

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
ALESSANDRO DO NASCIMENTO GARRITANO

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E METANO VIA FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA UTILIZANDO HIDROLISADO DE POME OBTIDO COM O
PREPARADO ENZIMÁTICO DE *RICINUS COMMUNIS*

RIO DE JANEIRO

2017

ALESSANDRO DO NASCIMENTO GARRITANO

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E METANO VIA FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA UTILIZANDO HIDROLISADO DE POME OBTIDO COM O
PREPARADO ENZIMÁTICO DE *RICINUS COMMUNIS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão
Co-orientadora: Lívian Ribeiro Vasconcelos de Sá

RIO DE JANEIRO

2017

ALESSANDRO DO NASCIMENTO GARRITANO

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E METANO VIA FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA UTILIZANDO HIDROLISADO DE POME OBTIDO COM O
PREPARADO ENZIMÁTICO DE *RICINUS COMMUNIS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Aprovada em 31 de março de 2017

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

Lívian Ribeiro Vasconcelos de Sá, D.Sc., INT

Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc., IQ/UFRJ

Magali Christe Cammarota, D.Sc., EQ/UFRJ

Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D.Sc., EQ/UFRJ

*Dedico este trabalho:
Aos meus pais, Jerusa e Pasquale, sem os quais nada seria possível.
Se eu fosse escrever aqui tudo pelo que gostaria de agradecer, não caberia.
Ao meu irmão Fabrizioo e à minha madrinha Barbel, imprescindíveis
para o meu crescimento pessoal e constante aprimoramento.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão e Dra. Lívia Ribeiro Vasconcelos de Sá. Obrigado por acreditarem naquele garoto que chegou queimado de praia, de chinelo e bermuda no LABIC há dois anos e por transformarem o mesmo no pesquisador que sou hoje em dia. Foi uma jornada incrível de muito crescimento sob o olhar de vocês

À Dra. Ayla Sant'Ana da Silva, pelos conselhos e visão crítica sobre o meu trabalho

À Mariana Oliveira Faber e ao Leonardo Belo Pazutti, por todo o trabalho em equipe, risadas conversas e, em especial, ajuda com contas! O dia-a-dia no LABIC não seria o mesmo sem vocês.

Ao Vitor Cataldo e à Vanessa Obermuller, obrigado por terem sido IC's tão esforçados e espertos. Jamais poderia ter escolhido melhor!

Ao Bruno Coelho, Taisa Nogueira, Ingrid Miguez, Pedro Guido, Anahy Carvalho, João Henrique Rangel, Julia Finamor, Alvaro Monteiro João Pedro Rodrigues, Adriana Marçal, Lucas Duarte, Michele Caldeira, Marina Costa, Gabriel Zamith e à Aline Ramalho. Num ambiente predominantemente sério, sempre consegui ser fiel à minha pessoa dentre vocês.

Ao chip (Pedro Peres) e Rebelde (Amanda Araujo), meus eternos roomies, sem os quais a minha jornada universitária não teria sido uma pequena fração do que foi. Vocês contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional de mais maneiras que eu consigo expressar. De verdade, meu muito obrigado.

À Pega (Bruna Lucheze) e à Barbe (Jennifer Paiva), por todos os trabalhos em grupo, pelo tempo que dividimos apartamento, pelos ovos cozidos e carros de bombeiro. Foi um período incrível da minha vida e sou grato por ter dividido com vocês.

Ao Chicken (Paulo Bernardino), Messi (Leonel Teixeira) e Bagaço (Diego Graciano) que sempre agregaram a mim. Seja ao final de uma night ou durante as aulas da faculdade. A parceria de vocês é fundamental na minha vida.

À Buh (Bruna Belli) e à Clits (Ingrid Gafanhão), os meus portos seguros numa casa tão louca quanto era a nossa República. Sempre pude contar com vocês para tudo.

À Marina Mendes e à Mococa (Ariadne Gomes), pessoas de temperamento difícil que foram a personificação de que "dois bicudos não se beijam" em minha vida até aprendermos a apreciar os pontos positivos do outro. Só a gente sabe que esse nosso jeito é só disfarce pra uma barra de manteiga.

À República KXT e todos os outros moradores com quem convivi menos tempo. Nossa República tem tanta história que devia virar seriado. A UNICAMP não seria a mesma sem vocês, o IB não seria o mesmo sem vocês, minha vida não seria a mesma sem

vocês. Mais que uma República, a KXT é uma mãe e somos todos filhos dela. Agradeço imensamente por ter tido a chance de dividir tantos marcos com vocês.

À Paula Duarte (Xuxu BUBBS), Maria Carolina Muniz (Original BUBBS) e Mariana Corrêa, pelo companheirismo, amizade, conselhos e risadas que já vem há mais de dez anos.

Ao Felipe Cabral, Rafael Gomes, Gabriel Oliveira, Tiago Cabral, Ricardo Freire, Daniel Netto. Nossa história me acompanha quase que desde as barrigas das nossas mães. Espero levá-la comigo para sempre.

À Amanda Xavier, sem quem eu não teria chegado até aqui. Meu muitíssimo obrigado por me aguentar desde aquele fatídico dia na aula de educação física. Tudo o que dividimos até agora, todas as viagens, experiências, jantares, discussões e reconciliações só fazem com que eu espere, cada vez mais, que tenhamos a oportunidade de dividir uma vida. Te amo.

À minha mãe (Jerusa do Nascimento), meu pai (Pasquale Garritano), meu irmão (Fabrizio Garritano), minha madrinha-avó (Barbel de Magalhaens). Se existe uma razão por eu ter chegado onde cheguei são vocês. Não existem meios de expressar minha gratidão. Vocês são a família dos sonhos. Cada passo, cada conquista, é tudo graças a vocês. Muito, muito, muito obrigado!

“The fairest thing we can experience is the mysterious. It is the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science. He who knows it not and can no longer wonder, no longer feel amazement, is as good as dead, a snuffed-out candle.”
Albert Einstein

RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de H_2 e CH_4 via fermentação anaeróbia tem sido considerada bastante promissora por seu potencial energético, econômico e ambiental. O Efluente da Indústria do Óleo de Palma (POME – do inglês *Palm Oil Mill Effluent*), rico em triglicerídeos (TAGs), é produzido ao longo do processo de extração do óleo de palma, cuja indústria se encontra em forte crescimento, tanto no cenário brasileiro quanto mundial. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a produção biológica de H_2 e CH_4 a partir do POME. Inicialmente, realizou-se a produção de H_2 biológico a partir de três diferentes estratégias de condução do processo: fermentação de POME bruto, hidrólise simultânea à fermentação e hidrólise do POME seguida de fermentação. O efluente gerado durante a produção de H_2 , efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW – do inglês *Hydrogen Producing Liquid Waste*), foi então utilizado como matéria-prima para a produção de CH_4 . O preparado enzimático vegetal (PEV) utilizado, rico em hidrolases, foi extraído de sementes de mamona. A estratégia de hidrólise do POME seguida por fermentação anaeróbia (duas etapas) gerou os melhores resultados em termos de rendimento ($2,56 \text{ mmol } H_2/ \text{ g DQO}$) e produtividade ($0,174 \text{ mmol } H_2/ \text{ g DQO.h}$) em H_2 , além de permitir a redução da fase adaptativa de crescimento em 12 h. O processo de produção de CH_4 sequencial à produção de H_2 proporcionou a geração de $9,13 \text{ mmol } CH_4/ \text{ g DQO}$, indicando o grande potencial de aproveitamento do efluente da produção de H_2 , o HPLW.

