



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**ISABELLE NASCIMENTO TEIXEIRA**

**ADAPTAÇÃO DE LODO MESOFÍLICO À CONDIÇÃO TERMOFÍLICA PARA  
FERMENTAÇÃO ESCURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E VERDURAS GERADOS  
NA CENTRAL DE ABASTECIMENTO DO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2023**



ISABELLE NASCIMENTO TEIXEIRA

ADAPTAÇÃO DE LODO MESOFÍLICO À CONDIÇÃO TERMOFÍLICA PARA  
FERMENTAÇÃO ESCURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E VERDURAS GERADOS NA  
CENTRAL DE ABASTECIMENTO DO CEARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto Ciências do Mar, da Universidade  
Federal do Ceará, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Michael Barbosa Viana  
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Aparecida  
de Menezes

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- T266a     Teixeira, Isabelle Nascimento.  
            Adaptação de lodo mesofílico à condição termofílica para fermentação escura de resíduos de frutas e verduras gerados na Central de Abastecimento do Ceará / Isabelle Nascimento Teixeira. – 2023.  
            59 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2023.  
            Orientação: Prof. Dr. Michael Barbosa Viana.  
            Coorientação: Prof. Dr. Camila Aparecida de Menezes.
1. Fermentação escura. 2. Resíduo de frutas e verduras. 3. Gás hidrogênio. 4. Adaptação de inóculo. 5. Temperatura termofílica. I. Título.

CDD 333.7

---

ISABELLE NASCIMENTO TEIXEIRA

ADAPTAÇÃO DE LODO MESOFÍLICO À CONDIÇÃO TERMOFÍLICA PARA  
FERMENTAÇÃO ESCURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E VERDURAS GERADOS NA  
CENTRAL DE ABASTECIMENTO DO CEARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto Ciências do Mar, da Universidade  
Federal do Ceará, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Ambientais.

Aprovada em 15/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Michael Barbosa Viana (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Camila Aparecida de Menezes (Co-orientadora)  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscilla de Souza Almeida  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais:  
Luciê e Sandra.

Por todo amor, exemplo e apoio. Obrigada por  
lutarem, junto comigo, pelos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela proteção e por me permitirem alcançar essa conquista;

Agradeço a Embrapa Agroindústria Tropical e, em especial, ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB). Obrigada pelo suporte ao desenvolvimento dessa pesquisa;

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Iniciação Científica;

Agradeço a Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo ensino público de qualidade. Aqui, tornei-me cientista;

Agradeço ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) por ser minha segunda casa nos últimos quatro anos;

Agradeço ao Renato Carrhá Leitão pela liderança e pelo exemplo de pesquisador a ser seguido;

Agradeço ao meu orientador: Professor Dr. Michael Barbosa Viana. Obrigada por acreditar no meu potencial desde o início, por vibrar pelas minhas conquistas e por todos os conselhos;

Agradeço a minha coorientadora: Professora Dra. Camila Aparecida de Menezes. Obrigada por tudo: pelo auxílio na construção desse trabalho, pelos ensinamentos, pelas boas lembranças e por sempre enxergar o melhor de mim. Para mim, você é um exemplo de mulher e de pesquisadora;

Agradeço aos meus parceiros de laboratório: Daniel dos Santos Rodrigues, Francisco das Chagas Gomes da Silva Júnior, Maíra Saldanha, Nicolas Freitas e Willame de Araújo Cavalcante. Obrigada pelas risadas, pela companhia, pelos lanches e por todo o aprendizado. Vocês transformaram os meses de pesquisa em lembranças muito felizes;

Agradeço a Vicunha Têxtil S/A e aos meus colegas fabris: Carlos Eduardo Dantas, Clemilton Barros, Damião Sousa, Felipe Braga, Francielio, Ivanido, John John, Lisyanne Herrera, Luiz Felipe Oliveira, Magdiel Silva, Marcos Aurélio Teixeira, Oleon Camelo, Vinícius Sampaio, Tia Cristina, Trifêna Faustino e Victor Hugo. Evoluímos juntos e, com vocês, adquiri a minha *jeans identity*. Obrigada, turma da ETA/ETE e do setor de Utilidades, vocês são muito especiais para mim;

Agradeço aos meus pais: José Luciê Teixeira e Sandra Inácio do Nascimento. Esta conquista também é de vocês: meu coração transborda alegria ao saber o quão orgulhosos

vocês estão por terem uma filha cientista ambiental. Eu amo vocês, obrigada pelo amor, pela criação e pelo apoio;

Agradeço aos meus avós maternos: Luiz Serapião Pereira do Nascimento e Maria Inácia Pereira do Nascimento. Obrigada pelo amor e pelo carinho. Eu amo vocês e sei que sempre serei acolhida em sua casa;

Agradeço a todos os professores da minha família: Daniele Teixeira, Darcio Teixeira, Darlio Teixeira, Edson Teixeira, Maria Luiza Teixeira, Tiago Teixeira e, em especial, minha avó paterna, Maria Helena (*in memoriam*). Quando precisei enfrentar obstáculos na esfera acadêmica, eu me inspirei em vocês. Que privilégio é ter tantos educadores exemplares perto de mim;

Agradeço ao meu amor: Alexsandro Lopes. Obrigada por ser meu parceiro, por me acalmar nos momentos difíceis e por sempre me lembrar do quanto eu sou capaz. Eu te amo e amo dividir minha vida com você;

Agradeço a minha turma de graduação, e, em especial, a Angélica Caetano, a Elaine Aguiar, a Iorrana Joyce, a Mariana Lima, ao Maxwell Cruz e a Vivian Lopes. Obrigada pelas risadas e pelo apoio. O amor pelo meio ambiente nos uniu e isso torna a nossa amizade muito especial;

Agradeço as minhas irmãs de coração: Gabriella e Maria Isabel. Os laços cordimarianos criaram essa amizade que perdura até hoje. Obrigada por serem tão presentes, pelos treinos de corrida, pelos conselhos e por todas as memórias incríveis que criamos juntas.

A todos que fazem parte da minha vida e estão contribuindo, de alguma forma, para meu crescimento pessoal e profissional.

*Meus agradecimentos.*

“As baleias, o musgo, nós. Todos somos um só. Uma flor é seu irmão.” (COMO MUDAR O MUNDO, 2015).



## RESUMO

O crescimento populacional observado nos últimos anos envolve várias consequências, destacando-se para este trabalho: o aumento da demanda por energia e por produtos alimentícios. A problemática que envolve o aumento da demanda por energia está relacionada a dependência brasileira das fontes energéticas não renováveis e poluentes, o que impulsiona o estudo e o uso de fontes energéticas renováveis, a exemplo da obtenção de gases combustíveis (como o gás hidrogênio) por meio da fermentação escura. Além disso, o aumento da demanda por produtos alimentícios também se caracteriza como um problema socioambiental, já que, quando não consumido pela população, esse resíduo é descartado, principalmente, em Centrais de Abastecimento, o que o torna um causador de impacto ambiental negativo. Sendo assim, a proposta deste projeto de pesquisa é avaliar a produção de gás hidrogênio ( $H_2$ ) a partir da fermentação escura, em condições mesofílicas e em condições termofílicas, de cultura mista com resíduo orgânico de frutas e verduras. Na primeira etapa desta pesquisa, foi avaliada a eficiência de três métodos de pré-tratamento de inóculo anaeróbio (método de adição de clorofórmio, método de choque ácido e método de choque térmico) para a inibição da etapa metabólica metanogênica da digestão anaeróbia, com melhor desempenho atribuído ao pré-tratamento térmico, com produção acumulada de 90 mL  $H_2$  e rendimento de 2,7 mol  $H_2$ /mol Sacarose. Na segunda etapa desta pesquisa, foi avaliado o efeito do aumento escalonado da temperatura operacional (de 35°C a 45°C) na produção de gás hidrogênio ( $H_2$ ), com melhor desempenho atribuído a temperatura de 43°C, com produção acumulada de 552 mL  $H_2$  e rendimento de 4,9 mol  $H_2$ /mol Sacarose. Na terceira etapa desta pesquisa, foi avaliada a produção acumulada e o rendimento de gás hidrogênio ( $H_2$ ) na fermentação escura de resíduo de frutas e verduras em 30°C e em 43°C, o que resultou no destaque da temperatura de 43°C como a mais eficiente para a produção de gás hidrogênio ( $H_2$ ), com produção acumulada de 265 mL  $H_2$  e rendimento de 7,3 mol  $H_2$ /mol Sacarose, enquanto a temperatura de 30°C resultou em produção acumulada de 104 mL  $H_2$  e rendimento de 3,1 mol  $H_2$ /mol Sacarose. Por fim, para a fabricação de estudos futuros, sugere-se o uso da temperatura operacional de 43°C em reatores de alta taxa para produção de gás hidrogênio ( $H_2$ ) a partir do resíduo de frutas e verduras.

Palavras-chave: fermentação escura; resíduo de frutas e verduras; gás hidrogênio; adaptação de inóculo; temperatura termofílica.

## ABSTRACT

The population growth observed in recent years involves several consequences, one of which stands out for this work: the increase in demand for energy and food products. The problem involving the increase in demand for energy is related to Brazil's dependence on non-renewable and polluting energy sources, which drives the study and use of renewable energy sources, such as obtaining combustible gases (such as hydrogen gas) by the middle of dark fermentation. Furthermore, the increase in demand for food products is also characterized as a socio-environmental problem, since, when not consumed by the population, this waste is discarded, mainly, in Supply Centers, which makes it a cause of negative environmental impact. Therefore, the purpose of this research project is to evaluate the production of hydrogen gas ( $H_2$ ) from dark fermentation, in mesophilic and thermophilic conditions, of mixed culture with organic waste of fruits and vegetables. In the first stage of this research, the efficiency of three anaerobic inoculum pre-treatment methods (chloroform addition method, acid shock method, and heat shock method) was evaluated for inhibiting the methanogenic metabolic step of anaerobic digestion, with better performance attributed to thermal pretreatment, with accumulated production of 90 mL  $H_2$  and yield of 2,7 mol  $H_2$ /mol Sucrose. In the second stage of this research, the effect of a stepwise increase in operating temperature (from 35°C to 45°C) on the production of hydrogen gas ( $H_2$ ) was evaluated, with better performance attributed to a temperature of 43°C, with an accumulated production of 552 mL  $H_2$  and a yield of 4,9 mol  $H_2$ /mol Sucrose. In the third stage of this research, the accumulated production and yield of hydrogen gas ( $H_2$ ) were evaluated in the dark selection of fruit and vegetable shortages at 30°C and 43°C, which was proven by highlighting the temperature of 43°C as the most efficient for the production of hydrogen gas ( $H_2$ ), with an accumulated production of 265 mL  $H_2$  and a yield of 7.3 mol  $H_2$ /mol Sucrose, while the temperature of 30°C resulted in an accumulated production of 104 mL  $H_2$  and a yield of 3.1 mol  $H_2$ /mol Sucrose. Finally, for future studies, it is suggested to use an operating temperature of 43°C in high-rate reactors to produce hydrogen gas ( $H_2$ ) from fruit and vegetable waste.

**Keywords:** dark fermentation; fruit and vegetable waste; hydrogen gas; inoculum adaptation; thermophilic temperature.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rota metabólica geral da digestão anaeróbia.....	22
Figura 2 - Subprodutos orgânicos da fase hidrólise. ....	23
Figura 3 - Rota metabólica geral da fermentação escura.....	25
Figura 4 – Identificação dos ensaios em batelada para acompanhamento dos métodos de pré-tratamento. ....	40
Figura 5 – Aumento da temperatura operacional ao longo das semanas de experimento.....	41
Figura 6 – Triplicatas de acompanhamento do efeito do aumento da temperatura.....	42
Figura 7 – Bateladas comparativas das condições a 30°C e a 43°C.....	44
Figura 8 – Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria na produção de gás hidrogênio.....	48
Figura 9 – Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na produção acumulada de gás hidrogênio. ....	51
Figura 10 – Avaliação do efeito da temperatura de 30°C e da temperatura de 43°C na produção acumulada de gás hidrogênio. ....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metabólitos gerados na acetogênese.....	24
Tabela 2 - Faixas de temperatura do crescimento microbiano.....	26
Tabela 3 - Faixas de pH ótimo para o metabolismo microbiano anaeróbio.....	28
Tabela 4 - Métodos de pré-tratamento de inóculo testados por Hidalgo, Pérez-Zapatero & Martín-Marroquín.....	34
Tabela 5 - Caracterização do resíduo de frutas e verduras.....	38
Tabela 6 - Caracterização do lodo anaeróbio mesofílico de indústria cervejeira.....	39
Tabela 7 - Quantidade de lodo usada nos ensaios em batelada ao longo das semanas de experimento.....	43
Tabela 8 - Frequência e metodologias das análises.....	46
Tabela 9 - Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do lodo de cervejaria na conversão de carboidratos.....	47
Tabela 10 - Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria no rendimento médio de gás hidrogênio.....	49
Tabela 11 - Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na eficiência de conversão de carboidratos e na eficiência de remoção de matéria orgânica.....	50
Tabela 12 - Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional no rendimento de gás hidrogênio.....	52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
3.1	RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS.....	20
3.2	DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	22
3.3	FERMENTAÇÃO ESCURA.....	24
3.3.1	Temperatura operacional.....	25
3.3.2	pH .....	27
3.3.3	Tipo de inóculo e sua composição.....	28
3.3.4	Carga orgânica volumétrica.....	29
3.3.5	Características dos substratos .....	30
3.4	PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA.....	32
3.5	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1	RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS.....	37
4.2	INÓCULO.....	38
4.3	EFEITO DO TIPO DE PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA.....	39
4.4	EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA.....	41
4.5	COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES A 30°C E A 43°C .....	44
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	45
4.6.1	Determinação da concentração de carboidratos.....	45
4.6.2	Análises físico-químicas.....	45
4.6.3	Medida de produção volumétrica e composição do biogás .....	45
4.6.4	Frequência das análises .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
5.1	PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA.....	47
5.2	AUMENTO GRADUAL DA TEMPERATURA OPERACIONAL .....	50
5.3	COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES A 30°C E A 43°C .....	53

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com Menezes (2018), o desenvolvimento socioeconômico de um país depende intrinsecamente da sua suficiência energética. Considerando o intenso aumento populacional ocorrido nas últimas décadas (principalmente nas economias em crescimento, como a brasileira), observou-se a elevação da demanda por energia. Apesar de o Brasil possuir um enorme potencial no setor renovável de produção energética, englobando diversas tecnologias (a exemplo da energia eólica, da energia solar, da energia geotérmica e da energia de biomassa), os combustíveis fósseis ainda são o componente principal da matriz energética brasileira (Borges et al., 2017). Segundo Borges et al. (2017), a principal problemática relacionada à dependência brasileira dos combustíveis fósseis é alta emissão de gases do efeito estufa para a atmosfera, o que torna o seu uso prejudicial ao meio ambiente. Logo, a fim de suprir a necessidade energética populacional, torna-se essencial o estudo e a exploração de fontes energéticas ambientalmente favoráveis.

