio.

Horas de operação (mg/L)	2	5	7	10	13	23	30	45	49
Acetona	1,83	0,67	0,75	1,03	1,31	1,96	2,25	5,00	4,00
Metanol	21,95	18,20	12,26	16,40	11,48	13,65	17,87	14,95	15,32
Etanol	341,73	638,89	606,50	762,03	310,02	441,42	539,05	493,89	460,56
n-Butanol	13,95	18,55	20,55	21,29	20,63	20,71	77,34	146,22	153,26
Ác. Acético	35,84	28,54	62,06	171,99	66,74	84,77	105,78	131,17	125,47
Ác. Propiônico	9,89	11,46	10,04	14,37	5,70	3,69	3,08	4,87	4,03
Ác. Isobutírico	8,14	10,87	9,01	7,96	10,26	11,23	13,35	14,64	15,05
Ác. Butírico	43,51	51,08	135,35	227,46	169,04	216,97	233,29	230,15	233,11
Ác. Isovalérico	1,54	1,69	1,83	1,48	2,12	1,56	0,70	0,27	0,19
Ác. Valérico	3,38	3,32	3,35	3,97	3,09	3,38	3,40	3,06	3,42
Ac. Capróico	6,84	4,13	2,09	2,50	4,12	1,80	1,91	1,72	2,02

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

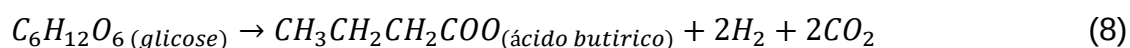
A composição da água residuária com carboidratos facilmente degradáveis ocasionou rápida hidrólise e acúmulo de AGV nas primeiras 10 horas de operação, coincidindo com a fase exponencial da produção de hidrogênio, com destaque para etanol, n-butanol, ácido acético e butírico.

Dentre os metabólitos analisados, levando em consideração que a fase de produção de hidrogênio ocorreu nas primeiras 10 horas, foi observado o aumento da concentração de álcoois e ácidos graxos voláteis como o Etanol (762,03 mg/L), Ácido Acético (171,99 mg/L) e Ácido Butírico (227,46 mg/L), sendo o seu acúmulo esperado para a fase acidogênica, conforme verificado por Mari et al. (2020) em reatores

sequenciais de dois estágios em batelada para a produção de hidrogênio e metano a partir da água residuária da mandioca.

Em relação ao reator de otimização da produção de hidrogênio com o resíduo sólido, os metabólitos semelhantes que se destacaram foram Etanol, Ácido Acético e n-Butanol, porém o comportamento metabólico antes da fase estacionária se diferenciou, sendo que para o resíduo sólido da banana, não tivemos o consumo do Etanol para entrar na fase estacionária. Ainda foi verificado diferentes quantidades de metabólitos ao final das operações, com Etanol em 692,93 mg/L para o resíduo sólido e 460,56 mg/L para a água residuária; Ácido Acético em 52,67 mg/L para o resíduo sólido e 125,47 mg/L para a água residuária; e n-Butanol em 74,42 mg/L para o resíduo sólido e 153,26 mg/L para a água residuária.

Considerando a produção significativa de Ácido Butírico e Ácido Acético presentes nas amostras, as rotas metabólicas predominantes assumidas podem ser representadas pelas equações onde apenas 2 mols de hidrogênio são produzidos quando o butirato (Equação 8) é o principal produto da fermentação e equação 5 a qual 4 mols de hidrogênio são produzidos a partir de 1 mol de glicose em fermentação do tipo acetato (descrito anteriormente).



A respeito do processo de fermentação do butanol, consiste em duas fases principais: (1) acidogênese durante o crescimento exponencial, com produção de ácido acético e butírico, e (2) solventegênese durante a transição de exponencial ao crescimento estacionário, quando ácidos são usados para produção de solventes (Dürre, 1998; Ezeji et al., 2007), sendo possível explicar o aumento significativo após 10 horas de operação dos reatores até o final do experimento.

Destaca-se que até 10 h de operação foram verificadas gerações elevadas de Hidrogênio na fase gasosa e os ácidos acético e butírico na fase líquida.

Na fase estacionária de geração de Hidrogênio foi observada uma mudança na rota metabólica com gerações elevadas de n-butanol (mg/L) (77,34; 146,22; 153,26) em respectivamente, 30, 45 E 49 h de operação. Destaca-se ainda a presença de etanol no início do ensaio (341,73 mg/L) e sua geração expressiva em 10 h de operação (762,03 mg/l), evidenciando a rota metabólica etanólica (Figura 23).

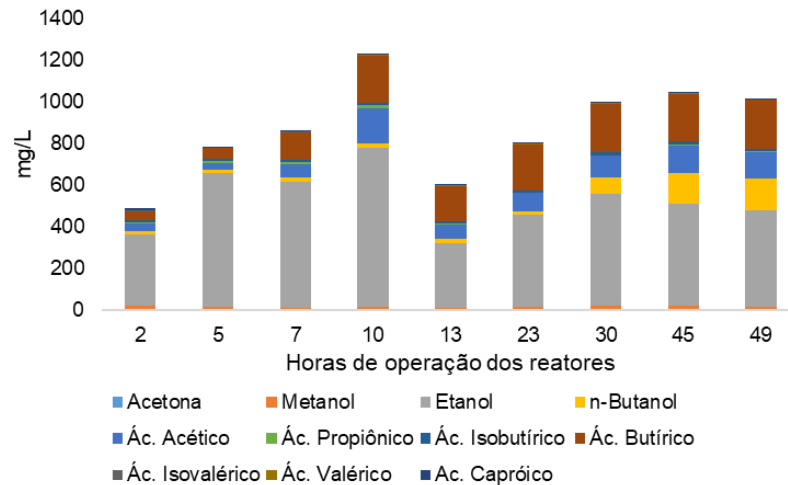


Figura 23 - Proporções de metabólitos gerados durante operação água residuária da lavagem de tachos do doce de Banana.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

2º. Estágio - Ensaio de geração de metano em reatores metanogênicos

Foram verificadas remoções de DQO total nos reatores, tal fato era esperado uma vez que a matéria orgânica representada pela DQO e presente na fase líquida é degradado em biogás (metano e dióxido de carbono) por processos biológicos anaeróbios (Chernicharo, 1997) (Figura 24).

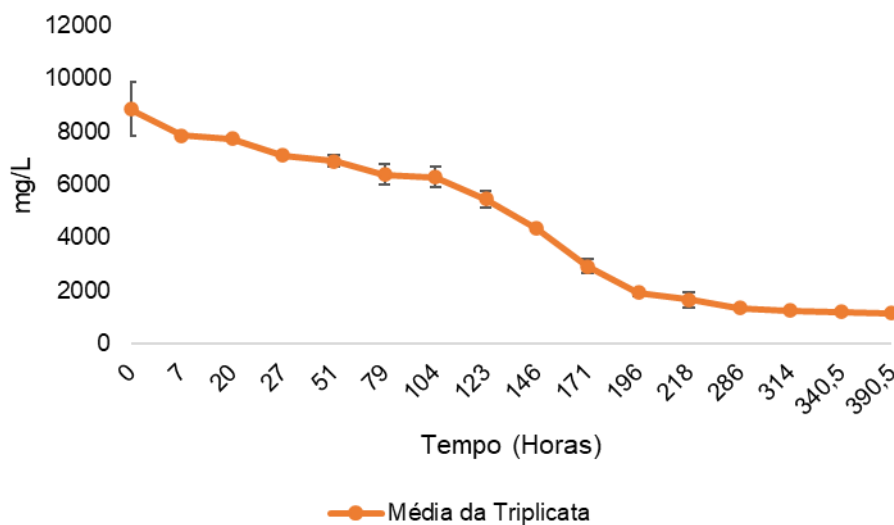


Figura 24 - Remoção de DQO Total durante a operação dos reatores

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Elevados consumos de DQO total foram verificados, apresentando 8840 ml/L no início da operação dos reatores e no final da operação restando apenas 1160 ml/L, representando remoções totais de 86,87% de suas concentrações iniciais, resultado menor em comparação ao consumo de 96,31%, verificado na otimização com resíduo sólido, porém, maior do que o encontrado por El-Kamah et al. (2010) para o processamento de água residuária da produção de suco de fruta utilizando reatores UASR com variação na taxa de carga orgânica entre 5,49 e 15,5 kg DQO/m³d para o tratamento.