ABSTRACT

The use of agroindustrial residues for the H₂ and CH₄ production via anaerobic fermentation has been considered very promising for its energy, economic and environmental potential. Palm Oil Mill Effluent (POME), rich in triglycerides (TAGs), is produced throughout the process of extracting palm oil, whose industry is in strong growth, both in the Brazilian and worldwide scenario. In this sense, the objective of this work was the biological production of H₂ and CH₄ from POME. Initially, the production of H₂ biological was carried out from three different strategies of process conduction: fermentation of crude POME, simultaneous hydrolysis to the fermentation and hydrolysis of POME followed by fermentation. The effluent generated during H₂ production, Hydrogen Producing Liquid Waste (HPLW), was then used as raw material for the production of CH₄. The plant enzyme preparation (PEV) used, rich in hydrolases, was extracted from castor bean seeds. The POME hydrolysis strategy followed by anaerobic fermentation (two stages) generated the best yield results (2.56 mmol H₂ / g DQO) and yield (0.174 mmol H₂ / g DQO.h) in H₂, in addition to allowing the reduction of the adaptive phase of growth in 12 h. The process of production of sequential CH₄ to the production of H₂ provided the generation of 9.13 mmol CH₄/ g DQO, indicating the great potential of use of the H₂ production effluent, the HPLW.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diferentes espécies das palmeiras produtoras de óleo de palma: *Elias guineensis* (A) e *Elias oleifera* (B). Fonte: Useful Tropical Plants 18
- Figura 2:** Adequabilidade do solo e condições climáticas para o plantio de palmeiras do gênero *Elaeis* (Fonte: <http://global.mongabay.com>) 19
- Figura 3:** Consumo de óleo de palma no mundo e suas principais aplicações. Fonte: FAOSTATS, U.N. Food and Agriculture Organization, 2010 20
- Figura 4:** Principais produtores de óleo de Palma no mundo 21
- Figura 5:** Diagrama de blocos do processamento do coco da palma até a obtenção do óleo vegetal 23
- Figura 6:** Produtos da extração do óleo de palma na indústria 25
- Figura 7:** Poder calorífico de compostos comumente utilizados como combustíveis. Fonte: WONG, WU & JUAN (2014) 27
- Figura 8:** Representação esquemática da fotólise da água realizada por cianobactérias filamentosas. PSI, fotosistema I; PSII, fotossistema II; Fd, Ferridoxina. Adaptado de (HALLENBECK; GHOSH, 2009)..... 30
- Figura 9:** Representação esquemática da produção de hidrogênio biológico por bactérias púrpuras não sulfurosas. PS, fotossistema; Q, ubiquinona; Cyt, citocromo; Fd, ferridoxina; F0 e F1, sub-unidades da ATP-sintase. Adaptado de (HALLENBECK; GHOSH, 2009) 31
- Figura 10:** Representação esquemática da fermentação anaeróbia usando lodo de estação de tratamento de esgoto como inóculo. A etapa de metanogênese é inibida devido ao pré-tratamento do lodo. Fonte: (WONG; WU; JUAN, 2014)..... 33
- Figura 11:** Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipase 35

Figura 12: Representação esquemática da beta-oxidação de ácidos graxos e produção de H ₂ . Os ciclos de β-oxidação continuam até que sejam produzidas duas moléculas de acetil-CoA.....	37
Figura 13: Representação esquemática do processo de produção sequencial de	40
Figura 14: Representação esquemática das três abordagens utilizadas para avaliar a produção de hidrogênio biológico utilizando PEV como biocatalisador	44
Figura 15: Fermentação em duas etapas para produção de hidrogênio e origem do HPLW	46
Figura 16: Curva de calibração do ácido acético. R2 = 0,99982 e resíduo = 1,842	52
Figura 17: Curva de calibração do ácido butírico. R2 = 0,99972 e resíduo = 3,724	52
Figura 18: Curva de calibração do ácido láurico. R2 = 0,99952 e resíduo = 8,151	52
Figura 19: Curva de calibração do ácido palmítico. R2 = 0,99971 e resíduo = 6,224	53
Figura 20: Curva de calibração do ácido oleico. R2 = 0,99986 e resíduo = 2,713	53
Figura 21: Cromatograma da mistura dos padrões utilizados na calibração do método analítico e seus respectivos tempos de retenção	53
Figura 22: Avaliação da produção de H ₂ a partir do POME em função do pH a 35 °C, 150 rpm por	54
Figura 23: Fermentação anaeróbia do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbio como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h.	55

Figura 24: Hidrólise e Fermentação simultânea do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h.	58
Figura 25: Bactérias anaeróbias produtoras de hidrogênio são capazes de transformar o piruvato em acetil-Co A reduzindo Ferredoxina. De modo a retornar ao seu estado de valência, a ferredoxina transfere os elétrons recebidos na oxidação do piruvato à acetil-Co A	59
Figura 26: Pré-hidrólise seguida de fermentação anaeróbica do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h. A linha tracejada marca a duração da pré-hidrólise.	60
Figura 27: Comparação entre a fermentação do POME bruto com os sistemas onde a o POME foi primeiramente hidrolisado e posteriormente fermentado para a obtenção de hidrogênio. Cinco diferentes enzimas comerciais foram utilizadas na etapa hidrolítica para efeito comparativo. Posteriormente a fermentação foi conduzida por apenas 12 h em pH 7, 45 °C e 200 rpm.	64
Figura 28: Acompanhamento da produção de metano utilizando HPLW da fermentação do POME como matéria-prima lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C por 34 dias.....	67
Figura 29: Aproveitamento da energia gerada ao longo de 34 dias da produção biológica de hidrogênio e metano via fermentação anaeróbia para 1 g de DQO ou 1 L de POME. 1 mol H ₂ = 286 KJ; 1 mol CH ₄ = 890 KJ. * valor referente à uma lâmpada de 100 W ** valor referente a um aparelho de televisão cujo consumo é de 90 W.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais matérias-primas para extração de óleo vegetal e seus rendimentos (IBGE, 2012).....	20
Tabela 2: Principais fontes renováveis e não-renováveis para produção de hidrogênio Fonte:(KAPDAN; KARGI, 2006)	28
Tabela 3: Concentração, em ppm, dos analítos utilizados para construção da curva analítica	47
Tabela 4: Características químicas do efluente do indústria de óleo de palma usado neste estudo.	51
Tabela 5: Produtividade de H ₂ de acordo com diferentes concentrações de PEV utilizadas no processo fermentativo.....	57
Tabela 6: Parâmetros de produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia do POME nas três condições estudadas	62
Tabela 7: Comparação da produção, produtividade e rendimento no processo de produção de hidrogênio biológico utilizando POME como matéria-prima....	63

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
2.2.1. Caracterizar o efluente da indústria do óleo de palma (POME);	15
2.2.2. Determinar a DQO inicial mais propícia para fermentação do POME para a produção de H ₂ ;	15
2.2.3. Avaliar o pH inicial mais favorável para a produção de H ₂ biológico;	15
2.2.4. Desenvolver a metodologia para análise dos ácidos acético, butírico, palmítico e oleico por cromatografia gasosa;	15
2.2.5. Analisar a cinética de fermentação do POME para produção de H ₂ biológico;	15
2.2.6. Dosar a atividade do PEV utilizado em diferentes pHs e avaliar a concentração ideal para utilização no meio fermentativo para produção de H ₂ ;	15
2.2.7. Analisar a cinética de fermentação do POME, com adição de PEV em uma etapa, para produção de H ₂ biológico;	15
2.2.8. Avaliar o processo fermentativo realizado em duas etapas com relação ao potencial de produção de H ₂ ;	15
2.2.9. Comparar a eficácia do PEV no processo fermentativo em duas etapas frente a utilização de enzimas comerciais para a produção de H ₂ biológico;	16
2.2.10. Avaliar o potencial de produção de CH ₄ a partir do efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW) oriundo da fermentação anaeróbia do POME	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. As palmeiras <i>Elaeis guineensis</i> e <i>Elaeis oleifera</i>	18
3.2. A indústria e o mercado do óleo de Palma	19
3.3. A problemática ambiental da produção do óleo de palma e o efluente da indústria do óleo de palma (POME)	22
3.4. Hidrogênio como vetor alternativo de energia	27

