

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA – ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ROMÁRIO PEREIRA DE CARVALHO JÚNIOR

APLICAÇÃO DE RESÍDUO DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA GOIABA EM
REATORES ANAERÓBIOS PARA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS DE VALOR
AGREGADO.

ARARAQUARA
2022

ROMÁRIO PEREIRA DE CARVALHO JÚNIOR

Aplicação de resíduo do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios para produção de bioprodutos de valor agregado.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

Araraquara
2022

C331a

Carvalho Júnior, Romário Pereira de

Aplicação de resíduo do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios para produção de bioprodutos de valor agregado / Romário Pereira de Carvalho Júnior. -- Araraquara, 2022

106 f. : il.

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

Orientadora: Sandra Imaculada Maintinguer

1. Biorreatores. 2. Hidrogênio. 3. Metano. 4. Ácidos graxos. 5. Resíduos orgânicos - Reaproveitamento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

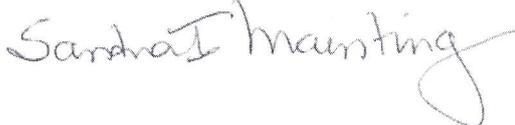
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Aplicação de resíduo do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios para produção de bioprodutos de valor agregado"

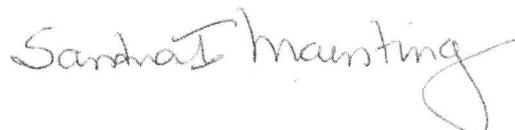
AUTOR: ROMÁRIO PEREIRA DE CARVALHO JÚNIOR

ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

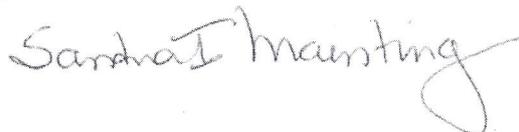
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Profª Drª SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. IVÁN MORENO ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento Ambiental / Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM - Ciudad de México



Profª. Drª. KATIA SIVIERI (Participação Virtual)
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Araraquara, 07 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Romário Pereira de Carvalho Júnior

Nome em citações bibliográficas: Carvalho Júnior, R. P. de.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quintandinha, CEP: 14800-060 – Araraquara, SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2019 – 2022: Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Aplicação de resíduo do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios para produção de bioprodutos de valor agregado.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2012 – 2018: Graduação em Engenharia Ambiental.

Universidade de Brasília, UnB, Brasil.

Título: Avaliação da eficiência do sistema de lagoas de alta taxa como pós-tratamento dos reatores UASB para garantia da qualidade do efluente final – ETE Paranoá/DF.

Orientadoras: Ariuska Karla Barbosa Amorim, Lenora Nunes Ludolf Gomes.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2020 – 2020: As Políticas de Água e Saneamento Básico em Países em Desenvolvimento. (Carga horária: 25h).

Universidade de Manchester, MANCHESTER, Inglaterra.

2020 – 2020: Curso de Comunicação e Escrita Científica. (Carga horária: 5h).

American Chemical Society, Estados Unidos.

2020 – 2020: Introdução à Engenharia de Saúde Pública em Contextos Humanitários.
(Carga horária: 12h).

Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL, Suíça.

2020 – 2020: Planejamento e criação de sistemas e tecnologias de saneamento.
(Carga horária: 20h).

Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL, Suíça.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2018 – 2019: Universidade Nacional Autônoma do México, UNAM, México.

Pesquisador estagiário (Bolsista IIUNAM-AIDIS).

2017 – 2018: Ministério Público do Distrito Federal e dos Territórios, MPDFT, Brasil.

Estagiário (Setor de Gestão Ambiental).

2016 – 2017: Universidade de Brasília, UnB, Brasil.

Estudante de iniciação científica.

Voluntário no Edital 2016/2017 ProIC/DPP/UnB PIBIC (CNPq).

Título: Avaliação da eficiência de biodegradação de benzeno em quimiostato.

2015 – 2017: Universidade de Brasília, UnB, Brasil.

Monitor nas disciplinas: Aspectos Químicos de Qualidade de Água Experimental; Cinética, Processos e Operações Unitárias; e Tratamento de Águas Residuárias Urbanas.

2015 – 2016: Universidade de Brasília, UnB, Brasil.

Estudante de iniciação científica.

Bolsista no Edital 2015/2016 ProIC/DPP/UnB – PIBIC (CNPq) pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

Título: Avaliação da capacidade de biodegradação do benzeno por microrganismos autóctones nos solos do Distrito Federal.

PRÊMIOS E TÍTULOS

1. 2021: Trabalho premiado como TOP 12, no International Symposium of Agricultural and Agroindustrial Waste Management. VII SIGERA. 2021.
2. 2019: Indicado ao Prêmio Destaque de Iniciação Científica, 23º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 14º Congresso de Iniciação Científica do DF.

3. 2018: Menção Honrosa pelo trabalho na área de Engenharia Sanitária, 70ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos submetidos

1. DE CARVALHO JÚNIOR, ROMÁRIO; IMACULADA MAINTINGUER, SANDRA. Application of a two-stage anaerobic system from guava processing waste to added-value bioproducts. *Industrial Biotechnology*. Submitted: 23/12/2021.
2. MARIN, D. F. C.; MENDOZA, L. M.; DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. Recovery of expired dairy products and sewage in biogas production by anaerobic digestion. *Engineering in Agriculture*. Submitted: 22/02/2022.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. BIOGAS PRODUCTION IN ANAEROBIC BATCH REACTORS FED WITH GUAVA PROCESSING WASTE. In: *Latin American Meetings on Anaerobic Digestion, 2020*. J-DAAL, 2020.

Resumos publicados em anais de congressos

1. DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. APPLICATION OF A TWO-STAGE ANAEROBIC SYSTEM: FROM GUAVA PROCESSING WASTE TO ADDED-VALUE BIOPRODUCTS. In: *International Symposium of Agricultural and Agroindustrial Waste Management, 2021*. VII SIGERA.
2. MARIN, D. F. C.; DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. RECOVERY OF DAIRY WASTE AND SEWAGE IN BIOGAS PRODUCTION BY ANAEROBIC DIGESTION. In: *International Symposium of Agricultural and Agroindustrial Waste Management, 2021*. VII SIGERA.
3. CARVALHO JÚNIOR, R. P.; RODRIGUEZ, G. M.; MARIN, M. A. C. ; SANCHEZ, A. ; BUITRON, G. . CO-DIGESTIÓN DE EFLUENTES LIGNOCELULÓSICOS DE BIORREFINERÍA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METANO. In: *XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2019, León*. *Memorias XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2019*.

4. CARVALHO JÚNIOR, R. P.; VIZZOTTO, C. S.; AMORIM, A. K. B. ; GOMES, L. N. L. . AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIODEGRADAÇÃO DE BENZENO EM QUIMIOSTATO. In: 70ª Reunião Anual da SBPC, 2018, Maceió. Resumos da 70ª Reunião Anual da SBPC, 2018.
5. CARVALHO JÚNIOR, R. P.; VIZZOTTO, C. S.; AMORIM, A. K. B.; GOMES, L. N. L. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO BENZENO POR MICRO-ORGANISMOS AUTÓCTONES NOS SOLOS DO DISTRITO FEDERAL. In: 69ª Reunião Anual da SBPC, 2017, Belo Horizonte. 69ª Reunião Anual da SBPC, 2017.

Apresentações de Trabalho

1. DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MARIN, D. F. C.; MAINTINGUER, S. I. Codigestão anaeróbia de resíduos do processamento da goiaba e esgoto sanitário na produção de biocombustíveis. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. SILVA, S. F. C.; DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. Aplicação de resíduos do processamento da goiaba na geração de Metano em reatores anaeróbios em batelada. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; SILVA, S. F. C.; MAINTINGUER, S. I. Produção de metano a partir de resíduo do processamento industrial da goiaba em codigestão com esgoto sanitário. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. DE CARVALHO JÚNIOR, R. P.; MAINTINGUER, S. I. Digestão anaeróbia em dois estágios de resíduo do processamento da goiaba. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. CARVALHO JÚNIOR, R. P. Producción de biocombustibles gaseosos a partir de residuos de una biorrefinería. 2019. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. CARVALHO JÚNIOR, R. P. Aplicação de efluentes do processamento da fruticultura nacional na geração de biogás por processos anaeróbios. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).

ORIENTAÇÕES

Iniciação Científica (Coorientação)

1. Stephanie F. Caldeira da Silva. Reatores anaeróbios alimentados com resíduos do processamento da goiaba para a geração de biogás. 2020. Iniciação Científica (Aluna de Ensino Médio). Unesp – IGCE. Rio Claro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer.
2. Ivan Mangini. Digestão anaeróbia de resíduos do processamento da goiaba submetidos a pré-tratamento visando a produção de biogás. Iniciação Científica. Unesp – IGCE). Rio Claro. Edital PROPe Unesp N° 04/2021. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, vigência 2021/2022. Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer.

*Aos meus sobrinhos
Helena, Marina e Tom.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar, pela salvação, pela comunhão com o Espírito Santo e por me fazer permanecer firme na esperança de que Jesus voltará.

Aos meus pais, Anna e Romário, por me apoiarem, incentivarem, por acolherem minhas decisões e por todo amor. À minha avó Nazaré (*in memoriam*), sou grato por toda a vida. Aos meus irmãos Thyago, Mariana, Matheus e, em especial, à Isabel, pelo companheirismo, união e dedicação. Aos meus sobrinhos, vê-los crescer é uma sensação indescritível. A todos da minha família, vocês são minha base.

À minha noiva Carolina, pelo amor, dedicação, compreensão, respeito, por escolher ficar e ser presente. Você foi fundamental nessa etapa. Aos seus pais, Vanuza e Jadeilson, por serem família e me acolherem com tanto amor. À Vanessa e Hugo pelo apoio em minha trajetória profissional e pela amizade.

À Profa. Sandra Maintinguer, pela orientação e apoio recebido durante este trabalho, pela disposição em ajudar.

A todos do Laboratório de Bioprocessos pela companhia e amizade desenvolvida. Daia, Dani e Luan, vocês merecem um agradecimento especial.

Aos professores e funcionários do IPBEN. Em especial, à Edna e Roberto por todo apoio e cuidado que tiveram comigo nesse tempo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por sempre prestarem todo suporte necessário com muita atenção.

Aos queridos da Primeira Igreja Presbiteriana de Rio Claro. Em especial, ao Levi Ceccato. Eu cresci muito com vocês e tê-los foi providência divina para o tempo que estive aí.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida e à FAPESP pelo Projeto Temático.

Ao David Bouças e à Carla Vizzotto por me inspirarem e incentivarem na jornada acadêmica e de pesquisa.

À Carolina Zampol pelas sugestões e ajuda nesse trabalho.

A todos os meus amigos e todos que foram presentes e contribuíram de alguma forma em mais esta etapa da minha vida.

RESUMO

A fruticultura tem grande importância para a economia brasileira, tendo em vista o consumo, industrialização e exportação. A goiaba contribui com a produção nacional anual total de 44 milhões de toneladas de frutas. Entretanto, a quantidade de resíduos gerados no seu processamento industrial é elevada. Os resíduos agroindustriais são altamente poluidores e devem ser tratados para redução de matéria orgânica previamente à sua disposição final. A digestão anaeróbia pode ocorrer em dois estágios, permitindo a produção de biohidrogênio, AGVs, álcoois e biometano a partir de tais resíduos. O presente trabalho avaliou o potencial do resíduo do processamento da goiaba em reatores anaeróbios operados em batelada, em codigestão com esgoto sanitário, visando determinar condições ótimas para produção de bioprodutos e identificar os microrganismos envolvidos no processo. Quatro ensaios foram realizados num sistema anaeróbio em dois estágios, com diferentes relações S/I (substrato/inóculo) (0,67, 1,0, 2,0 e 3,0 g DQO g⁻¹ SV), em triplicata de reatores em batelada (1 L), *headspace* (0,3 L, N₂ 99,99%), a 37°C e a 120 rpm. Primeiro estágio: resíduo, esgoto sanitário, inóculo pré-tratado e pH inicial de 5,5; segundo estágio: efluente do primeiro estágio, lodo granular anaeróbio de reator UASB e pH inicial de 7,0. Além disso, foi realizada a digestão anaeróbia em único estágio (relação S/I de 1,0). No sistema em dois estágios, o melhor rendimento de H₂ foi obtido na relação S/I de 0,67 (5,26 mL H₂ g⁻¹ SV) e de CH₄ nas relações S/I de 0,67 e de 1,0 (266,27 e 256,88 mL CH₄ g⁻¹ SV, respectivamente). Na relação S/I de 0,67, o ácido acético foi o principal metabólito gerado (0,96 g DQO L⁻¹). Ao se aumentar a relação S/I, a rota metabólica predominante foi a do propionato e houve acúmulo de ácido valérico. *Paraclostridium* e *Clostridium* foram os gêneros dominantes no estágio acidogênico, enquanto gêneros de arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas foram identificados no estágio metanogênico. O sistema em dois estágios proporcionou produção acumulada de metano 21% maior do que em único estágio. Estudo de superfície de resposta foi desenvolvido para otimização da fermentação escura, para maximizar os rendimentos de H₂ e de metabólitos, além da remoção de carboidratos. Para isso, 15 condições foram testadas em duplicata de reatores anaeróbios (100 mL) com resíduo da goiaba, esgoto sanitário e lodo granular pré-tratado, variando relação S/I, temperatura e pH inicial. Os três fatores analisados influenciaram a fermentação escura do resíduo. A melhor recuperação energética foi verificada para relação S/I de 0,3, em pH inicial de 6,79 e a 49,8°C, com 78% na remoção de carboidratos, gerações de metabólitos de 715,21 mg DQO g⁻¹ SV e rendimentos de 0,21 mmol H₂ mmol⁻¹ Carb. Ácidos acético e butírico foram os principais metabólitos gerados. Novas possibilidades foram abertas para a valorização do resíduo da goiaba, objetivando sua destinação sustentável.

Palavras-chave: Biorreatores; Hidrogênio; Metano; Ácidos graxos; Resíduos orgânicos - Reaproveitamento.

ABSTRACT

Brazilian fruit farming has great importance to the economy, with its consumption, industrialization, and exportation. Guava contributes to the annual production of around 44 million tons of fruit. The waste quantity generated on industrial processing is elevated. The agro-industrial wastes are highly polluting and need to be treated before their final disposal. Anaerobic digestion can occur in two stages, allowing the biohydrogen, VFAs, alcohols, and biomethane production from these wastes. The present study evaluated the guava processing waste potential in anaerobic batch reactors, in co-digestion with sanitary sewage aiming to determine the optimal conditions for these bioproducts production and identify the microorganisms involved in the process. Four essays were carried out in a two-stage anaerobic system, with different S/I (substrate/inoculum) ratios (0.67, 1.0 2.0, 3.0 g COD g⁻¹ VS), in triplicate of batch reactors (1L), headspace (0.3 L, N₂ 99.99%), under 37°C and 120 rpm. First stage: guava processing waste, granular sludge heat-treated previously, and initial pH 5.5; second stage: first stage effluent, anaerobic sludge from UASB reactor, and initial pH 7.0. Moreover, the anaerobic digestion in one stage (S/I ratio of 1.0) was done. On the two-stage system, the best H₂ yield was obtained in the S/I ratio of 0.67 (5.25 mL H₂ g⁻¹ SV) and the S/I ratios of 0.67 and 1.0 for CH₄ yield (266.27 and 256.88 mL CH₄ g⁻¹ SV, respectively). In the S/I ratio of 0.67, acetic acid was the main metabolite generated (0.96 g COD L⁻¹). With the increase of the S/I ratio, the predominant metabolic pathway was propionate and had valeric acid accumulation. *Paraclostridium* and *Clostridium* were the dominant genera on the acidogenic stage, while acetoclastic and hydrogenotrophic archaea genera were identified on the methanogenic stage. The two-stage system allowed CH₄ accumulated production 21% higher than for just one stage. Response surface study was elaborate for dark fermentation optimization, to maximize the H₂ and metabolites yields, besides carbohydrates removal. To do this, 15 conditions were tested in duplicate of anaerobic batch (100 mL) with the guava waste, sanitary sewage, and granular sludge heat-treated, varying S/I ratio, temperature, and initial pH. The three factors analyzed influenced the dark fermentation of the waste. The best recuperation was in the S/I ratio of 0.3, initial pH of 6.79 and 49.8 °C, with 78% of carbohydrate removal, metabolites generation of 715.21 mg COD g⁻¹ SV and yield of 0.21 mmol H₂ mmol⁻¹ Carb. Acetic and butyric acids were the main metabolites generated. New possibilities are open for guava waste valorization, aiming at its sustainable destination.

Keywords: biogas; biohydrogen; biomethane; volatile fatty acids; agro-industrial waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos de digestão anaeróbia em (a) único estágio e (b) dois estágios.	26
Figura 2 – Fluxograma da metodologia.	35
Figura 3 – Fluxograma da linha de moagem de goiaba.	36
Figura 4 – Sistema utilizado na digestão anaeróbia em dois estágios.	39
Figura 5 – Sistema para acompanhamento do estudo de superfície de resposta.	42
Figura 6 – Produção acumulada de hidrogênio durante operação dos reatores acidogênicos.	50
Figura 7 – Rendimento de hidrogênio em função da quantidade de substrato aplicada.	51
Figura 8 – Metabólitos presentes nos efluentes do estágio acidogênico para as diferentes relações S/I testadas.	55
Figura 9 – Valores de pH durante operação dos reatores acidogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).	58
Figura 10 – Valores de carboidratos totais durante operação dos reatores acidogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).	59
Figura 11 – Produção acumulada de metano durante operação dos reatores metanogênicos.	60
Figura 12 – Porcentagem de metano no biogás produzido durante operação dos reatores metanogênicos.	62
Figura 13 – Rendimentos de metano obtidos no segundo estágio (metanogênico).	63
Figura 14 – Abundância relativa dos domínios Bacteria e Archaea presentes no inóculo e no final da operação dos reatores acidogênicos (RA) e dos reatores metanogênicos (RM).	69
Figura 15 – Abundância relativa de filos presentes no inóculo in natura e no final da operação dos reatores acidogênicos (RA) e reatores metanogênicos (RM).	70
Figura 16 – Abundância relativa dos gêneros para (a) inóculo in natura; (b) reatores acidogênicos (RA); e (c) reatores metanogênicos (RM).	73
Figura 17 – Fluxograma simplificado com possíveis rotas metabólicas e principais microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia do resíduo do processamento da goiaba em dois estágios.	75

- Figura 18** – Produção acumulada de metano por volume de reator no Ensaio M1 (S/I de 1,0). 76
- Figura 19** – Comparação da produção acumulada e porcentagem de CH₄ entre o estágio metanogênico do Ensaio 2 e o Ensaio M1. 78
- Figura 20** – Curvas de contorno da remoção de carboidratos a 37°C (A), a 46°C (B), a 55°C (C) e superfície de resposta em pH inicial de 6,8 (D). 80
- Figura 21** – Curvas de contorno para o rendimento de H₂ em relações S/I de 0,2 (A), 2,6 (B) e 5,0 (C), e a pH inicial de 5,5 (D), 6,8 (E) e 8,0 (F). 83
- Figura 22** – Superfície de resposta para o rendimento de H₂ a 55°C. 84
- Figura 23** – Curvas de contorno para o rendimento de metabólitos a 46°C (A), em pH inicial 6,8 (B) e superfície de resposta na relação S/I de 0,2 (C). 86
- Figura 24** – Rendimento e distribuição dos metabólitos e rendimento de H₂ para cada condição testada. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do esgoto doméstico sintético.	37
Tabela 2 – Condições dos ensaios.	38
Tabela 3 – Fatores utilizados no estudo de superfície de resposta.	40
Tabela 4 – Condições do planejamento experimental utilizadas no estudo de superfície de resposta.	41
Tabela 5 – Parâmetros, métodos e referência utilizados.	43
Tabela 6 – Amostras, nome e fonte dos inóculos para identificação.	44
Tabela 7 – Características físico-químicas do substrato e inóculos utilizados nos ensaios	48
Tabela 8 – Porcentagem máxima de hidrogênio no biogás produzido nos reatores acidogênicos	51
Tabela 9 – Valores médios de produção acumulada e rendimento de H ₂ .	52
Tabela 10 – Metabólitos gerados na fase líquida dos reatores e presentes nos efluentes do estágio acidogênico.	54
Tabela 11 – Reações bioquímicas ocorridas para os diferentes metabólitos produzidos.	56
Tabela 12 – Resultados de DQO e carboidratos para o estágio acidogênico.	60
Tabela 13 – Valores médios de produção acumulada e rendimento de CH ₄ .	63
Tabela 14 – Remoções de DQO no segundo estágio (metanogênico).	64
Tabela 15 – Valores de DQO _t e de pH durante a operação dos reatores metanogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).	65
Tabela 16 – Resultados das análises e remoções no sistema integrado (acidogênico + metanogênico).	66
Tabela 17 – Rendimento de biogás e recuperação energética no sistema integrado (acidogênico + metanogênico).	67
Tabela 18 – Parâmetros obtidos pelo ajuste da Equação de Gompertz (Equação 1).	68
Tabela 19 – Rendimento obtido no Ensaio M1 e comparação com a literatura.	77
Tabela 20 – Resultados de DQO e carboidratos para o Ensaio M1.	77
Tabela 21 – Valores médios de produção acumulada, porcentagem e taxa de produção de metano para o Ensaio 2 (S/I de 1,0) e Ensaio M1 (S/I de 1,0).	78

Tabela 22 – Composição máxima de H ₂ no biogás na fermentação escura do resíduo da goiaba nas diferentes condições testadas.	88
Tabela 23 – Respostas obtidas a partir dos fatores utilizados no estudo de superfície de resposta.	89
Tabela 24 – Solução da otimização das respostas a partir dos fatores estudados.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGVs ácidos graxos voláteis

AnSBBR reatores anaeróbios de biofilme em batelada

ATP adenosina trifosfato

COV carga orgânica volumétrica

CSTR reator de mistura completa de fluxo contínuo

DQO (Sol) demanda química de oxigênio solúvel

DQO demanda química de oxigênio

DTC detector de condutividade térmica

ETE Estação de Tratamento de Esgoto

NT nitrogênio total

RA reator anaeróbio

RM reator metanogênico

S/I substrato/inóculo

ST sólidos totais

SV sólidos voláteis

TDH tempo de detenção hidráulica

UASB reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente

LISTA DE SÍMBOLOS

(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O molibdato de amônio

C₆H₁₂O₆ glicose

CaCl₂.2H₂O cloreto de cálcio

CH₃(CH₂)₃COOH ácido valérico

CH₃CH₂CH₂COOH ácido butírico

CH₃CH₂COOH ácido propiônico

CH₃CH₂OH etanol

CH₃COOH ácido acético

CH₄ metano

CO₂ gás carbônico

CoCl₂.6H₂O cloreto de cobalto

CuCl₂.2H₂O cloreto de cobre

e número de Euler (2,718)

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

FeCl₃.4H₂O cloreto de ferro

H₂ gás hidrogênio

H₃BO₃ ácido bórico

HCl ácido clorídrico

KH₂PO₄ fosfato de potássio

MgSO₄.7H₂O sulfato de magnésio

MnCl₂.4H₂O cloreto de manganês

N₂ gás nitrogênio

NaHCO₃ bicarbonato de sódio

NaSeO₃.H₂O selenito de sódio

NiCl₂.6H₂O cloreto de níquel

P potencial de produção de H₂ ou CH₄ (mL biogás L_R⁻¹)

RM taxa máxima de produção de H₂ ou CH₄ (mL biogás L_R⁻¹ d⁻¹),

ZnCl₂ cloreto de zinco

λ duração da fase de início da produção de H₂ ou CH₄ (dia)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Resíduos agroindustriais de frutas	23
2.2	Digestão anaeróbia em dois estágios	24
2.3	Lodo granular e pré-tratamentos	27
2.4	Digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais em dois estágios	28
2.5	Aplicação de superfície de resposta em trabalhos de fermentação escura para otimização de obtenção de bioprodutos de valor agregado	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Geral	34
3.2	Específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Caracterização dos substratos e preparação do inóculo	37
4.2	Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em dois estágios	38
4.3	Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em único estágio	40
4.4	Otimização da remoção de carboidratos, produção de H ₂ e de metabólitos a partir da fermentação escura do resíduo da goiaba codigerido com esgoto sintético	40
4.5	Análises físico-químicas, cromatográficas, de biologia molecular e estatísticas	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Caracterização do substrato e inóculo	48
5.2	Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em dois estágios	49
5.2.1	Acidogênese	49

5.2.2	Metanogênese	60
5.2.3	Sistema integrado (acidogênese + metanogênese)	65
5.3	Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em nico estágio	75
5.4	Otimização das condições operacionais na fermentação para remoções de carboidratos, rendimentos de H ₂ e gerações de metabólitos	79
6	CONCLUSÕES	91
7	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A	101

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui condições que permitem o cultivo e colheita de grande variedade e quantidade de frutas quase o ano todo nas diferentes regiões, sendo o terceiro maior produtor do mundo. A fruticultura nacional movimentada a economia com produção anual de cerca de 44 milhões de toneladas de frutas. Boa parte é consumida *in natura*, entretanto, 47% da produção é destinada ao mercado de frutas processadas, como sucos, doces, polpas e uma série de outros aproveitamentos (TREICHEL *et al.*, 2016). A goiaba tem uma produção considerável de 415 mil toneladas anuais (KIST *et al.*, 2018). A goiabada, doce tradicional de goiaba, é um dos produtos industrializados de fruta mais produzidos e consumidos no mercado brasileiro (MENEZES *et al.*, 2009).

Existem perdas consideráveis de produtos agrícolas durante a cadeia de processamento industrial, o que gera quantidade elevada de resíduos com carga orgânica elevada. Fatos marcantes com relação aos resíduos orgânicos gerados constituem risco ambiental, tais como a falta de gerenciamento, ausência de tratamento, disposição final inadequada e suas decorrências, dentro outros. Dessa forma, o tratamento e reaproveitamento desses resíduos abrangem questões de interesse ambiental e econômico (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

Diversas tecnologias podem ser utilizadas para o tratamento de resíduos do processamento de frutas, além de serem bons substratos para a produção de biogás, na digestão anaeróbia, que envolve o uso de um consórcio de microrganismos para a degradação e estabilização de substratos orgânicos (PELLERA; GIDARAKOS, 2016).

O biogás surge como uma fonte energética alternativa, por ser energia reciclável, renovável e limpa, que pode ser utilizada diretamente para geração de energia elétrica. Além disso, o biogás gerado pode ser purificado a biohidrogênio ou biometano para aplicação como combustível veicular, por exemplo. O uso do biogás segue em crescimento no mundo como um todo, porque apresenta vantagens únicas, como conservação de energia, redução da emissão de gases de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global, além de questões sociais.

A microgeração e minigeração distribuída de biogás também têm sido incentivada. No Brasil, a Lei 14.300/22 trouxe esses avanços para o setor, com mais autonomia, pois produtores de biogás, a partir de biomassa, poderão receber créditos equivalentes à sua produção de energia elétrica e taxa de 0% para energia

autoconsumida. Além disso, há a facilidade na realização de investimentos (BRASIL, 2022).

O biogás pode ser obtido de diversas fontes, com destaque para os resíduos da agroindústria, como do processamento de frutas que podem ser aplicados na digestão anaeróbia para obtenção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4) (GAO *et al.*, 2019).

Durante a operação e montagem de reatores biológicos podem ser impostas condições de processo que favoreçam a degradação da matéria orgânica em dois estágios, fermentação seguida de metanogênese. Nesse sentido, o primeiro estágio pode ocorrer num reator acidogênico, com produção de biogás rico em hidrogênio e de produto líquido composto de AGVs e álcoois, resultantes da fermentação da matéria orgânica complexa que formam o efluente desse reator. A seguir, o efluente acidogênico pode ser transferido a um reator metanogênico, no qual haverá a conversão dos AGVs a biogás rico em CH_4 . Dessa forma, a digestão anaeróbia em dois estágios é vantajosa porque é um processo que viabiliza a produção de dois biocombustíveis, o biohidrogênio e o biometano (HANS; KUMAR, 2019).

O processo em estágios também pode permitir uma recuperação energética até 20% maior do que em único estágio, devido ao aumento de AGVs disponibilizados pelo primeiro estágio. Além da contribuição energética do biohidrogênio no balanço final, mesmo que em quantidades reduzidas (GIOANNIS *et al.*, 2017).

Efluentes do processamento industrial podem ser aplicados em processos de codigestão, ou seja, dois ou mais substratos simultaneamente, como uma alternativa para melhorar o tratamento e incrementar a produção de biogás. Além disso, a codigestão apresenta outras vantagens, como o aumento da estabilidade do processo, diluição de substâncias inibitórias, balanço de nutrientes, efeito sinérgico de microrganismos, aumento da biodegradabilidade da matéria orgânica e vantagens econômicas para aplicação em grande escala (HAGOS *et al.*, 2017). Apesar da relação DQO (demanda química de oxigênio – matéria orgânica): N (nitrogênio) ser necessária para que a digestão anaeróbia ocorra, tal taxa pode variar bastante, dependendo do tipo de efluente ou do resíduo aplicado. Estudos sugerem que a relação mínima necessária seja de 300:1 (HUSSAIN *et al.*, 2015).

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 99,9% de água, podendo agir como

diluído 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.*, 2021; MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014).