Em relação ao consumo de carboidratos totais, apesar de chegar a 50% de consumo, é importante ressaltar que a concentração de carboidratos no efluente ao início da operação era baixa (232,75 ml/L), pois em sua grande maioria, os carboidratos haviam sido consumidos na primeira etapa (Figura 25), relação que também foi verificada na otimização com resíduo sólido da banana que apesar de 95,70% dos carboidratos terem sido consumidos, inicialmente a concentração era de 615 mg/L, já que no primeiro estágio os carboidratos são convertidos em Hidrogênio e metabólitos como etanol (EtOH), acetato (HAc), butirato (HBu), lactato (HLa), propionato (HPr) enquanto a DQO é mantida (SIVAGURUNATHAN et al., 2018).

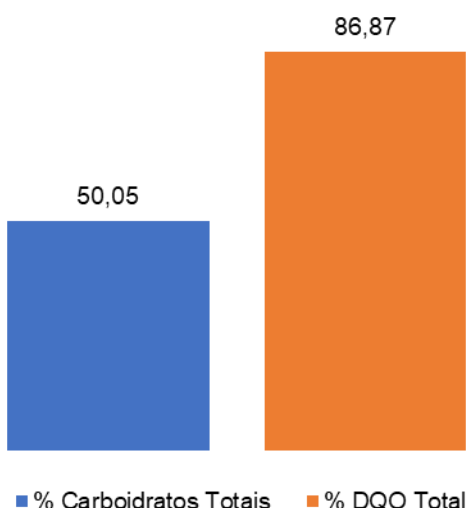


Figura 25 - Remoção de DQO Total e Carboidratos (em %) para produção de CH₄

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Na Figura 26 estão apresentados os resultados da produção acumulada de metano, em 16 dias de operação nos reatores com inóculo enriquecido em meio de

cultivo para a metanogênese, ajustados pela função de Gompertz modificada (Figura 26, Tabela 24).

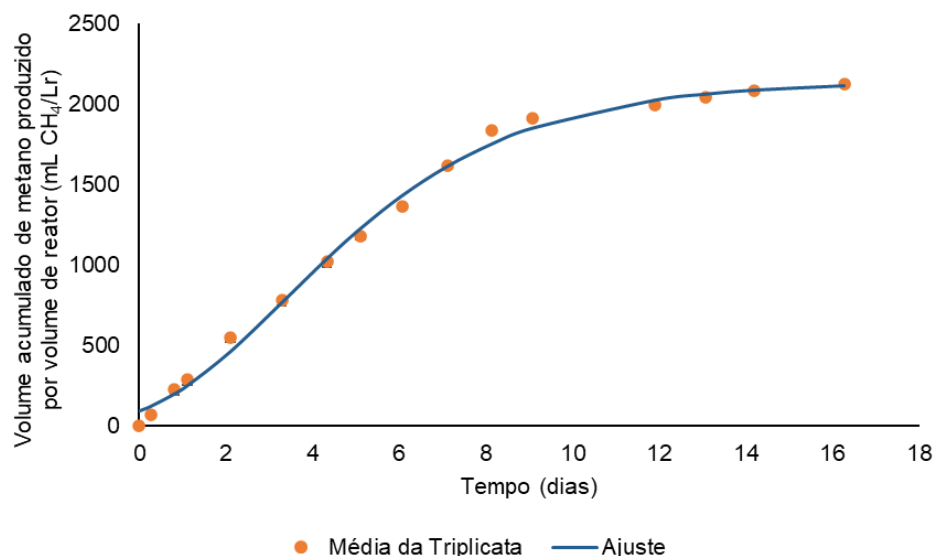


Figura 26 - Volume acumulado temporal de biogás (Metano).

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 24 - Produção acumulada, estabilidade dos reatores, potencial de produção e taxa máxima de produção para Metano.

Reator	Produção acumulada (mL CH ₄ /Lr)	Estabilidade (Dias após início da operação)	Potencial de produção (mL CH ₄ /Lr)	Taxa máxima de produção (mL CH ₄ /Lr/H)
CH ₄	2126	9	2144,63	265,64

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Através do teste de ANOVA e Tukey foi possível verificar que não houve diferença significativa entre todos os reatores da triplicata. Apesar do tempo total de 16 dias de operação dos reatores, foi observado que sua produção se estabilizou nos 9 primeiros dias. Assim como no ensaio aplicando o ajuste com a equação de Gompertz, foi demonstrado a adaptação dos microrganismos nos reatores em 9 h de operação, com remoções expressivas de DQO nos primeiros dias, conforme descrito. Ainda em comparação com a otimização a partir do resíduo sólido, foi possível analisar diferença significativa na conversão de DQO em metano, para o resíduo sólido a eficiência na conversão foi de 0,32 ml/CH₄/g DQO, enquanto para água residuária foi

de 0,27 ml/CH₄/g DQO. Também foi observado que junto da menor eficiência na conversão de DQO em metano, a otimização com água residuária teve uma menor velocidade (265,64 mL CH₄/Lr/H) comparado ao resíduo sólido (584,14 mL CH₄/Lr/H).

Análise metagenômica

O sequenciamento das amostras para identificação dos microrganismos presentes nos reatores permitiu uma avaliação da abundância relativa destes nos reatores do estágio acidogênico e metanogênico do sistema integrado, partidos do inóculo. No lodo granular anaeróbio, adicionado aos reatores acidogênicos, foi observada porcentagem reduzida na abundância relativa para o Domínio Archaea (7,01%) e consequente aumento para 92,42% para o Domínio Bacteria. Tal fato confirmou que o pré-tratamento térmico aplicado ao inóculo e as condições operacionais impostas para o enriquecimento favorecerem o crescimento de comunidade microbiana responsável pelos processos fermentativos de produção de AGVs, álcoois e Hidrogênio (WANG & WAN, 2008a).

Ao final da operação dos reatores acidogênicos, foi verificada abundância relativa mais elevada para o filo Firmicutes (91,38%), que é constituído por bactérias anaeróbias fermentativas, além de incluir os principais microrganismos envolvidos nas etapas de hidrólise e acidogênese, nas quais diversos substratos são utilizados para a produção de hidrogênio e demais metabólitos e solventes. Ademais, a elevada abundância de Firmicutes pode estar associada ao conteúdo elevado de carboidratos do resíduo, além de serem capazes de solubilizar substratos lignocelulósicos (GRESES; TOMÁS-PEJÓ; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, 2020) (Tabela 25).

Foi observado que nos reatores acidogênicos houve predomínio do gênero *Clostridium_sensu_stricto_1* (23,54%), seguido de *Haloimpatiens* (12,50%), representando um crescimento de 12,33% e 12,50%, respectivamente, em relação ao início da operação dos reatores. Para o gênero *Clostridium_sensu_stricto_1*, o resultado era esperado, pois as bactérias produtoras de hidrogênio pertencentes a esses gêneros podem resistir ao pré-tratamento térmico aplicado no inóculo, formando esporos (Setlow, 2006). O gênero *Haloimpatiens* não foi verificado no inóculo. Porém sua presença ocorreu devido ao resíduo utilizado já que as bactérias endofíticas das bananas podem ser agrupadas em quatro filos principais: Proteobacteria, Firmicutes (*Haloimpatiens*), Actinobacteria, Bacteroidetes e demais filos tais como

Cianobactérias, Cloroflexi, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Acidobacteria e Spirochaetes (Thomas et al. 2008; Cabanás et al. 2021; Thomas et al. 2017).