3.5.	Produção biológica de H ₂	29
3.5.1.	Aspectos gerais da biofotólise da água.....	29
3.6.	Aspectos gerais da foto-fermentação.....	31
3.6.1.	Aspectos gerais da fermentação anaeróbia	32
3.7.	Catálise enzimática do POME	35
3.8.	Produção biológica de CH ₄ utilizando como substrato o efluente líquido obtido após produção de H ₂ (HPLW) a partir do POME	38
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1.	Origem e caracterização do <i>Palm Oil Mill Effluent</i> (POME).....	42
4.1.	Origem e pré-tratamento do inóculo	42
4.2.	Origem e/ou produção dos biocatalisadores	42
4.3.	Determinação da atividade do PEV	43
4.4.	Avaliação da hidrólise de POME por diferentes concentrações de PEV	43
4.5.	Avaliação preliminar da produção de H ₂	43
4.5.1.	Avaliação da produção de H ₂ com diferentes diluições de POME.....	44
4.5.2.	Avaliação da produção de H ₂ simultânea à hidrólise do POME (processo em uma etapa).....	44
4.5.3.	Avaliação da produção de H ₂ posterior à hidrólise do POME (processo em duas etapas).....	45
4.6.	Fixação das células presentes no meio fermentativo	45
4.7.	Imunohistoquímica, citometria de fluxo e contagem celular	45
4.8.	Origem e caracterização do efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW)	46
4.9.	Metodologia para determinação dos ácidos orgânicos por Cromatografia Gasosa.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Caracterização do POME.....	50
5.2.	Adaptação e Padronização da metodologia para uso do Cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890B	51
	Utilizando o método ajustado, não houve co-eluição de nenhum analito, conforme Figura 21.....	53
5.3.	Testes de pH para fermentação anaeróbia do POME	54
5.4.	Fermentação do POME <i>in natura</i> visando a produção de H ₂	55
5.5.	Dosagem de atividade do PEV e avaliação de sua concentração no sistema.....	56
5.6.	Fermentação anaeróbia do POME com adição do PEV (uma etapa) visando a produção de H ₂	57

5.7. Pré-hidrólise do POME seguida de fermentação anaeróbia (duas etapas) visando a produção de H ₂	59
5.8. Comparação da eficácia do PEV na fermentação anaeróbia visando produção de H ₂ com as enzimas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Palatase and Lipomod 34 MDP.....	64
5.9. Fermentação anaeróbia do HPLW visando a produção de metano	66
6. CONCLUSÕES.....	71
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Capítulo 1: Introdução

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de uma era da bioeconomia exige não apenas uma mudança de padrão de produção, mas também uma profunda modernização dos processos de produção, que inclui a valorização dos resíduos gerados durante o processo agroindustrial (REGINATTO; ANTÔNIO, 2015). A utilização de matérias-primas renováveis e a sua exploração através de vários usos e aplicações têm uma importância notável (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2017). Neste contexto, o trabalho proposto apresenta uma abordagem eficiente utilizando um tratamento de pré-hidrólise com um preparado enzimático vegetal (PEV) de *Ricinus communis*, visando facilitar o acesso dos microorganismos (HAN; YE; *et al.*, 2015) aos nutrientes presentes no Efluente da Indústria do Óleo de Palma (POME – do inglês Palm Oil Mill Effluent) durante a fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄).

O POME, rico em triacilgliceróis, é produzido ao longo do processo de extração do óleo de palma, uma indústria em rápido crescimento no cenário global (AHMED *et al.*, 2015a) e o PEV consiste em uma preparação enzimática hidrolítica não comercial com elevada atividade de lipase, obtida a partir de sementes de *Ricinus communis* dormentes (CAVALCANTI *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram analisadas três diferentes abordagens para produção de hidrogênio biológico: fermentação direta do POME bruto, hidrólise simultânea e fermentação do POME (uma etapa) e hidrólise e fermentação em separado do POME (duas etapas).

No processo de duas etapas, foi realizada a hidrólise anteriormente à fermentação, com o objetivo de produzir hidrogênio biológico com uma maior produtividade conforme reportado na literatura até o presente momento (RASDI *et al.*, 2012). A adição da etapa de hidrólise permitiu que a produção de H₂ ocorresse em um tempo 75% menor do que no processo de fermentação do POME bruto. Além disso, esta estratégia ocasionou um aumento de 14% no rendimento total do processo.

A notável diminuição da duração da fase adaptativa e o aumento na taxa de produção de H₂ melhoram consideravelmente o potencial para a produção

deste combustível por meio do processo de fermentação anaeróbica e a sua atratividade como uma possível alternativa verde à produção de H₂. Além disso, um estudo da capacidade hidrolítica de enzimas comerciais também foi realizado para comparar com o desempenho de PEV.

A partir do efluente gerado no processo produção de H₂, HPLW, foi possível ainda apontar os potenciais de geração de CH₄ e de redução de DQO, em relação ao POME bruto, em um processo sequencial de produção de H₂ e CH₄.

A presente dissertação de mestrado foi dividida em seis capítulos e está estruturada da seguinte forma: inicia-se com este capítulo 1 que trata da apresentação do tema de tese, seguido pelo capítulo 2 com o referencial teórico que reporta: os aspectos biológicos do cultivo das palmeiras produtoras dos frutos dos quais se extraem o óleo de palma, o panorama da indústria desse óleo no Brasil e no mundo; a problemática ambiental da produção dos resíduos que essa indústria gera; potenciais usos para o Palm Oil Mill Effluent (POME) e possíveis pré-tratamentos do mesmo para posterior produção de biogás.

Em seguida, no capítulo 3, estão apresentadas as justificativas da importância do tema da dissertação, além dos objetivos, geral e específicos. No capítulo 4 estão descritas todas as metodologias experimentais e analíticas utilizadas para a execução da presente dissertação de forma detalhada. Na sequência, no capítulo 5, apresentam-se os resultados discutidos de acordo com os dados experimentais obtidos e comparados, quando procedente, com os resultados reportados na literatura. Por fim, no capítulo 6 relatam-se as principais conclusões e no capítulo 7, sugestões para trabalhos futuros.