Produção de biohidrogênio a partir de biomassa orgânica, como resíduos agroindustriais, via fermentação escura é uma tecnologia promissora. Entretanto conhecer a influência dos parâmetros operacionais, da configuração do reator e ter o controle do processo é importante para garantia de alta *performance*. Dessa forma, para cada resíduo a ser aplicado na fermentação escura é importante conhecer como se comportará o reator e qual a será o rendimento de H₂ e demais bioprodutos de valor agregado nas diferentes condições operacionais. Como diversos fatores influenciam conjuntamente os processos biológicos, trabalhos empregando metodologia de estudo de superfície de resposta têm sido empregados de forma a otimizar a geração desses bioprodutos (GHIMIRE *et al.*, 2015).

Ademais, é importante enfatizar que pesquisas sobre a digestão anaeróbia de resíduo de goiaba é escassa na literatura. Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de biohidrogênio, biometano e outros bioprodutos de valor agregado a partir da codigestão de resíduos orgânicos do processamento industrial da goiaba, em concentrações crescentes, e esgoto sanitário em reatores anaeróbios operados em batelada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resíduos agroindustriais de frutas

O Brasil, beneficiado pelo clima, é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, com volume estimado em 43 milhões de toneladas em 2019. Há também a importância econômica para o país, principalmente ao se considerar o volume de exportação, que em 2018 chegou a 980 mil toneladas de frutas. O mercado absorve grande parte das frutas *in natura*, mas 47% das frutas são destinadas para o processamento e industrialização, com conservas, sucos, doces e refrigerantes, entre outros produtos. A goiaba teve uma produção estimada de 578,6 mil toneladas em 2018 (CARVALHO; KIST; BELING, 2019).

A região Sudeste lidera o plantio, sendo São Paulo o principal estado. A quantidade de frutas produzida no Circuito das Frutas, região que abrange dez municípios do estado entre Campinas e São Paulo, tem bons índices em relação à produção nacional, inclusive com a goiaba (PINTO *et al.*, 2018).

O processamento das frutas é uma atividade agroindustrial importante pois permite agregar valor econômico, além de minimizar perdas pela possibilidade de consumo no período entressafra e de utilização de frutas que não atendam ao padrão de ingestão *in natura*. Entretanto, parte da fruta é rejeitada ao longo da cadeia operacional, como cascas, sementes, caroços e polpas, o que gera resíduos com carga orgânica elevada que, quando não tratados, geram um passivo ambiental, dispostos em aterros sanitários ou, simplesmente, descartados em lugares inadequados.

Esses resíduos têm sido utilizados como alimentos para gado ou para compostagem. Além disso, estudos mostram o potencial de serem utilizados como subprodutos, por serem fonte disponível, econômica e sustentável na obtenção de ampla gama de compostos bioativos. A inclusão na dieta humana é atrativa, principalmente de subprodutos ricos em vitaminas, minerais, fibras e óleos, sendo alimentos funcionais e aditivos alimentares em sintonia com o crescente interesse dos consumidores pela promoção da saúde e redução do risco de doenças. Os compostos bioativos têm muitas vias de atuação, como a capacidade de interagir com proteínas, DNA e outras moléculas biológicas produzindo respostas desejadas do organismo e o potencial para modificar a composição e atividade metabólica da microbiota

intestinal. Além disso, tais resíduos orgânicos também podem ser aplicados como adubos (REGUENGO *et al.*, 2022).

Entretanto, a produção de biogás a partir de resíduos agroindustriais por meio da digestão anaeróbia é uma alternativa interessante para a redução da poluição, além da valorização desses na obtenção de energia. Além disso, os resíduos orgânicos do processamento industrial de frutas são indicados (DONADON; SANTOS, 2018; FREITAS *et al.*, 2021; NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015). No entanto, resíduos com níveis de açúcares solúveis elevados e aplicados em altas cargas orgânicas não são indicados para tratamento em sistemas de único estágio, pois comprometem a ação dos microrganismos metanogênicos e, à vista disso, diminuem a eficiência de remoção da matéria orgânica e produção de metano (CREMONEZ *et al.*, 2021).

2.2 Digestão anaeróbia em dois estágios

Processos de digestão anaeróbia são entendidos como um sistema em que os microrganismos trabalham de maneira interativa para a conversão de matéria orgânica complexa em produtos, como metano, gás carbônico, água e novas células, e ocorrem em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. As três primeiras etapas – fermentação –, nas quais o biogás rico em H_2 é formado, envolve degradação de materiais complexos em açúcares simples, além da formação de bioprodutos de valor agregado, como os ácidos graxos voláteis (AGVs) e álcoois, com interesse econômico por sua aplicação industrial. É na última etapa – metanogênese – que os AGVs e álcoois são utilizados para produção de biogás rico em CH_4 (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005).

A etapa de hidrólise consiste na conversão de partículas complexas (de cadeia maior, nem sempre sólidas) em materiais dissolvidos mais simples, pela ação de exoenzimas, que possam passar pela parede celular das bactérias fermentativas para seus metabolismos. *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* são exemplos de bactérias que realizam esse processo e produzem lipases, proteases e amilases para a conversão de lipídeos a ácidos graxos, proteínas a aminoácidos e polissacarídeos a açúcares menores, respectivamente (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005).

Na acidogênese, as bactérias fermentativas metabolizam os produtos da hidrólise no interior das células, produzindo AGVs (acético, propiónico, butírico, por

exemplo), álcoois (etanol), cetonas (acetona), CO₂ e H₂. Com isso, na acetogênese, as bactérias acetogênicas (*Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*, mais comuns) fazem a oxidação dos compostos orgânicos intermediários em substrato apropriado para os microrganismos da metanogênese, principalmente acetato e H₂ (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005).

Por fim, na metanogênese, as arqueias metanogênicas acetoclásticas e as hidrogenotróficas utilizam acetato (fonte de carbono e energia) e CO₂ e hidrogênio para produção de metano, respectivamente. Em grande parte de reatores, as acetoclásticas são responsáveis por cerca de 70% do metano produzido, sendo *Methanosaeta* e *Methanosarcina* as mais conhecidas (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005) (Figura 1 (a)).

De forma simplificada, é possível compreender a digestão anaeróbia em dois estágios, conforme descrito a seguir. No primeiro estágio (fermentação escura) bactérias facultativas e anaeróbias convertem a matéria orgânica complexa em materiais orgânicos simples, principalmente ácidos graxos voláteis (AGVs), bem como gás carbônico e hidrogênio (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005).

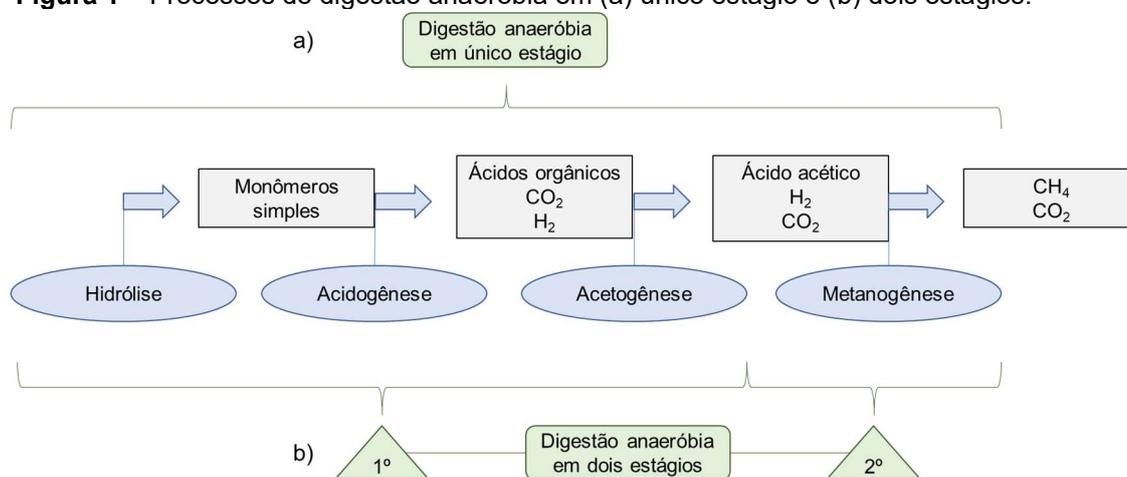
As três primeiras etapas da digestão anaeróbia também são conhecidas como fermentação escura, que envolve a degradação da matéria orgânica complexa, como carboidratos, em açúcares simples, como a glicose, que é metabolizada em piruvato via glicólise. Na via glicolítica, o ATP gerado é utilizado pelos microrganismos para obter energia, enquanto o piruvato é convertido em AGVs, álcoois, H₂ e CO₂ (HANS; KUMAR, 2019).

Atualmente, os AGVs quando isolados e purificados são amplamente utilizados nas indústrias têxtil, farmacêutica, de couro, de plásticos, além de alimentícias, com efeitos na saúde e de alto valor agregado, podendo ser denominados como pós-bióticos. Também são aplicados na remoção biológica de hidrogênio, produção de biodiesel e geração de eletricidade por meio de células combustíveis, por exemplo. Sua produção também é desejada por, em comparação com biogás, ser de mais fácil e mais segura transportação e armazenamento, e possuir maior valor agregado. Dessa forma, os AGVs são produtos almejados na recuperação proporcionada por meio da fermentação escura (ZHOU *et al.*, 2018). Tradicionalmente, esses compostos têm sido obtidos por meios petroquímicos, enquanto a busca por fontes renováveis aliada a preocupações ambientais impulsiona

a necessidade de desenvolver novos modelos de produção, como a por processos biológicos (GRESES; TOMÁS-PEJÓ; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, 2020).

O segundo estágio é de conversão de AGVs e hidrogênio em metano, por arqueias metanogênicas em uma interação sintrófica (VON SPERLING; CHERNICARO, 2005). Por conseguinte, há também a possibilidade de realizar esse processo em dois estágios, em um sistema composto de dois reatores, o primeiro chamado de acidogênico, no qual ocorrem as três primeiras etapas do processo, e o segundo, chamado de metanogênico (Figura 1 (b)).

Figura 1 – Processos de digestão anaeróbia em (a) único estágio e (b) dois estágios.



Fonte: adaptado de Hans e Kumar (2019).

O processo de desintegração também pode ocorrer, anteriormente à hidrólise, para a conversão de partículas inertes e solúveis, como a lignina e a celulose, em polímeros, quando biomassas orgânicas complexas são utilizadas como substrato. O desenvolvimento do processo da digestão anaeróbia separada em dois estágios é relatada na literatura, como uma interessante alternativa por aumentar a estabilidade e desempenho global do processo (HANS; KUMAR, 2019).

Uma vantagem de destaque em dividir o processo de digestão anaeróbia em dois estágios está em propiciar a produção de hidrogênio, um combustível livre de carbono e que tem como único produto de sua combustão a água, além de possuir aplicações industriais mais amplas do que o próprio metano. Além disso, a produção biológica de H_2 é promissora por demandar menos energia do que outros processos e, assim, se torna uma tecnologia economicamente viável e com custo mais competitivo, principalmente ao se considerar que proporciona o uso de resíduos como

substrato, em que há consumo de açúcares e geração de produtos para serem utilizados em segundo estágio da digestão anaeróbia (GHIMIRE *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a condição anaeróbia é a que faz com que os prótons H^+ atuem como receptores de elétrons na oxidação dos substratos orgânicos e, por isso, há a consequente produção de H_2 , bem como diversos intermediários e coprodutos. As vias metabólicas durante o processo depende do substrato, do metabolismo microbiano envolvido e de fatores como temperatura, pH e pressão parcial de H_2 (GHIMIRE *et al.*, 2015).

Digestores de dois estágios propiciam ajustes adequados nas condições de processo que otimizam o enriquecimento e a *performance* dos microrganismos acidogênicos e metanogênicos, como ajuste no pH, temperatura, tempo de retenção hidráulica e carga orgânica. O pH entre 5,0 e 6,0 no reator acidogênico e 7,0 no reator metanogênico favorece a diversidade dos respectivos microrganismos envolvidos nas gerações de hidrogênio e de metano, respectivamente. Além disso, tais condições operacionais apresentam estabilidade para resíduos altamente fermentáveis, propiciando, assim, aplicações de maiores cargas orgânicas. Ou seja, substratos com elevada concentração de açúcares, facilmente hidrolisáveis, apresentam potencial mais elevado de degradação e de produção de biogás hidrogênio e metano nesse tipo de sistema.

De forma contrária, reatores anaeróbios operados em único estágio, poderiam ocasionar complicações relacionadas à instabilidade e acidificação. Dessa maneira, muitos trabalhos têm aludido ao emprego de resíduos gerados em toda cadeia agroindustrial em sistemas anaeróbios de dois estágios (CREMONEZ *et al.*, 2021).

2.3 Lodo granular e pré-tratamentos

A escolha do inóculo é um passo fundamental para o bom desempenho do processo de digestão anaeróbia. Adicionar inóculo adequado no início da operação de reatores evita inibição do processo e favorece a operação. Dessa forma, a quantidade de lodo adicionada a digestores também é um fator importante a ser considerado e determinado (CREMONEZ *et al.*, 2021).

O lodo granular anaeróbio proveniente de reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente) é conhecido por sua relevante aplicação no tratamento de diferentes efluentes e resíduos, tanto

em escala de laboratório quanto em escala piloto. O processo de granulação é complexo e abrange muitos parâmetros físico-químicos. Comumente, as bactérias hidrolíticas e as acidificantes são observadas nas camadas externas nos grânulos, enquanto as arqueias metanogênicas predominam nas camadas mais internas. As cavidades presentes nas superfícies dos grânulos têm como função ser um canal de transporte de gases, substratos e metabólitos (LIM; KIM, 2014).

Inocular reatores para digestão anaeróbia em único estágio com lodo granular anaeróbio é recomendado, uma vez que os grânulos já possuem os consórcios microbianos responsáveis pelas etapas do processo. Entretanto, para o processo em dois estágios (fermentação e metanogênese), com objetivo da produção de hidrogênio no primeiro estágio, é recomendável a eliminação de microrganismos consumidores desse gás, como metanogênicos que o utilizam para a geração de metano e estão presentes no lodo granular. Portanto, a inibição das espécies consumidoras de H_2 , a partir de lodos anaeróbios advindos de reatores aplicados no tratamento de efluentes orgânicos é necessária para maximizar a produção de hidrogênio no estágio acidogênico (ALIBARDI *et al.*, 2012).

Pré-tratamentos no lodo granular, como por exemplo ácido, básico, choque térmico, calor seco e dessecação ou congelamento e descongelamento são indicados para a inibição dos microrganismos metanogênicos. O pré-tratamento térmico é muito executado devido a sua efetividade na inibição da metanogênese, ao enriquecimento de produtores de H_2 e por ser um método simples e de baixo custo. Além disso, combinar o pré-tratamento com as condições ótimas do processo também é desejado, como pH, temperatura e características do substratos, que poderão promover as rotas metabólicas de produções elevadas de hidrogênio (ROSSI *et al.*, 2011).

2.4 Digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais em dois estágios

O tratamento anaeróbio de resíduos agroindustriais para recuperação energética, bem como a codigestão e digestão anaeróbia em dois estágios, já são alvo de estudos. O foco de tais estudos é a redução da disposição desses resíduos, por meio de sua valorização como fonte de bioenergia e bioprodutos.

Dareioti *et al.* (2009) estudaram a codigestão anaeróbia em dois estágios de diferentes resíduos agroindustriais, sendo o efluente do processamento de azeitona, esterco líquido de vaca e soro de queijo, em reatores de mistura completa de fluxo

contínuo (CSTR) com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 19 dias, considerando todo o sistema. A mistura foi composta por 55, 40 e 5% de cada resíduo, respectivamente. Foi obtida remoção de DQO solúvel de 75,5% e de DQO total de 64%, com rendimentos de metano de 243 L CH₄ kg⁻¹ DQO, em porcentagens médias de 73,5% de CH₄ no biogás, resultados que mostraram a viabilidade de tratamento desses resíduos com concomitante produção de biogás. No reator acidogênico, a produção de hidrogênio oscilou, com média de 0,46 L H₂ L_R⁻¹ d⁻¹ e porcentagem de hidrogênio no biogás de 27%, e não foi observada a remoção de DQO solúvel. Entretanto, foi verificada a produção crescente de ácido acético com o passar da operação do reator, atribuído ao aumento da concentração de bactérias acidogênicas, bem como produção dos ácidos butírico, isobutírico, propiônico, valérico e isovalérico, o que permitiu maior produção de metano no segundo estágio por serem utilizados como substrato pelo consórcio microbiano. Os autores também concluíram que o uso do esterco e soro de queijo como cosubstratos trouxe vantagens como a estabilidade do processo, rendimento elevado de metano e viabilidade devido à sazonalidade dos efluentes.

Carvalho *et al.* (2018) analisaram a performance de um sistema anaeróbio em dois estágios tratando resíduos de polpa de frutas (pêssego e maçã) em reatores do tipo CSTR (5 litros) em condições mesofílicas, com recirculação no primeiro estágio, para aumentar o tempo de retenção de sólidos. O reator acidogênico foi inoculado com lodo de reator anaeróbio uma estação de tratamento de esgoto sanitário. Foi aplicada carga orgânica volumétrica (COV) de 33,3 g DQO L⁻¹ d⁻¹ em pH de 5,50. Foram obtidos como produtos principais ácido propiônico e etanol. O efluente foi aplicado no reator metanogênico, inoculado com lodo granular anaeróbio do tratamento de efluentes de cervejaria, numa COV de 9,3 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e pH 7,4. Foram obtidos rendimentos de metano de 0,29 L CH₄ g⁻¹ DQO e porcentagem elevada de CH₄ no biogás (74,3%), além de remoção de DQO de 98,4%. A separação em dois estágios, para resíduos da fruticultura, apresentou outra vantagem, devido à sazonalidade das frutas. O reator acidogênico foi mais robusto e pôde suportar uma frequente mudança de substrato. O reator metanogênico foi preservado das variações da composição inicial dos resíduos, favorecendo a ação da comunidade metanogênica, que é mais sensível a possíveis choques de pH, resultantes do acúmulo de ácidos, quando resíduos de alta carga são utilizados.

Mari *et al.* (2020) determinaram o potencial energético de produção de biogás no sistema em dois estágios a partir de águas residuárias de processamento de mandioca e obtiveram os melhores rendimentos, de 1,1 mol H₂ kg⁻¹ Carb e 0,263 L CH₄ g⁻¹ DQO, a COV de 14 g Carb L⁻¹ d⁻¹ e 12 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Os ensaios foram realizados em reatores anaeróbios de biofilme em batelada (AnSBBR) a diferentes COVs. O tempo total do ciclo foi de 10 horas, abaixo de sistemas com único estágio, que normalmente requerem TDH maiores do que 24 horas. A porcentagem de metano no biogás foi elevada, chegando a 78%, o que era esperado para dois estágios. Foi verificado que, mesmo com aumento da carga orgânica, houve elevação na produção de metano, embora tenha ocorrido uma redução na remoção de DQO. A energia produzida pelo sistema foi de 105,2 kJ L⁻¹ d⁻¹, o que mostrou um potencial de recuperar 407 MJ/tonelada do resíduo, que segundo os autores, representou cerca de 20% da energia consumida pela indústria.

Muitos desses resíduos agroindústrias são materiais lignocelulósicos, que possuem conteúdo energético elevado, em misturas de polímeros naturais, sendo eles celulose (30-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-30%). A sua degradação efetiva requer estágios sinérgicos de produção de enzimas celulolíticas, hidrólise de polissacarídeos e fermentação de açúcar. A hidrólise é geralmente limitada pela estrutura complexa de materiais, incluindo cristalinidade de celulose e tamanho da partícula (RUBIN, 2008).

A composição lignocelulósica dos resíduos de processamento de goiaba variam e conhecer a sua composição pode ajudar a compreender a digestão anaeróbia e suas rotas metabólicas. Azevêdo *et al.* (2012) obtiveram 22,1% (matéria seca) de lignina no resíduo do processamento de goiaba (*Psidium guajava*) para produção de suco, composto principalmente de casca, semente e parte fibrosa. Kader *et al.* (2016) analisaram a composição de resíduo do processamento de goiaba rosa e encontraram elevada porcentagem de lignina (4,57-40,02%), celulose (7,48-11,74%) e hemicelulose (4,42-9,72%).

Entretanto, é importante salientar que estudos do reaproveitamento desses resíduos do processamento industrial da goiaba para a produção de biogás e compostos de valor agregado são escassos na literatura.

2.5 Aplicação de superfície de resposta em trabalhos de fermentação escura para otimização de obtenção de bioprodutos de valor agregado

A fermentação escura de biomassa pode resultar em variados produtos, devido à série de reações químicas que coexistem dentro do reator e dependem dos parâmetros operacionais, como carga orgânica aplicada, pH, temperatura, bem como da estrutura da comunidade microbiana. Ademais, a elucidação clara das rotas metabólicas é essencial para a otimização do processo acidogênico para a recuperação eficiente dos produtos desejados. A proporção dos metabólitos a serem gerados a partir do piruvato também depende do substrato utilizado e de suas características. A codigestão também pode influenciar positivamente no processo biológico, com rendimentos elevados de biogás e de produtos de valor agregado (ZHOU *et al.*, 2018).

Estudos de superfície de resposta podem ser utilizados para avaliar a influência das condições operacionais e demais fatores na fermentação escura, a partir de diferentes resíduos, conforme descrito a seguir.

Hitit, Lazaro e Hallenbeck (2017a) aplicaram metodologia de superfície de resposta à etapa de foto-fermentação, realizada após a fermentação escura de água de lavagem de batata e glicose, para otimizar o rendimento de H₂ e a remoção de DQO em reatores anaeróbios de 160 mL (volume de trabalho de 100 mL), a 30°C e a 120 rpm. A intensidade de aplicação de luz na superfície dos reatores foi de 40 W m⁻². Os fatores variados foram quantidade de inóculo, pH inicial e diluição do efluente, que possuía concentração inicial de 3,8 g L⁻¹. O rendimento mais elevado foi de 7,21 mmol H₂ g⁻¹ DQO, com 9 mL de inóculo, diluição do efluente em 2,5 vezes e pH de 7,5. 97% de remoção de DQO foi obtida na menor concentração da fonte de carbono e em pH 6,5.

Hitit, Lazaro e Hallenbeck (2017b) realizaram novos experimentos, nos quais se avaliou o efeito da proporção de microrganismos (1 a 5) (*R. palustres*: *C. butyricum*, em mL) e as concentrações de substrato (5 a 25 g L⁻¹) e de solução tampão (20 a 80 mM) com o mesmo efluente, sob mesmas condições, por meio de desenho de Box-Behnken. O rendimento mais elevado de H₂ foi de 6,4 mol H₂ mol⁻¹ Carb, obtido na concentração de substrato de 15 g L⁻¹, concentração de tampão de 50 mM e relação dos microrganismos de 3. Os autores inferiram que a forte interação entre as

concentrações de substrato e do tampão observada seja devido à necessidade de otimizar o pH para os microrganismos envolvidos.

Montoya *et al.* (2020) usaram planejamento do tipo composto central rotacional, para determinar as condições operacionais ideais da fermentação escura de resíduo de café na produção de H₂. Nas condições operacionais otimizadas (pH 7,0, 7 g L⁻¹ de polpa e de casca e 30% de *headspace*) foram produzidos 3,04 L H₂ L⁻¹ d⁻¹. Os principais metabólitos gerados na fermentação do resíduo foram os ácidos butírico (3838 mg L⁻¹) e isobutírico (506 mg L⁻¹), além de metanol (266 mg L⁻¹) e butanol (156 mg L⁻¹). Os autores realizaram 17 ensaios em frascos Duran® de 500 mL a 30°C e sob modo estático, sendo que a polpa e a casca foram pré-tratadas e, para se atingir o volume de trabalho, foi utilizado efluente do processamento de café (30 g DQO L⁻¹). O consórcio microbiano aplicado nos reatores foi obtido a partir de sucessivos reatores fermentativos em bateladas com aumento gradual de efluente do processamento de café e utilizado em 0,5 g SV L⁻¹. No reator otimizado, *Clostridium* foi o principal gênero identificado, provavelmente envolvido na degradação da celulose, lignina, hemicelulose e fenol.

Ochoa *et al.* (2021) utilizaram um desenho experimental de Box-Benken para determinar a condição ideal nos rendimentos de hidrogênio e gerações de metabólitos. Foram testadas três variáveis: relação entre moído de café e moído de cacau (para codigestão) (3:1 a 1:3), carga orgânica aplicada (2 a 8 g DQO L⁻¹) e relação C/N (25 a 45), utilizando estrume de porco. Os testes foram realizados em reatores anaeróbios em batelada (frasco âmbar), com volume de trabalho de 200 mL, relação S/I de 1, com lodo de estação de tratamento de efluentes de laticínios pré-tratado termicamente, operados a 35°C e pH de 5,5, além da adição de solução tampão. O maior rendimento, de 271,3 mL H₂ g⁻¹ DQO, foi obtido a relação de moído de café e moído de cacau de 1:3, carga orgânica aplicada de 2 e relação C/N de 35. A rota metabólica do tipo acetato-butirato foi predominante. Entretanto também se observou produções de propionato e lactato. Os gêneros dominantes após a operação dos reatores foram *Clostridium*, *Bacillus* e *Tisierella*.

A influência das condições operacionais na fermentação escura de resíduos de frutas tem sido avaliada na literatura, conforme descrito a seguir.

Mazareli *et al.* (2020) aplicaram desenho experimental do tipo Plackett-Burman para avaliar o efeito do pH (5,5 a 7,5), da temperatura (30 a 44°C), volume do *headspace* (40 a 60%), porcentagem do inóculo (5 a 15%) e concentração de

carboidratos (3 a 15 g L⁻¹) na fermentação de resíduo de banana, como único substrato, utilizando bactérias autóctones. Reatores anaeróbios em batelada (250 mL) foram operados e os autores verificaram que somente o pH, a temperatura e o *headspace* foram variáveis significantes na produção de H₂. A máxima produção (38,08 mL H₂) foi alcançada a pH 7,5, 44°C, 40% de *headspace*, 15% de inóculo e concentração de carboidratos de 15 g L⁻¹. Além disso, houve produção de ácidos acético (0,02 a 0,72 g L⁻¹), butírico (0,03 a 2,66 g L⁻¹) e láctico (0,26 a 5,14 g L⁻¹), além de etanol (0,08 a 0,64 g L⁻¹) nos ensaios. *Clostridium* e *Lactobacillus* foram os gêneros autóctones mais abundantes do resíduo da banana.

Camargo *et al.* (2021a) realizaram caracterização microbiana e funcional de consórcio anaeróbio granular de reator UASB aplicado à produção de H₂ a partir de resíduo citrícola (casca) em reatores operados em batelada nas condições otimizadas. 48,47 mmol H₂ L⁻¹ foi obtido, sendo 3,64 vezes maior do que a condição não otimizada. A rota metabólica predominante foi da acetogênese, com gerações máximas de 3731 mg L⁻¹ de ácido butírico e 3516 mg L⁻¹ de ácido acético e houve favorecimento do gênero *Clostridium* (79,78%), além da degradação da celulose. A condição otimizada após desenho experimental do tipo composto central rotacional (DCCR) foi concentração de 4 g SV L⁻¹ de inóculo, 29,8 g L⁻¹ do resíduo e pH de 8,98.

Previamente, Camargo *et al.* (2021b) já haviam obtido, por meio de estudo de superfície de resposta do tipo Plackett e Burman, que as variáveis mais significantes para o resíduo de casca citrícola foram o pH, concentrações de inóculo e de substrato.

Dessa forma, os resíduos agroindustriais de frutas, como o resíduo da goiaba, podem ser testados para aplicações na digestão anaeróbia para obtenção de bioprodutos de valor agregado.

O processo anaeróbio em dois estágios possui diversas vantagens que foram apresentadas, principalmente em rendimentos mais elevados de geração de biogás.

As condições de operação que otimizam a produção de biogás e demais produtos de valor agregado por digestão anaeróbia a partir do resíduo da goiaba nunca foram estudadas.