Os gêneros bacterianos verificados no presente estudo são bactérias fermentativas e típicas produtoras de hidrogênio, podendo gerar simultaneamente AGV e hidrogênio com ou sem interações com outras bactérias (Navarro-Díaz et al. 2016; Yang et al. 2020). *Clostridium_sensu_stricto_1* foi relatado por produzir maiores quantidades de hidrogênio quando comparado com outras bactérias. No entanto, suas atividades podem ser inibidas quando o pH extracelular é menor que 5,7 (Castelló et al. 2020, Chen et al, 2021), condizente com o pH dos reatores do ensaio (5,75).

Tabela 25 - Abundâncias relativas (%) do Dominio Bacteria para taxonomias de Filo e de Gênero para as amostras no início e no final da operação dos reatores acidogênicos com resíduos sólidos da banana.

Filo	Inicial (%)	Final (%)	Gênero	Inicial (%)	Final (%)
Firmicutes	81,76	91,38	Clostridium_sensu_stricto_1	11,21	23,54
			Haloimpatiens	0	12,50
			Clostridium_sensu_stricto_10	0	8,90
			Clostridium_sensu_stricto_7	12,64	7,90
			Enterococcus	0,02	7,69
			Clostridium_sensu_stricto_2	0	4,97
			Clostridium_sensu_stricto_14	0	3,82
			Bacillus	0,07	3,75
			Clostridium_sensu_stricto_11	0	3,51
			Clostridium_sensu_stricto_8	0,05	3,46
			Paraclostridium	57,29	1,95
Halobacterota	6,68	3,03	Methanosaeta	5,81	2,25
			Methanoregula	0,52	0,43
Desulfobacterota	4,41	2,06	Syntrophus	3,01	0,88
			Syntrophorhabdus	0,62	0,47
Spirochaetota	1,77	0,80	Spirochaeta	1,62	0,70
Proteobacteria	2,24	0,77	Enterobacter	2,14	0,01
Acidobacteriota	0,57	0,07	Thermoanaerobaculum	0,47	0,05
Chloroflexi	1,04	0,63			
Thermoplasmatota	0,34	0,61			
Cloacimonadota	0,39	0,32	Outros	4,45	13,12
Caldatibacteriota	0,03	0,15			
Outros	0,74	0,16			

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Não foi detectado metano nos reatores acidogênicos, apesar de ser verificada abundância relativa do gênero *Methanosaeta* (2,25%) e *Methanoregula* (0,43), comprovando a inatividade de tais archaeas (Figura 27).

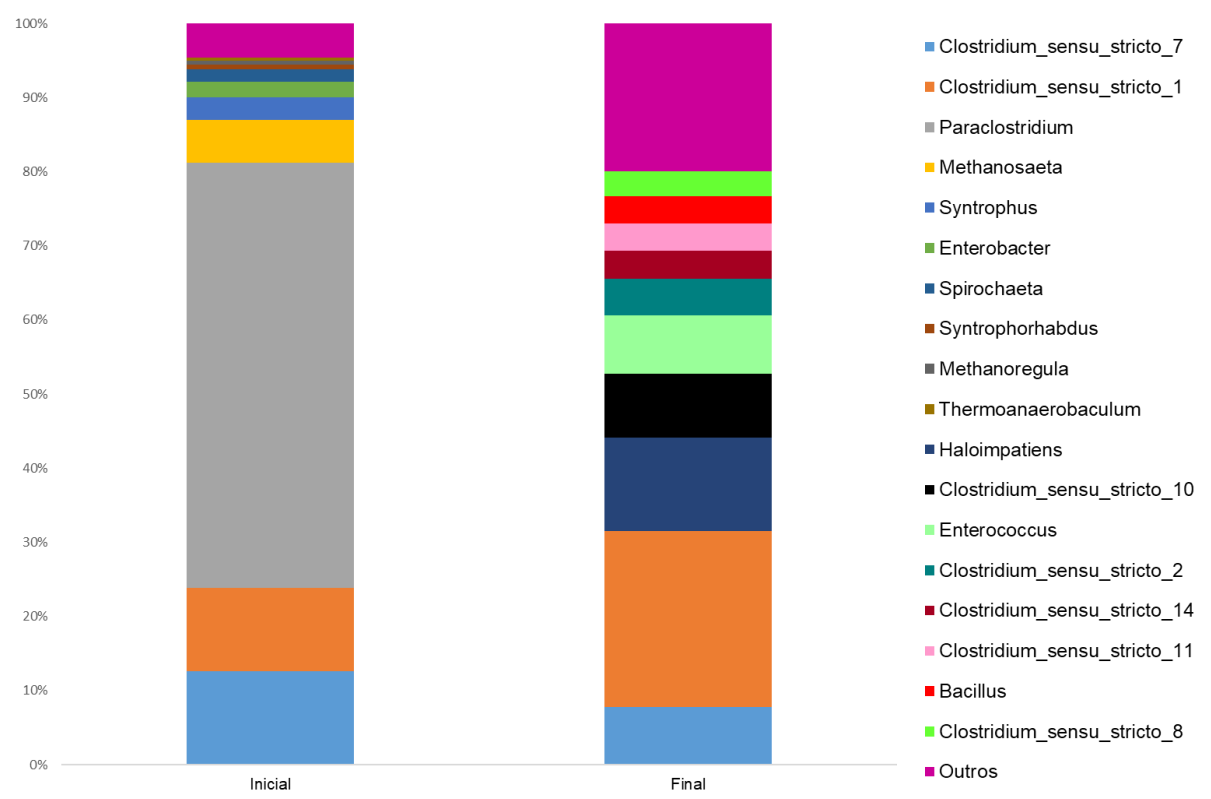


Figura 27 - Abundância relativa de gêneros para Bacteria e Archaea em reatores acidogênicos no início e fim da operação

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Análise das abundancias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas está ilustrado no ideograma circular (Figura 28).