O crescimento populacional intenso também possui como consequência a elevação da demanda por produtos alimentícios, o que intensifica a produção agrícola (já bem desenvolvida) em todo o país. Um dos principais problemas relacionado à produção agrícola brasileira é a má gestão dos resíduos orgânicos, já que muitos alimentos não são consumidos e possuem como fim o descarte em Centrais de Abastecimento (Marchi & Mendes, 2021). Essa realidade se caracteriza como um impacto ambiental negativo, pois o excesso desse tipo de resíduo pode ser responsável pela redução da vida útil de aterros sanitários (Pereira & Maia, 2012). A gestão eficiente dos resíduos sólidos orgânicos contribui com prolongamento da vida útil de aterros sanitários, pois seu uso alternativo diminui consideravelmente a carga de materiais que precisa ser depositada nessas estruturas (Pereira & Maia, 2012).

Como tentativa de minimizar o impacto ambiental negativo causado pelos resíduos orgânicos não aproveitados para consumo populacional, são frequentes os estudos sobre a produção de gás hidrogênio ( $H_2$ ) via fermentação escura, usando diferentes culturas mistas como inóculo (Martínez, Rodríguez & Agudelo, 2012; Neitzel, 2015; Silveira, 2017; Bastos et al.; Araújo, 2019). Essa alternativa torna-se interessante ambientalmente e economicamente, porque aproveita o alto potencial orgânico do resíduo e o fornece uma destinação final mais adequada, além de produzir bio-hidrogênio, gás energético considerado ambientalmente limpo.

Existem diversos estudos científicos sobre o aproveitamento dos resíduos orgânicos para a produção fermentativa de  $H_2$ , entretanto a maioria dos pesquisadores utiliza a faixa de

temperatura operacional mesófila para o desenvolvimento de seus trabalhos (Martínez, Rodríguez & Agudelo, 2012; Neitzel, 2015). Atualmente, observa-se uma tendência a estudos que utilizam a faixa de temperatura operacional termófila para o desenvolvimento de trabalhos (Silveira, 2017), já que, teoricamente, há o beneficiamento do metabolismo dos microrganismos produtores de  $H_2$  (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022). Sendo assim, este estudo propõe avaliar a produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura de resíduos orgânicos com cultura microbiana mista, testando o desempenho desse esquema em diferentes faixas de temperatura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Como objetivo geral, o presente estudo propõe avaliar a produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura, em condições mesofílicas e em condições termofílicas, de resíduos de frutas e verduras descartados na Central de Abastecimento do Ceará (localizada no município de Maracanaú-CE).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- i. Identificar o método de pré-tratamento de inóculo anaeróbio (entre o método de adição de clorofórmio, o método de choque ácido e o método de choque térmico) que proporciona maior rendimento de  $H_2$  a partir da fermentação escura de substrato orgânico;
- ii. Identificar a temperatura operacional que proporciona maior rendimento de  $H_2$  a partir da fermentação escura de substrato orgânico, comparando cenários entre 35°C e 45°C;
- iii. Identificar a temperatura operacional que proporciona maior rendimento de  $H_2$  a partir da fermentação escura do resíduo de frutas e verduras, comparando os cenários de 30°C e de 43°C.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS

O Brasil possui cerca de 8,5 milhões de km<sup>2</sup> de extensão, englobando terrenos com diferentes características de solo, de relevo e de retenção hídrica, que, também, são expostos a diversas condições climáticas. Por conta dessa variabilidade, o setor agrícola nacional se desenvolveu em elevada escala, o que explica a alta posição do Brasil, que ocupa o 4º lugar, no ranking mundial de países em áreas cultivadas no mundo (FAO, 2019).

Como consequência da grande produção de produtos alimentícios, observa-se a vultosa geração de resíduos orgânicos, advindos de desperdícios alimentares, que, geralmente, são descartados em Centrais de Abastecimento (Marchi & Mendes, 2021). Quando mal gerenciado, esse tipo de resíduo se caracteriza como um impacto ambiental negativo, já que ele pode ser responsável pela diminuição da vida útil de aterros sanitários, sobrecarregando-os (Pereira & Maia, 2012). Para evitar esse cenário prejudicial ao meio ambiente, faz-se necessária a gestão responsável dos resíduos orgânicos.

A gestão eficiente dos resíduos orgânicos engloba diversas medidas mitigadoras, e, dentre elas, está a opção do aproveitamento do resíduo de frutas e verduras (RFV). De acordo com Esparza et al. (2020), esse aproveitamento ocorre por vias tradicionais (que baseiam-se na transformação bioquímica de matéria orgânica complexa em moléculas simples) ou por vias emergentes (que baseiam-se no aproveitamento direto dos macronutrientes presentes no resíduo). A partir dessas possibilidades, têm-se como rotas de aproveitamento do RFV a extração de compostos bioativos, a produção de enzimas, a produção de exopolissacarídeos, a síntese de bioplásticos, a síntese de biopolímeros e a produção de biocombustíveis (Esparza et al., 2020). Objetiva-se, então, encontrar uma alternativa que proporcione a melhor gestão desse resíduo orgânico, avaliando a eficiência do método, os benefícios socioambientais e os custos de produção.

Considerando essa ideia, destaca-se, também, que, a partir do crescimento populacional observado nas últimas décadas, houve o aumento da demanda por energia. No Brasil, apesar da elevada disponibilidade de fontes geradoras de energia limpa (Borges et al., 2017), a produção energética ainda depende de combustíveis fósseis e de fontes não renováveis, o que caracteriza um cenário prejudicial ao meio ambiente (Menezes, 2018). Por conta dessa realidade, a rota de aproveitamento que usa do RFV como substrato para o processo

metabólico da digestão anaeróbia torna-se uma opção eficiente de aproveitamento do resíduo orgânico para a produção de gases combustíveis, como o  $H_2$ .

Sobre o RFV, sabe-se que ele se compõe, majoritariamente, por carboidratos, por lipídios e por proteínas, macronutrientes que variam sua quantidade conforme a composição base do resíduo (Meena et al., 2020). A localidade e a sazonalidade da coleta, por exemplo, são fatores que influenciam na sua composição, porém, apesar das variações, a quantidade de carboidratos permanece estável e alta nesse tipo de substrato, o que possibilita o seu uso para geração de gases combustíveis via digestão anaeróbia (Meena et al., 2020).

Sobre o  $H_2$ , gás componente do biogás gerado na cadeia metabólica da digestão anaeróbia, sabe-se que ele é considerado ambientalmente limpo, pois a célula combustível à base de  $H_2$  produz como subproduto apenas água (Dutta, 2014), enquanto a queima de outros combustíveis libera gás carbônico ( $CO_2$ ). Além disso, o  $H_2$  possui elevado teor de energia por massa (120 MJ/kg) quando comparado a outros combustíveis, como a gasolina automotiva (46,4 MJ/kg) e o etanol (45,6 MJ/kg).

Para comprovar a viabilidade da digestão anaeróbia usando RFV como substrato, Silveira (2017) realizou estudos sobre o potencial de produção de biogás a partir da digestão anaeróbia, em condições termofílicas, de RFV com lodo de esgoto sanitário. A autora pontuou que o desenvolvimento de inóculo mesofílico à condição termofílica foi eficiente e que, também, o potencial máximo de produção de biogás foi alcançado em apenas onze dias de experimento, o que confirma a elevada biodegradabilidade do RFV.

De forma complementar, Araújo (2019) realizou pesquisa sobre a codigestão anaeróbia mesofílica de resíduos de indústria de processamento de frutas e de indústria de processamento de sorvete com lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) de Estação de Tratamento de Efluentes domésticos (ETE). Nessa pesquisa, visou-se a produção de  $H_2$  por meio da fermentação escura (para isso, inibiu-se a ação dos microrganismos metanogênicos componentes da cadeia da digestão anaeróbia). A autora observou que o reator, em escala de batelada, composto por efluente de indústria de processamento de frutas e lodo de reator UASB obteve eficiência considerável na produção de  $H_2$  (0,82 mL  $H_2$ /g SV) quando comparado ao reator composto por efluente de indústria de processamento de sorvete e lodo de reator UASB (que não apresentou produção de  $H_2$ ), concluindo que, para esse método, o uso dos resíduos de frutas foi mais vantajoso que o uso dos resíduos de sorvete.

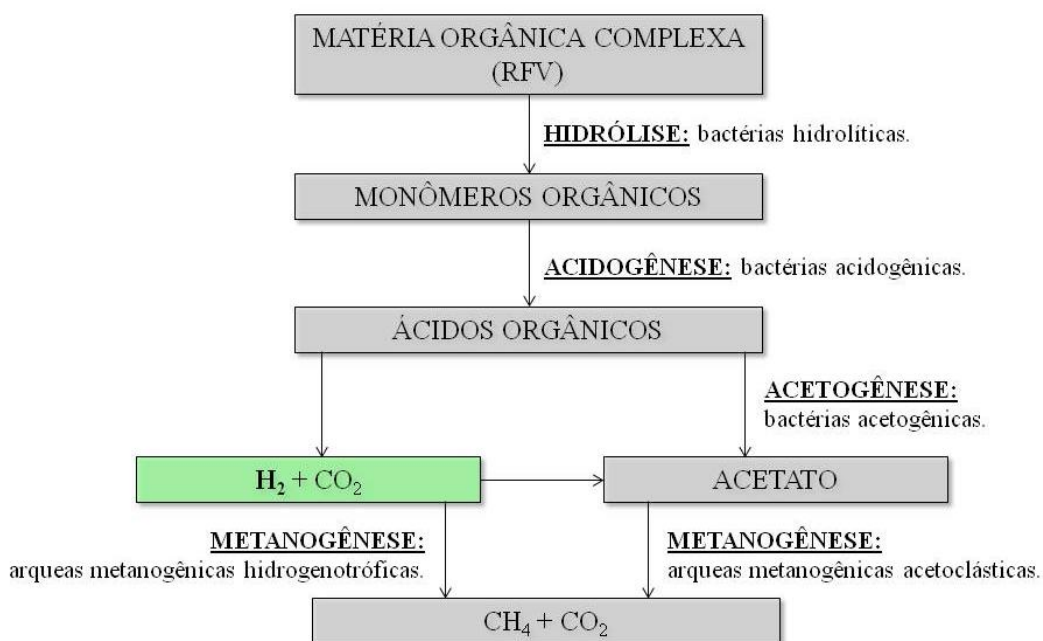
A partir dos dados fornecidos pelos trabalhos supracitados, verifica-se a viabilidade do uso da cadeia metabólica da digestão anaeróbia como rota para gestão sustentável do RFV, visando, por fim, a produção de biogás energético. Como vantagem econômica, esse método

apresenta a produção de biogás a partir de culturas microbianas mistas (cultura de microrganismos composta por diferentes populações), excluindo a possibilidade de produção de biogás a partir de culturas microbianas puras (cultura de microrganismos composta por uma única população), o que resultaria em custos elevados de manipulação laboratorial (Elbeshbishy et al., 2017).

### 3.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo metabólico que ocorre, na ausência de gás oxigênio ( $O_2$ ), em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Mccarty, 1964). Em cada etapa, diferentes grupos de microrganismos atuam em conjunto com o objetivo final de transformar matéria orgânica complexa em gás metano ( $CH_4$ ) e  $CO_2$  (Mccarty, 1964). Esse processo está ilustrado, de maneira simplificada, na Figura 1 (Rota metabólica geral da digestão anaeróbia).

Figura 1 - Rota metabólica geral da digestão anaeróbia.

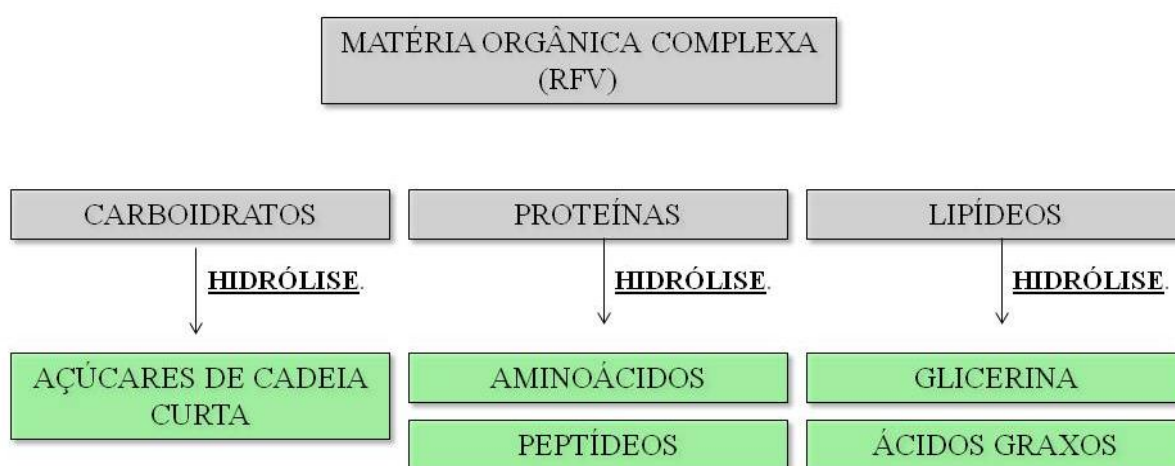


Nota: RFV = Resíduo de frutas e verduras.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na primeira etapa do processo ocorre a hidrólise, quando as bactérias hidrolíticas degradam, por meio de ação enzimática, matéria orgânica complexa (advinda do substrato orgânico utilizado, que, nesse presente trabalho, é o RFV) em monômeros orgânicos (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022), processo ilustrado na Figura 2 (Subprodutos orgânicos da fase hidrólise). Essa etapa é importante porque, no caso de sua ausência, os microrganismos responsáveis pelos estágios seguintes não conseguiriam assimilar a matéria orgânica em sua fase complexa, impedindo, dessa forma, toda a cadeia da digestão anaeróbia.

Figura 2 - Subprodutos orgânicos da fase hidrólise.