Nesse sentido, diferentes metodologias necessitam ser testadas em biorreatores operados com resíduos da goiaba, aplicados na geração de produtos de valor agregado, por digestão anaeróbia e, dessa forma, auxiliar a dinâmica da comunidade microbiana envolvida nos consumos elevados de tais resíduos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

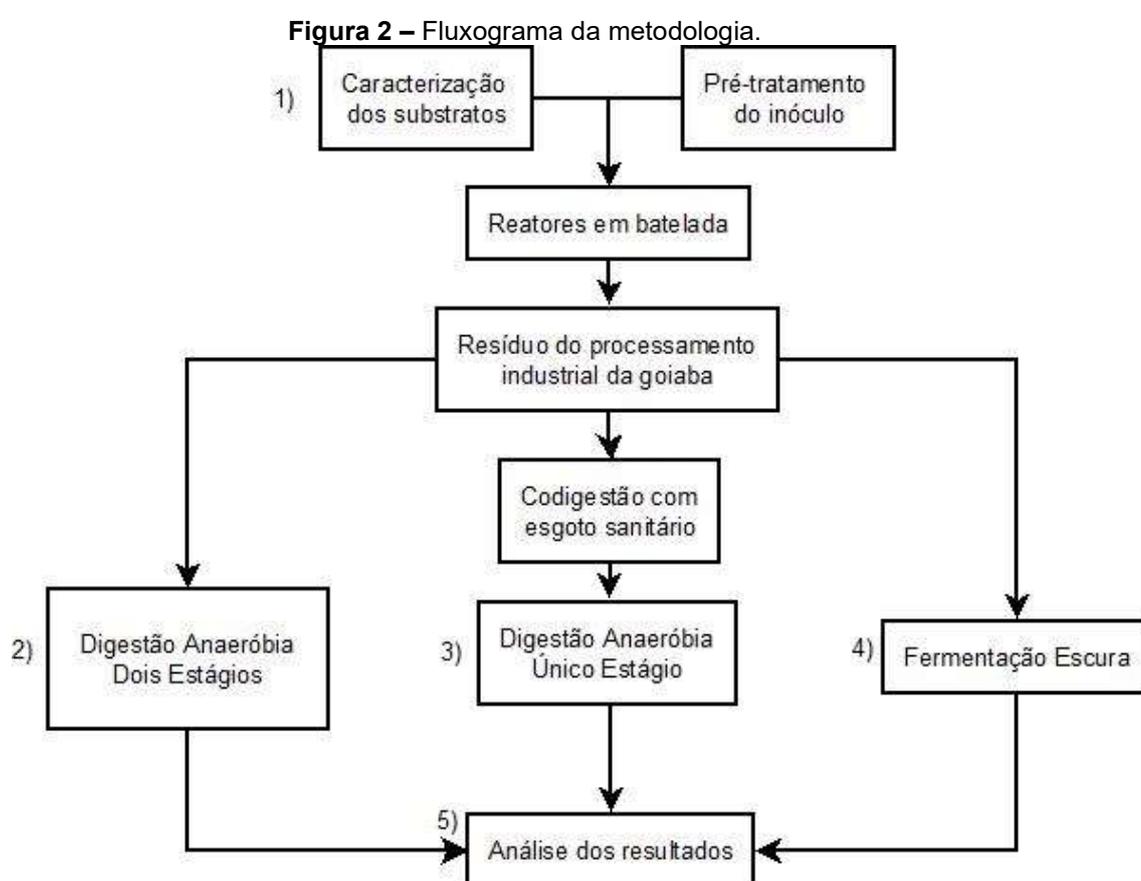
Quantificar a produção de biogás e outros bioprodutos de valor agregado a partir de resíduos orgânicos do processamento industrial da goiaba em reatores anaeróbios operados em batelada.

3.2 Específicos

- a) operar reatores anaeróbios em batelada com resíduos orgânicos oriundos do processamento da goiaba, em concentrações crescentes, visando à produção de hidrogênio e metano, num sistema de dois estágios;
- b) operar reatores anaeróbios em batelada com resíduos orgânicos oriundos do processamento da goiaba, visando à produção de metano, em estágio único;
- c) avaliar a influência das condições de operação dos reatores para maximização da produção de H₂ e bioprodutos de valor agregado;
- d) quantificar a produção de bioprodutos de valor agregado (ácidos graxos voláteis e álcoois) durante o tratamento anaeróbio;
- e) comparar a recuperação energética entre a digestão anaeróbia em estágio único e a digestão anaeróbia em dois estágios para o resíduo da goiaba; e
- f) identificar o consórcio de bactérias anaeróbias fermentadoras na produção de H₂ e o consórcio de arqueias metanogênicas na produção de CH₄.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biosistemas para Bioenergia no Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) – Unesp de Rio Claro, e fez parte do Projeto Temático da FAPESP 2017/22401-8 intitulado “Fruto-Refinaria: Processos de Obtenção, métodos de caracterização e geração de produtos oriundos de resíduos da fruticultura”, no IPBEN – Laboratório Central - Rio Claro. A pesquisa foi dividida em 5 etapas, conforme fluxograma resumido (Figura 2).



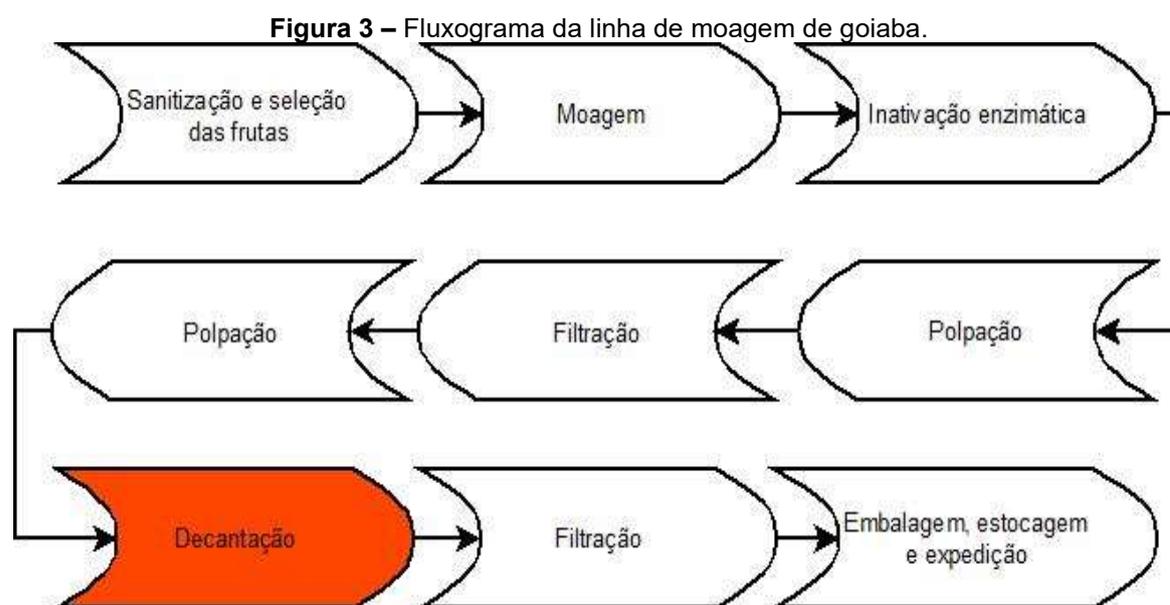
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A primeira etapa consistiu na caracterização dos substratos, pré-tratamento e aclimação do inóculo. Na segunda etapa foram operados reatores em batelada para digestão anaeróbia, em dois estágios, com o resíduo do processamento industrial da goiaba, em concentrações crescentes e com os mesmos inóculos, codigerido com esgoto sanitário. Na terceira etapa foi realizada a digestão anaeróbia do resíduo do processamento industrial da goiaba, em único estágio, visando a geração de metano. Na quarta etapa foi realizada a fermentação escura do resíduo para otimizar a

produção de hidrogênio, demais coprodutos de valor agregado e remoção de carboidratos, por meio de desenho experimental. Por fim, na quinta etapa, foram analisados, discutidos e comparados com a literatura os resultados obtidos durante a operação dos reatores anaeróbios.

a) Substratos:

A fonte de carbono principal utilizada foi o resíduo do processamento industrial da goiaba, cedido por indústria alimentícia de produção de doces de goiaba e geleias (Predilecta Alimentos – São Lourenço do Turvo, Matão, São Paulo, Brasil); empresa parceira no Projeto Temático. O resíduo foi o proveniente do *decanter*, cuja localização se encontra no fluxograma cedido pela empresa e apresentado na Figura 3.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Esgoto sanitário foi coletado em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da cidade de Rio Claro (22°25'24" S 47°32'58" O), cedido pela BRK Ambiental, empresa responsável pelo tratamento da cidade (Rio Claro, São Paulo, Brasil), e utilizado nas Etapas 2 e 3. As amostras foram acondicionadas em refrigerador.

Esgoto sanitário sintético foi preparado segundo Martín *et al.* (2010), cuja composição está descrita na Tabela 1 e foi utilizado na Etapa 4. Tal fato foi necessário

devido à pandemia de COVID-19, que inviabilizou a coleta do esgoto sanitário municipal, descrito anteriormente.

Tabela 1 – Composição do esgoto doméstico sintético.

Solução de macronutrientes			Solução de micronutrientes	
Composto	Fonte	[mg/L]	Composto	[mg/L]
Glicose	C-Carboidrato	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
KH 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: Elaborada pelo Autor (2022).

(1) Quantidade expressa em mL/L.

b) Inóculo:

Lodo granular anaeróbio proveniente de reator UASB, que trata resíduos do abate de aves (Avícola Dacar Ltda. – Tietê, São Paulo, Brasil) foi usado como fonte de microrganismos.

4.1 Caracterização dos substratos e preparação do inóculo

O resíduo foi caracterizado previamente ao início da operação dos reatores anaeróbios em batelada, em parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SV), pH, nitrogênio total, pH e carboidratos totais. O esgoto sanitário foi caracterizado em análises de DQO, nitrogênio total e sólidos.

O lodo granular anaeróbio foi nomeado como “inóculo *in natura*”. A seguir, foi aplicado pré-tratamento térmico em parte do inóculo (100°C por 15 minutos), de acordo com Maintinguer *et al.* (2008), para inibição de atividade metanogênica e nomeado como “inóculo pré-tratado”. Para caracterização dos inóculos utilizados foram realizadas análises de sólidos.

4.2 Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em dois estágios

Quatro ensaios foram realizados com a operação de reatores anaeróbios operados em batelada, seguindo as condições descritas na Tabela 2. Inicialmente foi definida a relação substrato/inóculo (S/I) a ser utilizada no ensaio, sendo essa calculada em função da quantidade total de DQO aplicada, em gO_2 do resíduo, pela massa total do lodo utilizado, em g SV. A concentração do inóculo foi fixada em 15 g SV L^{-1} . A quantidade de esgoto sanitário adicionada nos reatores para realização de codigestão foi a necessária para se atingir o volume de trabalho, de 0,7 L. Os ensaios foram realizados em quantidades crescentes do resíduo, tendo em vista a carga orgânica elevada do resíduo e a imprevisibilidade de adaptação da comunidade microbológica presente nos inóculos ao resíduo, de forma a evitar a inibição ou a sobrecarga do sistema.

Tabela 2 – Condições dos ensaios.

Ensaio	Relação S/I ($\text{gDQO g}^{-1}\text{SV}$)	DQO ($\text{gO}_2 \text{L}^{-1}$)	SV (g) substrato	SV (g) inóculo
1	0,67	10	5,51	
2	1,0	15	8,27	10,5
3	2,0	30	16,54	
4	3,0	45	24,80	

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

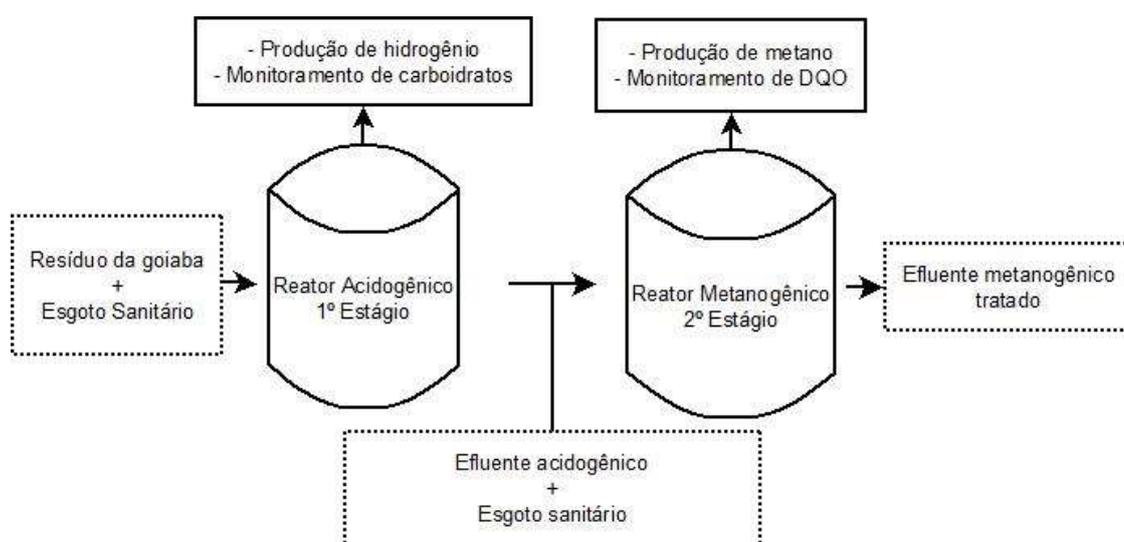
Notas: Relação S/I: relação substrato/inóculo; DQO: demanda química de oxigênio; SV: sólidos totais voláteis.

Os ensaios foram realizados em triplicata de reatores anaeróbios (frascos Duran®) de 1 L com *headspace* (0,3L) preenchido com N_2 99,99% sob fluxo constante por 10 minutos, de forma a garantir a anaerobiose. Reator controle (sem adição de substrato) também foi montado em cada ensaio para verificar a atividade endógena do próprio lodo e subtrair a produção de biogás obtida nos ensaios com substratos (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). Para a manutenção do pH, foram adicionados aos

reatores acidogênicos 2 g L⁻¹ de fosfato de potássio (KH₂PO₄) e 2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Nos reatores metanogênicos foram adicionados 5 g L⁻¹ de NaHCO₃ (ANGELIDAKI *et al.*, 2009), alcalinidade necessária para se manter o pH dentro da faixa desejada na digestão anaeróbia. O pH no primeiro estágio foi ajustado para 5,5 e no segundo estágio para 7,0, utilizando solução de HCl 3M ou NaOH 15%. Os reatores foram mantidos em Incubadora Shaker a 37°C (condição mesofílica) e em agitação constante de 120 rpm até a estabilização da produção de biogás.

O primeiro estágio era composto por reatores acidogênicos, visando a produção de hidrogênio, álcoois e AGVs, com resíduos do processamento da goiaba e inóculo pré-tratado. O segundo estágio era composto por reatores metanogênicos alimentados com os efluentes acidogênicos e inóculo *in natura*, para produção de metano (Figura 4).

Figura 4 – Sistema utilizado na digestão anaeróbia em dois estágios.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

No sistema integrado foram monitoradas a produções de H₂, CH₄ e a composição de biogás, bem como análises iniciais e finais na mistura líquida de carboidratos totais, DQO total, DQO solúvel e AGVs e álcoois, além de pH. Durante o Ensaio 2 (relação S/I de 1,0), no primeiro estágio foi realizado monitoramento temporal dos consumos de carboidratos e pH e, no segundo estágio, os consumos de DQO total e pH.

4.3 Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em único estágio

O ensaio da codigestão anaeróbia em único estágio, nomeado Ensaio M1, foi realizado seguindo as condições do Ensaio 2 (relação S/l de 1,0), descritas na Tabela 2 com adições de resíduo do processamento da goiaba e esgoto sanitário. O ensaio foi realizado em triplicata, em condições de anaerobiose e os reatores operados em batelada (1 L), com *headspace* (0,35L) preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante por 10 minutos. Reator controle sem alimentação de substrato foi montado. Para o tamponamento, foram adicionados 5 g/L de NaHCO₃ (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). O pH inicial foi de 7,5 e os reatores foram mantidos em Incubadora Shaker a 37°C e agitação constante (120 rpm). Foram monitoradas a produção de CH₄, composição do biogás, DQO e carboidratos totais.

4.4 Otimização da remoção de carboidratos, produção de H₂ e de metabólitos a partir da fermentação escura do resíduo da goiaba codigerido com esgoto sintético

Foram testadas as influências da relação S/l, do pH inicial e da temperatura (Tabela 3) na remoção de carboidratos, a partir do resíduo da goiaba codigerido com esgoto sanitário sintético, nos rendimentos de H₂ no biogás e de metabólitos na fase líquida por meio de estudo de superfície de resposta, utilizando o software Design-Expert® (StatEase, Inc., EUA), versão 11.1.2.0.

O estudo foi do tipo D-ótimo e do subtipo randomizado. Foram geradas 15 condições (C1 a C15) para serem testadas a partir dos três fatores numéricos (relação S/l, pH inicial e temperatura) (Tabela 3, Tabela 4).

Tabela 3 – Fatores utilizados no estudo de superfície de resposta.

Fator	Nome	Unidade	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
A	Relação S/l	g DQO g ⁻¹ SV	0.2	5.0
B	pH inicial	-	5.5	8.0
C	Temperatura	°C	37	55

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Tabela 4 – Condições do planejamento experimental utilizadas no estudo de superfície de resposta.

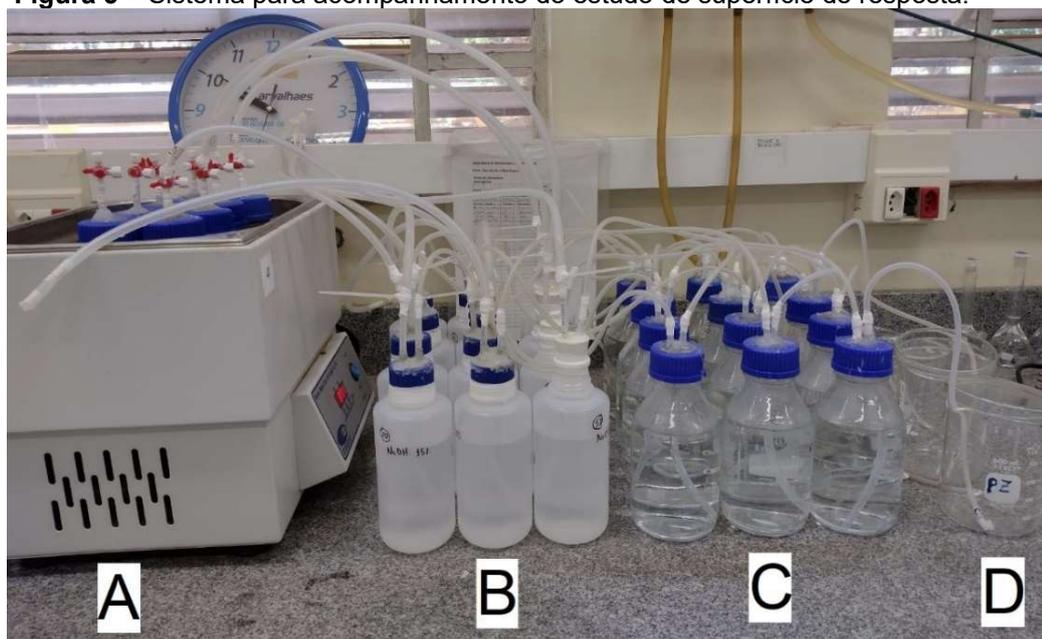
Condição	A Relação S/I (g DQO g ⁻¹ SV)	B pH inicial	C Temperatura (°C)
C1	5	8	43.8
C2	1.93	6.48	55
C3	2.02	8	55
C4	2.6	6.75	46
C5	5	6.58	42.7
C6	0.2	8	37
C7	5	6.44	55
C8	0.2	5.5	37
C9	0.2	5.5	55
C10	0.2	6.98	47.6
C11	5	5.5	37
C12	5	8	55
C13	3.06	6.98	37
C14	3.06	5.5	47.6
C15	2.36	8	42.7

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Os ensaios foram realizados em duplicata de reatores anaeróbios (frascos Duran®) de 100 mL com *headspace* (20 mL) preenchido com N₂ 99,99% sob fluxo constante por 5 minutos. Reator controle também foi montado para verificação e subtração do biogás obtido pela atividade endógena do próprio lodo (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). A fonte de microrganismos adicionada aos reatores foi proveniente do pré-tratamento térmico (inóculo pré-tratado). Para a manutenção do pH, foram adicionados nos reatores acidogênicos 2 g L⁻¹ de fosfato de potássio (KH₂PO₄) e 2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Foi adicionado esgoto sintético nos reatores até se atingir o volume de trabalho, de 80 mL.

Os reatores foram mantidos em banho-maria, no modo estático. O monitoramento da produção de H₂ foi realizada num sistema de deslocamento constante adaptado de Aquino *et al.* (2007), com lavagem do biogás em NaOH (15%), para captura do CO₂, e posterior deslocamento em água (Figura 5). Também foram verificados os consumos de carboidratos, além das análises cromatográficas da composição do biogás e de produção de AGVs e álcoois.

Figura 5 – Sistema para acompanhamento do estudo de superfície de resposta.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: A: reatores em banho-maria; B: solução NaOH (15%); C: água; D: Becker para captação da água deslocada.

As respostas foram ajustadas com modelo quadrático e, somente para o rendimento de metabólitos, foi realizada transformação usando função raiz quadrada ($k=0$) para se obter maior R^2 . Por fim, foi realizada a otimização numérica para maximização dos rendimentos de H_2 e metabólitos, e da remoção de carboidratos, considerando os três fatores com o mesmo grau de importância (HITIT; LAZARO; HALLENBECK, 2017).

4.5 Análises físico-químicas, cromatográficas, de biologia molecular e estatísticas

A Tabela 5 apresenta as análises físico-químicas e cromatográficas realizadas no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Tabela 5 – Parâmetros, métodos e referência utilizados.

Parâmetro	Método	Referência
DQO	Colorimétrico	APHA, AWWA, WEF (2005)
Carboidratos	Colorimétrico	Dubois <i>et al.</i> (1956)
Sólidos	Gravimétrico	APHA, AWWA, WEF (2005)
pH	Potenciométrico	APHA, AWWA, WEF (2005)
Composição do biogás	Cromatográfico	Maintinguer <i>et al.</i> (2008)
Quantificação do biogás	Deslocamento volumétrico	Aquino <i>et al.</i> (2007)
Nitrogênio total	Semi-micro Kjeldahl	APHA, AWWA, WEF (2005)
AGVs e álcoois	Cromatográfico	Adorno, Hirasawa, Varesche (2014)

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

O volume de biogás gerado nos reatores foi determinado por deslocamento de volume, método adaptado de Aquino *et al.* (2007). A análise de composição do biogás pelo método cromatográfico foi realizada a partir de um cromatógrafo de gás Shimadzu® (GC-2014), equipado com detector de condutividade térmica (DCT) e coluna Carboxen 1010 PLOT, 30 m x 0,53 mm. O fluxo da coluna foi 5 mL min⁻¹ com argônio ultrapuro (gás de arraste). As temperaturas do injetor e do detector foram 220 e 230 °C, respectivamente. As temperaturas da coluna foram: 120°C (1 min) 200°C (3 min) 40°C min⁻¹ e 230°C (0,5 min) 50°C min⁻¹, com o tempo total da corrida de 7,10 minutos. H₂, CH₄, N₂ e CO₂ foram os gases para os quais a curva no cromatógrafo foi realizada. 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.

Os AGVs (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico), álcoois (metanol, etanol e n-butanol) e acetona foram determinados através de cromatografia gasosa (CG), de acordo com Adorno, Hirasawa e Varesche (2014). A determinação foi realizada em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2030, equipado com detector de ionização de chama, amostrador automático para *headspace* AOC 6000 Plus e coluna HP INNOWAX (Agilent Technologies), de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. As condições cromatográficas foram: 35 °C (0 min) 2 °C min⁻¹ 38 °C (0 min) 10 °C min⁻¹ 75 °C (0 min) 35 °C min⁻¹ 120°C (1

min) 10 °C min⁻¹ 170 °C (2 min), com aumento da temperatura final da rampa de aquecimento até 230°C por 2 minutos, totalizando aproximadamente 17 minutos de tempo de corrida. O fluxo da coluna foi de 1,5 mL min⁻¹ com nitrogênio (N₂) como gás de arraste. O detector usou hidrogênio (H₂) a 30 mL min⁻¹ com ar sintético a 300 mL min⁻¹ e N₂ a 30 mL min⁻¹ como gases de chama e auxiliar, respectivamente. A temperatura do detector foi de 280 °C. As condições do amostrador automático utilizando seringa de 2,5 mL foram: 13 minutos de incubação da amostra, a 100°C, injeção de 400 µL de amostra com a seringa a 100 °C e, 3 minutos de lavagem da seringa com N₂ após cada injeção. O software LabSolutions de solução do cromatógrafo foi usado para o tratamento dos dados.

As concentrações de etanol e AGV determinadas pela cromatografia foram expressas em equivalente de DQO, calculadas com base na completa oxidação a CO₂ e H₂O. Os valores, expressos em g DQO g⁻¹ metabólito, foram: etanol, 2,087; ácido acético, 1,066; ácido propiónico, 1,512; ácido butírico e isobutírico, 1,816; ácido valérico e isovalérico, 2,036; e ácido caproico, 2,204 (CARRILLO-REYES *et al.*, 2020).

Amostras de lodo dos estágios acidogênico e metanogênico (RA e RM, respectivamente) foram coletadas ao final da operação dos quatro ensaios para identificação do consórcio microbiano, a partir da mistura de cada uma das réplicas (triplicata). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80 °C numa solução de glicerina (50%). A identificação do consórcio microbiano advindo do inóculo *in natura* também foi realizada. Dessa forma, foram realizadas identificações de três amostras, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Amostras, nome e fonte dos inóculos para identificação.

Amostra	Nome	Fonte
1	Inóculo	Inóculo <i>in natura</i>
2	Reator acidogênico (RA)	Lodo granular do final da operação da triplicata dos reatores acidogênicos
3	Reator metanogênico (RM)	Lodo granular do final da operação da triplicata dos reatores metanogênicos

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A extração de *DNA* (ácido desoxirribonucleico) foi realizada em solução fenol-clorofórmio, como proposto por GRIFFITHS *et al.* (2000), com modificações. Utilizou-se fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v). A quantificação de *DNA* após extração foi realizada em espectrofotômetro de microvolumes (*ND-2000*, *Nanodrop*, Inc., Wilmington, Estados Unidos, DEA). Valores maiores que 1,8 para a razão entre a absorção nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (260/280 nm) foram considerados indicativos de *DNA* com qualidade suficiente para realização das etapas seguintes.

As amostras foram armazenadas a -20°C até o seu envio à empresa GENONE® (Rio de Janeiro-RJ, Brasil) para a realização sequenciamento em plataforma *NGS* (*Next Generation Sequencing*) *Illumina MiSeq*.

A identificação foi realizada através da avaliação das sequências de nucleotídeos dos genes marcadores filogenéticos *rRNA 16S*, para procariotos, *rRNA 18S* e *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*), para eucariotos. As regiões genéticas sequenciadas foram as regiões hipervariáveis V3, V4, V3-V4 e V4-V5 do *rRNA 16S* e as regiões hipervariáveis V4 e V9 do *rRNA 18S* e as regiões intergênicas ITS1 e ITS2. As reações de *PCR* (*Polymerase chain reaction*) para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse foram realizadas com o *kit* enzimático completo *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs) e primers específicos para cada região amplificada e *barcodes* para identificação das amostras. Os produtos das *PCR* (*amplicons*) foram avaliados em gel de agarose (2% p/v) e os fragmentos contendo entre 400-450 pares seguiram para as etapas posteriores.

Os *amplicons* foram misturados em proporções de densidade iguais e purificados com o *kit Qiagen Gel Extraction* (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas foram preparadas com o *kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep* quantificadas por fluorescência com o *Qubit* e *Q-PCR* (*Quantitative PCR*).

O sequenciamento em plataforma *Illumina MiSeq* foi realizado de forma bidirecional (*paired-end*) e gerou fragmentos (*reads*) de 250 pb. As amostras foram separadas pelas sequências *barcode* identificadoras. Os *read forward* e *reverse* foram pareados utilizando o *software* FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (MAGOČ; SALZBERG, 2011). As sequências passaram por análise de qualidade com o *software* *Qiime* (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html) para a remoção de sequências com índice *Phred score* insatisfatório (CAPORASO *et al.*, 2010). A remoção de quimeras foi realizada com o algoritmo UCHIME (algoritmo

UCHIME, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) utilizando como referência o banco de dados *Silva database* (EDGAR *et al.*, 2011; HAAS *et al.*, 2011).

A análise taxonômica das sequências foi realizada pelo software *Uparse*® (*Uparse* v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) (EDGAR, 2013). A análise foi feita ao nível de espécie, sendo que sequências com similaridade $\geq 97\%$ foram agrupadas na mesma *OTU* (*Operational Taxonomic Unit*). A classificação taxonômica das *OTU* foi realizada de acordo com o banco de dados *Silva database* (<http://www.arb-silva.de/>) pelo método *Mothur* implementado dentro do software *Qiime* (Version 1.7.0, http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html) (ALTSCHUL *et al.*, 1990; QUAST *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2007).

A relação filogenética entre as *OTU* representativas foi determinada pela ferramenta MUSCLE (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) (EDGAR, 2004) foi utilizada.

As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados público *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Bioproject PRJNA643936, **Inóculo**: Biosample SAMN19023544 (SRA:SRR14459439); **RAF**: Biosample SAMN19024281 (SRA:SRR14459463); e **RMF**: Biosample SAMN19024300 (SRA:SRR14459477).

Os dados experimentais obtidos da produção acumulada de hidrogênio e de metano foram ajustados utilizando os valores médios obtidos das triplicatas dos reatores operados em batelada por meio do software *Statistica*® (versão 8.0). A taxa máxima de produção de biogás foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada (LAY *et al.*, 1998), indicada pela Equação 1, onde: P é o potencial de produção de H_2 ou CH_4 (mL biogás L_R^{-1}), R_M é a taxa máxima de produção de H_2 ou CH_4 (mL biogás $L_R^{-1} d^{-1}$), λ é a duração da fase de início da produção de H_2 ou CH_4 (dia), t é o período de operação (dia) e e é o número de Euler (2,71).