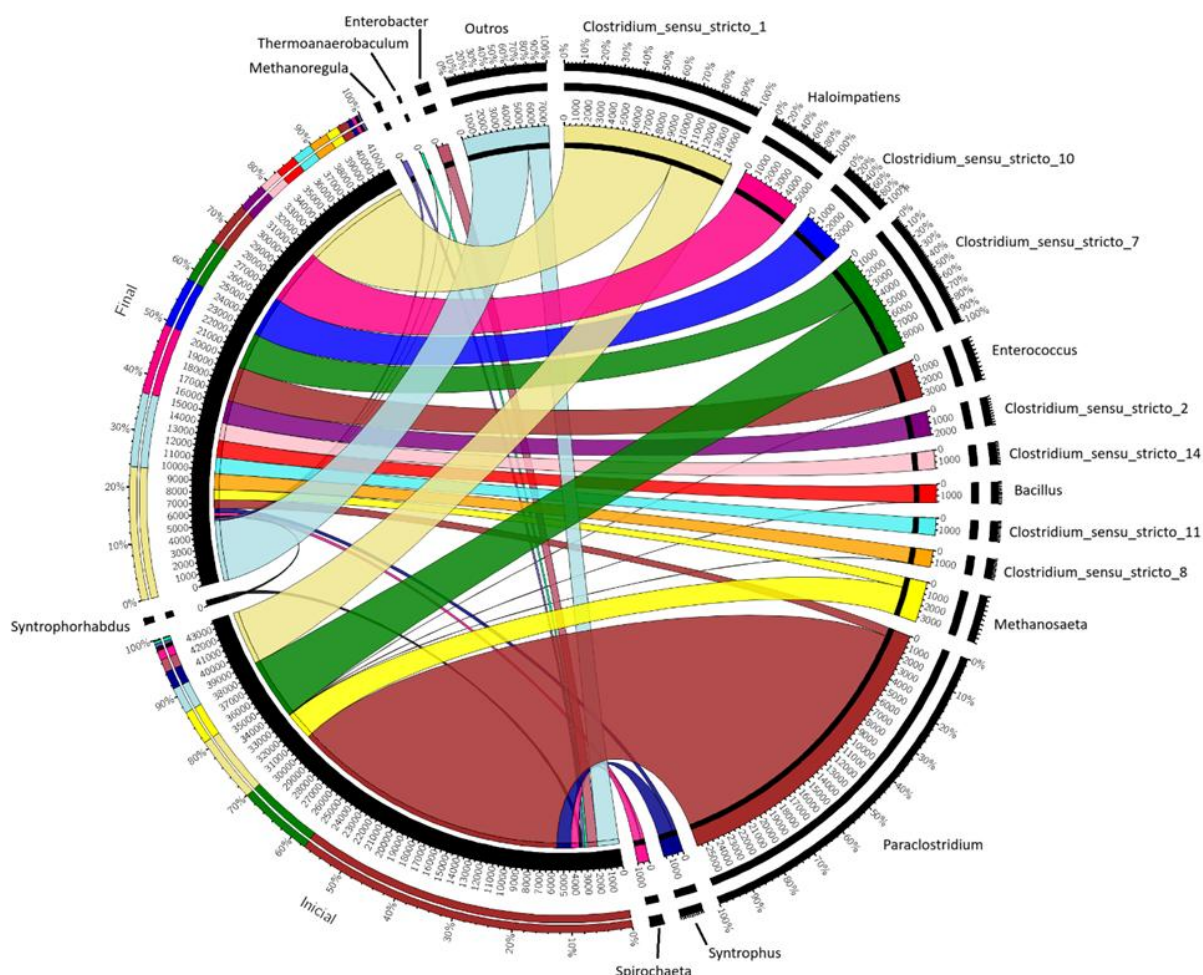


Figura 28 - Ideograma circular “Circos” na variação das abundancias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas no início e final do ensaio da fase acidogênica.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nos reatores metanogênicos foi observada diminuição da abundância relativa do Domínio Bactéria para 45,42% e aumento do Domínio Archaea para 52,72%, com relação ao reator acidogênico. Tal resultado era resultado esperado, principalmente devido ao enriquecimento do inóculo metanogênico em meio de cultivo específico, segundo Del Nery (1987), além da manutenção das condições ideais para a metanogênese com imposição de pH inicial 7,0. O aumento das archaeas pode proporcionar a geração de metano verificada nos bioreatores.

No final da operação dos reatores metanogênicos foi observada abundância relativa mais reduzida do filo Firmicutes (4,79%), ou seja, provavelmente carboidratos e demais açúcares contidos no efluente dos reatores acidogênicos foram consumidos com produção de produtos intermediários, como acetato e dióxido de carbono, para

posterior conversão a metano. O filo Desulfobacterota foi o segundo com abundância relativa mais elevada (9,48%), seguido dos filot Bacteroidota e Chloroflexi, com 5,14% e 4,96%, respectivamente. O enriquecimento seletivo de Bacteroidota pode promover a degradação de matéria orgânica macromolecular complexa, provavelmente envolvido na degradação de proteína e exercendo um papel importante na degradação de celulose, tendo acetato e propionato como produtos. Normalmente, o filo Bacteroidota está relacionado às etapas hidrolítica e acidogênica quando a atividade acetogênica é limitada. Bactérias pertencentes ao filo Chloroflexi são tolerantes a elevadas cargas orgânicas em processos de acidogênese, além de participarem de processos sinérgicos com as metanogênicas hidrogenotróficas. Além disso, tais microrganismos são favorecidos quando o pH é mais próximo da neutralidade. Dessa forma, a elevada abundância de tais filot pode significar que, apesar da separação em dois estágios, a etapa de acidogênese continuou ocorrendo no segundo estágio (XU et al., 2020) (Tabela 26). Entretanto é importante salientar que a principal vantagem na separação das fases acidogênese e metanogênese é que se pode evitar o acúmulo de ácidos graxos voláteis advindos da fermentação em fase única de geração de metano. Tal acúmulo de ácidos pode inibir a metanogênese, causando toxicidade a microrganismos do Dominio Archaea que são mais sensíveis, como comumente pode ocorrer em reatores de fase única.

Foi observada abundância relativa mais elevada de archaeas metanogênicas no segundo estágio, o que pode ter favorecido o elevado rendimento de metano verificado e descrito anteriormente. Ou seja, a manutenção da abundância relativa de microrganismos anaeróbios do inóculo in natura foi mantida na presença do efluente rico em AGVs. Nesses reatores foi observada a abundância relativa do gênero *Methanoregula* (14,20%), que juntamente com *Methanolinea* (13,09%), indicaram a rota metabólica hidrogenotrófica. Entretanto, também foi verificada a ocorrência dos gêneros *Methanosaeta* (36,96%), demonstrando a predominância de metanogênicas que utilizam o acetato. Resultado compatível com a produção de ácido acético no estágio acidogênico, já que o gênero *Methanosaeta* contém archaeas metanogênicas acetoclásticas que utilizam acetato e CO₂ como substrato para a produção de metano (Guo et al, 2015).

Tabela 26 - Abundâncias relativas (%) das taxonomias de Filo e de Gênero para o Dominio Archaea em amostras no início e no final da operação dos reatores metanogênicos operados com efluente dos reatores acidogênicos.

Filo	Inicial (%)	Final (%)	Gênero	Inicial (%)	Final (%)
Halobacterota	52,72	64,33	Methanosaeta	28,10	36,96
			Methanoregula	17,27	14,20
			Methanolinea	7,30	13,09
Desulfobacterota	2,24	9,48	Syntrophus	0,81	3,83
			Syntrophobacter	0,42	3,52
Bacteroidota	0,62	5,14	Macellibacteroides	0,40	2,59
Chloroflexi	1,28	4,96	Leptolinea	0,61	2,36
Firmicutes	35,00	4,79	Clostridium_sensu_stricto_1	8,92	0,22
			Paraclostridium	3,05	0,17
			Haloimpatiens	4,68	0,02
Euryarchaeota	4,25	2,35	Outros	28,44	23,04
Crenarchaeota	0,50	1,60			
Spirochaetota	0,62	1,45			
Cloacimonadota	0,75	1,10			
Synergistota	0,16	1,02			
Outros	1,87	2,73			

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A presença dos gêneros *Clostridium* (0,22%) e *Paraclostridium* (0,17%) no segundo estágio também pode ter favorecido a continuidade da degradação do substrato em ácidos e álcoois para a consequente produção de metano (RABELO et al., 2020) (Figura 29).