Nota: RFV = Resíduo de frutas e verduras.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na segunda etapa do processo ocorre a acidogênese, quando as bactérias acidogênicas transformam os monômeros orgânicos (produtos da hidrólise) em ácidos orgânicos de cadeia curta (ácido butírico, ácido propionico, ácido lático e ácido acético, por exemplo), alcoóis, óxidos de nitrogênio,  $H_2$  e  $CO_2$  (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022).

Na terceira etapa do processo ocorre a acetogênese, quando as bactérias acetogênicas transformam os ácidos gerados na etapa acidogênica em substratos acetogênicos (Tabela 1 – Metabólitos gerados na acetogênese). Ácidos de cadeia longa são transformados em ácidos de cadeia curta (como, por exemplo, o ácido fórmico e o ácido acético), e, além disso, também são produzidos  $H_2$  e  $CO_2$  (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022).

Tabela 1 - Metabólitos gerados na acetogênese.

Ácido transformado	Metabólito gerado	Reação química ou composto químico
Ácido Acético	Acetato	$\text{CH}_3\text{COOH}$
Ácido Butírico	Butirato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$
Ácido Fórmico	Formiato	$\text{HCOOH}$
Ácido Láctico	Lactato	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Ácido Propiônico	Propionato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$

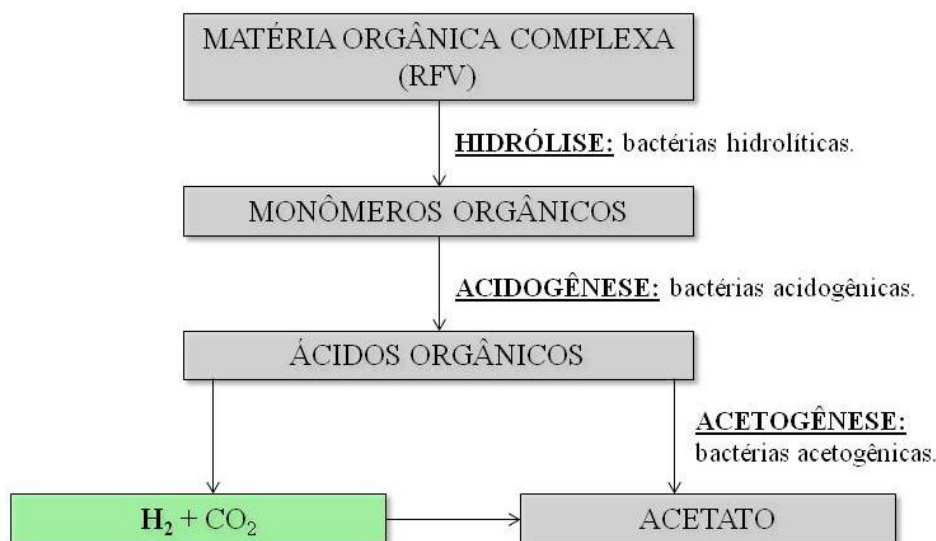
Fonte: Adaptado de Kunz, Steinmetx & Amaral (2022).

Na quarta, e última, etapa do processo ocorre a metanogênese, quando arqueias metanogênicas transformam diferentes metabólitos (como, por exemplo,  $\text{H}_2$ , bicarbonato, formiato, acetato, metanol e etanol), produtos das fases anteriores, em  $\text{CH}_4$  e em  $\text{CO}_2$ . A depender da via metabólica, as arqueias metanogênicas podem ser classificadas como metanogênicas hidrogenotróficas – transformam  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  em  $\text{CH}_4$  – e metanogênicas acetoclásticas – transformam acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) em  $\text{CH}_4$  – (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022). O monitoramento e o controle desses microrganismos e de suas rotas metabólicas são essenciais para pesquisas que visam à produção de  $\text{H}_2$ , já que a ação das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas reduz o percentual final desse gás no conteúdo do biogás gerado pela cadeia da digestão anaeróbia.

### 3.3 FERMENTAÇÃO ESCURA

A fermentação anaeróbia em ausência de luz ou, simplesmente, fermentação escura, é um subprocesso da digestão anaeróbia (Loubette & Junker, 2007). Basicamente, a fermentação escura engloba a fase hidrolítica, a fase acidogênica e a fase acetogênica da cadeia da digestão anaeróbia, excluindo a fase metanogênica (Loubette & Junker, 2007). Esse processo está ilustrado, de maneira simplificada, na Figura 3 (Rota metabólica geral da fermentação escura).

Figura 3 - Rota metabólica geral da fermentação escura.



Nota: RFV = Resíduo de frutas e verduras.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Analizando a cadeia da fermentação escura, apresentada na Figura 3 (Rota metabólica geral da fermentação escura), nota-se que o percentual de  $H_2$  presente no biogás gerado pelo processo é maximizado, já que a ação das arqueias metanogênicas (que consumiriam o  $H_2$ , transformando-o em  $CH_4$ ) é inibida. A exclusão do processo metabólico das arqueias metanogênicas se dá de diferentes maneiras: por meio da otimização do potencial hidrogeniônico (pH), por meio da determinação do tipo de substrato utilizado, por meio da determinação da concentração de substrato utilizada ou por meio de procedimentos laboratoriais de pré-tratamento do lodo de cultura mista (Viana et al., 2019). Logo, para uma fermentação escura estável e uma consequente maximização da produção de  $H_2$ , múltiplos parâmetros operacionais devem ser monitorados e controlados. São esses parâmetros, discutidos a seguir: a temperatura operacional, o pH, o tipo de inóculo e sua composição, a carga orgânica e as características do substrato.

### 3.3.1 Temperatura operacional

A temperatura operacional é um importante fator físico reacional para a fermentação escura, porque influencia diretamente no metabolismo microbiano, beneficiando ou prejudicando a velocidade das reações químicas do processo (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022). Segundo Lettinga et al. (1996), na maioria dos processos biológicos, três faixas de

temperatura, apresentadas na Tabela 2 (Faixas de temperatura do crescimento microbiano), podem ser associadas ao crescimento microbiano.

Tabela 2 - Faixas de temperatura do crescimento microbiano.

<b>Faixa</b>	<b>Intervalo de temperatura (°C)</b>
Psicrófila	Entre 0 e 20°C
Mesófila	Entre 20 e 45°C
Termófila	Acima de 45°C

Fonte: Lettinga et al. (1996).

A partir desse conhecimento, pode-se planejar a temperatura operacional de forma que ocorra o decaimento da atividade metabólica de microrganismos consumidores de  $H_2$  e o favorecimento da atividade metabólica de microrganismos produtores de  $H_2$ . De acordo com Kunz, Steinmetx & Amaral (2022), por exemplo, a quebra do propionato em acetato, em  $CO_2$  e em  $H_2$  é uma reação endotérmica, ou seja, é favorecida em temperaturas mais altas. Já a reação de transformação de  $H_2$  em  $CH_4$ , realizada pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, é exotérmica, ou seja, é desfavorecida em temperaturas mais altas. Subentende-se, dessa forma, que faixas de temperatura elevadas serão mais benéficas para a maximização da produção de  $H_2$ , beneficiando a atividade metabólica dos microrganismos produtores de  $H_2$  e dificultando a atividade metabólica dos microrganismos consumidores de  $H_2$ .

Para confirmar essa hipótese, Mu et al. (2007) avaliaram a produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura em diferentes temperaturas mesófilas (entre 33°C e 41°C), usando glicose como substrato orgânico e consórcio microbiano misto como inóculo anaeróbio. Observou-se que os níveis de  $H_2$  aumentaram com a elevação da temperatura: registrou-se produção de 36 mmol  $H_2$ /L e rendimento de 0,94 mol  $H_2$ /mol Glicose em temperatura de 33°C, enquanto que, em temperatura de 41°C, registrou-se produção de 62 mmol  $H_2$ /L e rendimento de 1,67 mol  $H_2$ /mol Glicose.

Tem-se, também, o estudo de Lazaro et al. (2015), que avaliou a produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura em temperatura mesófila (de 37°C) e em temperatura termófila (de 55°C), usando vinhaça como substrato orgânico e lodo metanogênico mesófilo como inóculo. A pesquisa seguiu com reatores em batelada (2, 5, 7 e 12 g DQO/L): em sua menor concentração (2 g DQO/L), as bateladas apresentaram maiores níveis de  $H_2$  na condição

termófila (produção de 5 mmol H<sub>2</sub>/g DQO e rendimento de 2,31 mmol H<sub>2</sub>/g DQO), comparando-se com os níveis de H<sub>2</sub> apresentados na condição mesófila (produção de 4,3 mmol H<sub>2</sub>/g DQO e rendimento de 1,99 mmol H<sub>2</sub>/g DQO). Em contrapartida, nos reatores com maiores concentrações (5, 7 e 12 g DQO/L), registraram-se melhores níveis de H<sub>2</sub> na condição mesófila (11,2 mmol H<sub>2</sub>/g DQO, 19 mmol H<sub>2</sub>/g DQO e 28,4 mmol H<sub>2</sub>/g DQO, respectivamente), comparando-se com os níveis de H<sub>2</sub> apresentados na condição termófila (6,3 mmol H<sub>2</sub>/g DQO, 5,3 mmol H<sub>2</sub>/g DQO e 6,7 mmol H<sub>2</sub>/g DQO, respectivamente). Isso ocorreu, provavelmente, devido à falta do pré-tratamento do lodo metanogênico mesófilo usado como inóculo.

Após a análise dos dados fornecidos pelos estudos supracitados, infere-se que, como apontaram Kunz, Steinmetx & Amaral (2022), a temperatura operacional é um parâmetro que afeta de forma direta a eficiência da fermentação escura e, por isso, deve-se haver o monitoramento e o controle desse fator.

### 3.3.2 pH

O pH é um fator químico reacional oscilante para a fermentação escura na literatura científica, porque sua faixa ótima varia conforme diferentes grupos de microrganismos anaeróbios e, também, conforme o substrato orgânico utilizado (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022; Alvarez et al., 2022).

Primeiramente, segundo Mccarty (1964), a neutralização do pH (que confere ao sistema um meio mais estável e menos estressante microbiologicamente) se relaciona com os ácidos graxos voláteis, com a alcalinidade do resíduo e com os bicarbonatos, fatores que precisam ser monitorados para que o pH permaneça entre 7,0 e 7,2. Demonstrando a variabilidade de faixas ótimas de pH para os microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, Kunz, Steinmetx & Amaral (2022) apontaram que as arqueias metanogênicas são os microrganismos mais sensíveis a baixos valores de pH, enquanto que as outras bactérias presentes no processo se beneficiam da acidez, o que conclui a importância da estabilização do pH do meio, evitando grandes variações que afetariam a eficiência do processo. A seguir consta, na Tabela 3 (Faixas de pH ótimo para o metabolismo microbiano anaeróbio), a faixa ótima de pH para alguns dos microrganismos que atuam na cadeia metabólica da digestão anaeróbia.

Tabela 3 - Faixas de pH ótimo para o metabolismo microbiano anaeróbio.

Grupo de microrganismos	Intervalo de pH ótimo
Bactérias acidogênicas	Entre 5,5 e 6,0
Arqueias metanogênicas	Entre 6,8 e 7,2

Fonte: Adaptado de Kunz, Steinmetx & Amaral (2022).

Aponta-se, também, que o valor ótimo de pH para fermentação escura varia conforme o substrato orgânico utilizado (Alvarez et al., 2022). Mangayil et al. (2011) apresentaram em seu estudo sobre produção de  $H_2$  a partir de diferentes tipos de açúcares, usando como inóculo uma cepa isolada de lodos ativados, que o pH ótimo é de 5,3 a 5,6. Em contrapartida, a pesquisa de Mazareli (2015), baseada na fermentação escura de resíduos vegetais com águas residuárias de suinocultura, definiu que uma faixa de pH neutro (7,0) é ideal para a estabilidade do processo. Tem-se, ainda, Pandey et al. (2021), que observaram em sua pesquisa sobre produção de  $H_2$  a partir de fermentação escura de biomassa algal (*Spirulina platensis*) que o pH ótimo é de 4,5 a 5,7.

Dessa forma, conclui-se que, como apontou Mccarty (1964), é de extrema importância o estudo e o controle do pH para a digestão anaeróbia e para a fermentação escura, a fim de que o parâmetro se mantenha ajustado ao processo e que não haja grandes oscilações, o que pode ocasionar a falência do sistema.

### 3.3.3 Tipo de inóculo e sua composição

A escolha do tipo de inóculo usado no processo da fermentação escura é um fator altamente relevante, pois do inóculo é advinda a comunidade microbiana anaeróbia que dará início ao processo de degradação da matéria orgânica (esta, que será proveniente do substrato). De acordo com Aquino et al. (2007), a depender a microbiota presente em determinado tipo de inóculo, há a variação da atividade metanogênica específica (AME), isto é, o potencial máximo do inóculo de transformar substratos orgânicos brutos em biogás. Provém dessa ideia, então, encontrar um inóculo que possua ótima AME, vasta disponibilidade local e boa adaptabilidade ao substrato orgânico pretendido.

Considerando o processo reacional da digestão anaeróbia e da fermentação escura, a literatura apresenta diferentes tipos de inóculo, com composições variadas, que viabilizam os processos. Mazareli (2015) usou águas residuárias de suinocultura para a codigestão anaeróbia (realizada em biodigestor anaeróbio) de resíduos orgânicos de banana e de tomate,

o que resultou na remoção máxima de 70% de DQO total, além da produção volumétrica de  $\text{CH}_4$  considerável (1,08 L  $\text{CH}_4$ /L.d).

Outro estudo, o de Lopes (2015), analisou a eficiência de lodo de UASB da usina sucroenergética de São Martinho (localizada em Pradópolis-SP) como inóculo para a fermentação escura (realizada em biodigestor anaeróbio) de soro de queijo, proveniente de indústria de laticínios. Como resultado, obteve-se que a microbiota anaeróbia adaptou-se otimamente ao substrato orgânico, o que forneceu altas conversões de carboidratos. Em números, os resultados mostraram que, em tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8h, a produção volumétrica de  $\text{H}_2$  foi de 115 mL  $\text{H}_2$ /L.h.

Por fim, Longaretti et al. (2019) pesquisaram sobre a AME de diferentes tipos de inóculos anaeróbios. Destacou-se no artigo o lodo proveniente de reator UASB de indústria cervejeira da região nordeste brasileira, que produziu considerável volume de  $\text{CH}_4$  nas 144 horas de experimento, o que confirma sua alta AME (0,36 g DQO  $\text{CH}_4$ /g ST.d).