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

A porcentagem de solubilização da DQO (Sol) durante a operação dos reatores acidogênicos foi calculada de acordo com a Equação 2, onde as letras i e f correspondem aos valores iniciais e finais, respectivamente, e s e t equivalem às frações solúvel e total da DQO (ALZATE *et al.*, 2012).

$$Sol_{DQO} = \left(\frac{[(DQO_s)_f - (DQO_s)_i]}{DQO_t - (DQO_s)_i} \right) 100 \quad (2)$$

Foram realizadas análises estatísticas dos valores médios obtidos por meio do Anova e Teste de Tukey a 5%, considerando-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos para as condições testadas na seção 4.2, sendo os Ensaios 1, 2, 3 e 4 e dois tratamentos para a seção 4.3, sendo os resultados do Ensaio 2 e do Ensaio M1, de modo a comparar a produção de metano e a remoção de matéria orgânica entre a digestão anaeróbia em dois estágios e em único estágio.

Taxas de rendimento de hidrogênio e metano foram obtidas, em mL H₂ g⁻¹ SV e mL CH₄ g⁻¹ SV, respectivamente. O tempo requerido para produzir 80% do CH₄ total - T80 - durante todo o período de incubação do segundo estágio foi calculado de acordo com Camarena-Martínez *et al.* (2020), como um tempo técnico de digestão. O T80 é definido ao verificar o tempo de operação dos reatores no qual se atingiu 80% da produção total de metano. Uma estimativa do potencial energético do biogás obtido foi calculada, considerando o valor energético de 12,7 kJ L⁻¹ para o hidrogênio e de 37,4 kJ L⁻¹ para o metano, de acordo com Mateus *et al.* (2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do substrato e inóculo

Os resultados obtidos a partir da caracterização físico-química do resíduo do processamento industrial da goiaba (substrato) e do inóculo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Características físico-químicas do substrato e inóculos utilizados nos ensaios

Parâmetro	Substrato	Inóculo <i>in natura</i>	Inóculo pré-tratado	Unidade
DQO total	1,27	-	-	gO ₂ /gSV
Carboidratos	334,25	-	-	mg/gSV
Nitrogênio Total	4,85	-	-	mgNT/gSV
Sólidos Totais	288,11	74,20	65,51	mgST/g
Sólidos Voláteis Totais	282,41	63,37	55,61	mgSV/g
pH	4,03	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A DQO total obtida do resíduo do processamento industrial da goiaba (1,27 g O₂ g⁻¹ SV) está próxima a outros resíduos industriais do processamento de frutas, como o de polpa de pera, polpa de tâmara e polpa de maçã (1,33; 1,32 e 1,64 g O₂ g⁻¹ SV, respectivamente) (PERIMENIS *et al.*, 2018). Entretanto, a concentração de carboidratos (334,25 mg g⁻¹ SV) foi mais elevada que a de outros resíduos agroindustriais, como o de águas residuárias do processamento da azeitona (30,33 g L⁻¹). O resultado da concentração reduzida de nitrogênio (4,85 mg NT g⁻¹ SV) também indicou uma biomassa rica em carboidratos e deficitária em nutrientes, o que justificou a necessidade adição de nutrientes e elementos-traço por meio da codigestão com esgoto sanitário.

A concentração de nitrogênio total do esgoto sanitário foi de 4,02 g NT L⁻¹. Ademais, os sólidos foram de 0,32 g ST L⁻¹ e 0,24 g SV L⁻¹. A DQO total foi de 252,72 mg O₂ L⁻¹, valor abaixo da média esperada porque a coleta se deu em um período chuvoso.

O inóculo *in natura* possuía 63,37 mg SV g⁻¹. Após o pré-tratamento térmico aplicado foram verificados valores de 55,61 mg SV g⁻¹, ou seja, parte da matéria

orgânica foi volatilizada no processo, o que pode sugerir a inativação de parte dos consórcios microbianos advindos do lodo granular metanogênico (inóculo *in natura*).

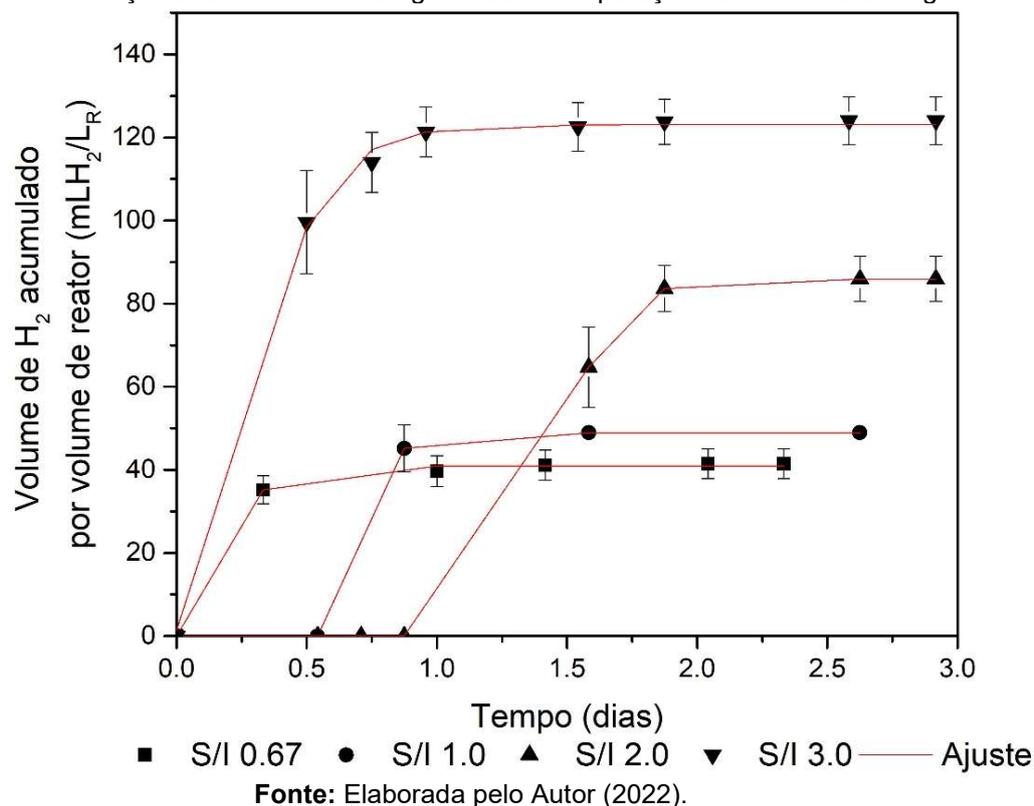
5.2 Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em dois estágios

5.2.1 Acidogênese

Na Figura 6 estão apresentados os resultados de produção acumulada de hidrogênio no primeiro estágio. Em todas as condições testadas houve H₂ no biogás. A produção total acumulada de H₂ aumentou com a relação S/I e, por isso, foi maior no Ensaio 4 (S/I de 3,0), com 124 ± 6 mL H₂ L_R⁻¹, o que já era esperado por ser a condição com quantidades mais elevadas do resíduo agroindustrial. Verificou-se que a produção se deu principalmente em até 0,8 dia de operação dos reatores. No Ensaio 1 (S/I de 0,67), foram verificadas produções de hidrogênio mais reduzidas, em 0,3 dia de operação. Quando as relações S/I foram mais elevadas (S/I de 1,0 e S/I de 2,0) foi verificada fase de início de produção de hidrogênio de 0,9 e 1,6 dias, respectivamente. Tal fato correspondeu à adaptação do inóculo ao aumento de carga do substrato. Contrariamente, no Ensaio 4 (S/I de 3,0), a produção de H₂ foi imediata, o que indicou adaptação por parte dos microrganismos nos consumos de substrato e consequente produção de H₂. Nos Ensaio 3 e 4 foram observadas gerações crescentes de H₂ até 2,9 dias.

Os resultados indicaram estabilização da produção provavelmente por esgotamento do substrato, que ocorreu aproximadamente 1 dia após o início de produção de hidrogênio. Provavelmente, de acordo com as condições experimentais adotadas, novos testes com concentrações mais elevadas de substrato não causariam inibição à fonte de microrganismos adicionada aos reatores, em função dos resultados obtidos com o Ensaio 4 (S/I de 3,0).

Figura 6 – Produção acumulada de hidrogênio durante operação dos reatores acidogênicos.



Na Tabela 8 estão apresentadas as porcentagens máximas de H₂ no biogás produzido nos reatores acidogênicos. Foi verificado que em todos os ensaios o perfil de porcentagem foi similar, com maior concentração de hidrogênio nas primeiras horas em que se inicia produção, com posterior diminuição da porcentagem ao final do ensaio. A porcentagem máxima obtida foi no Ensaio 3 (relação S/l de 2,0), de $28,6 \pm 2,2$ %H₂, e nos demais ensaios, nos pontos de máxima produção, ficou entre de 15 a 20%, resultados superiores ao encontrado por Mateus *et al.* (2020), de 10 e 12%. Os autores testaram resíduo de polpa de goiaba branca a cargas orgânicas de 11,9 e 10,7 g DQO L⁻¹, em pH de 5,0 e 4,5, respectivamente, com lodo anaeróbico floculado de reator acidogênico e lodo anaeróbico não aclimatado e sem pré-tratamento.

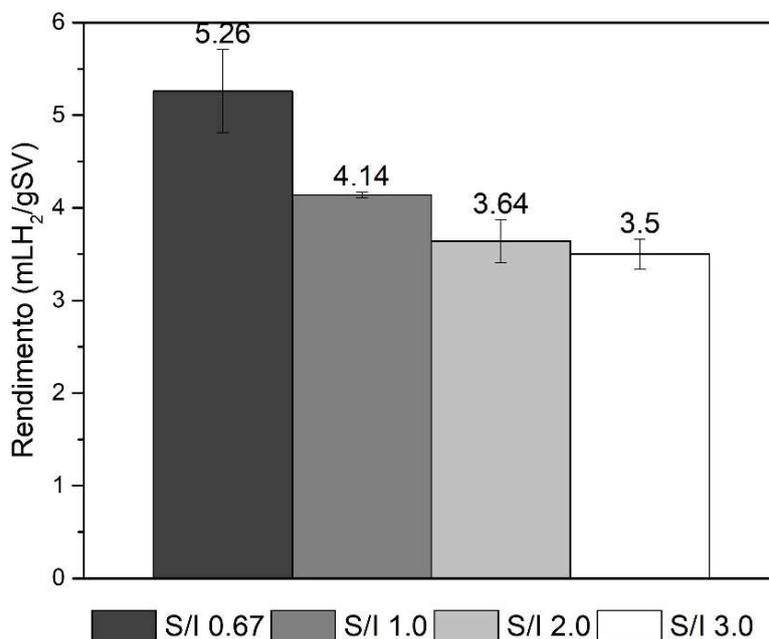
Tabela 8 – Percentagem máxima de hidrogênio no biogás produzido nos reatores acidogênicos

Ensaio (relação S/l)	Percentagem máxima (%H ₂)
1 (0,67)	17,0 ± 2,0
2 (1,0)	21,8 ± 1,5
3 (2,0)	28,6 ± 2,2
4 (3,0)	19,2 ± 3,0

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Não foi detectado metano no *headspace* dos reatores acidogênicos comprovando a inibição da metanogênese com o pré-tratamento térmico do lodo granular.

Os rendimentos de H₂ obtidos foram inversamente proporcionais às elevações nas taxas de S/l (Figura 7).

Figura 7 – Rendimento de hidrogênio em função da quantidade de substrato aplicada.

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Sendo assim, o rendimento mais elevado de H₂ observado foi de 5,26 ± 0,45 mL H₂ g⁻¹ SV com a relação mais reduzida, S/l de 0,67 (p<0,01). Decaimento no rendimento, de 21%, foi observado ao se aumentar a relação S/l de 0,67 para 1,0.

Nos Ensaio de 2 a 4 não foi verificada diferença significativa do rendimento obtido, de acordo com o teste estatístico realizado para comparação entre os ensaios. Além disso, foi verificado que a produção acumulada nos Ensaio 1 e 2 não houve diferença significativa, provavelmente pela baixa adição de matéria orgânica, de 10 para 15 g DQO L⁻¹ (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores médios de produção acumulada e rendimento de H₂.

	Produção	Rendimento
<i>Análise de variância</i>	de H ₂	de H ₂
Teste F	230,50**	27,16**
c.v. (%)	5,77	6,42
<i>Teste de Tukey a 5%</i>		
Ensaio 1 (S/I de 0,67)	41,43 c	5,26 a
Ensaio 2 (S/I de 1,0)	48,92 c	4,14 b
Ensaio 3 (S/I de 2,0)	85,91 b	3,64 b
Ensaio 4 (S/I de 3,0)	124,02 a	3,50 b

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: c.v. – coeficiente de variação; Letras iguais na mesma coluna indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ns - não significativo ($p > 0,05$).

O pH final de $5,6 \pm 0,2$ no Ensaio 1 (S/I de 0,67), de $5,0 \pm 0,0$ no Ensaio 2 (S/I de 1,0) e de $4,8 \pm 0,1$ nos Ensaio 3 (S/I de 2,0) e 4 (S/I de 3,0) foram considerados ainda dentro da faixa ótima esperada, como observado para sacarose em reatores acidogênicos (GHIMIRE *et al.*, 2015).

A produção e o rendimento de hidrogênio foram reduzidos nos ensaios realizados. Apesar do pré-tratamento térmico aplicado ser amplamente utilizado com sucesso no aumento da produção de hidrogênio e diminuição da fase de adaptação, há estudos que reportaram os seus efeitos negativos, causados pela diminuição da diversidade da comunidade microbiana, principalmente devido à inibição de algumas bactérias produtoras de H₂, não formadoras de esporos, o que desestabiliza as principais vias de produção (KRAEMER; BAGLEY, 2007). Entretanto, a conversão reduzida do substrato em hidrogênio pode estar relacionada com a presença de outros metabólitos, como etanol e propionato, indicando que outras rotas metabólicas

estavam ativas. Ademais, provavelmente o pH inicial utilizado não foi adequado, influenciando assim negativamente na produção de H₂, além de haver a influência da composição do substrato. Dependendo da composição química do resíduo, pH mais próximo de 7,0 é desejado para que a fermentação escura aconteça com eficiências elevadas na geração de H₂ (CAPPAL *et al.*, 2014). Mazareli *et al.* (2020) obtiveram produção de H₂ mais elevada em pH 7,5 (entre 31,01 a 38,08 mL) do que em pH entre 5,5 e 6,5 (entre 6,32 a 29 mL), na fermentação de resíduo de banana, com bactérias autóctones.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de metabólitos gerados na fase líquida nos reatores do estágio acidogênico. A comunidade microbiana foi capaz de produzir bioprodutos de valor agregado a partir do resíduo da goiaba em codigestão com esgoto sanitário, alcançando concentrações de metabólitos de 2,05 g DQO L⁻¹, para o Ensaio 1 (S/I de 0,67) a 6,62 g DQO L⁻¹ para o Ensaio 4 (S/I de 3,0). O aumento da produção total de metabólitos entre os Ensaio 2 (S/I de 1,0), 3 (S/I de 2,0) e 4 (S/I de 3,0) foi baixa em relação a produção entre os Ensaio 1 (S/I de 0,67) e 2 (S/I de 1,0), indicando que houve diminuição do rendimento de metabólitos, ou seja, uma limitação da atividade dos microrganismos com o acréscimo de substrato foi observada.

Tabela 10 – Metabólitos gerados na fase líquida dos reatores e presentes nos efluentes do estágio acidogênico.

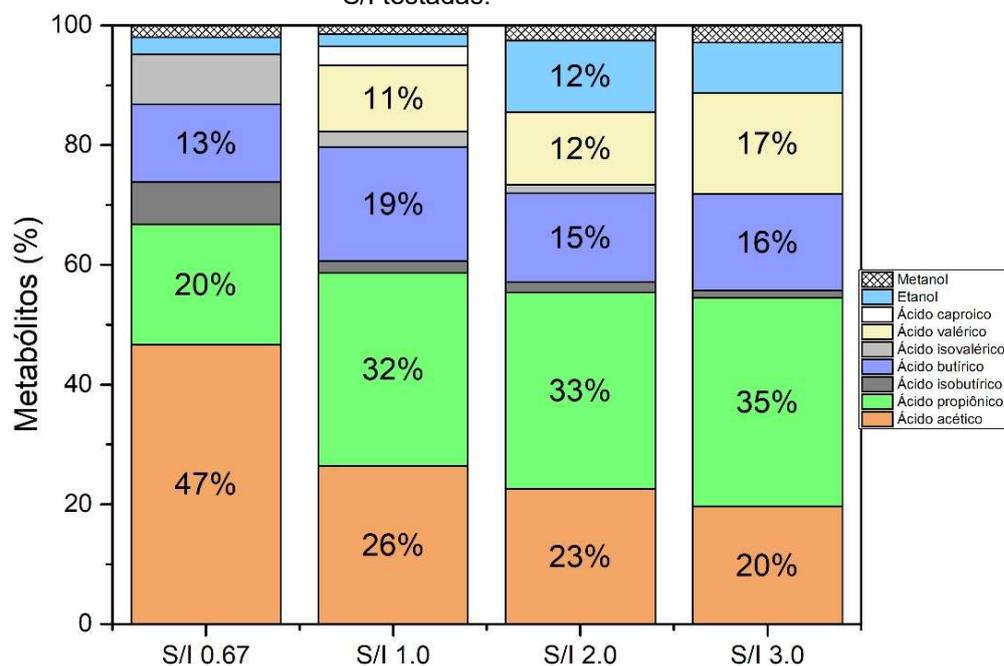
Produtos da Acidogênese	Concentração, em g DQO L ⁻¹ (Conteúdo relativo, em %)			
	Ensaio 1 (S/I de 0,67)	Ensaio 2 (S/I de 1,0)	Ensaio 3 (S/I de 2,0)	Ensaio 4 (S/I de 3,0)
Ácido acético	0,96 ± 0,12 (46,74 ± 2,05)	1,34 ± 0,06 (26,44 ± 0,24)	1,32 ± 0,11 (22,58 ± 0,40)	1,30 ± 0,10 (19,58 ± 1,13)
Ácido propiônico	0,41 ± 0,00 (19,95 ± 1,05)	1,64 ± 0,22 (32,30 ± 1,69)	1,92 ± 0,18 (32,80 ± 0,90)	2,31 ± 0,17 (34,94 ± 0,81)
Ácido isobutírico	0,15 ± 0,00 (7,09 ± 0,14)	0,10 ± 0,01 (1,99 ± 0,15)	0,11 ± 0,03 (1,84 ± 0,30)	0,08 ± 0,00 (1,22 ± 0,03)
Ácido butírico	0,27 ± 0,01 (13,03 ± 0,75)	0,96 ± 0,02 (18,93 ± 1,17)	0,86 ± 0,13 (14,78 ± 1,94)	1,06 ± 0,12 (16,10 ± 0,35)
Ácido isovalérico	0,17 ± 0,01 (8,31 ± 0,16)	0,14 ± 0,02 (2,69 ± 0,43)	0,08 ± 0,04 (1,37 ± 0,55)	<l.d.
Ácido valérico	<l.d.	0,56 ± 0,00 (11,00 ± 0,51)	0,71 ± 0,09 (12,17 ± 1,11)	1,12 ± 0,19 (16,89 ± 0,38)
Ácido caproico	<l.d.	0,16 ± 0,01 (3,19 ± 0,02)	<l.d.	<l.d.
Etanol	0,04 ± 0,01 (2,00 ± 0,28)	0,10 ± 0,05 (2,01 ± 0,61)	0,70 ± 0,01 (12,01 ± 0,46)	0,56 ± 0,10 (8,39 ± 1,07)
Metanol	0,06 ± 0,00 (2,88 ± 0,04)	0,07 ± 0,01 (1,45 ± 0,07)	0,14 ± 0,02 (2,45 ± 0,14)	0,19 ± 0,01 (2,88 ± 0,17)
TOTAL	2,05 ± 0,09	5,07 ± 0,21	5,85 ± 0,25	6,62 ± 0,02

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: l.d. – limite de detecção da curva: 10 mg L⁻¹.

A produção total de metabólitos aumentou com o incremento da relação S/I. Entretanto, as rotas metabólicas foram alteradas. A Figura 8 ilustra a distribuição dos produtos da acidogênese, em porcentagem (%). A maior proporção de ácido acético ocorreu no Ensaio 1 (S/I de 0,67). Então, com o aumento da relação S/I, um decaimento na proporção desse metabólito foi observado. Conseqüentemente, houve acréscimo na produção e proporção de outros metabólitos, principalmente os ácidos propiônico, butírico e valérico, além de etanol, demonstrando as mudanças das rotas metabólicas. O ácido propiônico foi o principal metabólito gerado para os Ensaio 2 (S/I de 1,0), 3 (S/I de 2,0) e 4 (S/I de 3,0).

Figura 8 – Metabólitos presentes nos efluentes do estágio acidogênico para as diferentes relações S/I testadas.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A produção de H₂ a partir da glicose tem diferentes rendimentos dependendo se ocorre a fermentação do tipo acetato e butirato, sendo que o rendimento teórico estequiométrico via butirato é inferior ao rendimento via acetato, conforme pode ser verificado nas Equações 3 e 4 da Tabela 11, onde estão descritas as reações químicas para a produção, ou consumo, de H₂ e demais metabólitos. Dessa forma, quando o principal metabólito é o ácido acético, maiores produções de H₂ são observadas. Também é possível que haja o consumo do H₂ produzido, quando metabólitos que são de interesse pelo valor agregado, como propiônico (Equação 5) e valérico (Equação 7), estão presentes nas rotas metabólicas da fermentação. Seguindo outro caminho, o ácido acético e propiônico também podem ser produzidos juntamente a partir da glicose, sem que haja geração de H₂ (Equação 8). Etanol também pode ser produzido em conjunto com ácido acético com um rendimento de H₂ menor do que quando há somente a produção desse ácido (Equação 6).

Tabela 11 – Reações bioquímicas ocorridas para os diferentes metabólitos produzidos.

Metabólitos	Reação	nº	Referência
Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	(3)	(SAADY, 2013)
Butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	(4)	(GHIMIRE <i>et al.</i> , 2015)
Propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	(5)	(CASTELLÓ <i>et al.</i> , 2020)
Etanol e acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2$	(6)	(GHIMIRE <i>et al.</i> , 2015)
Valérico	$CH_3CH_2COOH + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_3COOH + 4H_2O$	(7)	(SAADY, 2013)
Acetato e propionato	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COOH + 4CH_3CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	(8)	(LUO; KAUR; WONG, 2019)

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Apesar de o ácido propiônico ser reportado como metabólito em alguns sistemas de fermentação escura, principalmente com substratos complexos, essa elevada porcentagem encontrada pode sugerir que houve um desequilíbrio das rotas metabólicas, além de também influenciar negativamente a produção de hidrogênio, pois o processo consome o H_2 , conforme discutido acima (CASTELLÓ *et al.*, 2020).

Entretanto, a produção de propionato é mais favorável energeticamente e tal metabólito possui valor agregado, principalmente devido à sua aplicação industrial em herbicidas, intermediários químicos e como conservantes para alimentos, ração animal e grãos (ZHOU *et al.*, 2018).

O ácido butírico também teve produções consideráveis, acima de 13% em todas as relações testadas. Produção de ácido butírico a partir de resíduos de frutas também foi observada por Perimenis *et al.* (2018), em que foram alcançadas concentrações de 5,5 g DQO L⁻¹, para polpa de tâmara numa relação S/l de 4,0; resultado superior ao encontrado no Ensaio 4 (S/l de 3,0) (1,06 g DQO L⁻¹). Entretanto, os autores obtiveram como principais metabólitos produzidos os ácidos butírico e acético, enquanto no presente estudo, com o resíduo da goiaba, para as relações S/l mais elevadas, ácido propiônico foi predominante.

Concentrações dos ácidos acético e butírico estão associadas a microrganismos que produzem H_2 via fermentação dos tipos acetato e butirato, e são os principais metabólitos esperados. Entretanto, no presente estudo, foi observada

uma maior quantidade de ácido butírico, provavelmente em função da condição operacional imposta de pH mais ácido, que favorece a via de butirato, em condições mesofílicas (GHIMIRE *et al.*, 2015), com rendimento estequiométrico de produção de H₂ inferior (Tabela 11, Equações 3 e 4).

No Ensaio 3 (S/I de 2,0) foi observada uma produção de etanol de 12% (Figura 8). De acordo com Ghimire *et al.* (2015), produção de etanol também pode estar associada à redução do rendimento de H₂ pois há a diminuição dos redutores equivalentes disponíveis. Isto é, as vias metabólicas que levam à produção de etanol diminuem o rendimento estequiométrico de hidrogênio conforme a Equação 6 da Tabela 11.

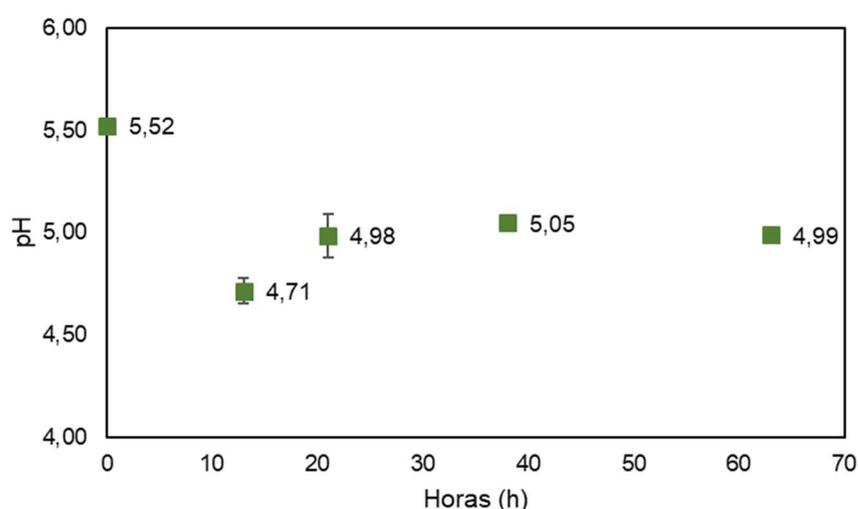
Com exceção do Ensaio 1 (S/I de 0,67), foi observada a formação de ácido valérico, em que seu acúmulo pode estar relacionado a uma sobrecarga nos reatores, sendo que para sua produção há o consumo de ácido propiônico e de H₂, conforme a Equação 7 da Tabela 11 (GRESES, TOMÁS-PEJÓ; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, 2020).

O perfil de produção de metabólitos foi amplo e isso pode ocorrer durante a acidogênese de carboidratos complexos, como o resíduo da goiaba, dependendo dos parâmetros operacionais (GHIMIRE *et al.*, 2015). Ácidos carboxílicos possuem valor agregado para a indústria química, e sua produção é economicamente atraente. Além disso, como discutido, a produção dos produtos intermediários na acidogênese também proporciona uma maior produção de CH₄ no estágio metanogênico (GRESES, TOMÁS-PEJÓ; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, 2020).

No Ensaio 2 (S/I de 2,0) foi observada reduzida variação no pH durante a operação dos reatores acidogênicos (Figura 9). Provavelmente, a manutenção do pH foi um dos fatores que favoreceu a geração de H₂ observada no Ensaio 2. A adição de fosfato de potássio e bicarbonato de potássio, garantiram a manutenção do pH, sobretudo nas primeiras horas de operação, período em que ocorre acúmulo elevado de AGVs, provenientes da etapa de acidogênese, que faz com que haja um decréscimo significativo e acelerado no pH, como verificado pH de 5,52 para 4,71 em 13 horas de operação. Mesmo que momentânea, essa diminuição de pH pode ter inibido parcialmente a atividade hidrolítica e acidogênica, impedindo a conversão do substrato em AGVs. Dessa forma, a instabilidade do pH nos reatores acidogênicos pode ter sido o efeito negativo na produção de hidrogênio, sendo essencial a sua correção, como reportado por Alibardi e Cossu (2016).

Diversos motivos foram apresentados para a baixa produção de H₂, possíveis soluções e sugestões seriam testar em pH mais neutro para o resíduo estudado, pois, para alguns resíduos lignocelulósicos, o pH ideal esteve entre 6,5 e 7,0. O aumento da temperatura também pode ser interessante, pois além de favorecer a via do tipo acetato, que tem um maior rendimento de hidrogênio, proporciona uma melhor hidrólise dos compostos lignocelulósicos (GHIMIRE *et al.*, 2015). Dessa forma, a hidrólise do material lignocelulósico pode ter sido um fator limitante para a produção de H₂.

Figura 9 – Valores de pH durante operação dos reatores acidogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).