O desenvolvimento desta dissertação possibilitou a comunicação dos seguintes trabalhos de produção científica e tecnológica:

Artigos em periódicos:

Anexo 1 - (*Under Review*) Garritano A. N., de Sá, L. R. V, Aguiéiras E. C. G., Freire D. M. G., Ferreira-Leitão, V. S. Efficient POME hydrolysis by *Ricinus*

communis enzyme preparation and sequential production of fermentative biohydrogen in a two-step process. *Green Chemistry*

Anexo 2 - (*Under Review*) Garritano A. N., Faber M. O., de Sá, L. R. V, Ferreira-Leitão, V. S. Palm Oil Mill Effluent as Raw Material for Biohydrogen and Methane Production via Dark Fermentation: A review

Apresentação oral em evento:

Anexo 3 - Evaluation of a one- and two-step process of POME hydrolysis by plant enzyme preparation and sequential production of biohydrogen Garritano A. N., de Sá, L. R. V, Aguiéiras E. C. G., Freire D. M. G., Ferreira-Leitão, V. S. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 2016**

Trabalhos publicados em eventos internos:

Anexo 4 - Avaliação da hidrólise enzimática do POME em uma e duas etapas para produção de hidrogênio Garritano A. N., de Sá, L. R. V, Aguiéiras E. C. G., Freire D. M. G., Ferreira-Leitão, V. S. TERCEIRO WORKSHOP DE COMPETÊNCIAS INTERNAS DO INT

Anexo 5 - Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia a partir de fração hemicelulósica de biomassa de cana-de-açúcar Medeiros V. C. A., de Sá L. R. V., Garritano, A. N., da Silva, A. S., Ferreira-Leitões V. S. TERCEIRO WORKSHOP DE COMPETÊNCIAS INTERNAS DO INT

Capítulo 2: Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um processo de produção de hidrogênio biológico e metano utilizando POME como matéria-prima e o preparado enzimático vegetal de *Ricinus communis* como biocatalisador para disponibilização dos nutrientes contidos no POME

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Caracterizar o efluente da indústria do óleo de palma (POME);
- 2.2.2. Determinar a DQO inicial mais propícia para fermentação do POME para a produção de H₂;
- 2.2.3. Avaliar o pH inicial mais favorável para a produção de H₂ biológico;
- 2.2.4. Desenvolver a metodologia para análise dos ácidos acético, butírico, palmítico e oleico por cromatografia gasosa;
- 2.2.5. Analisar a cinética de fermentação do POME para produção de H₂ biológico;
- 2.2.6. Dosar a atividade do PEV utilizado em diferentes pHs e avaliar a concentração ideal para utilização no meio fermentativo para produção de H₂;
- 2.2.7. Analisar a cinética de fermentação do POME, com adição de PEV em uma etapa, para produção de H₂ biológico;
- 2.2.8. Avaliar o processo fermentativo realizado em duas etapas com relação ao potencial de produção de H₂;

2.2.9. Comparar a eficácia do PEV no processo fermentativo em duas etapas frente a utilização de enzimas comerciais para a produção de H₂ biológico;

2.2.10. Avaliar o potencial de produção de CH₄ a partir do efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW) oriundo da fermentação anaeróbia do POME.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. As palmeiras *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*

O gênero *Elaeis* está contido na família das Arecaceae, uma das famílias mais antigas de angiospermas, com fósseis que datam do período Cretáceo (SINGH, RAJINDER *et al.*, 2013). O gênero é constituído de somente duas espécies, *Elaeis guineensis*, a qual é nativa do oeste da África e do sudeste asiático, e *Elaeis oleifera*, nativa da América do Sul e Central (COMBRES *et al.*, 2013). Cada uma dessas espécies de palmeira apresenta suas particularidades no que tange o principal produto extraído do seu fruto: o óleo. Dentre as principais diferenças, pode-se destacar que a espécie americana apresenta maior resistência contra pragas, maior facilidade de colheita dos frutos e teor mais alto de ácidos graxos insaturados (MBA; DUMONT; NGADI, 2015). Já a espécie asiática, o rendimento de óleo por kg/ ha plantado é maior, consolidando os países dessa região como os maiores produtores e exportadores de óleo de palma atualmente (SINGH, RAJINDER *et al.*, 2013).

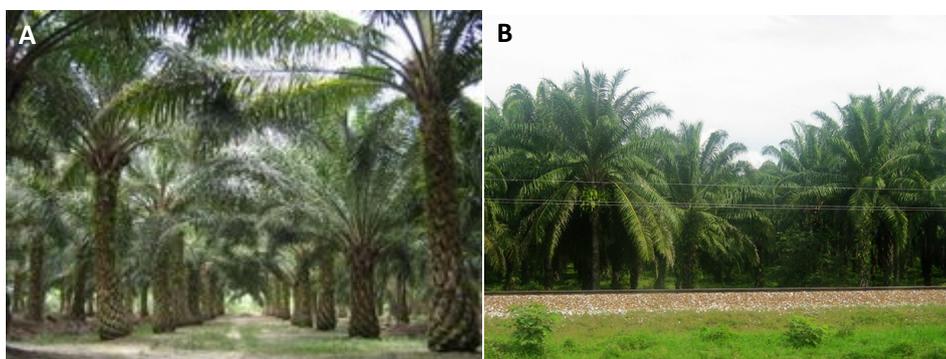


Figura 1: Diferentes espécies das palmeiras produtoras de óleo de palma: *Elaeis guineensis* (A) e *Elaeis oleifera* (B). Fonte: Useful Tropical Plants

No sudeste asiático, a atividade comercial desse óleo se iniciou entre as ilhas Maurício e Amsterdão, no ano de 1848. Tendo em vista a crescente demanda por tal óleo, começou-se a plantar a palmeira no início do século XX e, mesmo com todas as adversidades, o plantio se desenvolveu num curto espaço de tempo (SINGH, RAJINDER *et al.*, 2013). Dentre os principais empecilhos para o cultivo de palma, pode-se citar um longo ciclo reprodutivo - de 10 a 12 anos - grande demanda por água e a necessidade constante de sol (EDEM, 2002). Quando o fotoperíodo mínimo de 10 horas diárias não é

obedecido, pode haver deformações no verticilo floral, baixa atratividade de polinizadores ou até mesmo a infertilidade de sementes geradas, principal razão pela qual os principais países produtores e suas indústrias estão situados em latitudes de clima equatorial (Figura 2) (COMBRES *et al.*, 2013).

3.2. A indústria e o mercado do óleo de Palma

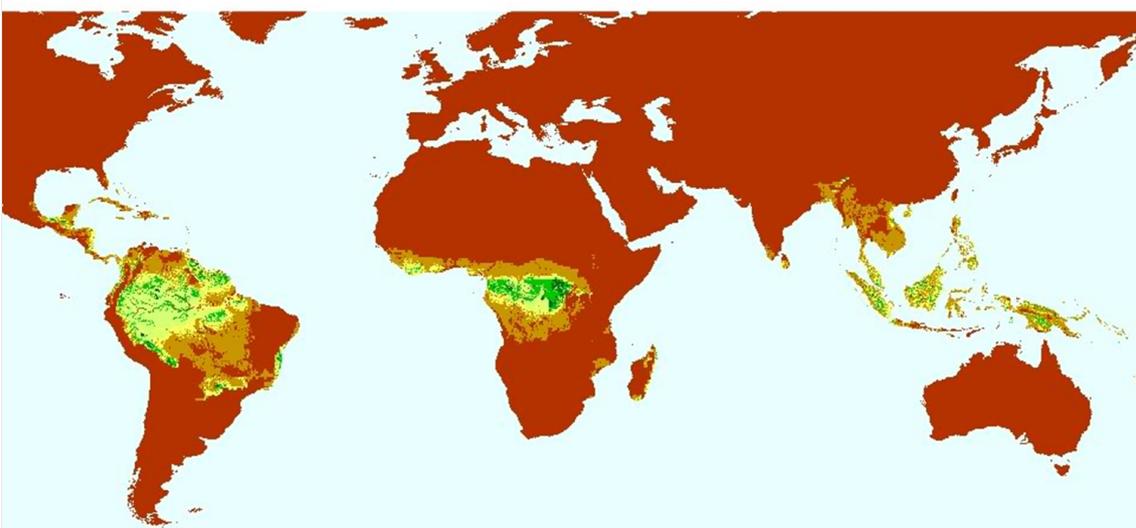


Figura 2: Adequabilidade do solo e condições climáticas para o plantio de palmeiras do gênero *Elaeis* (Fonte: <http://global.mongabay.com>)

A indústria da palma vem se desenvolvendo rapidamente, pois dentre os principais óleos vegetais comercializados, o óleo de palma consiste em um dos mais rentáveis e versáteis, como pode ser observado na Tabela 1 (IBGE, 2012). Além de ser um dos óleos vegetais com maior rendimento de óleo por hectare plantado (quase três vezes mais que o de milho, principal óleo produzido pelos EUA), seu potencial de produção de óleo é quase cinco vezes superior ao óleo de soja, muito usado no Brasil.