Levando em consideração as informações apresentadas pelos estudos pontuados acima, infere-se que vários tipos de inóculos anaeróbios proporcionam uma boa carga microbiológica para o início do processo de degradação, seja por digestão anaeróbia ou por fermentação escura. Realizando o controle dos parâmetros operacionais em laboratório, a produção de biogás é viável e vantajosa para variados tipos de inóculos anaeróbios.

### **3.3.4 Carga orgânica volumétrica**

A carga orgânica volumétrica define-se como a quantidade de substrato orgânico adicionado a um biodigestor em um determinado intervalo de tempo – o que representa a relação alimento/microrganismo – (Kunz, Steinmetx & Amaral, 2022). Simboliza um significativo fator físico reacional para a fermentação escura, porque, a depender da sua concentração, haverá a diminuição, o aumento ou a inibição da produção de biogás (Gueri et al., 2018).

De acordo com Kunz, Steinmetx & Amaral (2022), a carga orgânica promove três principais cenários de influencia no meio reacional: em uma condição ótima, em uma condição baixa e em uma condição elevada. Em condições ótimas, a carga orgânica está em níveis que proporcionam um estável crescimento e metabolismo microbiano. Em condições baixas, a carga orgânica reduz o metabolismo microbiano, devido à baixa relação alimento/microrganismo. Em condições altas, a carga orgânica inibe o metabolismo microbiano e causa a falência do sistema, devido ao acúmulo de ácidos orgânicos voláteis.

### 3.3.5 Características dos substratos

A escolha do tipo de substrato orgânico usado no processo metabólico da fermentação escura é um fator bastante importante, pois do substrato é advinda a matéria orgânica que será degradada pela comunidade microbiana anaeróbia presente no inóculo. No tópico 3.3.3 (Tipo de inóculo e sua composição), foi exposta a diversidade de inóculos anaeróbicos possíveis e vantajosos existentes na literatura científica sobre digestão anaeróbia e sobre fermentação escura. Observa-se a mesma variedade para os substratos orgânicos, que variam em sua natureza, mas também viabilizam os processos.

Nesse estudo, será realizada a análise de resultados obtidos a partir de RFV, que possuem papel ecológico significativo na atualidade. A lei federal nº 10.831/2003 afirma (em seu artigo 1º, § 1º, inciso VI) que um sistema de produção orgânico possui como uma de suas finalidades a reciclagem dos seus resíduos, reduzindo ao mínimo o emprego de recursos não renováveis. Portanto, entende-se que, considerando o aumento populacional observado nas últimas décadas (somado ao impulso sobre a diminuição do uso de fontes de energia não renováveis), torna-se essencial a exploração de meios de obtenção de energia limpa, como a digestão anaeróbia e a fermentação escura, que fornecem biogás energético. Além disso, como vantagem, há a melhoria da gestão dos RFV, anteriormente descartados nas Centrais de Abastecimento (Marchi & Mendes, 2020).

Como exemplo desse cenário, tem-se Martínez, Rodríguez & Agudelo (2012), que utilizaram RFV (obtidos em restaurantes típicos do município de Palmira, na Colômbia) como substrato orgânico, apresentando concentração de 2 g SV/L, para a digestão anaeróbia em temperatura mesofílica (a 37°C). Como inóculo, os pesquisadores utilizaram lodo de UASB da ETE do município de Genebra, no Valle Del Cauca. Em sessenta dias de experimento, comprovou-se a elevada biodegradabilidade do substrato por conta do rápido aumento de ácidos graxos voláteis e pela eficiência na remoção de sólidos voláteis (48%). O potencial de produção de biogás foi de 560 mL Biogás/g SV, com teor de CH<sub>4</sub> de 65%.

Para complementar, Neitzel (2015) utilizou como substrato orgânico os RFV coletados na Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina (CEASA/SC). A amostra (triturada em liquidificador doméstico) foi composta por tomate, cebola, brócolis, limão, laranja, manga, melancia, ovos, pepino, milho, abacaxi, berinjela, mamão, melão, pimenta calabresa, batata, caqui e repolho. O resultado da fermentação escura mesofílica (a 37°C) desse substrato com inóculo de biodigestor de dejetos animais (advindo da EMBRAPA Suínos e Aves,

localizada na cidade de Concórdia, em Santa Catarina) resultou em produção de biogás vultosa, resultando na produção máxima de 689 mL Biogás/g SV.

Ademais, tem-se Silveira (2017), que utilizou como substrato orgânico os RFV coletados na Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina (CEASA/SC). A amostra (triturada em liquidificador doméstico) foi composta por abacaxi, batata, berinjela, brócolis, caqui, cebola, limão, laranja, mamão, manga, melancia, melão, milho, ovos, pepino, pimenta calabresa, repolho e tomate. Esse substrato apresentou relação SV/ST de 0,912, o que indica uma elevada concentração de substâncias orgânicas e, além disso, seu pH era de 7,03. O resultado da fermentação escura termofílica (a 55°C) desse substrato com inóculo de lodo granular resultou em produção de biogás crescente ao longo dos trinta dias de experimento, resultando na produção máxima diária de 765 mL Biogás/g SV.

Além disso, Bastos et al. (2018) utilizaram dois diferentes substratos para codigestão anaeróbia em reator de mistura completa (CSTR): RFV (advindos da Central de Abastecimento do Paraná, localizada em Foz do Iguaçu-PR) e resíduos de alimentos (advindos do restaurante universitário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, localizada em Medianeira-PR). O inóculo utilizado foi preparado com três diferentes digestatos: lodo de biodigestor suíno, lodo de biodigestor bovino e dejetos bovinos (proporção 1:0,5:0,5, respectivamente). Os resultados foram positivos: a adição gradual do resíduo de alimento no RFV proporcionou um incremento na produção de biogás, provavelmente devido a maior quantidade de lipídeos (que possuem alto teor de carbono) presente em carnes e em alimentos temperados. Em números, a produção volumétrica diária de biogás passou de, em média, 4,74 L/m<sup>3</sup> Reator (operação com 100% da alimentação proveniente do RFV) para 6,35 L/m<sup>3</sup> Reator (operação com 50% da alimentação proveniente do RFV e 50% proveniente do resíduo de alimento).

Por último, Araújo (2019) analisou dois diferentes substratos para produção de H<sub>2</sub> a partir da fermentação escura: efluente de frutas advindo de indústria de polpas e efluente de lavagem das máquinas de sorvetes advindo de indústria de sorvete. Os parâmetros físico-químicos foram 6,27 g/L de sólidos voláteis e 4,37 de pH para o efluente de frutas, já para o efluente de lavagem das máquinas de sorvetes os parâmetros físico-químicos foram 108,89 g/L de sólidos voláteis e 7,1 de pH. Os resultados mostraram que o reator, em escala de batelada, composto por efluente de indústria de processamento de frutas obteve a melhor eficiência na produção de H<sub>2</sub> (0,82 mL H<sub>2</sub>/g SV), enquanto que não houve produção de H<sub>2</sub> nas bateladas compostas por efluente de lavagem das máquinas de sorvetes. Isso ocorreu,

provavelmente, devido à presença de compostos surfactantes no efluente de lavagem das máquinas de sorvetes.

A partir dos dados supracitados, entende-se que o RFV, apesar de variações sazonais em sua composição, é uma boa fonte de substrato orgânico para o processo metabólico da digestão anaeróbia e da fermentação escura, apresentando ótimos resultados na produção de biogás energético.

### 3.4 PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA

Conforme apontado anteriormente no Tópico 3.3 (Fermentação escura), o obstáculo para a maximização da produção de  $H_2$  por meio da digestão anaeróbia é a última etapa do seu processo metabólico, a metanogênese. A população microbiana presente nos inóculos mesofílicos (sejam eles dejetos bovinos, compostos orgânicos, lodos de estações de tratamento ou lodos granulares) consome o  $H_2$ , transformando-o em  $CH_4$  e em  $CO_2$  (Lopes, 2015).

Logo, infere-se que, para alcançar o objetivo principal dessa pesquisa (a produção fermentativa de  $H_2$ ), torna-se necessário, primeiramente, realizar a inibição do processo metabólico dos microrganismos metanogênicos, dando início, assim, a cadeia metabólica da fermentação escura. Após esse passo, o lodo mesofílico passará por adaptação à condição termofílica, já que, como supracitado no Tópico 3.3.1 (Temperatura operacional), o aumento gradual, em níveis adequados, da temperatura operacional pode favorecer a atividade dos microrganismos produtores de  $H_2$  (Lopes, 2015), fato que instiga a utilização de inóculos termofílicos.

Referente à primeira etapa da pesquisa (a inibição do processo metabólico dos microrganismos metanogênicos), tem-se o estudo de Viana et al. (2019). Os pesquisadores testaram três tipos de pré-tratamentos que inibem a metanogênese: o método de adição de clorofórmio (AC), o método de choque ácido (CA) e o método de choque térmico (CT). Para isso, foi realizada a fermentação escura do substrato glicerol (advindo da Fábrica de Biodiesel, localizada na cidade de Quixadá-CE) com quatro inóculos diferentes (lodo anaeróbio floculento de ETE, lodo anaeróbio granular de indústria cervejeira, líquido ruminal caprino e uma mistura equivalente dos três inóculos).

Os quatro inóculos foram submetidos aos três tipos de pré-tratamentos. No método de AC, adiciona-se 0,05% V/V de clorofórmio nos ensaios em batelada. No método de CA, adiciona-se ácido clorídrico (HCl 2M) aos ensaios em batelada até se atingir pH 3,0 (essa

condição deve permanecer por 24 horas). No método de CT, ferve-se o lodo (com auxílio de chapa quente), sob constante agitação, a 90°C durante dez minutos.

Nove ensaios em batelada (200 mL), montados em frascos Schott (250 mL), foram preparados. O pH inicial foi ajustado para 8,12 e, após isso, cada batelada foi borbulhada com gás nitrogênio ( $N_2$ ) – a fim de realizar a expulsão do  $O_2$  no interior do frasco, estabelecendo, assim, um estado de anaerobiose – . Por fim, os ensaios foram todos armazenados em incubadora agitada (120 rpm) a 37°C. O experimento se deu ao longo de três dias.

Como resultado, obteve-se que o método de AC exerceu o efeito positivo mais significativo na produção de  $H_2$ , atingindo rendimento médio de 0,17 mol  $H_2$ /mol Glicerol. O método de CA atingiu rendimento de 0,08 mol  $H_2$ /mol Glicerol e o método de CT atingiu rendimento de 0,06 mol  $H_2$ /mol Glicerol.

Além disso, o estudo de Hidalgo, Pérez-Zapatero & Martín-Marroquín (2023) analisou diferentes versões, totalizando dezesseis testes, de dois métodos de pré-tratamento: o método de CT (realizado em forno laboratorial) e o método de CA. Para a realização da pesquisa, foi feita a fermentação escura de lodo de reator UASB da ETE da cidade de Valladolid (localizada na Espanha) com o substrato orgânico glicose.

Triplicatas de cada tipo de teste, totalizando quarenta e oito ensaios de 500 mL, foram montadas em frascos de soro de vidro (1.000 mL) com 10 g Glicose/L e inóculo pré-tratado (a relação de substrato para inóculo foi de 2,0). Após a finalização da montagem dos ensaios, cada batelada foi borbulhada com  $N_2$  – a fim de realizar a expulsão do  $O_2$  no interior do frasco, estabelecendo, assim, um estado de anaerobiose – e, por fim, foram todas armazenadas em incubadora agitada a 34°C.

Os testes estão exemplificados a seguir, na Tabela 4 (Métodos de pré-tratamento de inóculo testados por Hidalgo, Pérez-Zapatero & Martín-Marroquín).

Tabela 4 - Métodos de pré-tratamento de inóculo testados por Hidalgo, Pérez-Zapatero & Martín-Marroquín.

Teste	Método de pré-tratamento
Teste 1	CT (60°C durante 15 minutos)
Teste 2	CT (60°C durante 30 minutos)
Teste 3	CT (60°C durante 60 minutos)
Teste 4	CT (80°C durante 15 minutos)
Teste 5	CT (80°C durante 30 minutos)
Teste 6	CT (80°C durante 60 minutos)
Teste 7	CT (100°C durante 15 minutos)
Teste 8	CT (100°C durante 30 minutos)
Teste 9	CT (100°C durante 60 minutos)
Teste 10	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 5,5)
Teste 11	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 7,1) + CT (80°C durante 30 minutos)
Teste 12	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 5,5) + CT (80°C durante 30 minutos)
Teste 13	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 7,1) + CT (100°C durante 30 minutos)
Teste 14	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 5,5) + CT (100°C durante 30 minutos)
Teste 15	CA com HCl 1N (ajustar o pH para 5,5)
Teste 16	CA com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N (ajustar o pH para 5,5)

Nota: CT = Método de choque térmico; CA = Método de choque ácido.

Fonte: Adaptado de Hidalgo, Pérez-Zapatero & Martín-Marroquín (2023).

Como resultado para os testes de CT (teste 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9), obteve-se que todas as tentativas resultaram em efeitos positivos na produção de biogás e na inibição da etapa metanogênica. Em 60°C, a produção de biogás aumenta à medida que o tempo de tratamento é prolongado (rendimento de 275 mL Biogás/g Glicose em 15 minutos, 277 mL Biogás/g Glicose em 30 minutos e 286 mL Biogás/g Glicose em 60 minutos). Em 80°C, a produção de biogás aumenta na transição de 15 para 30 minutos (270 mL Biogás/g Glicose em 15 minutos e 280 mL Biogás/g Glicose em 30 minutos), mas

diminui na aplicação dos 60 minutos (261 mL Biogás/g Glicose em 60 minutos). Observou-se o mesmo para a temperatura de 100°C, com rendimentos de 268 mL Biogás/g Glicose em 15 minutos, 283 mL Biogás/g Glicose em 30 minutos e 271 mL Biogás/g Glicose em 60 minutos. Acrescenta-se que todos esses testes apresentaram, em seu biogás, ausência de CH<sub>4</sub> e grande percentual de H<sub>2</sub> (42%, em média).

Como resultado para os testes de CA combinado com CT (teste 10, 11, 12, 13 e 14), obteve-se que a produção de biogás foi maior nos testes em que o pH foi ajustado para 5,5 (testes 10, 12 e 14), o que comprova a eficiência da junção dos dois métodos de pré-tratamento. Em números, compara-se o teste 14, que obteve rendimento de 107 mL Biogás/g Glicose, com o teste 13, que obteve rendimento de 86 mL Biogás/g Glicose. Acrescenta-se que todos esses testes apresentaram, em seu biogás, ausência de CH<sub>4</sub> e grande percentual de H<sub>2</sub> (43%, em média).