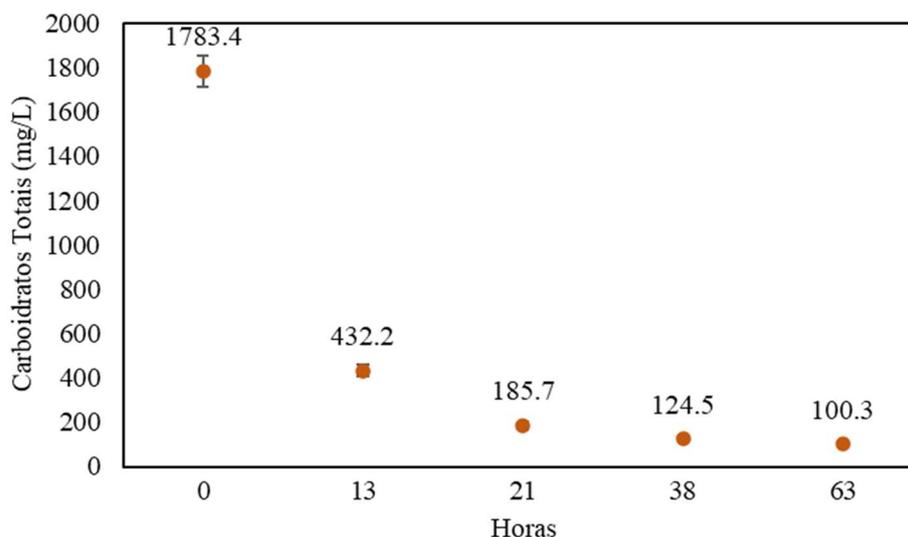
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Na Figura 10 estão apresentadas as concentrações de carboidratos totais em diferentes tempos de operação dos biorreatores do Ensaio 2 (S/I de 1,0). Observou-se que o consumo mais elevado de carboidratos se deu, principalmente, nas 13 primeiras horas, diretamente proporcional à produção de hidrogênio (Figura 6) e variação do pH (Figura 9).

A eficiência de remoção de carboidratos foi de 94%, em relação às suas concentrações iniciais. Tais resultados foram superiores a de outros estudos, como o de Dareioti e Kornaros (2014) que obtiveram 85% de remoção de carboidratos no estágio acidogênico com resíduo do processamento de azeitona codigerido com soro de queijo e esterco. As concentrações elevadas de carboidratos no resíduo do processamento da goiaba, principalmente os açúcares adicionados na produção de

goiabada, podem ter sido a fonte de substrato altamente assimilável pelos microrganismos, durante a operação desses reatores acidogênicos.

Figura 10 – Valores de carboidratos totais durante operação dos reatores acidogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados das análises de DQO para o estágio acidogênico. A DQO total teve pouca variação nesse estágio, com a remoção máxima de 14,3% no Ensaio 3 (S/I de 2,0). A remoção reduzida de matéria orgânica, representada pela DQO total, é esperada em reatores acidogênicos, estágio da digestão anaeróbia no qual ocorre consumos mais elevados de açúcares e a transformação de matéria orgânica complexa, ocasionando o acúmulo de demais coprodutos na fase líquida, como AGVs e álcoois. Resultados semelhantes foram verificados por Mari *et al.* (2020), com remoções de DQO no estágio acidogênico de 25% com efluentes agroindustriais do processamento da mandioca. A composição química do resíduo do processamento industrial da goiaba possui quantidades elevadas de fibras e, provavelmente, ocorreu solubilização de parte da matéria orgânica, com exceção do Ensaio 3 (S/I de 2,0), como calculado pela Equação 2.

Tabela 12 – Resultados de DQO e carboidratos para o estágio acidogênico.

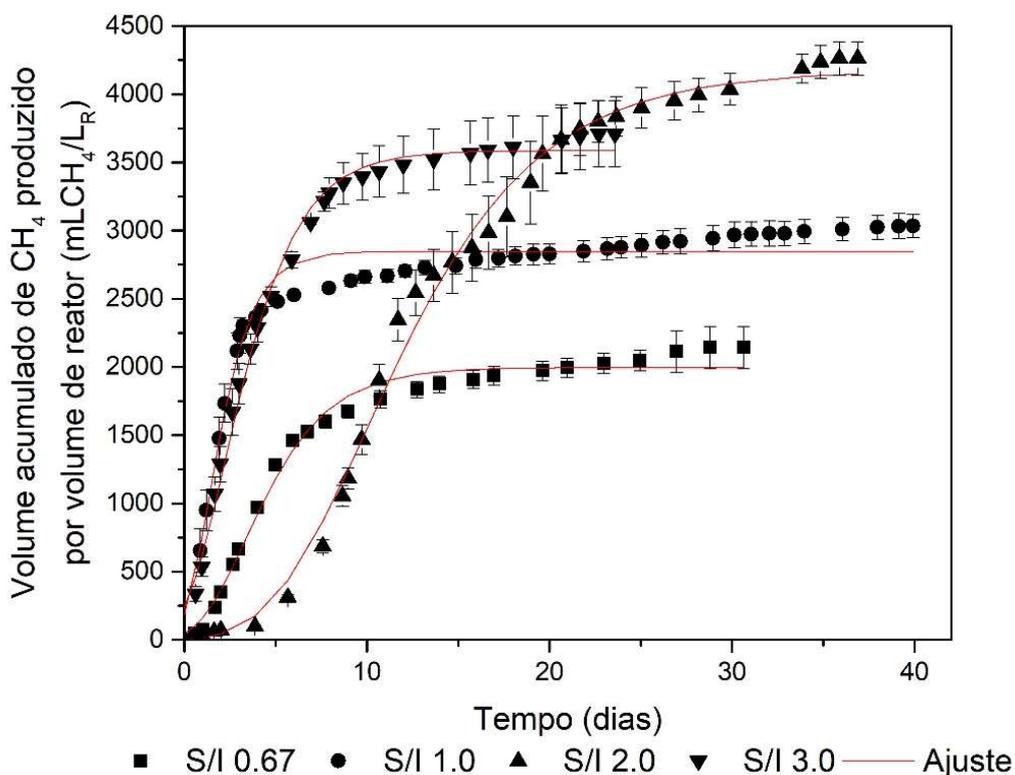
Ensaio (relação S/l)	DQOt (gO ₂ /L)			DQOs (gO ₂ /L)			Carboidratos (mg/L)		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Sol. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
1 (0,67)	9,30 ±0,48	8,04 ±0,70	13,5	4,73 ±0,16	5,02 ±0,15	6,3	1117,41 ±5,03	176,83 ±5,83	84,18
2 (1,0)	11,36 ±0,23	10,44 ±0,07	8,1	5,65 ±0,01	5,57 ±0,05	1,4	1783,40 ±69,74	100,28 ±0,25	94,38
3 (2,0)	25,12 ±1,59	21,53 ±0,00	14,3	9,61 ±0,34	8,82 ±0,07	-	3670,86 ±154,98	268,44 ±8,98	92,69
4 (3,0)	38,51 ±1,23	35,22 ±0,66	8,5	10,28 ±0,17	10,52 ±0,46	0,9	6399,05 ±186,36	161,16 ±2,77	97,48

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: DQOt: Demanda Química de Oxigênio total; DQOs: Demanda Química de Oxigênio da fração solúvel; Sol.: Solubilização da DQO; e Rem.: remoção.

5.2.2 Metanogênese

Na Figura 11 estão apresentados os resultados de produção acumulada de metano, atingidos no segundo estágio da digestão anaeróbia do resíduo do processamento da goiaba, durante os ensaios de codigestão em dois estágios.

Figura 11 – Produção acumulada de metano durante operação dos reatores metanogênicos.

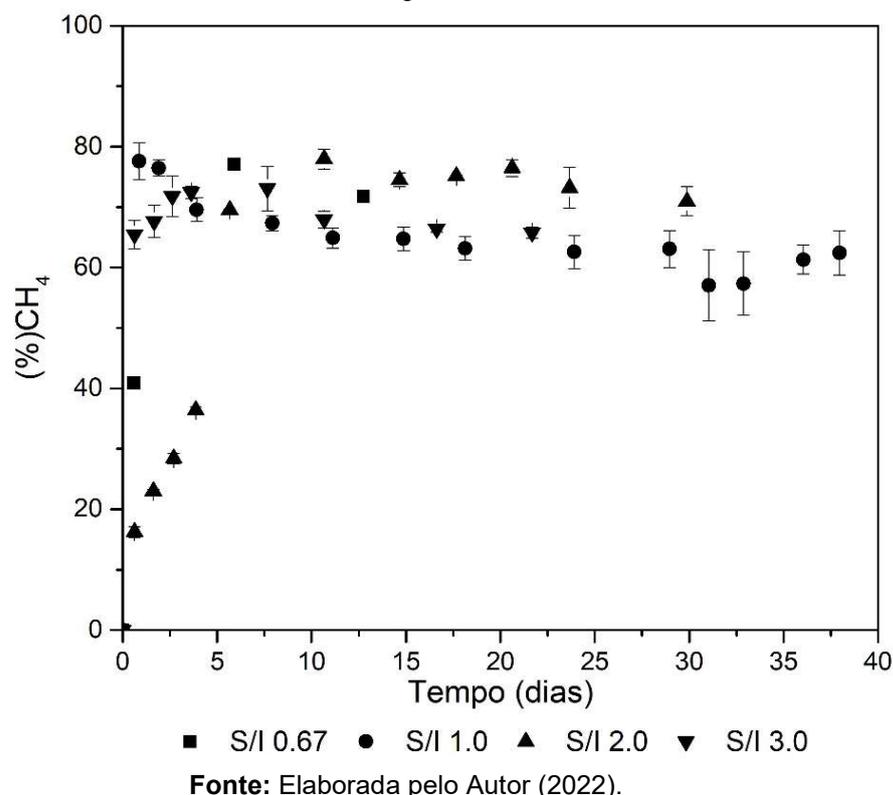
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A produção acumulada foi maior no Ensaio 3 (S/I de 2,0), 4263 ± 124 mLCH₄/LR com um T80 de 19,6 dias. Além disso, foi verificado nesse Ensaio 3 (S/I de 2,0) maior tempo de início da geração de CH₄, de aproximadamente 4 dias, quando comparado aos Ensaios 1 (S/I de 0,67) e 2 (S/I de 1,0), que continham menores quantidades de resíduo. Entretanto, para relações S/I mais elevadas, como no Ensaio 4 (S/I de 3,0), houve uma produção acumulada mais reduzida do que a relação precedente. Tal fato sugeriu alguma inibição da atividade dos microrganismos com essa elevação, apesar de ter sido verificado um T80 menor, de 6,9 dias. No Ensaio 1 (S/I de 0,67) foi verificada geração de metano mais reduzida, com início de produção em aproximadamente 1 dia. Além disso, o T80 para essa condição foi de 10,8 dias, superior ao observado no Ensaio 2 (S/I de 1,0), que foi de 5,1 dias, indicando adaptação do inóculo *in natura* à essa condição imposta.

As porcentagens de metano obtidas no biogás durante a operação dos reatores metanogênicos estão apresentadas na Figura 12. Constatou-se que as porcentagens se mantiveram majoritariamente acima dos 60%, com exceção dos Ensaios 1 (S/I de 0,67) e 3 (S/I de 2,0), que no início apresentaram porcentagens inferiores a 40%; com T80 mais elevados e que foram, respectivamente 10,8 e 19,6 dias, confirmando, mais uma vez, a adaptação da comunidade metanogênica ao resíduo. Conforme o processo entrou em fase exponencial, um crescente aumento da porcentagem de CH₄ foi observado. Apesar de o Ensaio 3 (S/I de 2,0) ter apresentado menores porcentagens na geração de biogás no início da operação dos reatores, foram verificadas porcentagens de metano mais elevadas na composição do biogás, sendo de $77,9 \pm 1,7\%$ com 10,7 dias de operação. O Ensaio 3 (S/I de 2,0) também foi o ensaio no qual foi observado a menor porcentagem obtida, de $16,2 \pm 0,9\%$ em 0,63 dia, ainda na fase de início de produção. Não foram detectadas concentrações de H₂ no biogás.

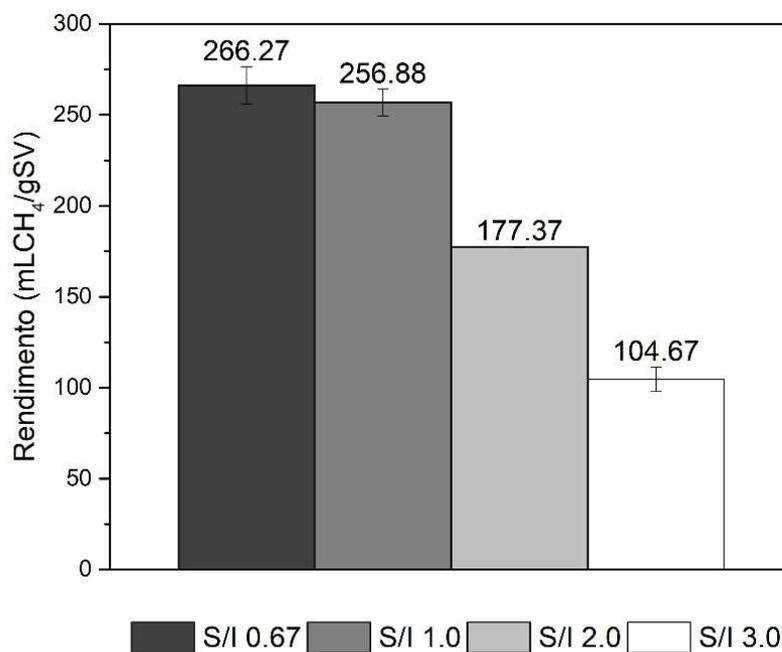
Conteúdo similar de CH₄ foi observado por Mari *et al.* (2020) (69-78%) com efluente do processamento da mandioca, portanto, de acordo com o desempenho de um sistema anaeróbio em dois estágios.

Figura 12 – Porcentagem de metano no biogás produzido durante operação dos reatores metanogênicos.



O maior rendimento de metano obtido foi de $266,27 \pm 10,19 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ ($p < 0,01$), para o Ensaio 1 (S/I de 0,67) (

Figura 13). Para o Ensaio 2 (S/I de 1,0), houve uma redução nos rendimentos de metano em apenas 3,5%, mas ao se considerar o desvio observado em ambos os ensaios, não houve diferença, conforme análise estatística (Tabela 13). Por isso, em ambas as condições testadas, foi verificado aproveitamento energético similar nas produções do metano. A diferença entre ambos os ensaios se deu, deste modo, na fase de início de geração de CH_4 e, conseqüentemente, no T80; embora a tendência seja que, em aumento de escala, essa dificuldade seja superada. Entretanto, redução acentuada de 31% no rendimento de metano foi observada entre os Ensaios 2 (S/I de 1,0) e 3 (S/I de 2,0). No Ensaio 4 (S/I de 3,0) foi obtido o menor rendimento de metano, de $104,67 \pm 6,84 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ e, portanto, ineficiente quando comparado às demais condições experimentais testadas.

Figura 13 – Rendimentos de metano obtidos no segundo estágio (metanogênico).

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Tabela 13 – Valores médios de produção acumulada e rendimento de CH₄.

<i>Análise de variância</i>	Produção de CH ₄	Rendimento de CH ₄
Teste F	95,05**	339,16**
CV (%)	4,94	3,54
<i>Teste de Tukey a 5%</i>		
Ensaio 1 (S/I de 0,67)	2142,55 d	266,27 a
Ensaio 2 (S/I de 1,0)	3034,86 c	256,88 a
Ensaio 3 (S/I de 2,0)	4262,59 a	177,37 b
Ensaio 4 (S/I de 3,0)	3708,40 b	104,67 c

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: c.v. – coeficiente de variação; Letras iguais na mesma coluna indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ns - não significativo ($p > 0,05$).

Os rendimentos mais elevados verificados neste estudo estão dentro do esperado e foram semelhantes a outros resíduos agroindustriais documentados na literatura, assim como a média de porcentagem de CH₄ alcançada em todos os ensaios. Dareioti e Kornaros (2014) obtiveram produção de metano mais reduzida com efluentes do processamento de azeitona que o presente estudo, 250,75 mL CH₄ g⁻¹ SV com 59% de CH₄ no biogás, em 20 dias de TDH e 203,11 mL CH₄ g⁻¹ SV com 65% de CH₄ no biogás produzido em 25 dias de TDH, indicando que os resíduos industriais de frutas, como o da goiaba, podem ser aplicados para produção de CH₄.

No segundo estágio foram obtidas eficiências de remoção de DQO total entre 71,2% e 86,9%, (Tabela 14). A DQO final para os Ensaios de 1 a 3 ficaram em concentrações próximas, em torno de 2,39 g O₂ L⁻¹, e a eficiência de remoção foi crescente com o aumento da DQO nos ensaios realizados. Contudo, houve uma diminuição da eficiência de remoção da matéria orgânica no Ensaio 4, o que indica um menor rendimento de produção de metano também em termos de DQO removida. As porcentagens de remoção encontradas nesse estudo foram inferiores às encontradas por Carvalheira *et al.* (2018), em estágio metanogênico, com reator de manta de lodo granular expandida alimentado com resíduos do processamento de pêsego e maçã, em que foram obtidas remoções em torno de 93% nas diferentes condições. Tais resultados obtidos pelos autores sugeriram que o resíduo do processamento da goiaba é matéria orgânica de mais difícil biodegradação. Pelos resultados de DQO solúvel (Tabela 14), foi possível verificar crescente remoção da matéria orgânica solubilizada.

Tabela 14 – Remoções de DQO no segundo estágio (metanogênico).

Ensaio (relação S/l)	DQOt (gO ₂ /L)			DQOs (gO ₂ /L)		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
1 (0,67)	8,01 ± 0,41	2,31 ± 0,17	71,2	4,41 ± 0,19	0,97 ± 0,12	78,0
2 (1,0)	10,00 ± 1,69	2,27 ± 0,05	77,3	5,49 ± 0,08	0,70 ± 0,00	87,2
3 (2,0)	19,68 ± 0,33	2,58 ± 0,20	86,9	8,36 ± 0,02	1,14 ± 0,08	86,4
4 (3,0)	33,46 ± 1,47	4,66 ± 0,38	86,1	8,52 ± 0,31	0,99 ± 0,02	88,4

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: DQOt: Demanda Química de Oxigênio total; DQOs: Demanda Química de Oxigênio da fração solúvel; e Rem.: remoção.

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados temporais de valores da DQO total do Ensaio 2 (S/I de 1,0). Nas primeiras horas de operação foram verificadas remoções elevadas da DQO total. Em 3,0 dias (73 horas) de operação foram verificadas remoções de 63% da DQO, o que é compatível e esperado quando se considera o T80, que foi de 5,1 dias, período no qual se obteve a maior taxa de produção de metano. Essa relação está dentro do esperado, pois é justamente durante o consumo da DQO que se obtém o metano.

Foi verificada variação temporal reduzida no pH durante a operação do Ensaio 2 (S/I de 1,0) (Tabela 15), permanecendo dentro da faixa ideal para o crescimento das arqueias metanogênicas. A variação reduzida no pH ocorreu, provavelmente, pela adição da solução tampão. Além disso, os AGVs contidos nos efluentes do primeiro estágio foram totalmente consumidos durante a operação do segundo estágio. Nos demais Ensaio (1,3 e 4) o pH final ficou na faixa desejada e apresentou valores entre 7,7 e 7,1.

Tabela 15 – Valores de DQOt e de pH durante a operação dos reatores metanogênicos no Ensaio 2 (S/I de 1,0).

Tempo (dias)	DQO (g O ₂ L ⁻¹)	Tempo (dias)	pH
0,0	10,0 ± 1,7	0,0	7,12 ± 0,04
0,9	6,3 ± 0,7	0,9	7,57 ± 0,03
3,0	3,7 ± 0,3	3,0	7,67 ± 0,05
6,0	2,4 ± 0,7	6,0	7,64 ± 0,02
39,9	2,3 ± 0,1	20,0	7,74 ± 0,01
		39,9	7,69 ± 0,03

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Dessa forma, por ser possível tratar maior quantidade de substrato, o Ensaio 2 (S/I de 1,0) apresentou o melhor resultado de rendimento.

5.2.3 Sistema integrado (acidogênese + metanogênese)

As remoções para DQO total, DQO solúvel e carboidratos, considerando o sistema integrado, estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das análises e remoções no sistema integrado (acidogênico + metanogênico).

Ensaio (relação S/l)	DQOt (gO ₂ /L)			DQOs (gO ₂ /L)			Carboidratos (mg/L)		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
1 (0,67)	9,30 ±0,48	2,31 ±0,17	75,15	4,73 ±0,16	0,97 ±0,12	79,48	1117,41 ±5,03	23,30 ±6,10	97,91
2 (1,0)	11,36 ±0,23	2,27 ±0,05	80,02	5,65 ±0,01	0,70 ±0,00	87,63	1783,40 ±69,74	40,27 ±2,52	97,74
3 (2,0)	25,12 ±1,59	2,58 ±0,20	89,73	9,61 ±0,34	1,14 ±0,08	88,14	3670,86 ±154,98	65,04 ±2,99	98,23
4 (3,0)	38,51 ±1,23	4,66 ±0,38	87,91	10,28 ±0,17	0,99 ±0,02	90,37	6399,505 ±186,36	44,10 ±1,94	99,31

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: DQOt: Demanda Química de Oxigênio total; DQOs: Demanda Química de Oxigênio da fração solúvel; e Rem.: remoção.

Os resultados indicaram que a separação da digestão anaeróbia em dois estágios permitiu remoção de matéria orgânica, com remoções de DQO total acima de 75% e de carboidratos acima de 97%, o que comprova a capacidade da comunidade microbiana de ambos os reatores tratar o resíduo, diminuindo assim, possíveis impactos ao meio ambiente.

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados de rendimento de hidrogênio e de metano por quilograma de sólidos voláteis do resíduo da goiaba, bem como a produção energética obtida em cada um dos dois estágios por grama de sólidos voláteis para os ensaios realizados. O Ensaio 1 (S/l de 0,67) apresentou a condição em que se obtiveram os melhores resultados para rendimento. Foi observado, que mesmo com a produção reduzida de H₂, no estágio acidogênico, a formação dos demais ácidos e álcoois favoreceu produções mais elevadas de CH₄ no estágio metanogênico. Os resultados indicaram que o sistema em dois estágios permitiu recuperação de biogás a partir do resíduo.

Foi verificado que o primeiro estágio (acidogênico) foi pouco responsável pela recuperação energética total, ou seja, foi de apenas 0,69% no Ensaio 1 (S/l de 0,67). Tal fato também foi observado por Schievano *et al.* (2014), com 3,9% da produção total de 12,6 MJ kg⁻¹ SV na primeira etapa, utilizando resíduos de frutas e vegetais em codigestão com estrume de suínos. De Gioannis *et al.* (2017), obtiveram 5% no

primeiro estágio de uma produção total de 14,5 MJ kg⁻¹, com resíduos alimentares. Contribuições energéticas do primeiro estágio mais elevadas já foram observadas por Mari *et al.* (2020), que atingiu 11%, porém foram aplicadas cargas orgânicas mais elevadas. Além disso, o resíduo usado no presente estudo é de origem industrial e pode apresentar componentes que dificultem o processo. Outros testes precisam ser realizados para otimizar a produção de hidrogênio, com possíveis pré-tratamentos a serem aplicados no resíduo ou diferentes condições.

Tabela 17 – Rendimento de biogás e recuperação energética no sistema integrado (acidogênico + metanogênico).

Ensaio (relação S/l)	Estágio	Rendimento de biogás (mLH ₂ ou CH ₄ /gSV)	Recuperação energética (J/gSV)	Recuperação total (MJ/kgSV)
1	1º	5,26	66,80	10,03
(0,67)	2º	266,27	9958,50	
2	1º	4,14	56,01	9,66
(1,0)	2º	256,88	9607,31	
3	1º	3,64	46,23	6,68
(2,0)	2º	177,37	6633,64	
4	1º	3,50	44,45	3,96
(3,0)	2º	104,67	3914,66	

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Na Tabela 18 estão apresentados os parâmetros obtidos por meio do ajuste da equação de Gompertz modificada. A taxa máxima mais elevada de produção de hidrogênio foi 270,74 mL H₂ L_R⁻¹ d⁻¹, obtida no Ensaio 4 (S/l de 3,0), e de metano foi 774,21 270,74 mL CH₄ L_R⁻¹ d⁻¹, para o Ensaio 2 (S/l de 1,0). Apesar de que, no Ensaio 4 (S/l de 3,0), o R_M de metano também foi elevado, 587,49 mL CH₄ L_R⁻¹ d⁻¹, quando comparado aos dos Ensaios 1 (S/l de 0,67) e 3 (S/l de 2,0), que foram 288,79 e 291,80 mL CH₄L_R⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Além disso, foi verificado que o potencial de produção de metano (P) foi mais reduzido no Ensaio 4 (S/l de 3,0), que foi de 3586,58 mL CH₄ L_R⁻¹, do que no Ensaio 3 (S/l de 2,0) com valor de 4172,61 mL CH₄ L_R⁻¹, com quantidades mais reduzidas de resíduo aplicado. Portanto, mesmo com a taxa máxima de produção elevada do Ensaio 4 (S/l de 3,0), o rendimento de metano observado foi reduzido, não sendo obtido, para essa condição, um aproveitamento energético satisfatório na digestão anaeróbia do resíduo.

Tabela 18 – Parâmetros obtidos pelo ajuste da Equação de Gompertz (Equação 1).

Parâmetro	Ensaio 1 (S/I de 0,67)		Ensaio 2 (S/I de 1,0)		Ensaio 3 (S/I de 2,0)		Ensaio 4 (S/I de 3,0)	
	1º estágio	2º estágio	1º estágio	2º estágio	1º estágio	2º estágio	1º estágio	2º estágio
P (mLbiogás _{LR} ⁻¹)	40,92	1995,48	48,93	2847,61	85,91	4172,61	123,12	3586,58
R _M (mLbiogás _{LR} ⁻¹ d)	173,07	288,79	262,80	774,21	255,93	291,80	270,74	587,49
λ (d)	0,08	0,81	0,63	0,01	1,30	4,69	0,08	0,00

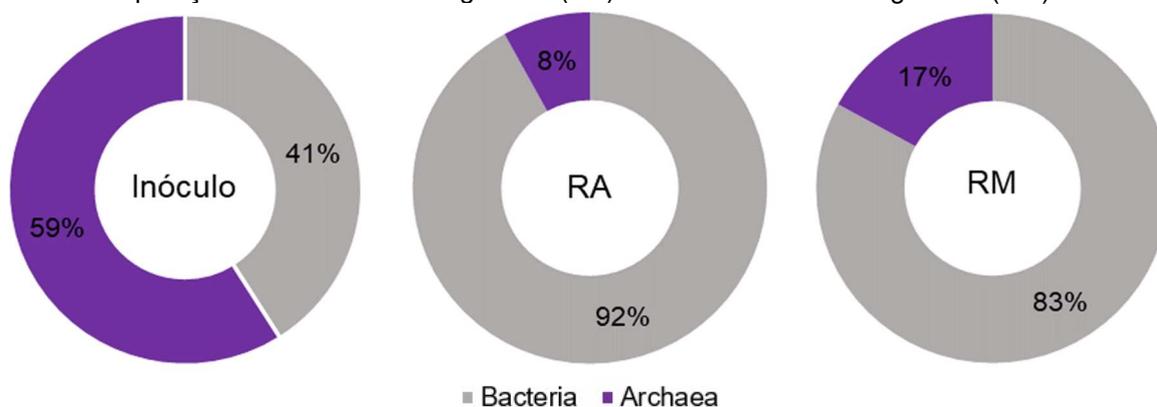
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: P: potencial de produção de H₂ ou CH₄; R_M: taxa máxima de produção de H₂ ou CH₄; λ: duração da fase de início da produção de H₂ ou CH₄.

Dessa forma, os resultados obtidos a partir do ajuste da função de Gompertz sugerem que as condições impostas no Ensaio 2 (S/I de 1,0) são recomendadas para aumento de escala.

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. O lodo granular anaeróbio (inóculo *in natura*), adicionado aos reatores, apresentou um percentual de abundância relativa para os domínios Bacteria e Archaea de 41 e 59%, respectivamente (Figura 14). Na amostra dos reatores acidogênicos (RA), foi observada porcentagem reduzida na abundância para o Domínio Archaea de 8% e consequente aumento para 92% do Domínio Bacteria. Tal fato confirmou que o pré-tratamento térmico aplicado ao inóculo e as condições operacionais impostas favorecerem o crescimento de comunidade microbiana responsável pelos processos fermentativos de produção de AGVs, álcoois e H₂ (GHIMIRE *et al.*, 2015). Nos reatores metanogênicos (RM) foi observada diminuição da abundância relativa do Domínio Bacteria para 83% e aumento do Domínio Archaea para 17%, com relação ao reator acidogênico. Esse aumento das arqueias proporcionou a geração de CH₄. Provavelmente, o efluente do reator acidogênico, rico em ácidos orgânicos voláteis e álcoois contribuiu para aumento arqueias e para o favorecimento de bactérias fermentativas mais resistentes.