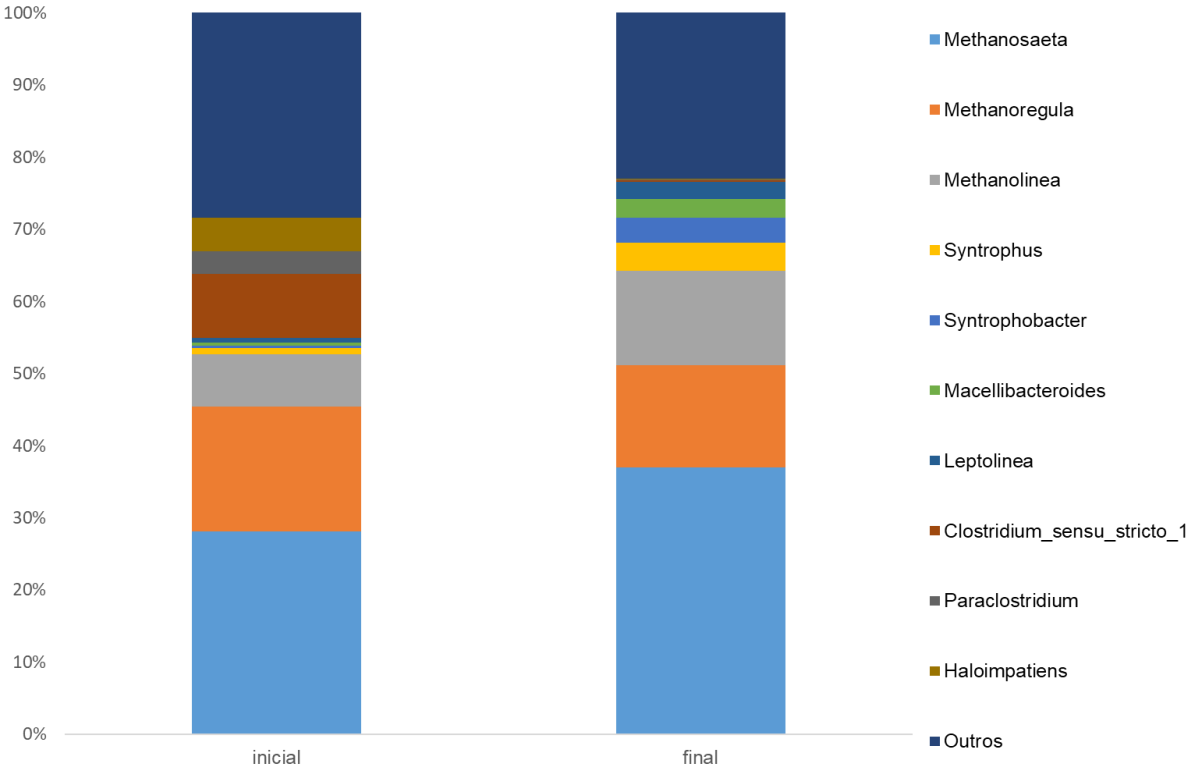


Figura 29 - Abundância relativa de gêneros para Bacteria e Archaea em reatores metanogênicos no início e fim da operação
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Análise das abundancias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas está ilustrado no ideograma circular (Figura 30).

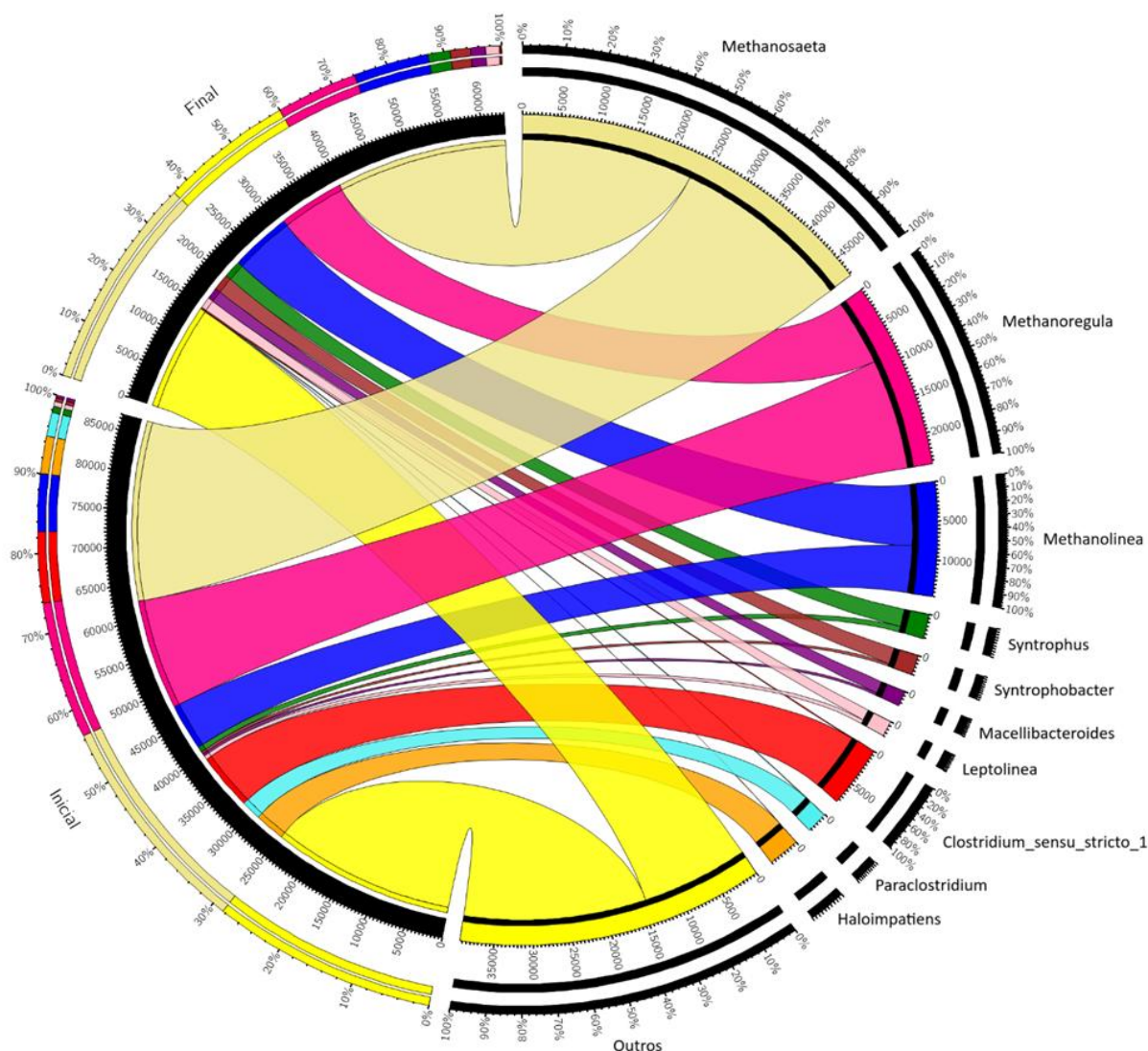


Figura 30 - Ideograma circular “Circos” na variação das abundâncias relativas dos principais gêneros de bactérias e archaeas no início e final do ensaio na fase metanogênica.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

T80 e Estimativa energética

O T80 é um parâmetro técnico usado para determinar o tempo necessário para produzir 80% do hidrogênio (H_2) e do metano (CH_4) totais durante o período de incubação em reatores de digestão anaeróbia. Esse parâmetro é essencial para avaliar a eficiência e o desempenho do processo, permitindo otimizar o tempo de retenção e a operação dos reatores.

Os valores de T80 para o reator acidogênico otimizado com resíduo sólido foi 9,75 horas, para o reator de metano em segundo estágio com resíduo sólido foi 79,5

horas e para o reator de metano direto com resíduo sólido 70,83 horas. Enquanto para os reatores que utilizaram a água residuária foram obtidos os valores de 8,00 horas para os reatores acidogênicos otimizados e 180,15 horas para os reatores de segundo estágio. (Tabela 27)

Tabela 27 - Cálculo do T80 para os reatores de Hidrogênio e Metano.

Reator	T80 (Horas)	Produção (mL/Lr)
Otimizado água residuária (H ₂)	8,00	785,07
Segundo estágio água residuária (CH ₄)	180,15	1700,80
Otimizado resíduo sólido(H ₂)	9,75	1887,20
Segundo estágio resíduo sólido (CH ₄)	79,50	1522,40
Direto resíduo sólido (CH ₄)	70,83	2485,20

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A estimativa energética se refere à implementação de fontes renováveis de energia e à aplicação de tecnologias sustentáveis, visando reduzir a dependência de combustíveis fósseis e mitigar os efeitos ambientais negativos (ELSEVIER, 2019) (Figura 31).