Como resultado para os testes de CA (teste 15 e 16), obteve-se que a evolução dos testes acidificados com ácido clorídrico (HCl) e com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foram praticamente as mesmas. Acrescenta-se que esses testes apresentaram, em seu biogás, ausência de CH<sub>4</sub> e grande percentual de H<sub>2</sub> (43%, em média).

Por fim, após a aplicação dos métodos de pré-tratamento citados nos estudos acima, e, então, inibição da atividade metabólica dos microrganismos metanogênicos, inicia-se o processo de adaptação de inóculo mesofílico às condições termofílicas. De acordo com Ribas (2006), é possível desenvolver uma população de microrganismos termófilos a partir de inóculo anaeróbio mesofílico (essencial, por exemplo, nos casos de indisponibilidade de inóculo termofílico para o “start” de um biodigestor). Ribas (2006) apontou que esse feito pode ser realizado usando-se diferentes tipos de inóculos, contanto que possuam razoável AME e vasta diversidade microbiológica. Durante a adaptação das condições mesofílicas às condições termofílicas, a população microbiológica mesofílica será gradualmente substituída pela população microbiológica termofílica, e, por fim, há a estabilização dessa recomposição, finalizando o processo de reestruturação da comunidade anaeróbia (Pap et al., 2015).

### 3.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Recapitulando, o presente estudo possuiu como objetivo principal a avaliação da produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura, em condições mesofílicas e em condições termofílicas, de cultura mista (inóculo anaeróbio) com RFV (fonte de carbono).

Destaca-se que essa pesquisa ocorreu em três etapas. Na primeira etapa, ocorreu a verificação da eficiência de três métodos de pré-tratamento de inóculo anaeróbio para inibição da etapa metabólica metanogênica da digestão anaeróbia. Na segunda etapa, ocorreu a verificação do efeito do aumento da temperatura operacional (entre 35°C e 45°C) na produção acumulada de  $H_2$ . Na terceira etapa, ocorreu a verificação dos níveis de rendimento de  $H_2$  na fermentação escura de RFV com cultura mista, comparando os resultados em 30°C e em condição mesofílica elevada 43°C.

A partir das informações apresentadas nos tópicos anteriores, foram definidos como parâmetros operacionais fixos para as três etapas desse trabalho: pH em faixa neutra (7,0) e concentração de substratos de 5 g DQO/L nos ensaios em batelada. Na primeira etapa da pesquisa, utilizou-se sacarose como substrato orgânico para testar os três métodos de pré-tratamento de inóculo anaeróbio estudados por Viana et al. (2019) em temperatura mesófila (37°C): o método de AC, o método de CA e o método de CT. Na segunda etapa da pesquisa, utilizou-se sacarose como substrato orgânico para adaptar o inóculo mesofílico às condições termofílicas, variando a temperatura operacional de 35°C a 45°C. Na terceira etapa da pesquisa, utilizou-se RFV como substrato orgânico para comparar os níveis de rendimento de  $H_2$  na fermentação escura em 30°C e em 43°C.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS

O RFV utilizado como substrato orgânico na alimentação dos ensaios em batelada foi coletado na Central de Abastecimento do Ceará S/A (CEASA/CE), localizada no município de Maracanaú-CE.

Durante o primeiro semestre do ano de 2021, foi coletado manualmente, respeitando a amostra previamente caracterizada gravimetricamente por Silva Júnior et al. (2021), um volume de RFV a partir de refugos segregados para fins de descarte, resultando em uma amostra composta, qualitativamente, por: laranja ( $42\% \pm 2,23\%$ ) cebola ( $7,7\% \pm 0,77\%$ ), milho ( $5,5\% \pm 3,6\%$ ), mamão ( $5,4\% \pm 0,22\%$ ), abacate ( $4,8\% \pm 1,08\%$ ), melancia ( $3,4\% \pm 0,37\%$ ), melão ( $3,1\% \pm 0,26\%$ ), abacaxi ( $3,1\% \pm 0,77\%$ ), banana ( $3\% \pm 0,34\%$ ), batata ( $3\% \pm 0,29\%$ ), repolho ( $2,4\% \pm 0,3\%$ ), goiaba ( $1,2\% \pm 0,16\%$ ), tomate ( $1\% \pm 0,04\%$ ), pimentão ( $0,9\% \pm 0,22\%$ ), beterraba ( $0,9\% \pm 0,25\%$ ), maçã ( $0,7\% \pm 0,12\%$ ), maracujá ( $0,4\% \pm 0,18\%$ ), cenoura ( $0,4\% \pm 0,21\%$ ) e abóbora ( $0,2\% \pm 0,01\%$ ).

Após a coleta *in loco*, a amostra foi conduzida ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa - LTB (instalado na Embrapa Agroindústria Tropical, localizada em Fortaleza-CE), onde passou pelo processo de trituração para redução do tamanho das partículas orgânicas. Após isso, a amostra triturada foi homogeneizada e armazenada em câmara refrigerada, na temperatura de 4°C (dessa forma, evitou-se a sua degradação a temperatura ambiente e assegurou-se uma composição constante do substrato ao longo da pesquisa).

A caracterização do resíduo foi feita com base na sua demanda química de oxigênio (DQO), nos seus sólidos totais (ST), nos seus sólidos voláteis (SV), no seu nitrogênio total Kjeldahl, nos seus carboidratos totais e nos seus diversos nutrientes. Os resultados, obtidos por Silva-Júnior et al. (2021), estão dispostos a seguir, na Tabela 5 (Caracterização do resíduo de frutas e verduras).

Tabela 5 - Caracterização do resíduo de frutas e verduras.

Variáveis	Resultados
DQO	138,13 ± 12,4 g/Kg Peso Úmido
ST	13% ± 0,2%
SV	94,1% ST ± 0,3%
Carboidratos	55% Peso Úmido ± 1,2%
Lipídios	0,8% Peso Úmido ± 0,16%
Proteínas	2,25% Peso Úmido ± 0,49%
Nitrogênio total Kjeldahl	9,3 ± 0,4 g/Kg Peso Seco
Fósforo	0,29 ± 0,02 g/Kg Peso Seco
Potássio	3 ± 0,08 g/Kg Peso Seco
Cálcio	0,9 ± 0,03 g/Kg Peso Seco
Magnésio	0,67 ± 0,02 g/Kg Peso Seco
Enxofre	0,6 ± 0,04 g/Kg Peso Seco
Sódio	5,22 ± 0,21 mg/Kg Peso Seco
Ferro	242,19 ± 12,95 mg/Kg Peso Seco
Zinco	23,09 ± 0,1 mg/Kg Peso Seco
Manganês	10,16 ± 0,21 mg/Kg Peso Seco

Nota: DQO = Demanda Química de Oxigênio; ST = Sólidos Totais; SV = Sólidos Voláteis.

Fonte: Silva-Júnior et al. (2021).

## 4.2 INÓCULO

O lodo mesofílico de um reator UASB destinado para o tratamento de águas residuárias geradas na indústria cervejeira Ambev, localizada no município de Aquiraz-CE, foi utilizado como inóculo para o desenvolvimento do presente estudo.

Ressalta-se que, para evitar a degradação do inóculo, o lodo anaeróbico mesofílico foi coletado *in loco* e, posteriormente, armazenado em geladeira convencional (a 4°C) antes do início da realização da pesquisa.

A caracterização do inóculo anaeróbico mesofílico foi feita com base nos seus ST, nos seus sólidos fixos (SF), nos seus SV e no seu pH. Os resultados estão dispostos a seguir, na Tabela 6 (Caracterização do lodo anaeróbico mesofílico de indústria cervejeira).

Tabela 6 - Caracterização do lodo anaeróbio mesofílico de indústria cervejeira.

Variáveis	Resultados
ST	1,06 g/mL
SF	1,01 g/mL
SV	0,05 g/mL
pH	7,5

Nota: ST = Sólidos Totais; SF = Sólidos Fixos; SV = Sólidos Voláteis.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.3 EFEITO DO TIPO DE PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA

Como mencionado anteriormente no Tópico 3.4 (Pré-tratamento do lodo de cultura mista), para se atingir o objetivo principal dessa pesquisa (a produção fermentativa de  $H_2$ ) fez-se necessária a aplicação de métodos de pré-tratamento no inóculo anaeróbio misto. Dessa forma, houve a inibição da ação dos microrganismos metanogênicos componentes da cadeia metabólica da digestão anaeróbia, dando início, assim, ao processo da fermentação escura, o que gera a maximização do percentual de  $H_2$  no biogás produzido.

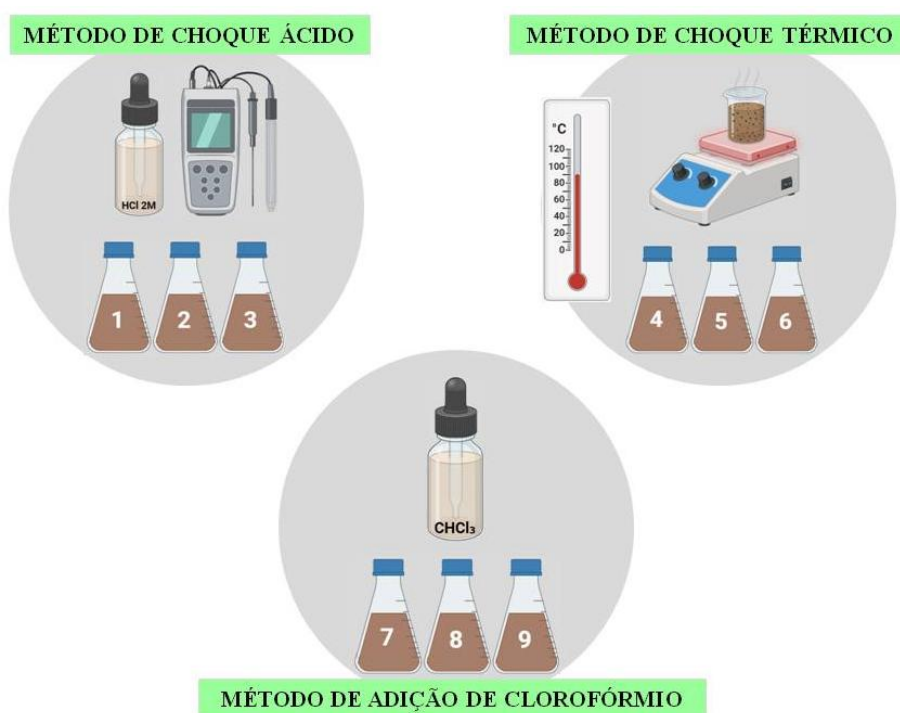
Os métodos escolhidos para analisar o melhor tipo de pré-tratamento foram: o de AC, o de CA e o de CT. No método de AC, adicionou-se 0,05% V/V de clorofórmio nos ensaios em batelada. No método de CA, adicionou-se ácido clorídrico (HCl 2M) aos ensaios em batelada, deixando essa condição permanecer durante 24 horas. No método de CT, ferveu-se o lodo (com auxílio de chapa quente), sob constante agitação, a 90°C durante dez minutos.

Ressalta-se que o substrato orgânico selecionado para a realização dessa fase da pesquisa foi a sacarose (escolha justificada pela simplicidade do substrato e pela vasta disponibilidade de dados existentes na literatura científica), e, por isso, a fim de assegurar um ótimo desenvolvimento microbiano, adicionaram-se alguns suplementos inorgânicos ao meio. O meio nutricional usado foi o formulado por Endo (1982) e adaptado por Menezes & Silva (2019), composto por:  $K_2HPO_4$  (125 mg/L),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (15 mg/L),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  mg/L (25 mg/L),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (5 mg/L) e  $CoCl_2 \cdot 5H_2O$  (0,125 mg/L).

Nessa etapa do estudo, então, nove ensaios em batelada (triplicatas de cada método de pré-tratamento) foram montados em frascos Schott de 400 mL. Cada batelada foi composta por 200 mL: 20 mL de lodo anaeróbio mesofílico pré-tratado, sacarose (5 g DQO/L), 2 mL de meio nutricional – formulado por Endo (1982) e adaptado por Menezes & Silva (2019) – e

169,7 mL de água. Após a finalização da montagem dos ensaios, cada batelada foi borbulhada com N<sub>2</sub> durante cinco minutos – a fim de realizar a expulsão do O<sub>2</sub> no interior do frasco, estabelecendo, assim, um estado de anaerobiose – e, por fim, foram todas armazenadas em incubadora agitada (150 rpm) a 37°C. Abaixo, na Figura 4 (Identificação dos ensaios em batelada para acompanhamento dos métodos de pré-tratamento), estão apontadas as bateladas em que cada método de pré-tratamento foi monitorado.

Figura 4 – Identificação dos ensaios em batelada para acompanhamento dos métodos de pré-tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Por fim, ressalta-se que o potencial do lodo anaeróbico mesofílico de converter a matéria orgânica em H<sub>2</sub> foi expresso em rendimento médio de hidrogênio (HY), seguido pelo seu desvio padrão. A Equação 1 mostra o cálculo do HY, a partir da sacarose, em mol H<sub>2</sub>/mol Sacarose (Luo et al., 2011).