Figura 14 – Abundância relativa dos domínios Bacteria e Archaea presentes no inóculo e no final da operação dos reatores acidogênicos (RA) e dos reatores metanogênicos (RM).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

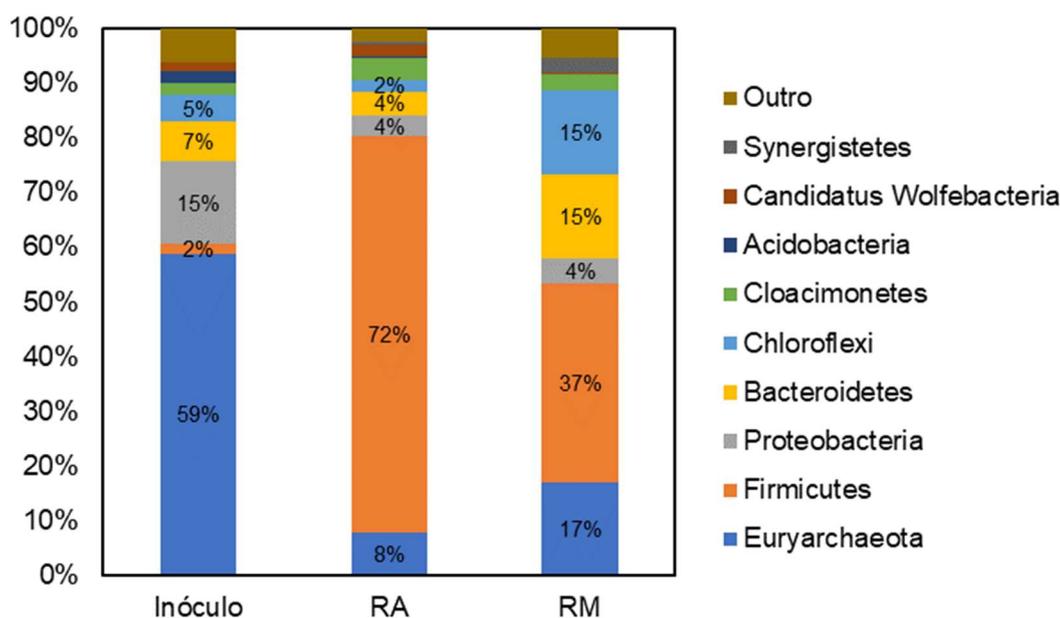
No inóculo *in natura* foi verificado predomínio na abundância relativa do filo Euryarchaeota (59%) (Figura 15). Tal fato era esperado por ser lodo proveniente de reator anaeróbico do tipo UASB, que favorece a predominância de filos do Domínio Archaea, seguido do filo Proteobacteria (15%), advindos do resíduo do abate de aves (XU *et al.*, 2018).

Ao final da operação dos reatores acidogênicos (RA), foi verificada abundância relativa mais elevada para o filo Firmicutes (72%), que é constituído por bactérias anaeróbicas 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). O pré-tratamento aplicado no inóculo selecionou microrganismos produtores de hidrogênio (YANG; YIN; WANG, 2019).

No final da operação dos reatores metanogênicos (RM) foi observada abundância relativa mais reduzida do filo Firmicutes (37%), ou seja, provavelmente carboidratos e demais açúcares contidos no efluente dos reatores acidogênicos foram consumidos com produção de produtos intermediários, para posterior conversão a metano. O filo Euryarchaeota foi o segundo com abundância relativa mais elevada (17%), seguido dos filos Bacteroidetes e Chloroflexi, ambos com 15%. O

enriquecimento seletivo de Bacteroidetes 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, o que foi verificado no presente estudo. Normalmente, o filo Bacteroidetes 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 filios pode significar que, apesar da separação em dois estágios, a etapa de acidogênese continuou ocorrendo no segundo estágio (XU *et al.*, 2020).

Figura 15 – Abundância relativa de filios presentes no inóculo *in natura* e no final da operação dos reatores acidogênicos (RA) e reatores metanogênicos (RM).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Foi observado que nos reatores acidogênicos (RA) houve predomínio do gênero *Paraclostridium* (38%), seguido de *Clostridium* (23%) (Figura 16 (b)). Tal fato era esperado, pois as bactérias produtoras de H₂ desses gêneros podem resistir ao pré-tratamento térmico aplicado, formando esporos, e contribuir para a produção de hidrogênio e demais coprodutos de valor agregado, além de serem capazes de degradar celulose. Conforme verificado, a produção dos ácidos acético, butírico e

propiônico podem ter ocorrido pelo gênero *Clostridium* (CASTELLÓ *et al.*, 2020). Algumas bactérias do gênero *Clostridium* podem apresentar rendimentos reduzidos de H₂ ao converter hexose diretamente a acetato com substratos lignocelulósicos, como resíduos da goiaba. Não foi detectado CH₄ nos reatores acidogênicos, apesar de ser verificada abundância relativa do gênero *Methanosaeta* (7%).

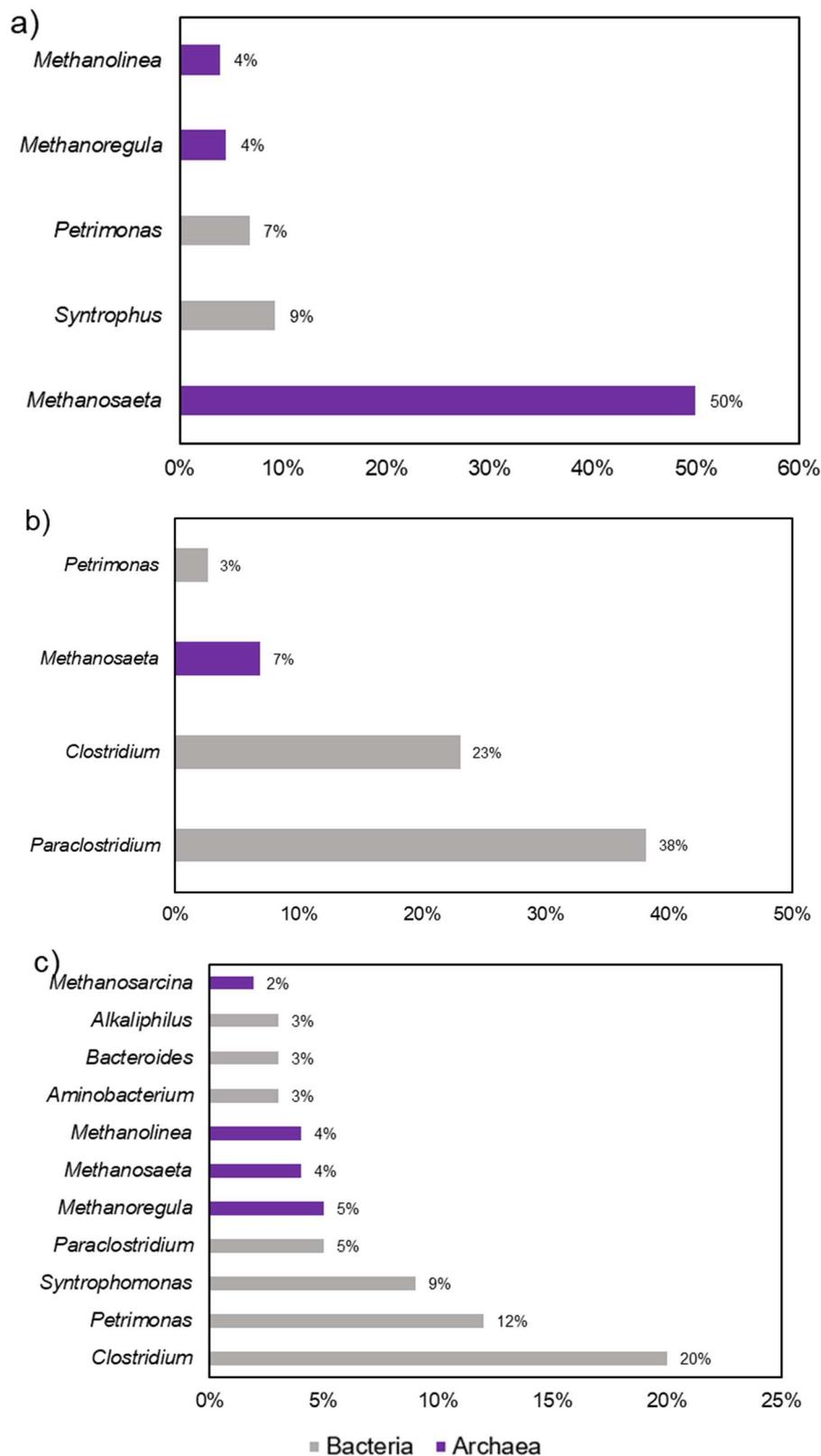
O gênero *Paraclostridium* é conhecido como eficiente produtor de hidrogênio e provavelmente a sua manutenção foi favorecida no tratamento térmico do inóculo, por possuir a capacidade de formar endósporos, frente a essa condição ambiental adversa. São obrigatoriamente anaeróbios e reportados como eficientes produtores de H₂. Entretanto, em concentrações elevadas de celulose, devido ao aumento da cadeia de carbono, a produção de H₂ por esse gênero pode ser afetada. Uma solução possível seria a hidrólise prévia por meio da aplicação de pré-tratamento ao substrato. Yang, Yin e Wang (2019), ao utilizarem diferentes pré-tratamentos, encontraram elevada produção de hidrogênio e abundância relativa de *Paraclostridium* (61%) no tratamento térmico de lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto sanitário.

Entretanto, é mais provável que as bactérias desse gênero tenham vindo do próprio resíduo, pois suas diferentes enzimas celulolíticas bacterianas já foram isoladas da autofermentação de material celulósico. Rabelo *et al.* (2020) identificaram o *Paraclostridium* como bactéria autóctone do bagaço de cana-de-açúcar que foi capaz de produzir H₂ a partir de glicose, celulose e do próprio bagaço. Em celulose, o *Paraclostridium* teve um crescimento lento e produção atrasada de ácidos orgânicos, com ácido propiônico e butírico observados como produtos predominantes, o que está de acordo com os resultados de AGVs obtidos e discutidos anteriormente. Em suma, é possível que o gênero *Paraclostridium*, identificado nos reatores acidogênicos, tenha origem no resíduo da goiaba e/ou do inóculo *in natura*, além de atuar na hidrólise da celulose, favorecendo dessa forma, a produção de metano verificada no segundo estágio.

Foi observada abundância relativa mais elevada de arqueias metanogênicas no segundo estágio (reatores metanogênicos (RM)) (Figura 16 (c)), 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* (5%), que juntamente com *Methanolinea* (4%), indicaram a predominância de rota metabólica hidrogenotrófica.

Entretanto, também foi verificada a ocorrência dos gêneros *Methanosaeta* (4%) e *Methanosarcina* (2%), metanogênicas que utilizam o acetato. Resultado compatível com a produção reduzida de ácido acético, em proporção, no estágio acidogênico. Os gêneros *Petrimonas* (12%) e *Syntrophomonas* (9%) identificados, podem ter atuado na degradação de ácidos graxos intermediários, como o propiônico (encontrado em grande proporção nas análises do estágio acidogênico), butírico, além de etanol. A presença dessas bactérias foi fundamental para oxidação do ácido propiônico produzido no primeiro estágio e a produção elevada de metano obtida no segundo estágio, desempenhando, portanto, um papel importante na digestão do resíduo (SCHMIDT *et al.*, 2016) (MERLINO *et al.*, 2012). A presença de *Clostridium* (20%) e *Paraclostridium* (12%) no segundo estágio também favoreceu a continuidade da degradação do substrato e a consequente produção de metano (RABELO *et al.*, 2020). Além disso, *Aminobacterium* (3%) foi encontrada no RM e é um tipo de bactéria que consome proteína para produção de acetato e propionato.

Figura 16 – Abundância relativa dos gêneros para (a) inóculo *in natura*; (b) reatores acidogênicos (RA); e (c) reatores metanogênicos (RM).

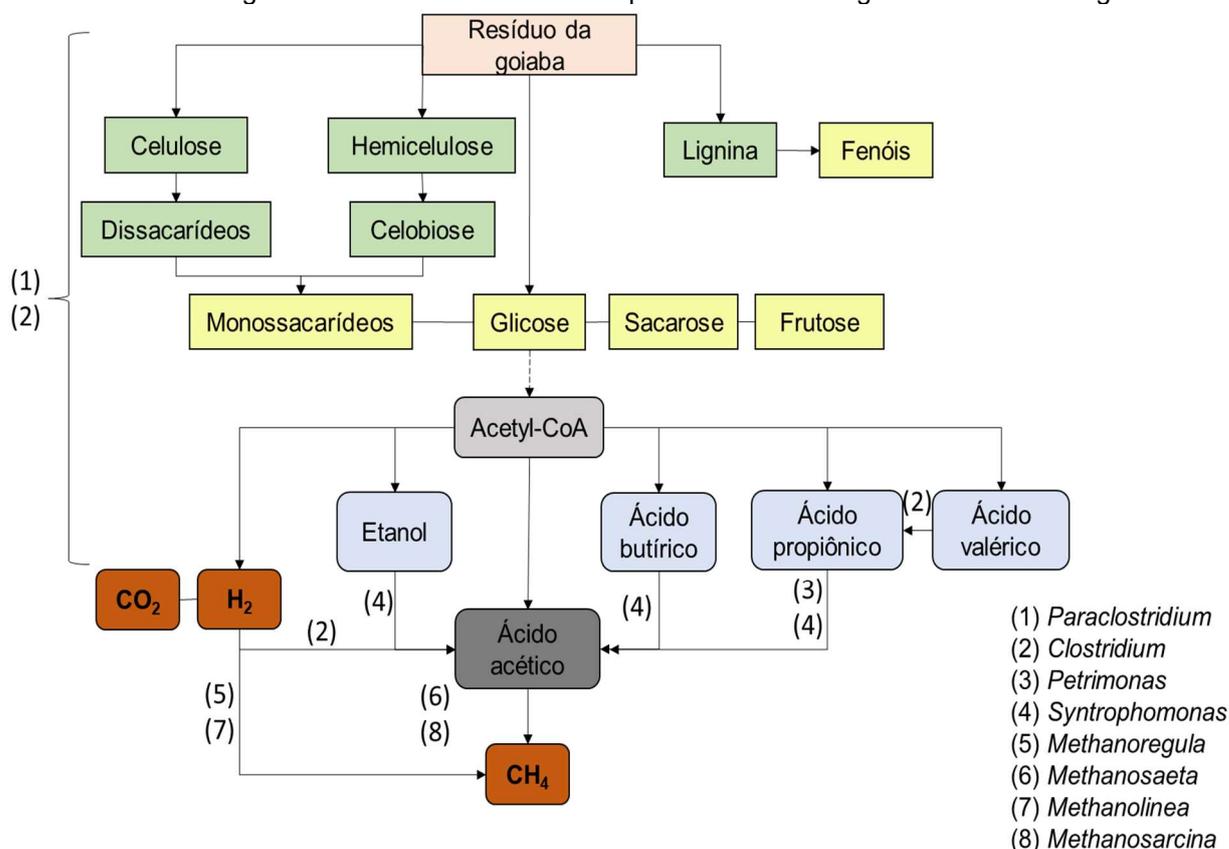


Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Com os resultados das análises dos AGVs formados durante o estágio acidogênico e análise biomolecular, já discutidos anteriormente, foi possível propor as principais rotas metabólicas e os microrganismos envolvidos nas respectivas conversões. A rota proposta se baseou na celulose (presente nas cascas, sementes e fibras da goiaba) e nos principais açúcares presentes na goiaba, principalmente glicose e frutose. Também foi levado em consideração que a etapa de acetogênese foi limitada no primeiro estágio, com conversão dos principais metabólitos intermediários encontrados (ácidos propiônico, butírico e valérico, e etanol) a acetato e hidrogênio. Posteriormente tais metabólitos foram usados como substrato para a produção de metano, que ocorreu no segundo estágio. Nesse sentido, foi inferido que ocorreu um processo de oxidação sintrófica para produção de acetato a partir do etanol e dos ácidos propiônico e butírico, com posterior utilização dos produtos pelas metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas. Normalmente, o valerato não é estável e pode ser facilmente convertido a ácido propiônico. Apesar das análises cromatográficas dos reatores metanogênicos não terem indicado a presença de H₂ no biogás, a presença das metanogênicas hidrogenotróficas indicou que houve a sua produção e o seu rápido consumo ainda na fase líquida (Figura 17) (CARVALHEIRA *et al.*, 2018; GHIMIRE *et al.*, 2015; LENS *et al.*, 1996; LUO; KAUR; WONG, 2019; OCHOA *et al.*, 2021; SCHMIDT *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018).

Dessa forma, bactérias dos gêneros *Paraclostridium* e *Clostridium* participaram da conversão dos resíduos industriais da goiaba com consumos de açúcares a etanol, ácidos acético, butírico, propiônico, valérico e hidrogênio (RABELO *et al.*, 2020). Além disso, há a versatilidade de bactérias fermentativas do gênero *Clostridium*, que podem estar envolvidas em possíveis consumos de hidrogênio a ácido acético, pela homoacetogênese (CASTELLÓ *et al.*, 2020). Bactérias fermentativas produziram ácido acético, incluindo as pertencentes ao gênero *Petrimonas*, que consumiram ácido propiônico e as do gênero *Syntrophomonas*, provavelmente envolvidas na degradação de etanol e ácido butírico (LUO; KAUR; WONG, 2019). A seguir, arqueias metanogênicas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* estiveram envolvidas nas gerações de metano a partir de ácido acético, além de *Methanoregula* e *Methanolinea* a partir de H₂ e CO₂ (Figura 17) (SCHMIDT *et al.*, 2016).

Figura 17 – Fluxograma simplificado com possíveis rotas metabólicas e principais microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia do resíduo do processamento da goiaba em dois estágios.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

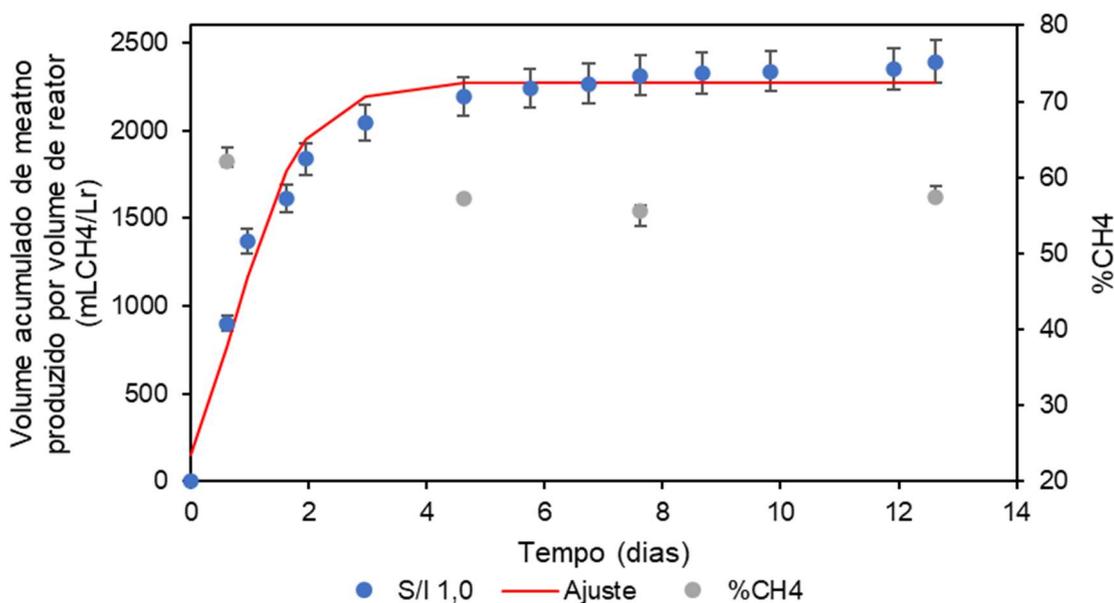
5.3 Operação dos reatores anaeróbios em batelada para codigestão anaeróbia em único estágio

Na Figura 18 estão apresentados os resultados da produção acumulada de metano no Ensaio M1 da digestão anaeróbia em estágio único com relação S/I de 1,0. A produção total acumulada foi de $2395 \pm 60 \text{ mL CH}_4 \text{ LR}^{-1}$ em 12,6 dias de operação. Pelos resultados obtidos do ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada, a produção acumulada se estabilizou em 6,8 dias, sendo o valor de P de $2277 \text{ mL CH}_4 \text{ LR}^{-1}$. O T80 foi de aproximadamente 3 dias. A taxa R_M foi de $1228,2 \text{ mL CH}_4 \text{ LR}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Quantidade considerável de metano foi produzido já nas primeiras horas de operação (0,6 dia) e, portanto, não foi observada fase de início de produção de metano ($\lambda=0$), o que indica a adaptação dos microrganismos ao substrato na relação indicada.

A porcentagem de metano no biogás, teve média de 58,1%. A composição máxima de metano foi atingida em 1,9 dias de operação, com $62,1 \pm 1,9\%$, período

no qual também se tem a maior produção. Após a estabilização, período com produções mais baixas, a concentração abaixou para $57,2 \pm 0,3\%$ (4,6 dias) e se manteve aproximadamente com o mesmo valor até o final da operação (Figura 18).

Figura 18 – Produção acumulada de metano por volume de reator no Ensaio M1 (S/l de 1,0).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

O rendimento de metano obtido em único estágio com o resíduo da goiaba foi de $189,2 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ e foi comparado com outros estudos na literatura utilizando resíduos agroindustriais de frutos (Tabela 19).

A geração de metano obtida em único estágio foi a mesma encontrada por Camarena-Martínez *et al.* (2020) na digestão anaeróbia de resíduo de tomate, todavia na relação S/l de 0,79 ($189 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$). Valor superior ($230 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$) foi encontrado por Perimenis *et al.* (2018) com resíduos do aproveitamento industrial da pera, processo de extração de suco e a água de lavagem para produção de xarope, entretanto com uma relação S/l menor, de 0,34.

Resultado de rendimento menor ($64 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$) do que o do presente estudo foi encontrado por dos Santos *et al.* (2020) ao realizar o teste de potencial bioquímico de metano (PBM) do resíduo de caju, sendo a polpa após a extração do suco. Os autores inferiram que o rendimento reduzido foi devido à composição da fibra do substrato, com 34,5% de lignina e 16,2% de hemicelulose, não obstante nenhuma solução de nutrientes foi adicionada.

Tabela 19 – Rendimento obtido no Ensaio M1 e comparação com a literatura.

Substrato (Resíduo)	Relação S/I (gDQO/gSV)	Temperatura (°C)	Rendimento (mLCH ₄ /gSV)	Fonte
Pera	0,34 (1)	35	230	Perimenis <i>et al.</i> (2018)
Caju	0,40 (1)	37	64	Dos Santos <i>et al.</i> (2020)
Tomate	0,79 (1)	39	189	Camarena-Martínez <i>et al.</i> (2020)
Goiaba	1,00	37	189	Este trabalho

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

(1) Calculado com dados fornecidos no artigo.

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados de DQO e carboidratos, bem como as eficiências de remoção encontradas para o Ensaio M1. Elevada eficiência de remoção de carboidratos foi encontrada, de 98%. A remoção de DQO total foi de 73%.

Tabela 20 – Resultados de DQO e carboidratos para o Ensaio M1.

	DQOt (gO ₂ /L)	DQOs (gO ₂ /L)	Carboidratos (mg/L)
Inicial	15,94 ± 0,42	4,06 ± 0,17	2707 ± 247
Final	4,36 ± 0,07	0,37 ± 0,02	60 ± 9
Rem. (%)	73	91	98

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: DQOt: Demanda Química de Oxigênio total; DQOs: Demanda Química de Oxigênio da fração solúvel; e Rem.: remoção.

Numa comparação por meio de teste estatístico da produção acumulada (Tabela 21), porcentagem no biogás e taxa máxima de produção de metano entre o estágio metanogênico do Ensaio 2 (S/I de 1,0) e o Ensaio M1 (S/I de 1,0) foram observadas diferenças significativas. A produção e a porcentagem de metano foram maiores no Ensaio 2 ($p < 0,01$). Entretanto a taxa de produção foi maior no Ensaio M1, com único estágio. À vista disso, a digestão anaeróbia em dois estágios do resíduo industrial da goiaba, quando comparado com único estágio, foi vantajosa pois proporcionou uma produção acumulada de metano 21% maior do que em único estágio, assim como uma maior concentração de metano no biogás (Figura 19).

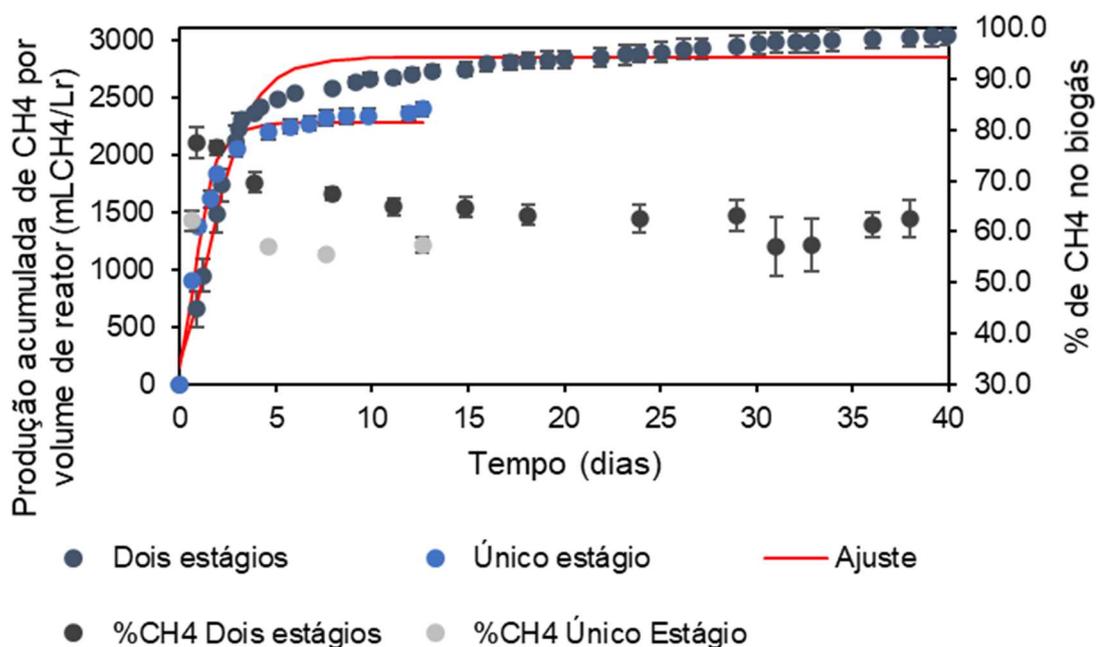
Tabela 21 – Valores médios de produção acumulada, porcentagem e taxa de produção de metano para o Ensaio 2 (S/I de 1,0) e Ensaio M1 (S/I de 1,0).

<i>Análise de variância</i>	Produção Acumulada	%CH ₄	R _M
Teste F	111,75**	57,16**	523,53**
c.v. (%)	2,73	3,59	2,15
<i>Teste de Tukey a 5%</i>			
Ensaio 2	3035 a	77,6 a	817,0 b
Ensaio M1	2395 b	62,1 b	1228,2 a

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: c.v. – coeficiente de variação; Letras iguais na mesma coluna indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$); ns - não significativo ($p > 0,05$).

Figura 19 – Comparação da produção acumulada e porcentagem de CH₄ entre o estágio metanogênico do Ensaio 2 e o Ensaio M1.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

5.4 Otimização das condições operacionais na fermentação para remoções de carboidratos, rendimentos de H₂ e gerações de metabólitos

O desenho experimental foi utilizado no presente estudo para avaliar os efeitos da temperatura, pH e relação S/l na remoção de carboidratos e nos rendimentos de H₂ e metabólitos. Após a realização dos ensaios preditos, foi então obtida a superfície de resposta para a remoção de carboidratos, em porcentagem. Foram verificadas remoções mais elevadas de carboidratos e superiores a 90% a temperaturas próximas de 46°C, para as relações S/l maiores do que 1,4, e pH entre 6,0 e 7,7 (Figura 20 B).

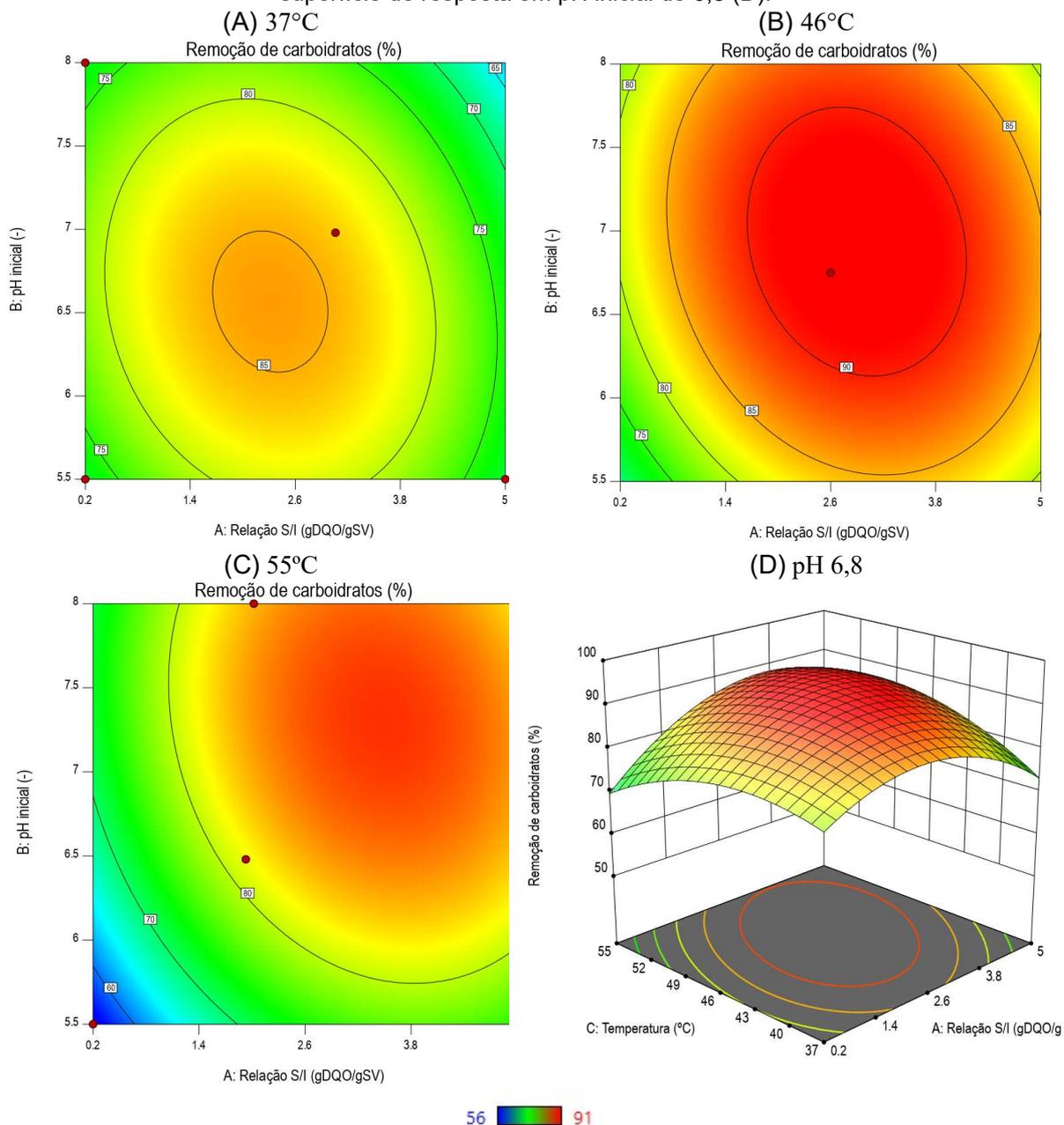
A 55°C também foram encontradas remoções satisfatórias para as regiões com pH acima de 6,2 e relações S/l maiores que 2,0. Possivelmente, a atividade microbiológica foi favorecida com o aumento da temperatura, maior disponibilidade de substrato e pH próximo a neutralidade. Contrariamente, para relações S/l inferiores a 1,4 e pH menor que 6,4 foram verificadas remoções inferiores a 67% (Figura 20 C).