Tabela 1: Principais matérias-primas para extração de óleo vegetal e seus rendimentos (IBGE, 2012)

Matéria-Prima	Rendimento do cultivo (Kg/Ha)	Conteúdo de óleo considerado (%)	Potencial de óleo (Kg/Ha)	Uso de terra (Ha/ton de óleo)
Palma	9479	20	1896	0,5
Amendoim	2018	41,5	837	1,2
Milho	3254	6,5	211	4,7
Soja	2558	18,5	473	2,1
Côco	3146	57	1793	0,6
Algodão	459	15	69	14,5
Mamona	643	46	296	3,4
Girassol	1342	48	644	1,6
Canola	1200	42	504	2

O óleo também tem diversas aplicações, tais como sua utilização na cozinha doméstica e na indústria de alimentos de um modo geral, porém sendo também bastante utilizado na oleoquímica e no setor de cosméticos e higiene pessoal (Figura 3) (FAOSTATS, 2010).

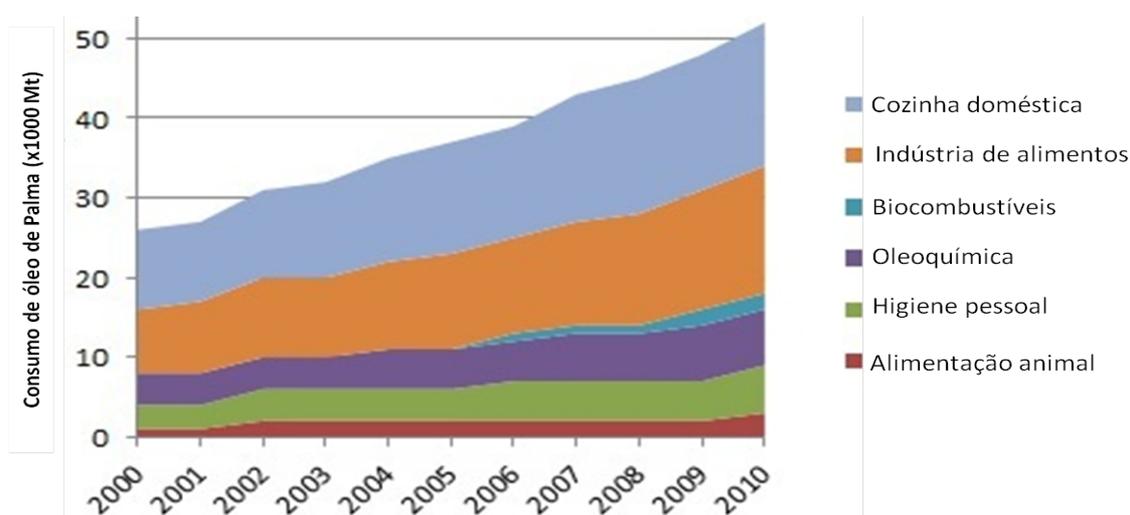


Figura 3: Consumo de óleo de palma no mundo e suas principais aplicações. Fonte: FAOSTATS, U.N. Food and Agriculture Organization, 2010

Os principais produtores de óleo de palma na atualidade são, justamente, os que aparecem com condições propícias para o plantio da palmeira. Neste sentido, Malásia e Tailândia respondem por, aproximadamente, 84,5% da produção mundial desse óleo (Figura 4).

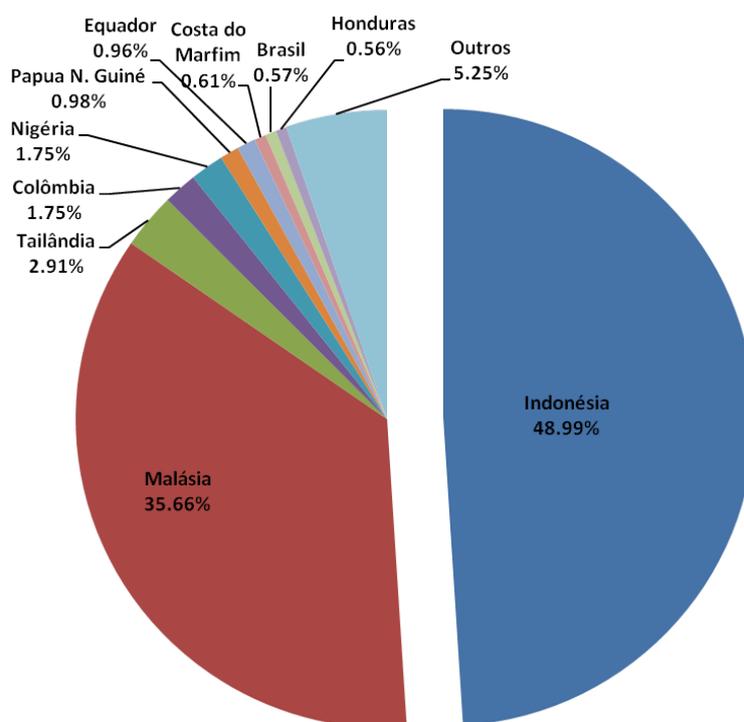


Figura 4: Principais produtores de óleo de Palma no mundo
Fonte: FAOSTATS, U.N. Food and Agriculture Organization, 2014

Com a saturação das áreas de plantio nos países asiáticos, é possível prever um crescimento do número de produtores de óleo de palma em países da América Central e do Sul e África Ocidental e Oriental (CASTIBLANCO; MORENO; ETTER, 2015; RESEARCH, 2015). Além disso, com o crescente aumento da demanda, a qual duplicou nos últimos 5 anos, Brasil, Tailândia e Colômbia vêm aumentando suas áreas de plantio rapidamente. Para o Brasil, o cenário é bastante otimista. É esperado que até 2020 o país ocupe a 3ª posição no ranking mundial de produtores de óleo de palma, com uma área de aproximadamente, 5 milhões de hectares plantados (FAOSTATS, 2014).

Outro motivo pelo qual o Brasil deve crescer no cenário dessa *commodity* é a demanda interna. Há uma previsão de consumo de 520.000 toneladas de óleo de palma, contra 240.00 toneladas de produção no país, o que demonstra a necessidade de importação deste produto para suprir a demanda nacional reforçando a previsão feita sobre a expansão da produção interna deste óleo (KUSS *et al.*, 2015). Desta forma, o país vem se mostrando um forte concorrente na produção de óleo de palma, dada sua disponibilidade de áreas favoráveis ao plantio de palma, principalmente nos estados da Bahia, Amazônia e Pará, sendo estes, responsáveis por 95% da produção de óleo de palma no país (ANDRÉ CREMONEZ *et al.*, 2015). Com o aumento da produção de óleo de palma, aumenta-se, também, a produção dos resíduos oriundos do processamento do fruto, que podem ser consideravelmente danosos ao ambiente quando não são adequadamente tratados.

3.3. A problemática ambiental da produção do óleo de palma e o efluente da indústria do óleo de palma (POME)

O processamento do óleo de palma gera biomassa, composta de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e um efluente líquido (rico em proteínas, lipídios, minerais e carboidratos), como resíduos (Figura 5) (SUKSONG; KONGJAN; O-THONG, 2015; YAKUB *et al.*, 2015).