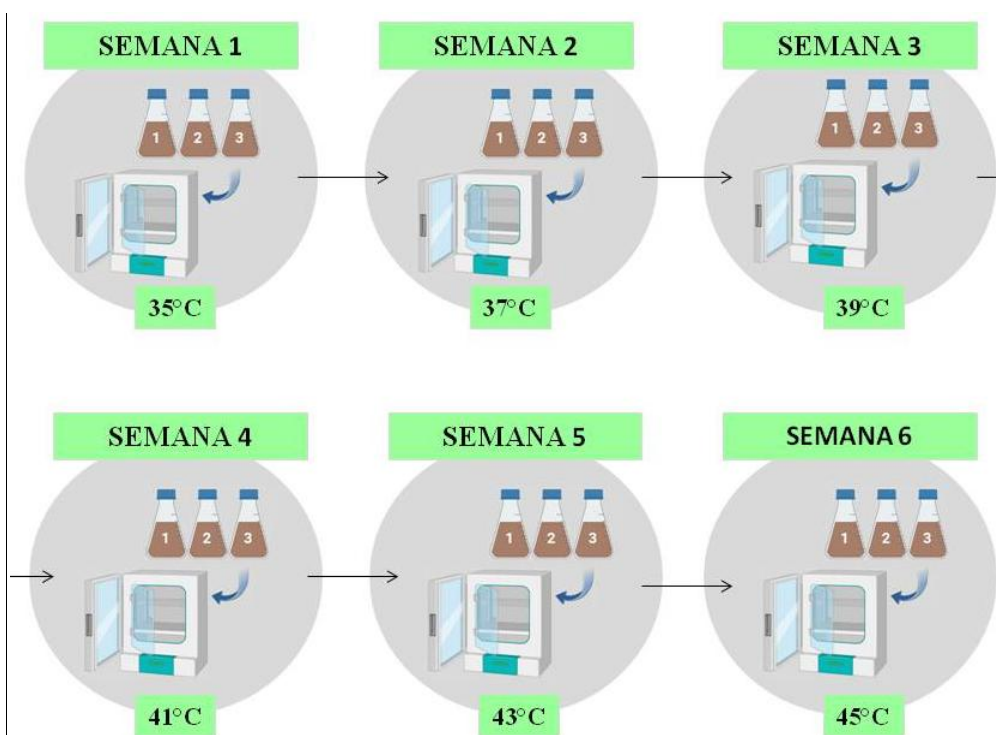
$$HY = \left[ \frac{\text{Produção de gás hidrogênio (mol)}}{(((\text{Carboidrato consumido (mg Sacarose/L)})/1000)/342,3) \times 0,2} \right] \quad (1)$$

#### 4.4 EFEITO DO AUMENTO DA TEMPERATURA

Após o término da fase de pré-tratamento do inóculo de cultura mista, iniciou-se a fase do aumento gradual da temperatura operacional. O objetivo específico dessa etapa foi adaptar o inóculo mesofílico de indústria cervejeira (pré-tratado para realizar a inibição da ação dos microrganismos metanogênicos) à condição termofílica, já que, como apontado por Pap et al. (2015), ocorre, ao longo desse processo, a substituição da população microbiológica mesofílica pela população microbiológica termofílica, reestruturando a comunidade anaeróbia presente no inóculo de indústria cervejeira.

A adaptação das condições mesofílicas às condições termofílicas ocorreu pelo aumento, lento e escalonado, da temperatura operacional, evoluindo (ao longo de seis semanas) de 35°C para 45°C. Na Figura 5 (Aumento da temperatura operacional ao longo das semanas de experimento), estão listadas as temperaturas usadas em cada semana da pesquisa. Destaca-se que o aumento da temperatura se deu em passos de 2°C por semana.

Figura 5 – Aumento da temperatura operacional ao longo das semanas de experimento.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ressalta-se que o substrato orgânico selecionado para a realização dessa fase da pesquisa foi a sacarose (escolha justificada pela simplicidade do substrato e pela vasta disponibilidade de dados existentes na literatura científica), e, por isso, a fim de assegurar um ótimo desenvolvimento microbiano, adicionaram-se alguns suplementos inorgânicos ao meio. O meio nutricional usado foi o formulado por Endo (1982) e adaptado por Menezes & Silva (2019), composto por:  $K_2HPO_4$  (125 mg/L),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (15 mg/L),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  mg/L (25 mg/L),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (5 mg/L) e  $CoCl_2 \cdot 5H_2O$  (0,125 mg/L).

Nesse estágio do estudo, então, a cada semana foram montadas triplicatas em batelada (em frascos Schott de 1.000 mL), compostas por 400 mL: lodo anaeróbio pré-tratado, sacarose (5 g DQO/L), 4 mL de meio nutricional – formulado por Endo (1982) e adaptado por Menezes & Silva (2019) – e água. Após a finalização da montagem dos ensaios, cada batelada foi borbulhada com  $N_2$  durante cinco minutos – a fim de realizar a expulsão do  $O_2$  no interior do frasco, estabelecendo, assim, um estado de anaerobiose – e, por fim, foram todas armazenadas em incubadora agitada (150 rpm) a temperatura pré-determinada para a semana. Essa configuração está ilustrada a seguir, na Figura 6 (Triplicatas de acompanhamento do efeito do aumento da temperatura).

Figura 6 – Triplicatas de acompanhamento do efeito do aumento da temperatura.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Destaca-se que foram usados 45,53 ml de lodo anaeróbio pré-tratado (distribuído igualmente nos três ensaios em batelada) na primeira semana de estudo. Essa quantidade sofreu alterações ao decorrer da pesquisa, já que, a cada nova semana, o lodo usado nos ensaios foi centrifugado a 3.300 rpm durante dez minutos, ressuspensionado com água destilada e, por fim, adicionado aos novos ensaios, incubados com a nova temperatura correspondente.

Dessa forma, estão dispostas, a seguir, as quantidades de lodo anaeróbio pré-tratado utilizadas a cada semana nos ensaios em batelada, na Tabela 7 (Quantidade de lodo usada nos ensaios em batelada ao longo das semanas de experimento).

Tabela 7 - Quantidade de lodo usada nos ensaios em batelada ao longo das semanas de experimento.

Semana de experimento	Quantidade de lodo usada
Semana 1	45,53 mL
Semana 2	45,29 mL
Semana 3	30 mL
Semana 4	33 mL
Semana 5	33 mL
Semana 6	30,76 mL

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Por fim, ressalta-se que o potencial do lodo anaeróbio pré-tratado de converter a matéria orgânica em  $H_2$  foi expresso em rendimento médio de hidrogênio (HY), seguido pelo seu desvio padrão. A Equação 2 mostra o cálculo do HY, a partir da sacarose, em mol  $H_2$ /mol Sacarose (Luo et al., 2011).

$$HY = \left[ \frac{\text{Produção de gás hidrogênio (mol)}}{(((\text{Carboidrato consumido (mg Sacarose/L)})/1000)/342,3) \times 0,4} \right] \quad (2)$$

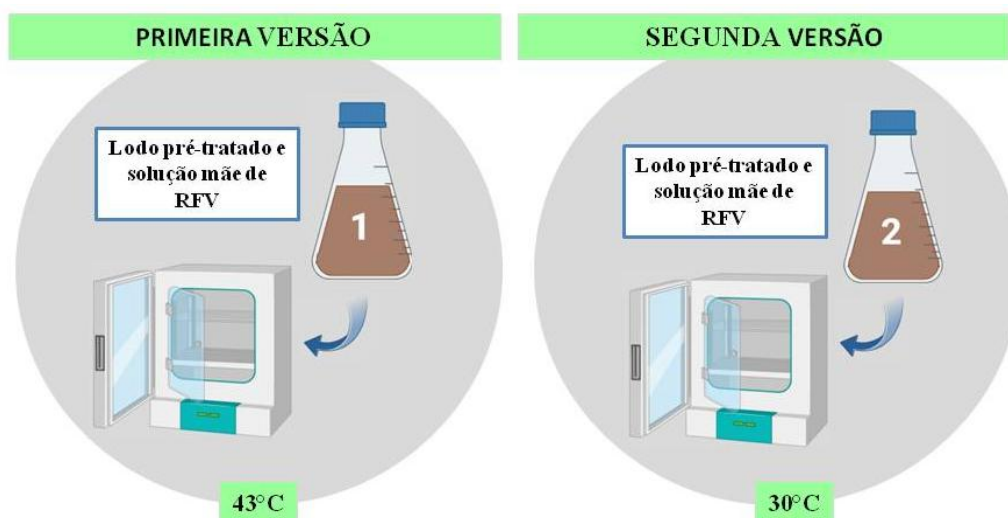
#### 4.5 COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES A 30°C E A 43°C

Na terceira, e última, etapa do estudo foi feita a fermentação escura do RFV com o lodo de indústria cervejeira em duas condições distintas: a primeira foi realizada com o lodo pré-tratado exposto a temperatura operacional de 43°C, já a segunda foi realizada com o lodo pré-tratado exposto a temperatura operacional de 30°C. O objetivo específico dessa fase foi comparar os níveis de rendimento de H<sub>2</sub> nos dois diferentes esquemas operacionais.

De início, foi preparada uma solução mãe de substrato orgânico composta por RFV triturado em Ultra-turrax. Posteriormente, os dois ensaios em batelada, compostos por 400 mL, foram montados em frascos Schott de 1.000 mL. A primeira versão foi composta por lodo anaeróbico pré-tratado, solução mãe de RFV (5 g DQO/L) e água. A segunda versão foi composta por lodo anaeróbico pré-tratado, solução mãe de RFV (5 g DQO/L) e água.

Após a finalização da montagem dos ensaios, cada batelada foi borbulhada com N<sub>2</sub> durante cinco minutos – a fim de realizar a expulsão do O<sub>2</sub> no interior do frasco, estabelecendo, assim, um estado de anaerobiose – e, por fim, foram armazenadas em incubadora agitada (150 rpm). A primeira versão foi incubada a 43°C, enquanto a segunda versão foi incubada a 30°C. Esse esquema está ilustrado a seguir, na Figura 7 (Bateladas de comparação da condição mesofílica elevada e da condição mesofílica mediana).

Figura 7 – Bateladas comparativas das condições a 30°C e a 43°C.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Por fim, ressalta-se que o potencial do lodo anaeróbio pré-tratado de converter a matéria orgânica em H<sub>2</sub> foi expresso em rendimento médio de hidrogênio (HY). A Equação 3 mostra o cálculo do HY, a partir da solução mãe de RFV, em mol H<sub>2</sub>/mol RFV (Luo et al., 2011).

$$HY = \left[ \frac{\text{Produção de gás hidrogênio (mol)}}{(((\text{Carboidrato consumido (mg RFV/L)})/1000)/\text{Massa molar RFV}) \times 0,4} \right] \quad (3)$$

## 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1 Determinação da concentração de carboidratos

A determinação da concentração de carboidratos foi determinada pela técnica espectrofotométrica de acordo com a metodologia de Dubois et al. (1956).

### 4.6.2 Análises físico-químicas

As medidas de pH, de DQO, de ST, de SF e de SV foram realizadas com base no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2005).

### 4.6.3 Medida de produção volumétrica e composição do biogás

A produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Walker et al. (2009). De acordo com essa metodologia, o volume de biogás é mensurado por meio do deslocamento da coluna de líquido contendo solução salina acidificada.

A análise de determinação dos componentes presentes no biogás produzido foi realizada por cromatografia gasosa. Para tanto, 1,0 mL de amostra do biogás foi coletada nas bateladas utilizando-se uma seringa *gas tight*. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo gasoso marca Shimadzu modelo GC-2010, Japan, equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e com coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) Sigma-Aldrich, sendo o argônio utilizado como gás de arraste.

#### 4.6.4 Frequência das análises

Abaixo, na Tabela 8 (Frequência e metodologias das análises), encontra-se a frequência e a metodologia das análises laboratoriais realizadas ao decorrer da pesquisa.

Tabela 8 - Frequência e metodologias das análises.

<b>Análise</b>	<b>Frequência</b>	<b>Metodologia</b>
pH	2x na semana	Eaton et al. (2005)
DQO	2x na semana	Eaton et al. (2005)
Concentração de carboidratos	2x na semana	Dubois et al. (1956)
Produção volumétrica	Diária	Walker et al. (2009)
<b>Análise</b>	<b>Frequência</b>	<b>Instrumento analítico</b>
Composição do biogás	1x na semana	Shimadzu GC-2010

Nota: DQO = Demanda Química de Oxigênio.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRÉ-TRATAMENTO DO LODO DE CULTURA MISTA

Após a análise dos dados obtidos a partir da metodologia descrita no tópico 4.3 (Efeito do tipo de pré-tratamento do lodo de cultura mista), elegeu-se o método de CT como o mais eficiente para o tratamento do lodo anaeróbio de cervejaria para produção de  $H_2$ .

O primeiro indicativo analisado, a eficiência de conversão de carboidratos, está com seus resultados expostos a seguir, na Tabela 9 (Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do lodo de cervejaria na conversão de carboidratos).

Tabela 9 - Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do lodo de cervejaria na conversão de carboidratos.

Bateladas e seus métodos de pré-tratamento	Eficiência de conversão de carboidratos
Batelada 1 (CA)	98%
Batelada 2 (CA)	98%
Batelada 3 (CA)	99%
Batelada 4 (CT)	97%
Batelada 5 (CT)	94%
Batelada 6 (CT)	95%
Batelada 7 (AC)	95%
Batelada 8 (AC)	98%
Batelada 9 (AC)	98%

Nota: CA = Método de choque ácido; CT = Método de choque térmico; AC = Método de adição de Clorofórmio.

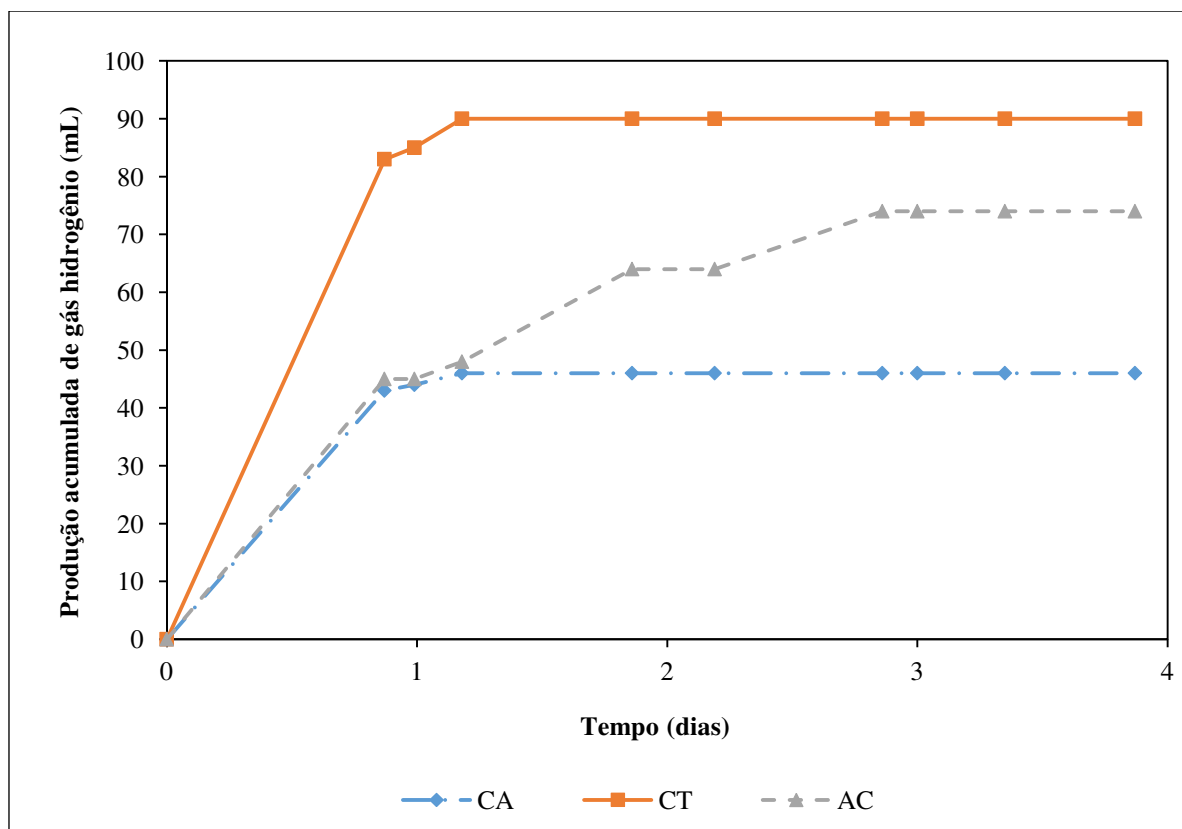
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em média, a eficiência de conversão de carboidratos no método de CA foi de 98,3% (a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 29%), com desvio padrão de  $\pm 0,57$ . No método de CT, a eficiência média de conversão de carboidratos foi de 95,3% (a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 30%), com desvio padrão de  $\pm 1,52$ . No método de AC, a eficiência média de conversão de carboidratos foi de 97% (a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 57%), com desvio padrão de  $\pm 1,73$ . Esses dados indicam que praticamente

todo o substrato (sacarose) adicionado nas bateladas foi consumido microbiologicamente e transformado em biogás e em ácidos orgânicos, independente do método analisado.