Remoções de carboidratos acima de 86% não foram verificadas a 37°C (Figura 20 A). Entretanto, não foram observadas remoções inferiores a 67%, como observado a 55°C. A 37 °C, nas regiões com pH inferior a 6,0 e acima de 7,3 foram observadas menores remoções de carboidratos (abaixo de 85%). O efeito negativo do pH ácido no consumo de carboidratos, de modo similar ao presente estudo, foi observado por Zhou *et al.* (2017) na degradação da glicose a 37°C, com lodo de estação de tratamento pré-tratado termicamente. Os autores inferiram que a diminuição do pH inibiu a atividade fermentativa das bactérias.

Em pH próximo à neutralidade (Figura 20 D), foi verificado que as condições operacionais que proporcionaram elevadas remoções de carboidratos (acima de 80%) foram em temperaturas acima de 40°C e relação S/l entre 1,4 e 3,8. Observou-se que as melhores remoções de carboidratos ocorreram com maior relação S/l. De modo semelhante ao presente estudo, Camargo *et al.* (2021a) obtiveram remoções reduzidas de carboidratos (17%) com 1,5 g L⁻¹ de resíduo citrícola (casca) e máximas remoções de carboidratos (67%) foram verificadas para 28,5 g L⁻¹ do resíduo, o que pode ser atribuído aos monômeros de carboidratos prontamente disponíveis, devido às maiores concentrações impostas. Os autores inferiram que com a elevação das concentrações do resíduo citrícola nos testes, os seus diferentes carboidratos presentes, como glicose, xilose, sucralose, celulose e lignina também aumentaram, dificultando dessa forma os seus consumos totais, como verificado no presente estudo

com o resíduo da goiaba. Assim, os carboidratos dissolvidos são consumidos prontamente, o que não ocorre com a biomassa lignocelulósica presente na forma de lignina, por exemplo.

Figura 20 – Curvas de contorno da remoção de carboidratos a 37°C (A), a 46°C (B), a 55°C (C) e superfície de resposta em pH inicial de 6,8 (D).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

As curvas de contorno obtidas para o rendimento de H_2 estão apresentadas na Figura 21. Pode-se observar que com a elevação da relação S/I houve redução no rendimento de H_2 . Entretanto, na relação S/I de 0,2 (Figura 21 A) houve uma maior

variação do rendimento obtido, com valores ($\text{mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$) acima de 0,3 e menores do que 0,1. Dessa forma, para essa condição S/I de 0,2 a temperatura e o pH influenciaram no rendimento, sendo que os valores máximos de H_2 foram obtidos para temperaturas superiores a 52°C e em pH inferior a 7,0. Os valores mínimos de rendimento nessa relação S/I de 0,2 foram encontrados nas regiões de pH acima de 7,0 e temperaturas menores do que 43°C .

Na relação S/I de 2,6 (Figura 21 B) não foi verificada considerável variação do rendimento de H_2 com a mudança de pH e da temperatura. Entretanto, a *performance* dos reatores à temperatura elevada, acima de 52°C , e pH inicial abaixo de 7,0 demonstrou melhores resultados de rendimento. Provavelmente, a temperatura elevada também beneficiou a hidrólise facilitando a biodisponibilidade do resíduo na fase líquida. Na relação S/I de 5,0 (Figura 21 C) o rendimento foi mais elevado a temperaturas mais reduzidas e em pH mais básico. A atividade microbológica foi favorecida para quantidades mais elevadas de substrato, a temperaturas mais reduzidas e pH inicial mais elevado. Tais condições impostas não causaram a queda brusca no pH, o que favoreceu a produção de H_2 .

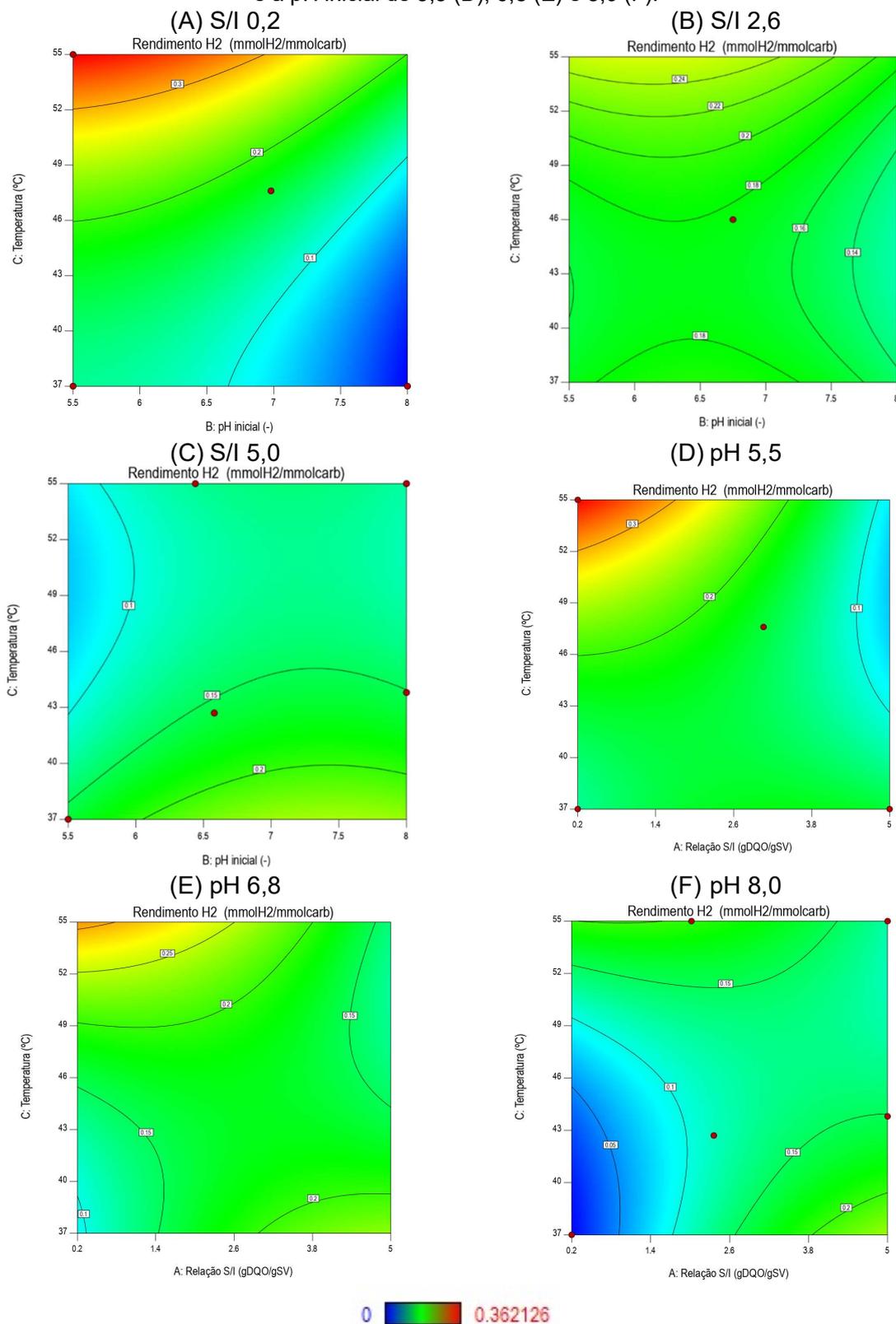
O rendimento de H_2 em pH inicial de 8,0 (Figura 21 F) apresentou rendimentos mais reduzidos e inferiores a $0,05 \text{ mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$, nas regiões com relações S/I menores que 1,0 e a temperaturas inferiores a 46°C . Provavelmente, a reduzida quantidade de resíduo aplicada fez com que o pH não fosse muito alterado e se mantivesse com valor neutro ou mais ácido, valores esses que favoreceram as rotas metabólicas para geração de H_2 , conforme discutido anteriormente. Essa afirmação pode ser confirmada com o que foi observado na condição C6 (relação S/I de 0,2, pH inicial de 8 e temperatura de 37°C), na qual o pH final foi próximo à neutralidade, em $7,26 \pm 0,02$. Contrariamente, com o pH inicial em 5,5 (Figura 21 D), as regiões com relação S/I mais elevadas não apresentaram resultados satisfatórios para o rendimento de H_2 , inferiores a $0,1 \text{ mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$, quando comparada aos rendimentos nas relações S/I inferiores a 2,6.

Para pH próximo da neutralidade (6,8) (Figura 21 E) foram verificados os melhores rendimentos de H_2 a temperaturas mais elevadas, acima de 52°C . Rendimentos de H_2 mais reduzidos, inferiores a $0,15 \text{ mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$, foram obtidos nas regiões com relação S/I menor que 1,4 e temperaturas inferiores a 46°C e; e relação S/I superiores a 4,0 e temperaturas superiores a 45°C .

Na Figura 22 está apresentada a superfície de resposta para o rendimento de H₂ a faixa termofílica de 55°C. Foi possível verificar que o rendimento de H₂ foi inversamente proporcional a relação S/I, ou seja, com a elevação da relação S/I houve sua redução. Igualmente, a elevação do pH inicial também foi inversamente proporcional até relações S/I próximas a 4,0. Como discutido anteriormente, a exceção ocorreu nas relações S/I superiores.

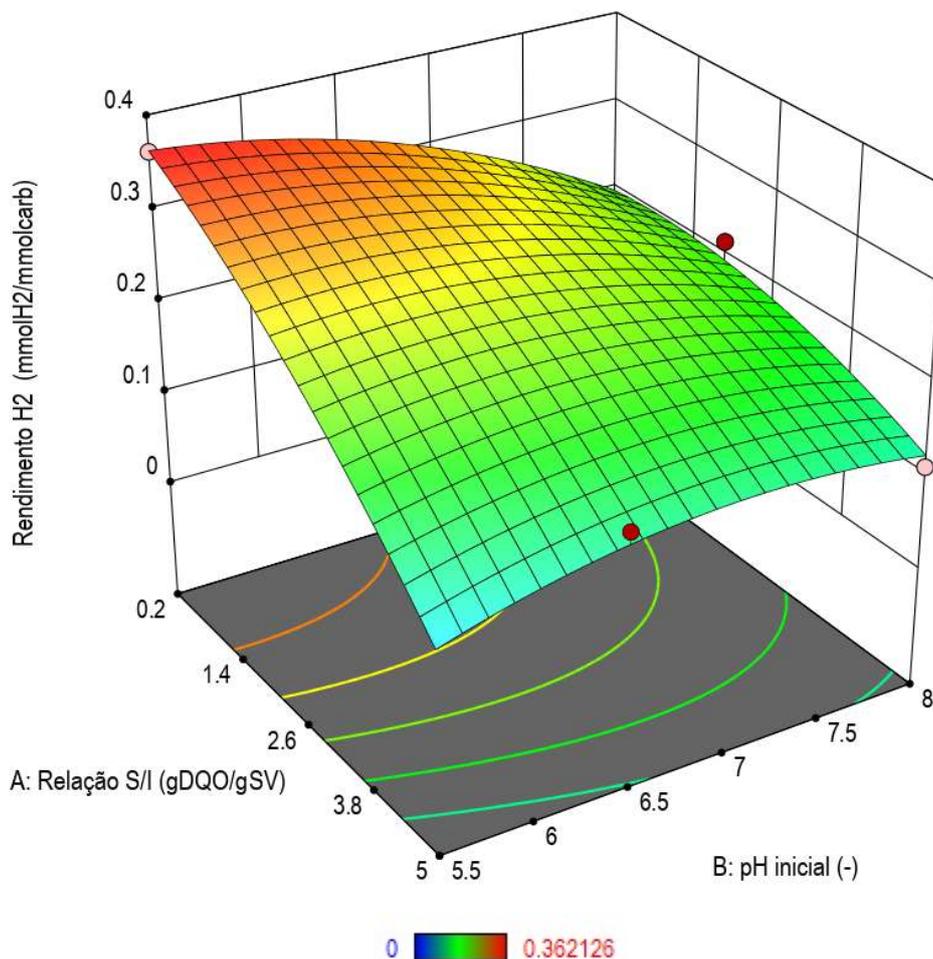
Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, as condições que proporcionam maior rendimento de H₂, superiores a 0,35 mmol H₂ mmol⁻¹ Carb, foram para temperaturas de 55°C, pH inicial inferior a 6,0 e relação S/I menor do que 0,55. Rendimentos satisfatórios (acima de 0,30 mmol H₂ mmol⁻¹ Carb) também foram encontrados para pH menor que 6,9 e relação S/I de até 1,6. Semelhantemente ao presente estudo, Montoya *et al.* (2020) obtiveram melhores resultados de produção de H₂ a partir de resíduo cítrico (casca) em pH 7,0 e inferiram que o pH próximo à neutralidade estimulou maior diversidade de microrganismos, elevando a sinergia entre bactérias com capacidade hidrolítica e fermentativa.

Figura 21 – Curvas de contorno para o rendimento de H₂ em relações S/I de 0,2 (A), 2,6 (B) e 5,0 (C), e a pH inicial de 5,5 (D), 6,8 (E) e 8,0 (F).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura 22 – Superfície de resposta para o rendimento de H₂ a 55°C.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

O rendimento de metabólitos (Figura 23) foi baixo para relações S/I superiores a 1,4 (Figura 23 A e Figura 23 B), mesmo com a variação do pH e temperatura, indicando que a quantidade de substrato foi o fator mais limitante na produção de metabólitos. Dessa forma, a influência da temperatura e do pH inicial foi mais significativa na relação S/I de 0,2, na qual os melhores rendimentos de metabólitos foram observados e superiores a 800 mg DQO g⁻¹ SV, na faixa de 42°C a 48°C e pH entre 6,4 e 7,5 (Figura 23 C). O pH acima de 7,0 proporcionou maior recuperação de metabólitos, principalmente ácidos acético e butírico, como verificado por Camargo *et al.* (2021a) a partir de resíduo citrícola, descrito a seguir.

Apesar de não ser recomendada a avaliação das condições individualmente, as distribuições de metabólitos para cada condição testada estão apresentadas na Figura 24, evidenciando as rotas metabólicas predominantes. Foi verificado que a distribuição dos metabólitos gerados ficou semelhante em todas as condições, com

produções mais elevadas de ácido butírico, seguido de ácido acético. Camargo *et al.* (2021a) a partir de resíduo citrícola (cascas) também encontraram produções principais dos ácidos butírico e acético, atingindo máximos de 3731 e 3516 mg L⁻¹, respectivamente, na condição otimizada, conforme descrito anteriormente. Esses resultados foram próximos aos verificados no presente estudo, principalmente na condição C5, em que se alcançaram concentrações de ácido butírico de 4424 mg L⁻¹ e de ácido acético de 2011,24 mg L⁻¹.

As condições nas quais ocorreram exceções nas distribuições de metabólitos foram para as condições C9 e C10; em que foram verificados os rendimentos mais elevados de H₂ (mg DQO g⁻¹ SV) de 100,43 e 73,39, respectivamente. Nessas condições houve o predomínio de produção de ácido acético (39,49 e 32,32%, respectivamente); resultado de acordo com o esperado, pois a produção do ácido acético a partir da glicose é acompanhada com rendimento mais elevado de H₂, conforme discutido anteriormente.

Na condição C6 não foi observada produção de H₂, entretanto a produção de ácido acético foi predominante (41,04%). É provável que houve o predomínio da homoacetogênese, em que há o consumo de H₂ para formação de ácido acético, conforme a Equação 7, bem como para a produção do ácido isovalérico, também gerado nessa condição (12,31%) (SAADY, 2013).

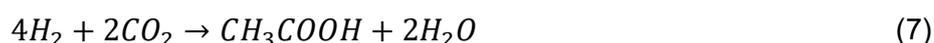
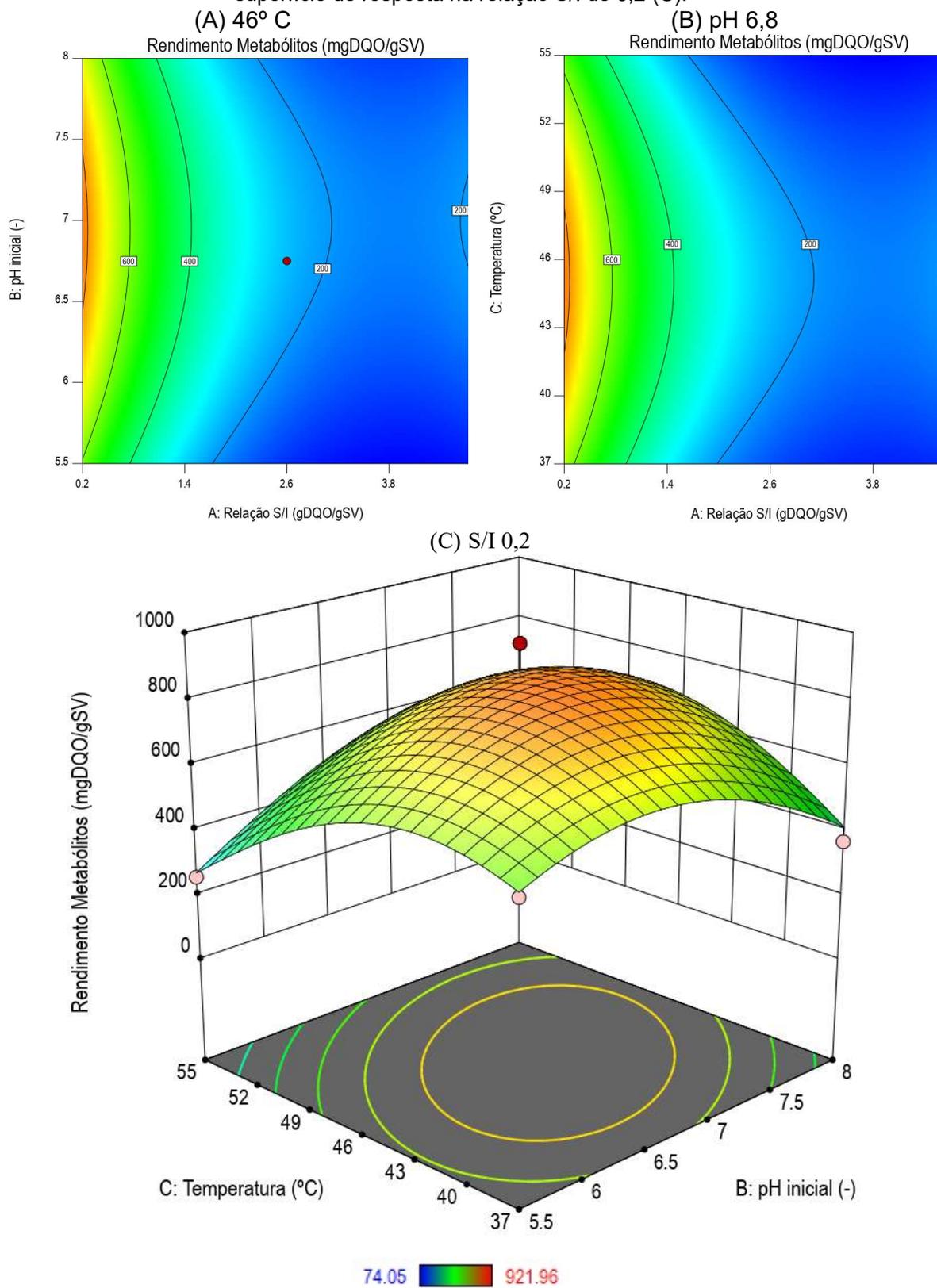
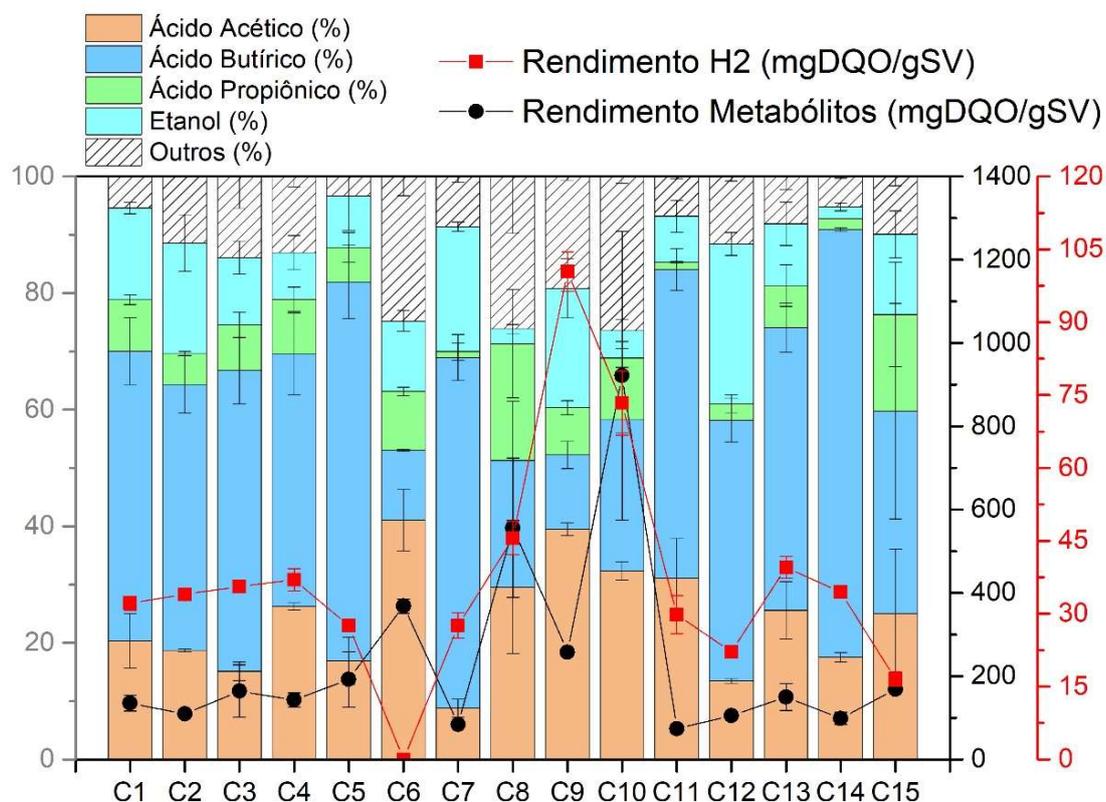


Figura 23 – Curvas de contorno para o rendimento de metabólitos a 46°C (A), em pH inicial 6,8 (B) e superfície de resposta na relação S/I de 0,2 (C).



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura 24 – Rendimento e distribuição dos metabólitos e rendimento de H₂ para cada condição testada.



Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

O menor rendimento de metabólitos foi observado na condição C11 (74,05 mg DQO g⁻¹ SV), em que os fatores foram relação S/I de 5, pH inicial de 5,5 e temperatura de 37°C. Tais fatos sugeriram que a quantidade elevada de resíduo aplicada e pH mais ácido afetaram negativamente a produção de metabólitos. O pH é um fator influente na produção de metabólitos, especialmente porque o ATP é usado para garantir a neutralidade celular em vez de produção de bioprodutos (CAMARGO *et al.*, 2021a). O pH final nessa condição foi de $4,62 \pm 0,08$. Com exceção das condições C11 e C14, que o pH final foi de $4,78 \pm 0,21$, as demais condições apresentaram pH final ainda dentro da faixa desejada para a fermentação, entre 5,23 (condição C7) e 7,26 (condição C6) (GHIMIRE *et al.*, 2015). A redução de pH ocorreu em todos os ensaios, provavelmente causada pela produção dos álcoois e ácidos orgânicos, fato comumente observado na fermentação (MONTROYA *et al.*, 2020).

Na condição C12 (relação S/I de 5, pH inicial de 8,0 e temperatura de 55 °C) houve significativa produção de etanol (28,92%), indicando o favorecimento da rota metabólica de produção desse álcool.

As porcentagens máximas de H₂ medidas para cada condição testada estão apresentadas na Tabela 22. A porcentagem máxima foi encontrada na condição C11, sendo de 53,9% de H₂ no biogás, seguida da condição C13, com 51,7%. Ambas as condições foram com relações S/I mais elevadas, de 5,0 e 3,06, a 37°C, respectivamente.

Tabela 22 – Composição máxima de H₂ no biogás na fermentação escura do resíduo da goiaba nas diferentes condições testadas.

Condição	Porcentagem máxima de H ₂ no biogás, em % (Tempo em horas)
C1	38,1 ± 2,9 (18,2)
C2	24,6 ± 2,1 (13,5)
C3	28,8 ± 0,5 (13,5)
C4	32,2 ± 0,9 (28,8)
C5	45,4 ± 1,6 (12,5)
C6	-
C7	30,9 ± 2,6 (20,0)
C8	12,2 ± 0,2 (4,4)
C9	11,4 ± 0,5 (20,0)
C10	26,9 ± 3,2 (28,8)
C11	53,9 ± 1,9 (1,9)
C12	29,3 ± 3,6 (20,0)
C13	51,7 ± 1,4 (22,8)
C14	39,6 ± 2,0 (28,8)
C15	24,94 ± 8,13 (38,8)

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Notas: Na C5 não foi observado H₂ na composição do biogás.

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados obtidos para as respostas em cada condição testada, com as quais foram obtidas as superfícies de resposta e curvas de contorno discutidas anteriormente. Rendimentos de H₂ (mmol H₂ mmol⁻¹ Carb) foram obtidos entre 0,00 (condição C6) e 0,36 (condição C9). Foram verificados rendimentos de metabólitos (mg DQO g⁻¹ SV) de 74,05 (condição C11) a 921,96

(condição C10) e remoção de carboidratos entre 56% (condição C9) e 91% (condição C4). Os resultados de carboidratos iniciais (g L^{-1}), do início da operação dos reatores, com os quais foram calculadas as remoções para superfície de resposta, foram $0,64 \pm 0,09$ (relação S/I de 0,20), $2,03 \pm 0,04$ (relação S/I de 1,93), $2,59 \pm 0,12$ (relação S/I de 2,02), $3,43 \pm 0,25$ (relação S/I de 2,36), $3,83 \pm 0,13$ (relação S/I de 2,60), $4,33 \pm 0,53$ (relação S/I de 3,06) e $7,05 \pm 0,92$ (relação S/I de 5,00).

Tabela 23 – Respostas obtidas a partir dos fatores utilizados no estudo de superfície de resposta.

Condição	Resposta 1 Rendimento de H_2 ($\text{mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$)	Resposta 2 Rendimento de metabólitos ($\text{mg DQO g}^{-1} \text{ SV}$)	Resposta 3 Remoção de carboidratos (%)
C1	0,17	135,25	72
C2	0,25	109,37	81
C3	0,22	164,30	82
C4	0,17	142,65	91
C5	0,13	192,42	84
C6	0,00	368,42	72
C7	0,14	84,25	82
C8	0,12	556,19	71
C9	0,36	257,56	56
C10	0,18	921,96	81
C11	0,16	74,05	72
C12	0,11	105,25	87
C13	0,23	150,24	85
C14	0,18	98,19	84
C15	0,08	168,72	89

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

O teste ANOVA demonstrou que os três fatores foram significantes para as três respostas obtidas. Os R^2 foram de 0,95 para ambos os rendimentos e de 0,94 para a remoção de carboidratos. Soares *et al.* (2019), em estudo de superfície de resposta para otimização da geração de bioprodutos a partir de bagaço de cana-de-açúcar, também verificaram que a concentração de substrato e a temperatura de incubação foram significantes na fermentação. Entretanto, os autores mantiveram o pH de todos os ensaios em 6,0 e não avaliaram sua influência, como foi realizado no presente estudo. Entretanto, concluíram que a temperatura afetou nos consumos dos carboidratos e na geração dos bioprodutos: ácidos acético, butírico, fórmico e propiônico.