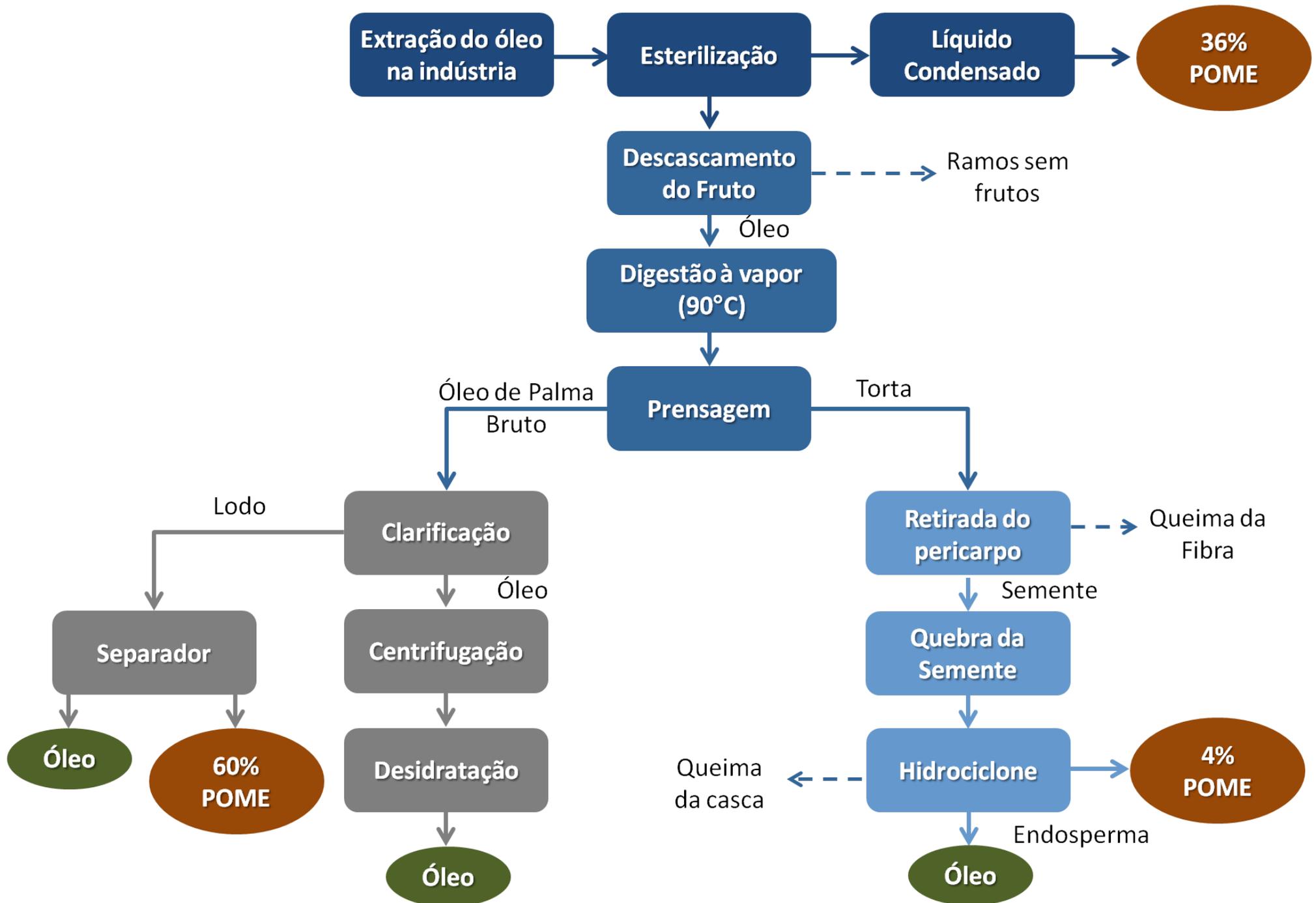


Figura 5: Diagrama de blocos do processamento do coco da palma até a obtenção do óleo vegetal
 Fonte: (MBA; DUMONT; NGADI, 2015)

Em uma indústria, durante a esterilização, os cachos de frutos passam por um cozimento, em alta temperatura e pressão, que não só desnatura qualquer lipase presente no endocarpo do fruto, como também amacia a estrutura fibrosa da casca (MBA; DUMONT; NGADI, 2015). Além disso, o tratamento também é responsável pela ruptura parcial dos lipoplastos, tipo celular que armazena óleos vegetais. Esse procedimento gera 36% do volume total do principal efluente gerado por essa indústria, o *Palm Oil Mill Effluent* (POME) (RUPANI; SINGH, 2010). Uma vez finalizado esse processo, os cachos são levados a um tambor-rotador para separação dos frutos. Esses, então, são encaminhados à fervura, para garantir a máxima extração do óleo na prensagem (IGWE; ONYEBADO, 2007). Após esta etapa, o óleo segue para um tanque de clarificação, onde é repetidamente tratado, até que adquira as propriedades desejadas. É durante o processo de clarificação que 60% do volume total de POME é gerado na indústria da palma (MBA; DUMONT; NGADI, 2015).

A indústria de óleo de palma gera 184 milhões de toneladas de resíduo anualmente (PUDUKUDY *et al.*, 2014). Para cada Kg de óleo de palma produzido, 4 kg de biomassa seca são gerados. Atualmente, toda a biomassa seca é queimada, à exemplo do que ocorre em diversas outras indústrias agrícolas (YAKUB *et al.*, 2015). Essa biomassa é composta por lignina, hemicelulose e celulose. Dentre esses compostos, aquele com maior poder combustível é a lignina (JOHNSON, 2010). Estudos recentes vem demonstrando a possibilidade de conversão da celulose e da hemicelulose em di-, tri- e polissacarídeos de alto valor agregado (BAE *et al.*, 2016; CHING; HARITOS; TANKSALE, 2016). Vale destacar, entretanto, que tais processos ainda são custosos para realização em escala industrial.

O POME, é produzido devido ao uso de água nas etapas de esterilização do mosto, após a separação do caroço e da casca em um hidrociclone e após a clarificação do óleo no processo de extração do óleo de palma. Para cada tonelada de óleo de palma produzida, são necessárias, em média, sete toneladas de água para o processamento, gerando assim, aproximadamente 2,5 toneladas de litros de POME, o que corresponde a 50%

dos produtos resultantes da indústria (Figura 6) (KAMARUDIN *et al.*, 2015; RUPANI; SINGH, 2010; URBANIEC; BAKKER, 2015).

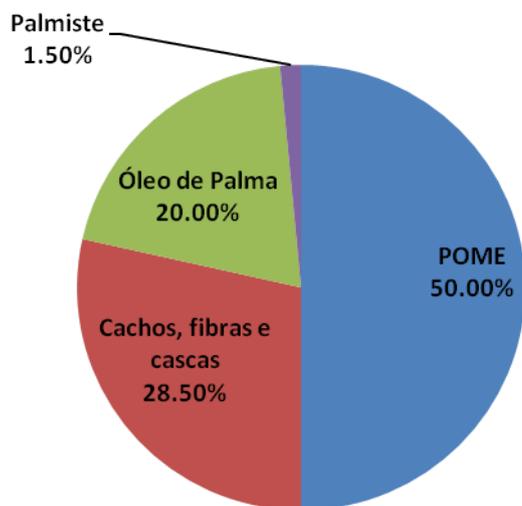


Figura 6: Produtos da extração do óleo de palma na indústria
Fonte: (HANSEN *et al.*, 2015)

O POME consiste em um material complexo, que contém altas concentrações de material orgânico, óleos e graxas (incluindo triacilgliceróis) e sólidos suspensos (AMAT *et al.*, 2015; CHONG *et al.*, 2009; KRISHNAN *et al.*, 2016; LIU; HUANG; WEN, 2016). Assim, um tratamento adequado é necessário antes de desprezá-lo em corpos d'água (IGWE; ONYEGBADO, 2007).