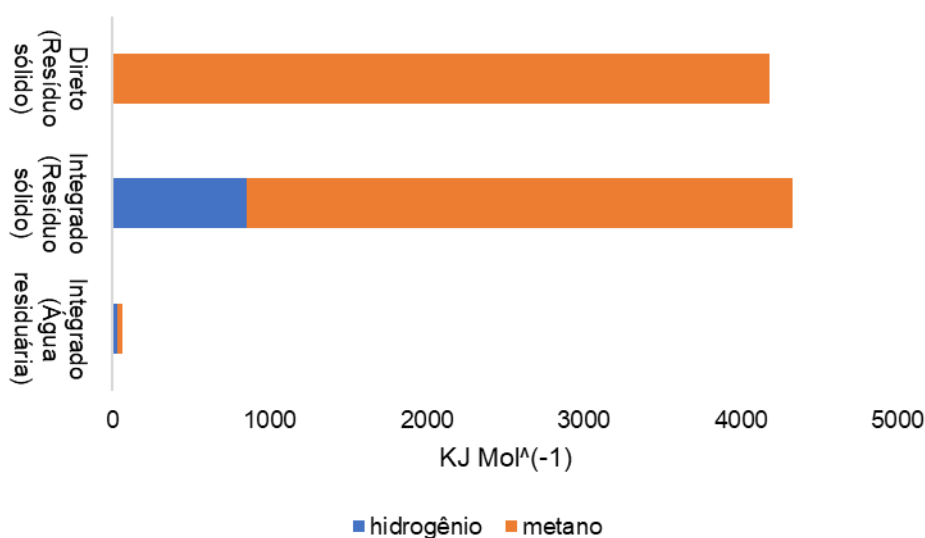


Figura 31 - Estimativa energética para reatores em biossistema integrado (hidrogênio + metano) e metano direto

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Dessa forma, a Estimativa energética total dos reatores de metano direto e biossistema integrado foram, respectivamente, 4181,32 e 4334,44 KJ Mol⁻¹. Assim, não houve diferença significativa entre os processos com apenas 3,53% de KJ Mol⁻¹ a mais no reator integrado na comparação utilizando o resíduo sólido, mas houve diferença significativa em comparação com a água residuária (64,88 KJ Mol⁻¹).

Na comparação entre os diferentes resíduos, os dados demonstram que o resíduo sólido foi o substrato mais eficiente para a produção de biogás, superando a água residuária em diversos aspectos. A produção de hidrogênio foi de 2359 mL H₂/Lr contra 981,33 mL H₂/Lr, com uma taxa máxima significativamente maior (382,16 mL H₂/Lr/H contra 169,53 mL H₂/Lr/H) e eficiência mais de 0,35 mL H₂/g carboidrato contra 0,16 mL H₂/g carboidrato. Na produção de metano, embora a água residuária tenha gerado um volume de 2126 mL CH₄/Lr contra 1903 mL CH₄/Lr, a taxa máxima de produção foi significativa no resíduo sólido (584,14 mL CH₄/Lr/H contra 265,64 mL CH₄/Lr/H), indicando um processo mais rápido e eficiente. Além disso, o tempo de início da produção de CH₄ foi menor no resíduo sólido (2,88 horas contra 9 horas), evidenciando uma resposta mais ágil. A conversão de matéria orgânica em metano também foi mais eficiente no resíduo sólido (0,32 mL CH₄/g DQO contra 0,27 mL CH₄/g DQO), reforçando sua maior capacidade de degradação. Embora a água

residuária tenha produzido mais ácidos graxos, o resíduo sólido promoveu maior produção de etanol (692,93 mg/L contra 460,56 mg/L), um intermediário valioso para conversão energética. No geral, o resíduo sólido demonstrou maior eficiência, produtividade e menor tempo de resposta, tornando-se a melhor escolha para otimizar a biodigestão anaeróbia e a produção de biogás. (Tabela 28)

Tabela 28 – Comparação entre resíduos sólidos e água residuária.

Reator	Resíduo sólido	Água residuária
Produção de H ₂ (mL H ₂ /Lr)	2359	981,33
H ₂ potencial de produção (mL H ₂ /Lr)	2303,76	957,05
H ₂ tempo de início para produção (Horas)	3,57	2
H ₂ taxa máxima de produção (mL H ₂ /Lr/H)	382,16	169,53
H ₂ eficiência (ml/H ₂ /g carboidrato)	0,35	0,16
Ác. Acético (mg/L)	52,67	125,47
Ác. Butírico (mg/L)	0,20	233,11
Etanol (mg/L)	692,93	460,56
n-Butanol (mg/L)	74,42	153,26
Produção de CH ₄ (mL CH ₄ /Lr)	1903	2126
CH ₄ potencial de produção (mL CH ₄ /Lr)	1874,01	2144,63
CH ₄ tempo de início para produção (Horas)	2,88	9
CH ₄ taxa máxima de produção (mL CH ₄ /Lr/H)	584,14	265,64
CH ₄ eficiência (ml/CH ₄ /g DQO)	0,32	0,27

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6 CONCLUSÃO

A caracterização dos resíduos da banana foi semelhante a outras frutas para a sua DQO, enquanto suas quantidades de carboidratos foram elevadas.

No ensaio de otimização da produção de Hidrogênio com o resíduo sólido da banana a melhor resposta prevista pelo modelo foi obtida na temperatura 40°C, pH inicial de 5 e S/I de 2 com produção de 480 ml/L de reator de biogás. Além disso, as análises de interação mostraram que X_1 (temperatura 22° - 45°) e X_3 (relação S/I 0,65 – 3,2) foram os parâmetros operacionais com maior influência na produção de Hidrogênio.

As remoções de carboidratos foram elevadas em todas as condições testadas e variaram de 82,66 a 92,44% das suas concentrações no início da operação dos reatores.

Gerações elevadas de álcoois e ácidos graxos voláteis como o Etanol e Ácido Acético foram verificadas no final da operação evidenciando a rota metabólica acética para as gerações de hidrogênio com resíduos sólidos da banana.

No biossistema integrado para os reatores acidogênicos foram verificadas eficiências elevadas na remoção de carboidratos totais, com reduções significativas nos valores iniciais. O consumo variou de 91,52% no reator otimizado a 97,83% no reator de menor observação, indicando que as condições operacionais otimizadas melhoraram tais consumos com eficiências elevadas. A redução de DQO total foi baixa ao longo da operação, com valores iniciais e finais variando entre os reatores, de 323,7 mg/L a 239,8 mg/L no reator otimizado e de 279,3 mg/L a 249,6 mg/L no menor observado. Tal fato confirmou a fermentação dos resíduos sólidos da banana a ácidos orgânicos e álcoois. A temperatura foi o fator mais influente para a produção de H_2 , com maior produção no reator operado a 45°C e menor geração a 22°C. Todos os reatores apresentaram fase de início de produção de H_2 . Assim, o reator operado a 22°C apresentou maior tempo de início de geração de H_2 e que foi de 11,60 horas, demonstrando que a temperatura foi um fator determinante para a produção de H_2 . Nos reatores otimizados, maior observado e ponto central, a produção de metabólitos estabilizou após 5,75 horas, com elevação nas gerações de hidrogênio. O reator de menor observado teve produção simultânea de metabólitos e hidrogênio, resultando em gerações de biogás mais reduzidas.

Nos reatores metanogênicos houve remoções de 96,31% da DQO no segundo estágio e 91,07% no reator direto. O consumo de carboidratos foi de 95,70% no reator

de metano direto e 73,98% no segundo estágio, com concentrações finais de 160 mg/L e 170 mg/L, respectivamente. As produções estabilizaram após 4 dias, e a adaptação dos microrganismos ocorreu em 2,88 horas no segundo estágio e 6,48 horas no metano direto

Para as condições otimizadas com água residuária dos tachos do doce de banana foi observado consumo superior a 95% dos carboidratos na produção de 981,33 mL H₂/Lr e metabólitos de valor agregado como o Etanol (762,03 mg/L), Ácido Acético (171,99 mg/L) e Ácido Butírico (227,46 mg/L), presentes no efluente dos reatores acidogênicos. Além disso, o efluente dos reatores acidogênicos foram importantes para produção de metano com o consumo de DQO (86,87% das quantidades iniciais), demonstrando eficiência na remoção de matéria orgânica por digestão anaeróbia.

Através da análise metagenômica foi possível justificar a produção de Hidrogênio devido à presença predominante de bactérias do gênero *Clostridium_sensu_stricto_1* pertencentes ao filo *Firmicutes*, conhecidas por suportarem o pré-tratamento de choque térmico ao qual o inóculo foi submetido. Em relação a produção de metano, foi observado a predominância do gênero *Methanosaeta* que pertence ao filo *Halobacterota*, indicando a rota acetoclástica como maior abundância durante a produção de Metano.