O segundo indicativo analisado, a produção acumulada de  $H_2$ , se deu como consequência do primeiro parâmetro. Abaixo, na Figura 8 (Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria na produção de gás hidrogênio), estão apresentados os dados de produção acumulada de  $H_2$  dos ensaios em batelada com inóculo tratado pelos métodos de CA, de CT e de AC.

Figura 8 – Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria na produção de gás hidrogênio.



Nota: CA = Método de choque ácido; CT = Método de choque térmico; AC = Método de adição de Clorofórmio.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A produção de  $H_2$  observada nos ensaios de acompanhamento do método de CA (bateladas 1, 2 e 3) foi considerável durante o dia 1 (44 mL  $H_2$ ) e, após isso, ocorreu uma pequena produção, seguida de estagnação, no dia 2 (46 mL  $H_2$ ) e no dia 3 (46 mL  $H_2$ ). A produção de  $H_2$  observada nos ensaios de acompanhamento do método de CT (bateladas 4, 5 e 6) foi expressiva durante o dia 1 (85 mL  $H_2$ ) e, após isso, ocorreu uma pequena produção,

seguida de estagnação, no dia 2 (90 mL H<sub>2</sub>) e no dia 3 (90 mL H<sub>2</sub>). A produção de H<sub>2</sub> observada nos ensaios de acompanhamento do método de AC (bateladas 7, 8 e 9) foi considerável durante o dia 1 (45 mL H<sub>2</sub>) e, após isso, continuou a produzir, em menor proporção, no dia 2 (64 mL H<sub>2</sub>) e no dia 3 (74 mL H<sub>2</sub>). Em termos de produção acumulada, o método de pré-tratamento de CT se mostrou o mais eficiente para a produção de H<sub>2</sub>, fato confirmado, de forma complementar, pelo seu alto rendimento médio de H<sub>2</sub>. Os dados de rendimento médio de H<sub>2</sub> estão apresentados a seguir, na Tabela 10 (Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria no rendimento médio de gás hidrogênio).

Tabela 10 - Avaliação do efeito do método de pré-tratamento do inóculo de cervejaria no rendimento médio de gás hidrogênio.

<b>Método de pré-tratamento</b>	<b>Rendimento de H<sub>2</sub></b>
CA	1,3 ± 0,55 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
CT	2,7 ± 0,10 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
AC	1,9 ± 1,61 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose

Nota: CA = Método de choque ácido; CT = Método de choque térmico; AC = Método de adição de Clorofórmio.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No estudo de Viana et al. (2019), os autores também avaliaram a eficiência do pré-tratamento de AC, do pré-tratamento de CA e do pré-tratamento de CT para a produção fermentativa de H<sub>2</sub>. Para isso, foi realizada a fermentação escura do substrato glicerol com quatro inóculos anaeróbios diferentes. Como resultado, os pesquisadores obtiveram rendimento médio de H<sub>2</sub> de 0,17 mol H<sub>2</sub>/mol Glicerol para o pré-tratamento de AC, de 0,08 mol H<sub>2</sub>/mol Glicerol para o pré-tratamento de CA e de 0,06 mol H<sub>2</sub>/mol Glicerol para o pré-tratamento de CT. Dessa maneira, o método de AC se destacou como o mais eficiente para a produção de H<sub>2</sub>.

Apesar de o presente estudo seguir a mesma metodologia usada por Viana et al. (2019), o método de AC (anteriormente pontuado pelos autores como o mais vantajoso) não foi o mais eficiente para esta pesquisa, destacando-se, então, o método de CT. Isso ocorreu, provavelmente, pelas diferentes naturezas dos substratos e dos inóculos utilizados: Viana et al. (2019) testaram lodo anaeróbio flocculento de ETE, lodo anaeróbio granular de indústria cervejeira, líquido ruminal caprino e uma mistura equivalente dos três inóculos anteriores para

a produção de H<sub>2</sub> a partir de glicerol residual, já o presente estudo usou lodo mesofílico de reator UASB destinado para o tratamento de águas residuárias geradas na indústria cervejeira Ambev na produção de H<sub>2</sub> a partir de sacarose, acrescida de meio nutricional.

## 5.2 AUMENTO GRADUAL DA TEMPERATURA OPERACIONAL

O acompanhamento e o monitoramento dos ensaios em batelada, descritos metodologicamente no tópico 4.4 (Efeito do aumento da temperatura), foram altamente relevantes para a confirmação da hipótese proposta no tópico 3.3.1 (Temperatura operacional). Como descrito anteriormente, de acordo com Kunz, Steinmetx & Amaral (2022), o aumento da temperatura operacional gera o favorecimento da atividade metabólica de microrganismos produtores de H<sub>2</sub> e o decaimento da atividade metabólica de microrganismos consumidores de H<sub>2</sub>.

Ao longo das seis semanas de pesquisa, os dados do efeito do aumento da temperatura operacional na eficiência de conversão de carboidratos, na eficiência de remoção de matéria orgânica, na produção acumulada de H<sub>2</sub> e no rendimento de H<sub>2</sub> foram obtidos. Estão expostos a seguir, na Tabela 11 (Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na eficiência de conversão de carboidratos e na eficiência de remoção de matéria orgânica) os resultados sobre a eficiência de conversão de carboidratos.

Tabela 11 - Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na eficiência de conversão de carboidratos e na eficiência de remoção de matéria orgânica.

<b>Temperatura operacional</b>	<b>Eficiência de conversão de carboidratos</b>	<b>Eficiência de remoção de matéria orgânica</b>
35°C	95% ± 1,56	32%
37°C	99% ± 0	27%
39°C	99% ± 0	23%
41°C	94% ± 2,88	17%
43°C	90% ± 11,80	13%
45°C	44% ± 11,10	13%

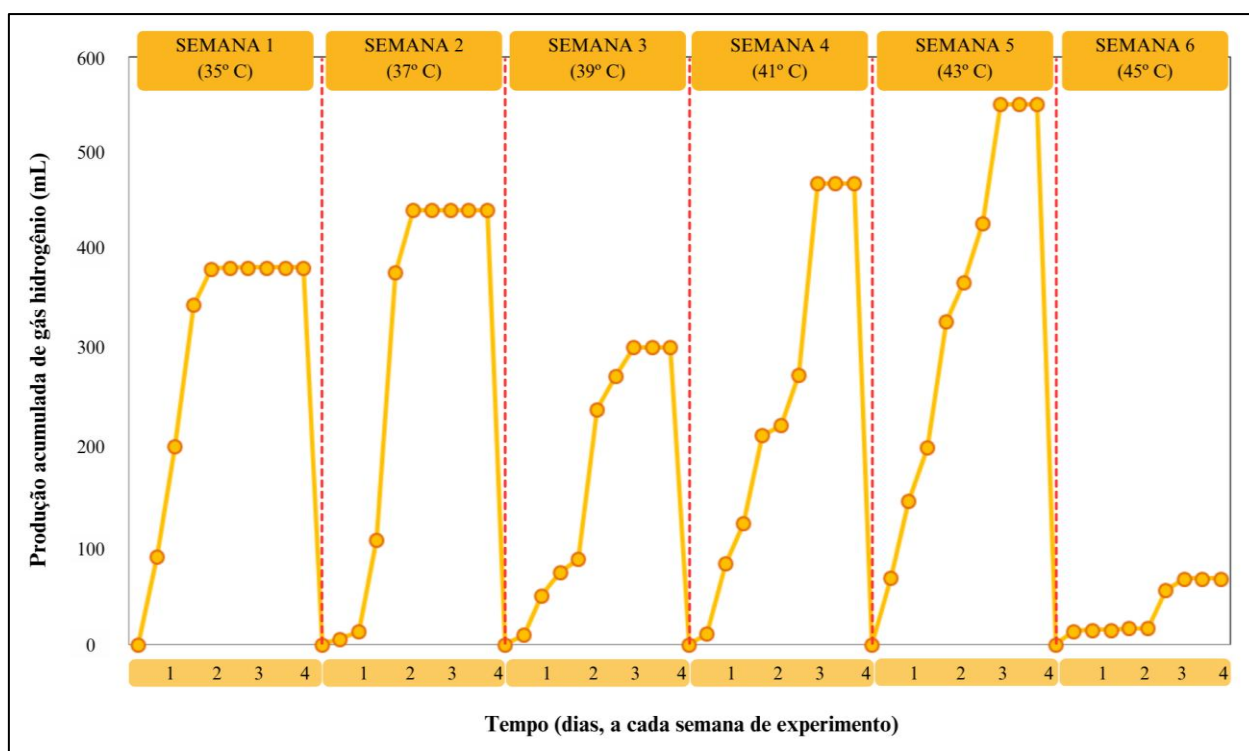
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Obteve-se que os resultados da semana 1 (35°C) até a semana 5 (43°C) são positivos, pois se mantiveram acima de 90%. Esses números indicam que praticamente todo o substrato

(sacarose) adicionado nas bateladas foi consumido microbiologicamente e transformado em biogás e em ácidos orgânicos. Entretanto, o dado de eficiência de conversão de carboidratos da semana 6 (45°C) é ineficiente (provavelmente devido ao estresse do meio exposto a alta temperatura), resultando em apenas 44%.

Em seguida, analisaram-se os valores de produção acumulada de  $H_2$ , expostos a seguir, na Figura 9 (Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na produção acumulada de gás hidrogênio).

Figura 9 – Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional na produção acumulada de gás hidrogênio.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ao fim do dia 1 de experimento de cada semana, obteve-se produção acumulada de  $H_2$  de 346 mL para 35°C, de 106 mL para 37°C, de 73 mL para 39°C, de 123 mL para 41°C, de 201 mL para 43°C e de 14 mL para 45°C. Dessa maneira, as temperaturas de 35°C e de 43°C se destacaram, respectivamente, pelas produções acumuladas de  $H_2$  mais elevadas, enquanto a temperatura de 45°C se destacou como a menos eficiente.

Ao fim do dia 2 de experimento de cada semana, obteve-se produção acumulada de  $H_2$  de 385 mL para 35°C, de 443 mL para 37°C, de 240 mL para 39°C, de 224 mL para 41°C, de 370 mL para 43°C e de 16 mL para 45°C. Dessa maneira, as temperaturas de 37°C e de 43°C se

destacaram, respectivamente, pelas produções acumuladas de H<sub>2</sub> mais elevadas, enquanto a temperatura de 45°C se destacou como a menos eficiente.

Ao fim do dia 3 de experimento de cada semana, obteve-se produção acumulada de H<sub>2</sub> de 385 mL para 35°C, de 443 mL para 37°C, de 303 mL para 39°C, de 471 mL para 41°C, de 552 mL para 43°C e de 67 mL para 45°C. Logo, conclui-se que a maior produção acumulada de H<sub>2</sub> ao fim do experimento foi a realizada na temperatura operacional de 43°C.

Outra variável pertinente é o rendimento médio de H<sub>2</sub>, que confirma, de forma complementar, a eficiência da temperatura de 43°C para a produção de H<sub>2</sub>. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir, na Tabela 12 (Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional no rendimento de gás hidrogênio).

Tabela 12 - Avaliação do efeito do aumento da temperatura operacional no rendimento de gás hidrogênio.

<b>Temperatura operacional</b>	<b>Rendimento de H<sub>2</sub></b>
35°C	2,7 ± 0,22 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
37°C	3,0 ± 0,40 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
39°C	3,5 ± 0,05 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
41°C	3,0 ± 0,17 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
43°C	4,9 ± 0,89 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose
45°C	1,1 ± 0,35 mol H <sub>2</sub> /mol Sacarose

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Comparando os dados obtidos nesse estudo com os dados apresentados por Mu et al. (2007), observa-se conformidade nos resultados. Usando glicose como substrato orgânico e consórcio microbiano misto como inóculo, os autores também registraram elevação dos níveis de produção de H<sub>2</sub> com o aumento da temperatura operacional. Mu et al. (2007) observaram rendimento médio de H<sub>2</sub> de 0,94 mol H<sub>2</sub>/mol Glicose em temperatura de 33°C e de 1,67 mol H<sub>2</sub>/mol Glicose em temperatura de 41°C.