Este efluente apresenta elevadas cargas de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), devido a sua alta concentração de matéria orgânica, tornando-o altamente poluente, apesar de não-tóxico (CHIN *et al.*, 2013; LANKA; PYDIPALLI; LATHA, 2015).

Dada a elevada DQO do POME, não é possível descartá-lo diretamente nos corpos hídricos, sendo necessário um tratamento prévio. O POME é comumente tratado por métodos físico-químicos, como adsorção, coagulação-floculação e filtração por membranas, porém, de forma não muito eficaz. De modo geral, estações de tratamento são vistas como investimentos não-rentáveis pelas indústrias, o que muitas vezes leva a um tratamento insuficiente dos efluentes e conseqüente poluição ambiental (CHAISRI *et al.*, 2007; KAMARUDIN *et al.*, 2015; RUPANI; SINGH, 2010).

Com base nas previsões citadas anteriormente a respeito da expansão deste mercado, faz-se necessário o uso de tecnologias para minimizar o impacto ambiental provocado por esta indústria. Dessa forma, há crescente preocupação com o aproveitamento da biomassa de origem industrial, visando minimizar o desperdício de materiais com potencial de novas aplicações, como forma alternativa para recursos não renováveis.

Um dos métodos que vêm sendo estudados consiste no uso de processos biológicos para tratamento e co-produção de produtos com valor agregado (HILIGSMANN *et al.*, 2011; RESNICK, 2004; SINGH, LAKHVEER; WAHID, 2015). A fermentação do POME pode gerar produtos de interesse econômico, tais como inseticidas, solventes, antibióticos, ácidos graxos e enzimas. Além disto, é observado que na produção de biodiesel e bioetanol por microalgas, o POME pode ser utilizado como fonte nutricional destes organismos, devido a sua elevada concentração de nitrato e orto-fosfato (GUO *et al.*, 2013; HABIB *et al.*, 1997; LANKA; PYDIPALLI; LATHA, 2015; LEAÑO; ANCENO; BABEL, 2012).

Uma outra alternativa, essa com interesse energético, é a fermentação anaeróbia do POME para produção de biogás. Estudos apontam que 100 toneladas de efluente são capazes de gerar cerca de 400 m³ de biogás, o qual é composto de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂) (CHAISRI *et al.*, 2007; NURLIYANA *et al.*, 2015; O-THONG *et al.*, 2008; PARTHASARATHY, PRAKASH; NARAYANAN, 2014).

3.4. Hidrogênio como vetor alternativo de energia

As mudanças climáticas globais, provenientes do efeito estufa, despertam crescente preocupação com o futuro das fontes energéticas do planeta. Neste cenário, o hidrogênio representa uma fonte promissora de energia, pois sua combustão é capaz de liberar mais energia que outros combustíveis, como metano, diesel, gás natural e etanol, além de ser um combustível limpo por produzir apenas água como subproduto de combustão (Figura 7) (O-THONG *et al.*, 2008; SARMA *et al.*, 2015).

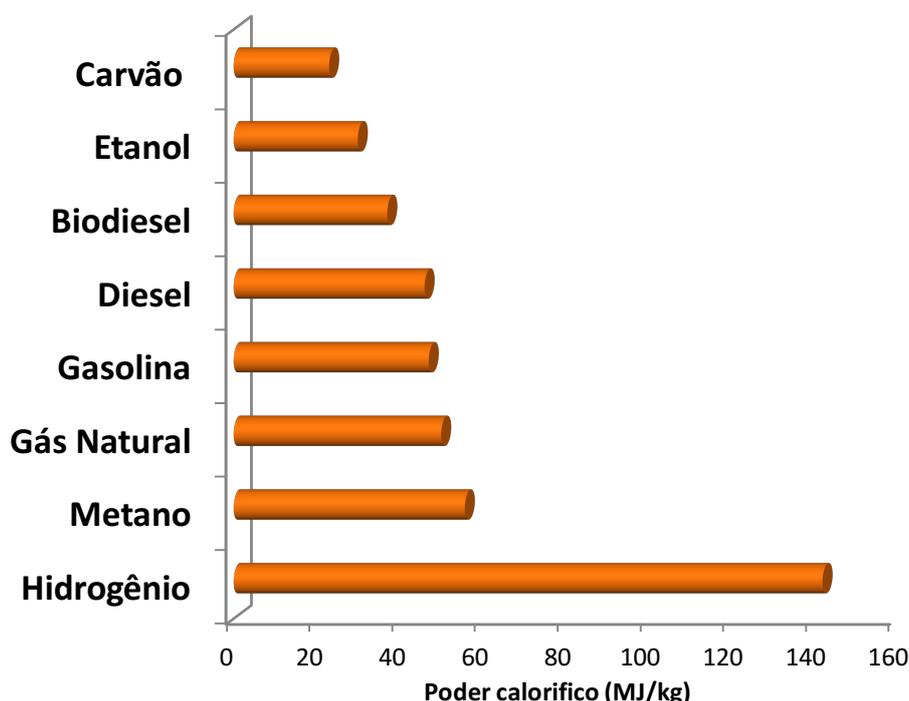


Figura 7: Poder calorífico de compostos comumente utilizados como combustíveis. Fonte: WONG, WU & JUAN (2014)

Em condições normais de pressão e temperatura, este gás é insípido, inodoro, incolor e apesar de ser um gás abundante no meio ambiente, dificilmente é possível encontrá-lo em sua forma molecular, por este motivo é denominado vetor energético (BABITA; SRIDHAR; RAGHAVAN, 2011).

Este gás apresenta diversas aplicações industriais, tais como a fabricação de amônia, produção de metais, hidrogenação de óleos e gorduras, combustível de propulsão de foguetes, processamento de combustíveis fósseis e setor de transportes (BOCKRIS, 2013).

Atualmente, a produção de H₂ parte de 3 diferentes fontes, sendo duas renováveis e uma não-renovável. Dentre os renováveis, temos a produção de

H₂ partindo de água e da biomassa, ao passo que a produção de H₂ não-renovável parte de combustíveis fósseis. Alguns dos métodos mais utilizados para a produção de H₂ estão listados na Tabela 2 (BRAGA *et al.*, 2013; PUDUKUDY *et al.*, 2014; RESNICK, 2004).

Tabela 2: Principais fontes renováveis e não-renováveis para produção de hidrogênio
 Fonte:(KAPDAN; KARGI, 2006)

Fontes	Matéria-prima	Métodos
Renováveis	Biomassa	Processos biológicos (biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbia) Gaseificação da biomassa Reforma a vapor do etanol Reforma em fase líquida
	Água	Eletrólise da água Processos foto-eletróquímicos Processos termoquímicos
Não-renováveis	Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados Gaseificação do carvão

Dentre os métodos citados, o H₂ obtido a partir de fonte não-renovável corresponde a aproximadamente 95% da produção mundial. Entre esses 95%, 40% são produzidos pela reforma a vapor do gás natural, seguido pela oxidação de hidrocarbonetos pesados (30%). A obtenção de H₂ a partir de fontes renováveis soma somente 5%, dos quais 4% são obtidos a partir de processos que usam a água como matéria-prima. A produção biológica contribui com apenas 1% no percentual de produção de H₂ no cenário atual (DAS *et al.*, 2006).