Em comparação entre as otimizações utilizando resíduo sólido da banana e água residuária do processamento da fruta, nos reatores acidogênico, o consumo de carboidratos foi semelhante, porém com maiores consumos de DQO e maior eficiência na conversão de carboidratos em hidrogênio com resíduo sólido (0,35 ml/H₂/g carboidrato), além de maior produção de Etanol (692,93 mg/L), enquanto a otimização com água residuária teve as maiores produções de Ácido Acético (125,47 mg/L) e n-Butanol (153,26 mg/L). Para os reatores metanogênicos, em ambas as otimizações, tivemos o consumo de carboidratos explicado pela baixa concentração inicial. A otimização com o resíduo sólido ainda apresentou maiores consumos de DQO (96,31%), maior eficiência na transformação de DQO em metano (0,32 ml/CH₄/g DQO) e maior velocidade de produção (584,14 mL CH₄/Lr/H).

Resíduos da banana, que são ricos em açúcares como glicose, foram ideais para produzir biocombustíveis como etanol e hidrogênio na fermentação por culturas mistas de bactérias anaeróbias.

REFERÊNCIAS

- ¹ Pereira Neto, J.T. Manual de compostagem: processo de baixo custo. Viçosa-MG: Editora UFV, 81p. 2007.
- ² Manhongo, T.T., Chimphango, A.F.A., Thornley, P., Röder, M.: Current status and opportunities for fruit processing waste biorefineries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111823>
- ³ Aurore, G., Parfait, B., Fahrasmane, L.: Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 78–91 (2009). <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2008.10.003>
- ⁴ GAO, M. et al. Opportunities and Challenges for Biogas Development: a Review in 2013– 2018. *Current Pollution Reports*, n. March, 2019.
- ⁵ S. Astals, D.J. Batstone, J. Mata-Alvarez, P.D. Jensen, Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes, *Bioresource Technology*, Volume 169, 2014, Pages 421-427, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.024>.
- ⁶ CORTEZ, L. A.B.; HONORIO, S. L.; MORETTI, C. L. Resfriamento de frutas e hortaliças. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.
- ⁷ Carvalho Júnior, R. P. D. (2022). Aplicação de resíduo do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios para produção de bioprodutos de valor agregado.
- ⁸ DEPPENMEIER, U. The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 71, p. 223–283, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660302710453>>.
- ⁹ AUGUSTOS DE LEMOS CHERNICHARO, Carlos; VON SPERLING, Marcos. Biological wastewater treatment in warm climate regions. IWA publishing, 2005.
- ¹⁰ Suárez, J.L.R, 2014. Producción de biogás a partir de biomasa de microalgas *Scenedesmus* sp. procedente de diferentes procesos. Tese doutoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España.
- ¹¹ KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. do (Ed.). Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019. p. 13-26. DOI: DOI - https://dx.doi.org/10.21452/978-85-93823-01-5.2019.01_1.

- ¹² MICELI, J. F.; TORRES, C. I.; KRAJMALNIK-BROWN, R. Shifting the balance of fermentation products between hydrogen and volatile fatty acids: microbial community structure and function. *FEMS microbiology ecology*, v. 92, 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://femsec.oxfordjournals.org/content/91/4/fiv011.abstract>>.
- ¹³ DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, n. 1, p. 13–28, 2001.
- ¹⁴ SIVAGURUNATHAN, P. et al. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment method, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 77, n. March 2016, p. 28–42, 2017.
- ¹⁵ DE CLERCQ, D.; WEN, Z.; GOTTFRIED, O.; SCHMIDT, F.; FEI, F. A review of global strategies promoting the conversion of food waste to bioenergy via anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 79, n. May, p. 204–221, 2017.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ RABELO, C. A. B. S. et al. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 223, n. July, p. 952–963, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015>>.
- ¹⁸ MAZARELI, R. C. da S. Otimização da produção de hidrogênio a partir de resíduos de banana: avaliação da diversidade de bactérias autóctones e distribuição funcional. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.
- ¹⁹ RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 4, p. 144–154, 2019.
- ²⁰ WALTER, A. et al. Biomethane potential of industrial paper wastes and investigation of the methanogenic communities involved. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, p. 1–21, 2016.
- ²¹ ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>>.
- ²² CHAPLEUR, O. et al. Asymmetrical response of anaerobic digestion microbiota to temperature changes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 3, p. 1445–1457, 2016.

- ²³ SOLLI, L. et al. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for biofuels*, v. 7, n. 1, p. 146, 2014. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/146>>.
- ²⁴ MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 34, p. 167–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>>.
- ²⁵ CREMONEZ, Paulo André et al. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 281, p. 111854, 2021.
- ²⁶ LIM, Seung Joo; KIM, Tak-Hyun. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. *Biomass and bioenergy*, v. 60, p. 189-202, 2014.
- ²⁷ CANAVER MARIN, DANIELI FERNANDA; RODRIGUES, CAROLINE VARELLA; MAINTINGUER, SANDRA IMACULADA. Maximizing biogas production from expired dairy products: A two-stage anaerobic digestion approach. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY*. v.100, p.173 - 183, 2025.
- ²⁸ RODRIGUES, CAROLINE VARELLA; CAMARGO, FRANCIELE PEREIRA; LOURENÇO, VITOR ALVES; SAKAMOTO, ISABEL KIMIKO; MAINTINGUER, SANDRA IMACULADA; SILVA, EDSON LUIZ; AMÂNCIO VARESCHE, MARIA BERNADETE. Towards a circular bioeconomy to produce methane by co-digestion of coffee and brewery waste using a mixture of anaerobic granular sludge and cattle manure as inoculum. *CHEMOSPHERE*. v.357, p.142062 - 14073, 2024.
- ²⁹ Silva D C; RODRIGUES, C. V.; MAINTINGUER, SANDRA IMACULADA; CANAVER MARIN, DANIELI FERNANDA; LAZARO, C. Z.; JACOBUS, ANA PAULA; Pires, L.O. Performance of clostridium species and autochthonous bacteria from citrus wastewater under different carbon sources to produce biofuels. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY*. v.1, p.77 - 181, 2023.
- ³⁰ ADAMES, LUAN VIEIRA; JACOBUS, ANA PAULA; SAKAMOTO, ISABEL KIMIKO; LAZARO, CAROLINA ZAMPOL; PIRES, LORENA OLIVEIRA; MAINTINGUER, SANDRA IMACULADA. Bioenergy Recovery from Anaerobic Co-Digestion of Crude Glycerol and Domestic Sewage In-Series Reactor: Microbial Characterization and System Performance. *BioEnergy Research*. v.1, p.32 - 43, 2022.
- ³¹ MARAGKAKI, A. E. et al. Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants. *Waste management*, v. 59, p. 362-370, 2017.
- ³² 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*, v. 76, p. 339–349, 2018.

- ³³ RODRIGUES, C. V.; Santana, K O; Nespeca M G; DE OLIVEIRA J. E.; MAINTINGUER, SANDRA IMACULADA. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. *International Journal of Hydrogen Energy*. v.41, p.14641 - 14651, 2016.
- ³⁴ KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017.
- ³⁵ APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater*. 21st. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2005.
- ³⁶ ADORNO, M.; HIRASAWA, J.; VARESCHE, M. Development and validation of two methods to quantify volatile acids. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 5, n. May, p. 406–414, 2014.
- ³⁷ MARTÍN, M. A.; SILES, J. A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource Technology*, Essex, v. 101, p. 8993–8999, 2010
- ³⁸ 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, 2017.
- ³⁹ MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 16, p. 4309–4317, 2008.
- ⁴⁰ Del Nery V (1987). *Utilização do lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos., Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo.
- ⁴¹ Widdel F, Pfennig N (1984) Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*; vol I. Williams & Wilkins, Baltimore London, pp 663- 679
- ⁴² ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops : a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*— WST, p. 927–934, 2009.
- ⁴³ MAIESKI, Luciano Missel. *Os principais microorganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite*. 2011.