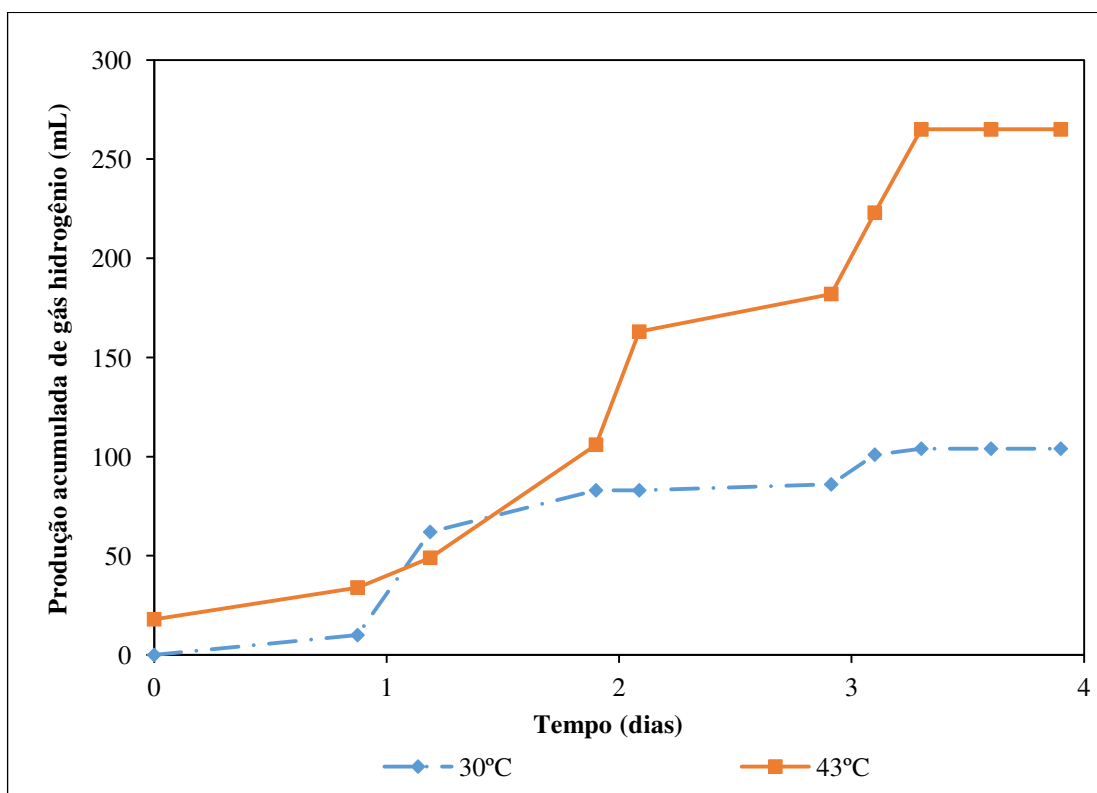
Portanto, conclui-se que a temperatura de 43°C foi avaliada como a mais positiva para o sistema, beneficiando a produção de H<sub>2</sub>. A temperatura de 45°C causou estresse no meio, levando-o a falência.

### 5.3 COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES A 30°C E A 43°C

O acompanhamento e o monitoramento dos dois ensaios em batelada, descritos metodologicamente no tópico 4.5 (Comparação das condições a 30°C e a 43°C), foram altamente relevantes para a confirmação de duas hipóteses: a primeira hipótese – proposta no tópico 3.1 (Resíduo de frutas e verduras) – propôs o uso do RFV como substrato orgânico para a fermentação escura, elencando-o como vantajoso ambientalmente e economicamente, e a segunda hipótese – proposta no tópico 3.3.1 (Temperatura operacional) – propôs o uso de temperaturas elevadas para a operação do sistema, elencando-a como mais vantajosa para a produção de  $H_2$ , quando comparada a temperaturas mais baixas.

Ressalta-se que foi feita a análise de DQO da solução mãe (fabricada com RFV triturado em Ultraturrax) utilizada como substrato orgânico nos dois ensaios em batelada. O resultado foi de 0,18 g DQO/g Triturado. Realizou-se, então, a análise dos dados de produção acumulada de  $H_2$ , expostos a seguir, na Figura 10 (Avaliação do efeito da temperatura de 30°C e da temperatura de 43°C na produção acumulada de gás hidrogênio).

Figura 10 – Avaliação do efeito da temperatura de 30°C e da temperatura de 43°C na produção acumulada de gás hidrogênio.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Contatou-se que a duração da fase lag, período de adaptação da microbiota anaeróbia ao substrato orgânico, no ensaio incubado a 30°C foi mais longa quando comparada fase lag no ensaio incubado a 43°C. Esse fato é justificado pela aceleração das taxas de hidrólise em temperaturas elevadas.

Ao fim do dia 1 de experimento, obteve-se produção acumulada de H<sub>2</sub> de 12 mL para 30°C e de 163 mL para 43°C. Dessa maneira, a temperatura de 43°C se destacou pela produção acumulada de H<sub>2</sub> mais elevada, enquanto a temperatura de 30°C se destacou como menos eficiente.

Ao fim do dia 2 de experimento, obteve-se produção acumulada de H<sub>2</sub> de 83 mL para 30°C e de 223 mL para 43°C. Dessa maneira, a temperatura de 43°C seguiu em destaque pela produção acumulada de H<sub>2</sub> mais elevada, enquanto a temperatura de 30°C também seguiu em destaque como menos eficiente.

Ao fim do dia 3 de experimento, obteve-se produção acumulada de H<sub>2</sub> de 104 mL para 30°C e de 265 mL para 43°C. Logo, é possível concluir que a de temperatura operacional de 43°C foi a responsável pela produção dos maiores níveis de H<sub>2</sub> ao fim do experimento.

Comparando os dados do presente estudo com os dados das pesquisas de Neitzel (2015) e de Silveira (2017), observa-se conformidade nos resultados. Ambos os autores usaram RFV, coletados na Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina (CEASA/SC), como substrato orgânico para a fermentação escura. Neitzel (2015) seguiu a pesquisa em condições mesofílicas (a 37°C), o que resultou em produção máxima de 689 ml de biogás, enquanto Silveira (2017) seguiu a pesquisa em condições termofílicas (a 55°C), o que resultou em produção máxima de 765 ml de biogás. O incremento na produção de biogás pontuado pelos autores ocorreu, também, nesse estudo (em termos de H<sub>2</sub>).

Por fim, os dados de rendimento de H<sub>2</sub> nas duas condições estudadas na presente pesquisa foram obtidos: o rendimento de H<sub>2</sub> no ensaio incubado a 30°C foi de 3,1 mol H<sub>2</sub>/mol Carboidratos, enquanto o rendimento de H<sub>2</sub> observado no ensaio incubado a 43°C foi 7,3 mol H<sub>2</sub>/mol Carboidratos.

## 6 CONCLUSÕES

Com suporte nos resultados obtidos durante a realização da pesquisa de produção de  $H_2$  a partir da fermentação escura de RFV com inóculo anaeróbio misto, testando o desempenho desse esquema nas faixas de temperatura de 30°C e de 43°C, conclui-se que:

- i. O método de pré-tratamento térmico comprovou ser o mais eficiente em inibir a atividade metanogênica da cadeia da digestão anaeróbia, conferindo incremento de  $H_2$  no biogás produzido;
- ii. O uso da temperatura operacional de 43°C beneficiou a produção de  $H_2$ , provavelmente devido à influência positiva no metabolismo microbiano;
- iii. De maneira geral, o uso de inóculo pré-tratado e incubado a 43°C resultou em níveis elevados de rendimento de  $H_2$  (7,3 mol  $H_2$ /mol Carboidratos) quando comparado ao uso de inóculo pré-tratado e incubado a 30°C (3,1 mol  $H_2$ /mol Carboidratos).

Para a fabricação de estudos futuros, sugere-se o uso da temperatura operacional de 43°C em reatores de alta taxa para produção de  $H_2$  a partir do resíduo de frutas e verduras.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. J.; FUENTES, K. L.; ARIAS, C. A.; CHAPARRO, T. R. Production of hydrogen from beverage wastewater by dark fermentation in an internal circulation reactor: Effect on pH and hydraulic retention time. **Energy Conversion and Management**. v. 15, 2022.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 12, n. 02, p. 192 – 201, 2007.
- ARAÚJO, Fernanda Karolina Oliveira de. **Produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de indústrias de processamento de leite e frutas**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.
- BASTOS, J. A.; ALINO, J. H. L.; FRARE, L. M.; EDWIGES, T. Co-digestão de Resíduos de Frutas e Vegetais e Resíduos de Restaurante Universitário para a Produção de Biogás. **Meio Ambiente: Inovação com Sustentabilidade**. Belo Horizonte/MG. v. 01, p. 151 – 158, 2019.
- BORGES, A. C. P.; SILVA, M. S.; ALVES, C. T.; TORRES, E. A. Energias renováveis: Uma contextualização da biomassa como fonte de energia. **REDE – Revista Eletrônica do PRODEMA**. Fortaleza/CE. v. 10, n. 02, 2017.
- BRASIL. Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2003.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; RAZO-FLORES, E. Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas. **BioTecnología**. v. 11, p. 19 – 27. 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n. 03, p. 350 – 356, 1956.
- DUTTA, S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 20, n. 4, p. 1148 – 1156, 2014.
- EATON, A. et al. PHA: standard methods for the examination of water and wastewater. In: **Centennial Edition., APHA, AWWA, WEF, Washington, DC**. Centennial ed. [s. l: s. n. ]
- ELBESHBISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H. S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 79, n. October 2015, p. 656 – 668, 2017.
- ESPARZA, I.; JIMÉNEZ-MORENO, N.; BIMBELA, F.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. **Journal of Environmental Management**. v. 265, 2020.

GUERI, M. V. D.; SOUZA, S. N. M.; KUCZMAN, O. Parâmetros operacionais do processo de digestão anaeróbia de resíduos alimentares: Uma revisão. **BIOFIZ Scientific Journal**. v. 03, n. 01, p. 17 – 25, 2018.

HIDALGO, D.; PÉREZ-ZAPATERO, E.; MARTÍN-MARROQUÍN, J. M. Comparative effect of acid and heat inoculum pretreatment on dark fermentative biohydrogen production. **Environmental Research**. v. 239, n. 02, 2023.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da Digestão Anaeróbia, Purificação do Biogás, Uso e Tratamento do Digestato**. 2. ed. Concórdia/SC: Sbera & Embrapa, 2022. P. 15 - 32. ISBN 978-65-88155-02-8.

LAZARO, C. Z.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Sequential fermentative and phototrophic system for hydrogen production: An approach for Brazilian alcohol distillery wastewater. **Internatitonal Journal of Hydrogen Energy**. v. 40, n. 31, p. 9.642 – 9.655, 2015.

LETTINGA, G.; HULSHOFF POL, L.W. E ZEEMANG G. Biological wastewater treatment. Lecture notes. Wageningen Agricultural University, ed. January, 1996.

LONGARETTI, G.; MEIRA, J. A.; SGANDERLA, I. B.; MAGRO, J. D; FIORI, M. A.; MELLO, J. M. M. Estudo da atividade metanogênica específica de diferentes lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária E Ambiental**. v. 24, n. 06, p. 1.139 – 1.146, 2019.

LOPES, Herlberth Júnior Santos. **Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108, n. 08, p. 1.816 – 1.827, 2011.

MANGAYIL, R.; SANTALA, V.; KARP, M. Fermentative production of hydrogen from different sugars by *Citrobacter sp.* in batch culture. **Internatitonal Journal of Hydrogen Energy**. v. 36, p. 15.187 – 15.104, 2011.

MARCHI, C. M. D. F.; MENDES, D. B. Centros Urbanos: Práticas Alimentares e Perdas nas Centrais de Abastecimento do Brasil. **Revista Rural & Urbano**. Recife. v. 06, n. 01, p. 78 - 96, 2021.

MARTÍNEZ, W. A. M.; RODRÍGUEZ, L.S. C.; AGUDELO, A. C. H. Potencial de biogás de resíduos de frutas e verduras provenientes de restaurantes de Palmira. **Acta Agronómica**. Colombia. v. 61, n. 05, p. 97 – 98, 2012.

MAZARELI, Raissa Cristina da Silva. **Co-digestão anaeróbia de resíduos vegetais e águas residuárias de suinocultura em reatores horizontais de leito fixo e alta taxa**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias , Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

McCarty, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals: Part One Chemistry and Microbiology. **Public Works**. v. 95, p, 107 – 112, 1964.

MEENA, R. A. A.; BANU, R. J.; KANNAH, Y. R.; YOGALAKSHMI, K. N.; KUMAR, G. Biohythane production from food processing wastes – Challenges and perspectives. **Bioresource Technology**. v. 298, 2020.

MENEZES, Camila Aparecida de. **Produção de hidrogênio e compostos de valor agregado em reatores de leito granular expandido mesofílicos a partir do caldo de cana-de-açúcar**. 2018. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub>-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, n. 04, p. 947 – 953, 2007.

MENEZES, C. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions: The role of homoacetogenesis and lactic acid production. **Industrial Crops and Products**. v. 138, 2019.

NEITZEL, Jonatan. **Potencial de Produção de Biogás da Codigestão Anaeróbia de Resíduos de Frutas e Verduras e Lodo de Esgoto Primário**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2015.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026**. [s.l: s. n.]

PANDEY, A.; SINHA, P.; PANDEYB, A. Hydrogen production by dark fermentation using *Spirulina platensis* wet biomass hydrolyzate: Response surface methodological approach. **Internatitonal Journal of Hydrogen Energy**. v. 46, p. 7.137 – 7.146, 2021.

PAP, B.; GYÖRKEI, Á.; BOBOESCU, I. Z.; NAGY, I. K.; BÍRÓ, T.; KONDOROSI, É.; MARÓTI, G. Temperature-dependent transformation of biogás: producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. **Bioresource Technology**. v. 177, p. 375 – 380, 2015.

PEREIRA, A. L.; MAIA, K. M. P. A Contribuição da gestão de resíduos sólidos e educação ambiental na durabilidade de aterros sanitários. **Sinapse Múltipla**. v. 1, n. 2, 2012.

RIBAS, M. M. F. **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operado em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SILVA-JÚNIOR, F. C. G.; MENEZES, C. A.; CAVALCANTE, W. A.; ARAGÃO, O. P.; ZAIAT, M.; LEITÃO, R. C. Caracterização de resíduos de frutas e hortaliças gerados em uma central atacadista de hortaliças: Um estudo de caso para produção de energia via biogás. **Biotechnologia Industrial**. v. 18, n. 04, p. 235 – 239, 2022.

SILVEIRA, Mirian Rocho da Rosa. **Potencial de Produção de Biogás da Codigestão Anaeróbia Termofílica de Resíduos de Frutas e Verduras e Lodo de Esgoto Primário**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química , Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2017.

VIANA, M. B.; BARRAGENS, R. I.; PINHEIRO, B. M.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T.; SANTOS, A. B. The Source of Inoculum and the Method of Methanogenesis Inhibition Can Affect Biological Hydrogen Production from Crude Glycerol. **Bioenergy Research**. v. 12, p. 733 – 742, 2019.

WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 24, p. 6.339 – 6.346, 2009.