Na Tabela 24 estão apresentados os resultados da otimização dos rendimentos e da remoção de carboidratos.

Tabela 24 – Solução da otimização das respostas a partir dos fatores estudados.

	Valor	Unidade
Fator		
Relação S/I	0,30	g DQO g ⁻¹ SV
pH inicial	6,79	-
Temperatura	49,8	°C
Resposta		
Rendimento H ₂	0,211	mmol H ₂ mmol ⁻¹ Carb
Rendimento metabólitos	715,21	mg DQO g ⁻¹ SV
Remoção de carboidratos	78	%
Desejabilidade	0,676	

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

A condição que proporcionou a melhor recuperação a partir do resíduo da goiaba e melhor remoção foi na relação S/I de 0,30, pH inicial de 6,79 e temperatura de 49,8°C (desejabilidade de 0,68), com rendimentos de H₂ de 0,21 mmol H₂ mmol⁻¹ Carb, rendimento de metabólitos de 715,21 mg DQO g⁻¹ SV e remoção de carboidratos de 78%. O valor otimizado de pH inicial 6,79 foi próximo à neutralidade, em conformidade com o pH 7,5 obtido na otimização realizada por Hitit, Lazaro e Hallenbeck (2017a) na foto-fermentação de efluente de batata com glicose e pH 7,0 encontrado por Montoya *et al.* (2020) na fermentação de resíduo de café. A temperatura que proporcionou melhores resultados no presente estudo foi a 49,8°C e similar aos resultados obtidos por Mazareli *et al.* (2020), de 44°C na fermentação de resíduo de banana.

Mazareli *et al.* (2020) obtiveram produções máximas de H₂ (mL H₂ LR⁻¹) 253,9 (calculado com base nos dados fornecidos no artigo), nas condições otimizadas (apresentadas no item de revisão da literatura) e tais resultados foram inferiores a 11 condições testadas no presente estudo, com o resíduo da goiaba.

Tais resultados indicaram que o resíduo da goiaba apresentou potencial de geração de H₂ via fermentação, pela ação da comunidade microbiana advinda do inóculo pré-tratado.

6 CONCLUSÕES

O sistema anaeróbio em dois estágios foi efetivo para tratar o resíduo da goiaba em codigestão com esgoto sanitário, com eficiências elevadas de remoção de matéria orgânica (75-90% para DQO total) e de carboidratos (98-99%) para obtenção de bioprodutos de valor agregado (2,05-6,62 g DQO L⁻¹), de biohidrogênio (5,26-3,50 mL H₂ g⁻¹ SV) e de biometano (266,27-104,7 mL CH₄ g⁻¹ SV).

Para relações S/I de 1,0 e 2,0 foi observada diminuição do rendimento de produção de biogás por quantidade de resíduo aplicada. Entretanto, resultados satisfatórios de remoção de matéria orgânica foram verificados. Na relação S/I de 3,0 foi verificado o menor rendimento de CH₄ e, portanto, não é recomendada para aplicação em aumento de escala.

A codigestão do resíduo com esgoto sanitário foi eficiente e evitou limitação para a digestão anaeróbia.

Produções mais elevadas dos ácidos propiônico, butírico e etanol foram verificados nos reatores acidogênicos, com o aumento da relação S/I. Tal ocorrência indicou que outras vias metabólicas foram favorecidas e diminuíram os rendimentos de hidrogênio. Ademais, o acúmulo de ácido valérico observado com o aumento da relação S/I indicou sobrecarga no sistema, inibindo assim a atividade microbiana.

Nos reatores acidogênicos a população microbiana foi dominada pelo filo Firmicutes, caracterizada pelas atividades hidrolítica e acidogênica elevadas. Além disso, o gênero *Paraclostridium* provavelmente teve origem no resíduo da goiaba e atuou na hidrólise da celulose, favorecendo a produção de metano no segundo estágio.

Uma diversidade microbiana mais elevada foi verificada nos reatores metanogênicos do segundo estágio, o que pode ter favorecido o elevado rendimento de metano.

A digestão anaeróbia em dois estágios proporcionou recuperação energética 21% maior do que em estágio único, com maior porcentagem de metano no biogás e maior remoção de matéria orgânica.

A condição otimizada de operação dos reatores para fermentação do resíduo do processamento da goiaba, obtida por meio de estudo de superfície de resposta, foi para relação S/I de 0,3, temperatura de 49,8°C e pH de 6,79, com remoção de 78%

de carboidratos, rendimentos de $0,211 \text{ mmol H}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ Carb}$ e de $715,21 \text{ mg DQO g}^{-1} \text{ SV}$. Os principais metabólitos gerados foram os ácidos butírico e acético.

Novas possibilidades foram abertas para a valorização do resíduo do processamento da goiaba, objetivando sua destinação sustentável.

7 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO

Avaliar a utilização do resíduo do processamento da goiaba em reatores contínuos, em diferentes configurações, principalmente em escala piloto, para que se proceda a implementação de reatores anaeróbios nas próprias usinas geradoras destes resíduos e com conseqüente utilização do biogás para abastecimento energético.

Avaliar a codigestão do resíduo da goiaba com outros efluentes de diferentes frutas que são gerados na agroindústria.

Realizar testes de pré-tratamento no resíduo da goiaba para liberação de açúcares objetivando rendimentos mais elevados de biogás e demais produtos de valor agregado.

REFERÊNCIAS

- ADAMES, L. V. *et al.* Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de fluxo contínuo utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, 2021.
- 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.
- ALIBARDI, L. *et al.* Effects of heat treatment on microbial communities of granular sludge for biological hydrogen production Luca Alibardi , Lorenzo Favaro , Maria Cristina Lavagnolo , Marina Basaglia. **Water Science and Technology**, v. 66.7, p. 1483–1490, 2012.
- ALIBARDI, L.; COSSU, R. Effects of carbohydrate , protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. **Waste Management**, v. 47, p. 69–77, 2016.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALZATE, M. E. *et al.* Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, 2012.
- 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.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. 21st. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F. *et al.* Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- AZEVÊDO, J. A. G. *et al.* In situ and in vitro degradation kinetics and prediction of the digestible neutral detergent fiber of agricultural and agro-industrial byproducts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 8, p. 1890–1898, 2012.
- BRASIL. Lei nº 14.300, de 6 de janeiro de 2022. **Diário Oficial da União**. 7.1.2022.
- CAMARENA-MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, J. H.; SALDAÑA-ROBLES, A. Effects of Experimental Parameters on Methane Production and Volatile Solids Removal from Tomato. **Bioresources**. v. 15, p. 4763–4780, 2020.
- CAMARGO, F. P. *et al.* Microbial and functional characterization of an allochthonous consortium applied to hydrogen production from Citrus Peel Waste in batch reactor in

optimized conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 291, n. April, p. 112631, 2021a.

CAMARGO, F. P. *et al.* Screening design of nutritional and physicochemical parameters on bio-hydrogen and volatile fatty acids production from Citrus Peel Waste in batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 11, p. 7794–7809, 2021b.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335–336, 2010.

CAPPAI, G. *et al.* An experimental study on fermentative H₂ production from food waste as affected by pH. **Waste Management**, v. 34, n. 8, p. 1510–1519, 2014.

CARRILLO-REYES, J. *et al.* Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. **MethodsX**, v. 7, n. 100754, 2020.

CARVALHEIRA, M. *et al.* Performance of a two-stage anaerobic digestion system treating fruit pulp waste: The impact of substrate shift and operational conditions. **Waste Management**, v. 78, p. 434–445, 2018.

CARVALHO, C. DE; KIST, B. B.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro de Horti & Fruit 2020**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2019.

CASTELLÓ, E. *et al.* Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. 109602, 2020.

CREMONEZ, P. A. *et al.* Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, p. 111854, 2021.

DAREIOTI, M. A. *et al.* Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. **Desalination**, v. 248, n. 1–3, p. 891–906, 2009.

DAREIOTI, M. A.; KORNAROS, M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 407–415, 2014.

DE GIOANNIS, G. *et al.* Energy recovery from one- and two-stage anaerobic digestion of food waste. **Waste Management**, v. 68, p. 595–602, 2017.

DONADON, F. A. B.; SANTOS, D. F. L. A relevância da eco-inovação para resíduos sólidos na agroindústria da fruticultura. **Revista Gestão & Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 205–227, 2018.

DOS SANTOS, L. A. *et al.* Methane generation potential through anaerobic digestion of fruit waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, n. 120389, 2020.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDGAR, R. C. *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, p. 996–998, 2013.

FREITAS, L. C. *et al.* From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? **Resources, Conservation and Recycling**, v. 169, n. January, 2021.

GAO, M. *et al.* Opportunities and Challenges for Biogas Development: a Review in 2013–2018. **Current Pollution Reports**, n. March, 2019.

GHIMIRE, A. *et al.* A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015.

GRESES, S.; TOMÁS-PEJÓ, E.; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, C. Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122486, 2020.

GRIFFITHS, Robert I. *et al.* Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

HAAS, B. J. *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Research**, v. 21, p. 494–504, 2011.

HAGOS, K. *et al.* Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March 2016, p. 1485–1496, 2017.

HANS, M.; KUMAR, S. Biohythane production in two-stage anaerobic digestion system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 17363–17380, 2019.

HITIT, Z. Y.; LAZARO, C. Z.; HALLENBECK, P. C. Increased hydrogen yield and COD removal from starch/glucose based medium by sequential dark and photo-fermentation using *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 18832–18843, 2017a.

HITIT, Z. Y.; LAZARO, C. Z.; HALLENBECK, P. C. Hydrogen production by co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*: optimization of

yield using response surface methodology. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 6578–6589, 2017b.

HUSSAIN, A.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Hussain_Kumar_Mehrotra_2015.pdf. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 14, n. 4, p. 769–780, 2015.

KADER, K. A. M. A. *et al.* Evaluation on physico-chemical properties of pink guava puree residue as bioresource. **International Food Research Journal**, v. 23, n. Suppl, p. 125–131, 2016.

KIST, B. B. *et al.* **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2018**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018.

KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 685–695, 2007.

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.

LENS, P. N. L. *et al.* Propionate Degradation by Mesophilic Anaerobic Sludge: Degradation Pathways and Effects of Other Volatile Fatty Acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 387–391, 1996.

LIM, S. J.; KIM, T. ScienceDirect Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 189–202, 2014.

LUO, L.; KAUR, G.; WONG, J. W. C. A mini-review on the metabolic pathways of food waste two-phase anaerobic digestion system. **Waste Management & Research**, v. 37, n. 4, p. 333–346, 2019.

MAGOČ, T.; SALZBERG, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 1, p. 2957–2963, 2011.

MAINTINGUER, S. I. *et al.* Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4309–4317, 2008.

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.

MARTÍN, M. A. *et al.* Kinetic evaluation of the psychrophilic anaerobic digestion of synthetic domestic sewage using an upflow filter. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 131–137, 2010.

MATA-ALVAREZ, J. *et al.* A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, 2014.

- MATEUS, S. *et al.* Two-stage anaerobic digestion system treating different seasonal fruit pulp wastes: Impact on biogas and hydrogen production and total energy recovery potential. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, n. November 2019, 2020.
- MAZARELI, R. C. D. S. *et al.* Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: screening design of factors that affect hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, n. 105573, 2020.
- MENEZES, C. C. *et al.* Caracterização física e físico-química de diferentes formulações de doce de goiaba (*Psidium guajava* L.) da cultivar Pedro Sato. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 618–625, 2009.
- MERLINO, G. *et al.* Shifts of microbial community structure during anaerobic digestion of agro-industrial energetic crops and food industry byproducts. v. 2012, n. February, p. 1302–1311, 2012.
- MONTOYA, A. C. V. *et al.* Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 4205–4222, 2020.
- NASCIMENTO FILHO, W. B. DO; FRANCO, C. R. Potential assessment of waste produced through the agro-industrial processing in Brazil. **Revista Virtual de Quimica**, v. 7, n. 6, p. 1968–1987, 2015.
- OCHOA, C. *et al.* Value-added by-products during dark fermentation of agro-industrial residual biomass: metabolic pathway analysis. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2021.
- PELLERA, F. M.; GIDARAKOS, E. Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methane potential of solid agroindustrial waste. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 3217–3229, 2016.
- PERIMENIS, A. *et al.* Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. **Waste Management**, v. 72, p. 178–185, 2018.
- PINTO, V. G. B. *et al.* **Variação da área colhida, produção e produtividade das principais frutíferas do Circuito das Frutas Paulista no período 2014 – 2016**. 12^o CIIC. **Anais...**2018.
- QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.
- RABELO, C. A. B. S. *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.
- REGUENGO, L. M. *et al.* Agro-industrial by-products: valuable sources of bioactive

compounds. **Food Research International**, v. 152, p. 110871, 2022.

ROSSI, D. M. *et al.* Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. August, p. 841–845, 2008.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SCHIEVANO, A. *et al.* Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? **Applied Energy**, v. 124, p. 335–342, 2014.

SCHMIDT, O. *et al.* Peat: home to novel syntrophic species that feed acetate- and hydrogen-scavenging methanogens. **The ISME Journal**, v. 10, p. 1954–1966, 2016.

SOARES, L. A. *et al.* Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition. **Renewable Energy**, v. 140, p. 852–861, 2019.

TREICHEL, M. *et al.* **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. 1^a ed. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016.

VON SPERLING, M.; CHERNICARO, C. A. L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. IWA publishing, 2005.

WANG, Q. *et al.* Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

XU, R. *et al.* A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1119–1127, 2018.

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.

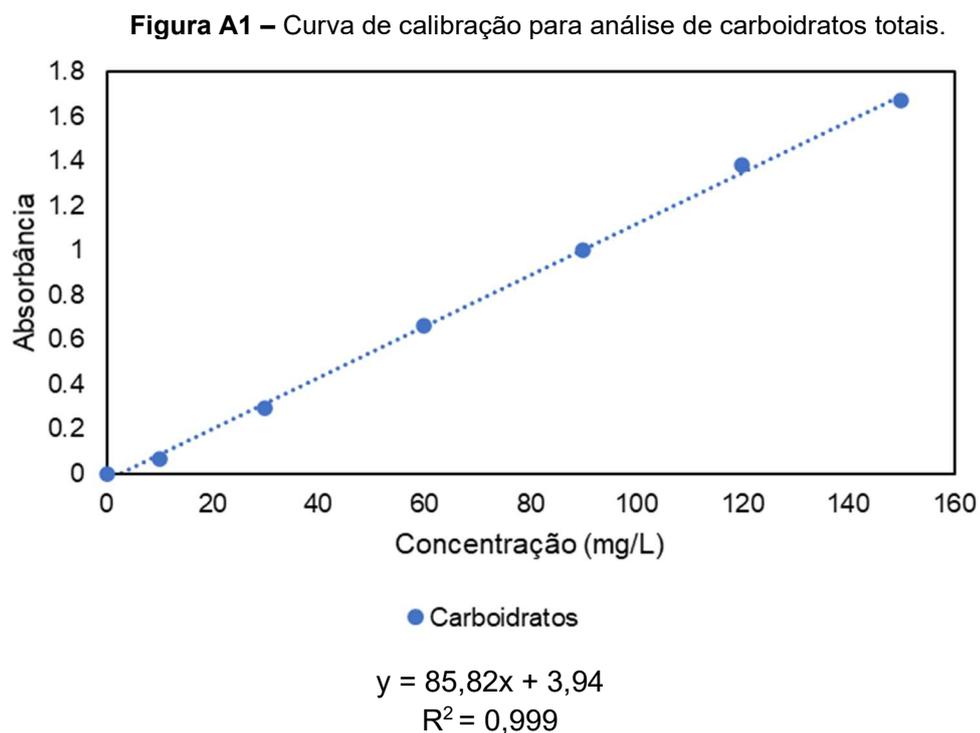
YANG, G.; YIN, Y.; WANG, J. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 26, p. 13147–13156, 2019.

ZHOU, M. *et al.* Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 44–51, 2017.

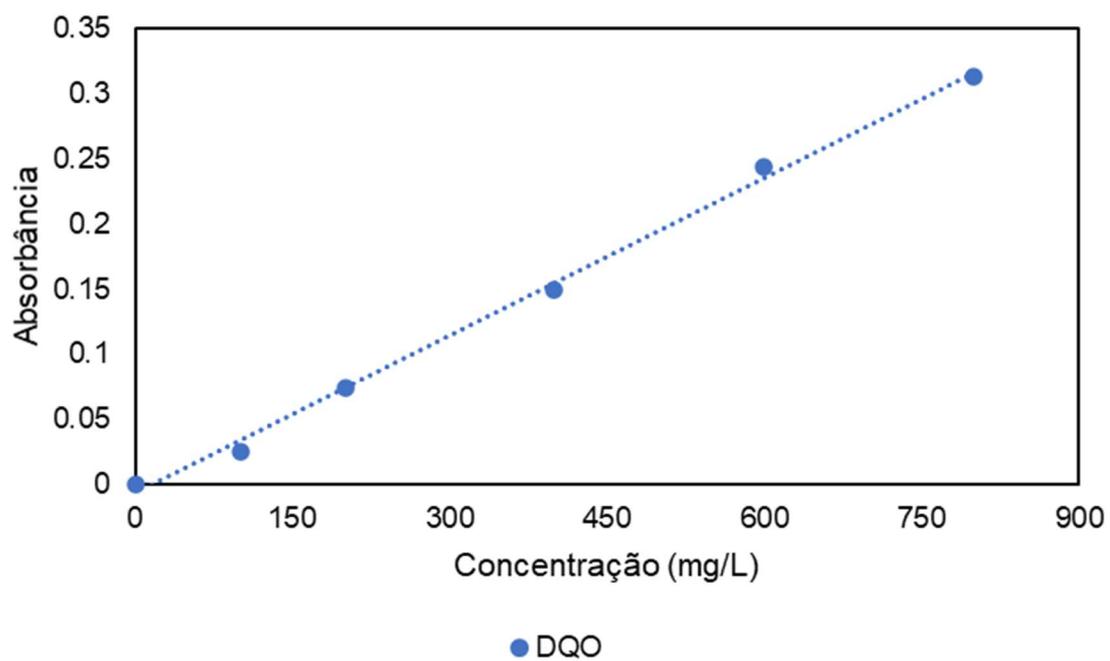
ZHOU, M. *et al.* Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste : a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 68–78, 2018.

APÊNDICE A – Curvas de calibração

As curvas de calibração utilizadas nas análises de carboidratos, DQO, acetona, álcoois, AGVs e composição do biogás descritas na metodologia estão apresentadas nas Figuras A1, A2, A3, A4, A5 e A6, respectivamente, assim como as equações do ajuste e R^2 obtidos.



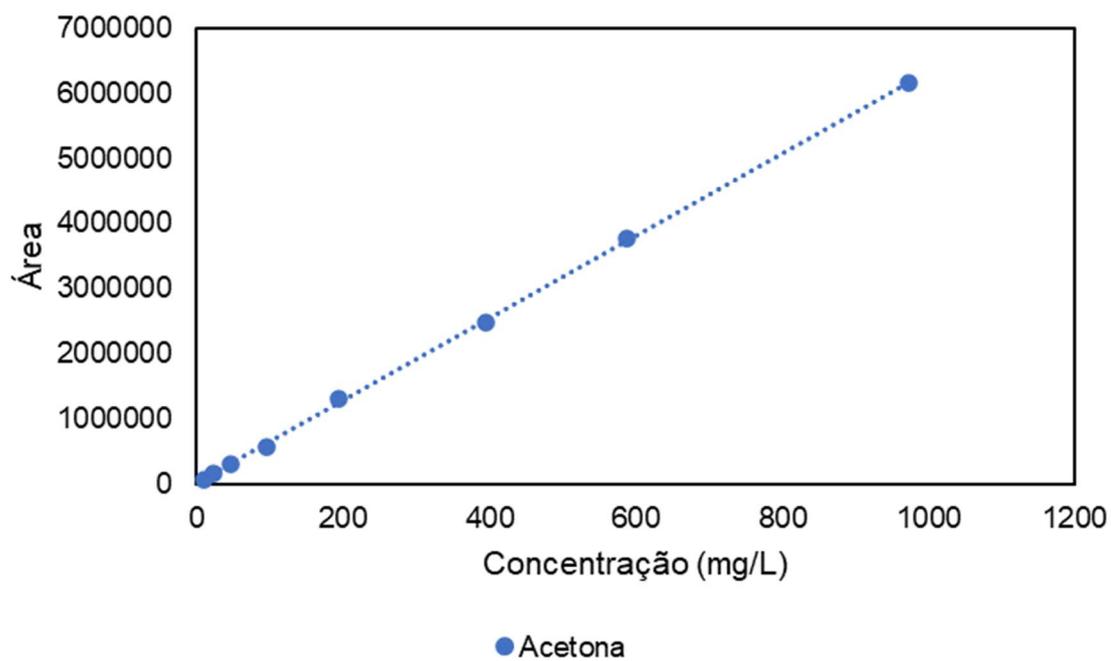
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura A2 – Curva de calibração para análise de DQO.

$$y = 2414,72x + 31,00$$

$$R^2 = 0,998$$

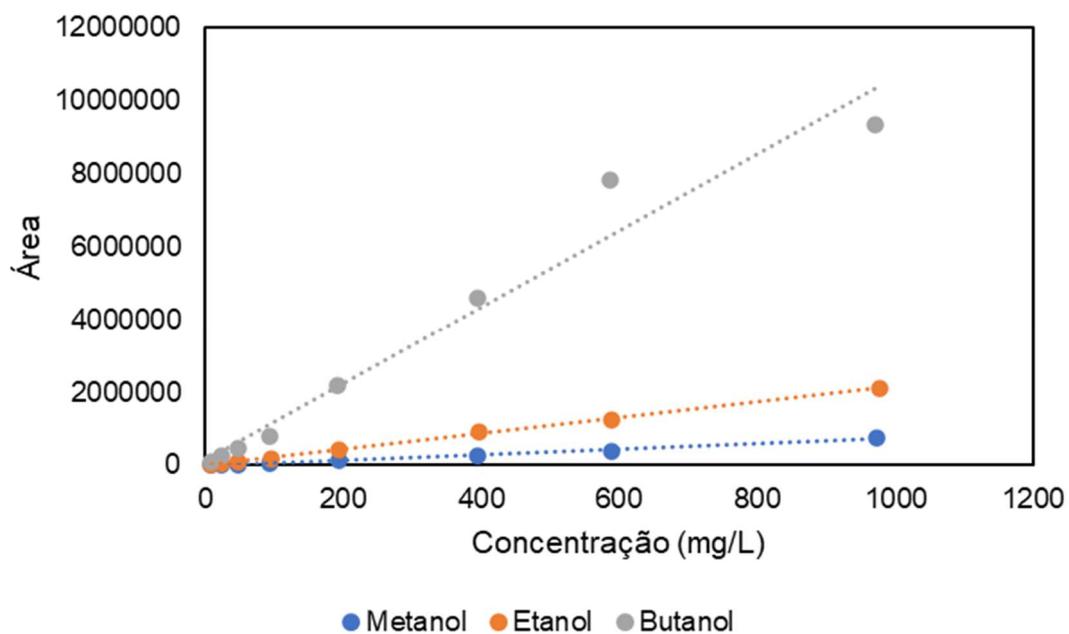
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura A3 – Curva de calibração para análise de acetona.

$$y = 6327,09x + 9115,36$$

$$R^2 = 0,999$$

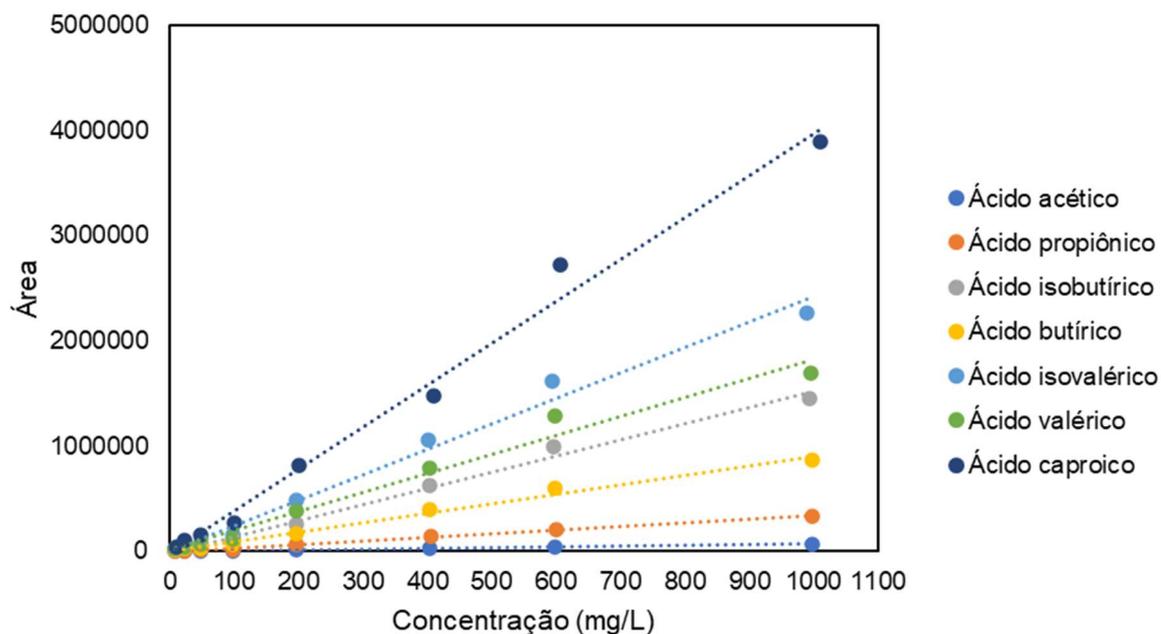
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura A4 – Curva de calibração para análise de álcoois.

Analito	Equação	R ²
Metanol	$y = 750,90x - 11024,4$	0,995
Etanol	$y = 2164,57x - 2786,84$	0,999
Butanol	$y = 10517,60x + 156808$	0,961

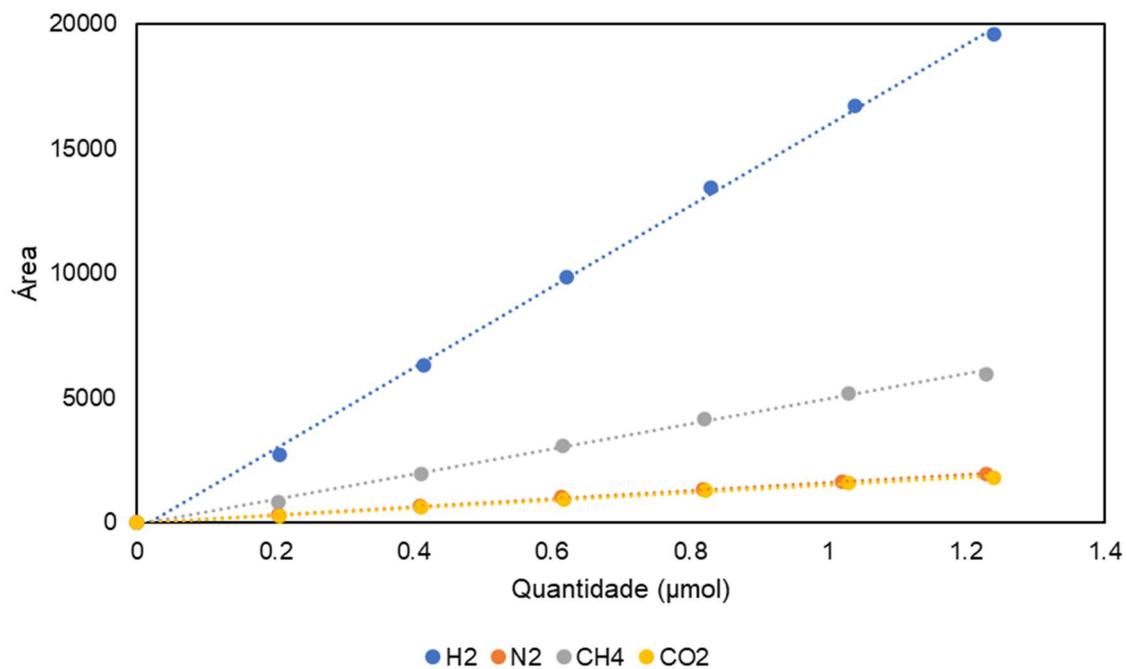
Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura A5 – Curva de calibração para análise de AGVs.



Analito	Equação	R ²
Ácido acético	$y = 69,21x - 1286,82$	0,995
Ácido propiônico	$y = 341,04x - 4262,54$	0,997
Ácido isobutírico	$y = 1472,35x - 9710,05$	0,991
Ácido butírico	$y = 907,73x - 1137,52$	0,991
Ácido isovalérico	$y = 2299,36x + 20812,40$	0,975
Ácido valérico	$y = 1697,24x + 25272,30$	0,971
Ácido caproico	$y = 3682,85x + 2920,89$	0,994

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).

Figura A6 – Curva de calibração para análise de composição de biogás.

Analito	Equação	R ²
H ₂	$y = 16432,50x - 479,78$	0,999
N ₂	$y = 1601,65x + 37,10$	0,998
CH ₄	$y = 5066,62x - 98,07$	0,997
CO ₂	$y = 1535,07x - 16,63$	0,995

Fonte: Elaborada pelo Autor (2022).