- ⁴⁴ Gang Wang, Yang Mu, Han-Qing Yu, Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 23, Issue 2, 2005, Pages 175-184
- ⁴⁵ NEVES, L.; OLIVEIRA, R.; ALVES, M. M. Influence of inoculum activity on the biomethanization of a kitchen waste under different waste/ inoculum ratios. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 12, p. 2019-2024, 2004.
- ⁴⁶ WHEELAN, C. Estatística: o que é, para que serve, como funciona. Editora Schwarcz-Companhia das Letras, 2016.
- ⁴⁷ Freire, C.C., Marin, D.F.C., da Silva Mazareli, R.C. et al. Unravelling the Biohydrogen Production Potential from a Co-Digestion Process of Banana Processing Wastewater and Synthetic Sewage by Anaerobic Fermentation: Performance Evaluation and Microbial Community Analysis. *Waste Biomass Valor* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02258-6>
- ⁴⁸ DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- ⁴⁹ AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ⁵⁰ LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Developments of Bacterial Population and Methanogenic Activity in a Laboratory-Scale Landfill Bioreactor. *Water Research*, v. 32, n. 12, p. 3673– 3679, 1998.
- ⁵¹ Zhang, R. et al. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 4, p. 929–935, 2007.
- ⁵² CAMARENA-MARTÍNEZ, Maria Eugenia; et al. Performance Evaluation of Anaerobic Digestion of Agricultural Waste for Biogas Production: The Influence of Temperature and Organic Loading Rate. *Renewable Energy*, v. 145, p. 1517-1526, 2020.
- ⁵³ RODRIGUES, C. V. et al. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste cooking oils. *Renewable Energy*, v. 162, p. 701–711, 2020b.
- ⁵⁴ GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. v. 1
- ⁵⁵ Julie Haendiges, Ruth Timme, Padmini Ramachandran, Maria Balkey 2020. DNA Quantification using the Qubit Fluorometer. [protocols.io](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bi8dkhs6) <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bi8dkhs6>

- ⁵⁶ Schaefer, Rejane. Técnicas em biologia molecular. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 24p.; 29cm. –(Documentos / Embrapa Suínos e Aves, ISSN 0101-6245; 116)
- ⁵⁷ Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- ⁵⁸ PERIMENIS, Anastasios et al. Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. *Waste Management*, v. 72, p. 178-185, 2018.
- ⁵⁹ RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. Experimental design and process optimization. Crc Press, 2014.
- ⁶⁰ M.M. Gomes, I.K. Sakamoto, C.A.B. Silva Rabelo, E.L. Silva, M.B.A. Varesche, Statistical optimization of methane production from brewery spent grain: Interaction effects of temperature and substrate concentration, *J. Environ. Manag.* 288 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112363>.
- ⁶¹ Reungsang, A., Pattr, S., Sittijunda, S., 2012. Optimization of key factors affecting methane production from acidic effluent coming from the sugarcane juice hydrogen fermentation process. *Energies* 5, 4746–4757. <https://doi.org/10.3390/en5114746>.
- ⁶² Kainthola, J., Kalamdhad, A.S., Goud, V.V., 2019. Optimization of methane production during anaerobic co-digestion of rice straw and hydrilla verticillata using response surface methodology. *Fuel* 235, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.094>.
- ⁶³ Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technol.* 91, 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00152-4).
- ⁶⁴ Mari, A. G. et al. Biohydrogen and biomethane production from cassava wastewater in a two-stage anaerobic sequencing batch biofilm reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 45, n. 8, p. 5165–5174, 2020.
- ⁶⁵ Jeong-Hoon Park, Sang-Hoon Lee, Jeong-Jun Yoon, Sang-Hyoun Kim, Hee-Deung Park, Predominance of cluster I *Clostridium* in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges, *Bioresource Technology*, Volume 157, 2014, Pages 98-106, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.081>.
- ⁶⁶ VALDEZ-VAZQUEZ, Idania; POGGI-VARALDO, Hector M. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 13, n. 5, p. 1000-1013, 2009.

- ⁶⁷ ELSHARNOUBY, Omneya et al. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 12, p. 4945-4966, 2013.
- ⁶⁸ WANG, Jianlong; WAN, Wei. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International journal of hydrogen energy*, v. 33, n. 12, p. 2934-2941, 2008a.
- ⁶⁹ Wang XJ, Ren NQ, Xiang WS, Guo WQ. ()2007Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogenproducing fermentative bacterial B49. *Int J Hydrogen Energy*, n. 32, p. 748–54.
- ⁷⁰ BARROS, Aruana Rocha; SILVA, Edson Luiz. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 61, p. 59-65, 2012.
- ⁷¹ CHERNICHARO, C. A. de L. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios*. Belo Horizonte: Segrac, 1997, v. 5. 245 p.
- ⁷² Hala El-Kamah, Ahmed Tawfik, Mohamed Mahmoud, Hisham Abdel-Halim, Treatment of high strength wastewater from fruit juice industry using integrated anaerobic/aerobic system, *Desalination*, Volume 253, Issues 1–3, 2010, Pages 158-163, ISSN 0011-9164, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.11.013>.
- ⁷³ SIVAGURUNATHAN, P.; KUPPAM, C.; MUDHOO, A.; SARATALE, G. D.; KADIER, A.; ZHEN, G.; CHATELLARD, L.; TRABLY, E.; KUMAR, G. A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 38, p. 868-882, 2018. doi: 10.1080/07388551.2017.1416578.
- ⁷⁴ DÜRRE, Peter. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 49, p. 639-648, 1998.
- ⁷⁵ EZEJI, Thaddeus; QURESHI, Nasib; BLASCHEK, Hans P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, v. 97, n. 6, p. 1460-1469, 2007.
- ⁷⁶ GRESES, Silvia; TOMÁS-PEJÓ, Elia; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, Cristina. Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. *Bioresource technology*, v. 297, p. 122486, 2020.
- ⁷⁷ Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101(3):514– 525

- ⁷⁸ Thomas, P.; Swarna, G.K.; Roy, P.K.; Patil, P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2008, 93, 55–63.
- ⁷⁹ Cabanás, G.-L.C.; Fernández-González, A.J.; Cardoni, M.; Valverde-Corredor, A.; López-Cepero, J.; Fernández-López, M.; Mercado-Blanco, J. The Banana root endophytome: Differences between mother plants and suckers and evaluation of selected bacteria to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *J. Fungi* 2021, 7, 194.
- ⁸⁰ Thomas, P.; Sekhar, A.C. Cultivation Versus Molecular Analysis of Banana (*Musa* sp.) Shoot-Tip tissue reveals enormous diversity of normally uncultivable endophytic bacteria. *Microb. Ecol.* 2017, 73, 885–899.
- ⁸¹ Navarro-Díaz M, Valdez-Vazquez I, Escalante AE. Ecological perspectives of hydrogen fermentation by microbial consortia: What we have learned and the way forward. *Int J Hydrog Energy* 2016;41(39):17297–308.
- ⁸² Yang G, Wang J. Biohydrogen production from waste activated sludge pretreated by combining sodium citrate with ultrasonic: Energy conversion and microbial community. *Energy Convers Manage* 2020;225:113436. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113436>.
- ⁸³ Castello ´ E, Nunes Ferraz-Junior AD, Andreani C, Anzola-Rojas MDP, Borzacconi L, Buitron ´ G, et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. *Renew Sust Energy Rev* 2020;119: 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- ⁸⁴ Chen Y, Yin Y, Wang J. Influence of butyrate on fermentative hydrogen production and microbial community analysis. *Int J Hydrogen Energy* 2021;46(53):26825–33
- ⁸⁵ XU, X. et al. Bioelectrochemical system for the enhancement of methane production by anaerobic digestion of alkaline pretreated sludge. *Bioresource Technology*, v. 304, p. 123000, 2020.
- ⁸⁶ Guo J, Peng Y, Ni BJ, et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb Cell Fact.* 2015;14(1):33.
- ⁸⁷ RABELO, Camila Abreu B. Silva et al. Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. *Science of the Total Environment*, v. 715, p. 136868, 2020.
- ⁸⁸ ELSEVIER. Renewable Energy: Sources and Methods. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780128172107/renewable-energy>>. Acesso em: 12 nov. 2024.