Devido à abundância de biomassa residual de diversos processos agroindustriais, o desenvolvimento de tecnologias para produção biológica de H₂ vem sendo estimulado por diversas iniciativas governamentais (Horizon 2020, UE; Hydrogen from Biomass NREL/E.U.A. Department of Energy; Rede Brasileira de Hidrogênio, Brasil). Os processos biológicos para produção de H₂ tem mostrado grande potencial devido a capacidade de utilizar tais resíduos, além de serem adequados para produção descentralizada de energia em instalações de pequena escala, em locais onde tais efluentes estão disponíveis, evitando assim custos adicionais com transporte (KOTAY E DAS, 2008). Além disso, os processos biológicos são geralmente operados à

temperatura e pressão ambientes, levando assim a um menor consumo de energia e a balanços energéticos favoráveis (BALAT; KIRTAY, 2010; KUMARI, SINU; DAS, 2015).

3.5. Produção biológica de H₂

Apesar de ser responsável por somente 1% da produção total de H₂, a produção por via biológica vem recebendo grande atenção pela possibilidade de reaproveitamento de resíduos e efluentes; por apresentar menor consumo de energia; por ocorrerem em pressão e temperatura brandas; além de ser uma alternativa econômica, se implementada em locais onde os resíduos e a biomassa já estão disponíveis (BOCKRIS, 2013). As principais vias de produção de H₂ biológico são a biofotólise da água, a foto-fermentação e a fermentação anaeróbia (OH *et al.*, 2011).

3.5.1. Aspectos gerais da biofotólise da água

As enzimas das famílias hidrogenase e nitrogenase são responsáveis por catalisar a produção de hidrogênio via fotólise da água, em um processo que consiste em remover elétrons de uma molécula de água e utilizá-los para reduzir prótons em hidrogênio (H₂) (TEE *et al.*, 2017). Neste processo, cianobactérias e microalgas utilizam a água como fonte de prótons e elétrons e o CO₂, presente no meio, como fonte de carbono para crescimento celular. É justamente durante esse crescimento que o hidrogênio é produzido (KUMARI, SHEENA; NASR; KUMAR, 2017).

Durante a biofotólise, a energia luminosa é usada para catalisar a quebra da água no centro de reação do fotossistema 2 (PS II) e os elétrons gerados saltam através do esquema-Z (Figura 8). Os elétrons chegam à molécula de ferredoxina (Fd), que, por sua vez, os doa às hidrogenases, catalisando a formação de hidrogênio (KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010; MERSCH *et al.*, 2015).

No caso de cianobactérias filamentosas, as enzimas responsáveis por catalisar a formação de hidrogênio são as nitrogenases. Apesar de este método utilizar água como substrato e não necessitar do dispêndio de ATP por

parte das bactérias, há a obrigatoriedade de iluminação constante além de ser facilmente inibido na presença de O₂. Dessa forma, uma possível aplicação em larga escala ficaria comprometida.(KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010)

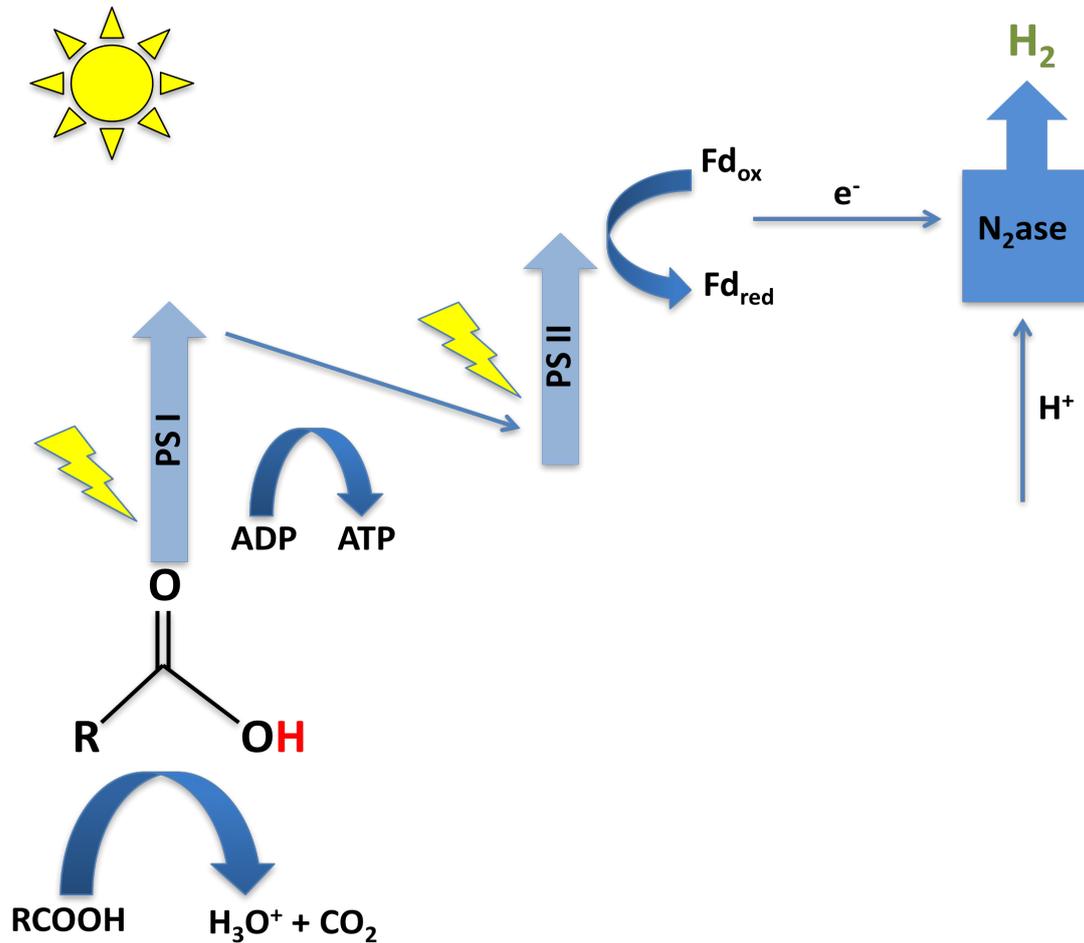


Figura 8: Representação esquemática da fotólise da água realizada por cianobactérias filamentosas. PSI, fotosistema I; PSII, fotossistema II; Fd, Ferridoxina. Adaptado de (HALLENBECK; GHOSH, 2009)

3.6. Aspectos gerais da foto-fermentação

Bactérias púrpuras não sulfurosas constituem um grupo não-taxonômico de microorganismos capazes de produzir H_2 (IZU *et al.*, 2001). Apesar de serem capazes de crescer numa gama de condições (aeróbios facultativas, podem crescer na ausência ou na presença de luz, autótrofas ou heterótrofas) a produção de hidrogênio ocorre somente em condições específicas de crescimento fotoheterotrófico, ou seja, na presença de luz e em ambientes com disponibilidade de matéria orgânica (ÖZGÜR; PEKSEL, 2013). Durante a fase de crescimento, as mesmas usam compostos orgânicos de cadeia curta como doadores de elétrons para formarem ATP para seus processos metabólicos. Os elétrons obtidos durante a oxidação desses compostos viajam por uma série de carreadores de elétrons (Figura 9) e são entregues à Fd, as quais os entregam às nitrogenases. Essas, quando em ausência de nitrogênio, são capazes de atuar como hidrogenases, reduzindo prótons e catalisando a formação de H_2 . Como essas bactérias não são capazes de formar O_2 , não há inibição de nitrogenases (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

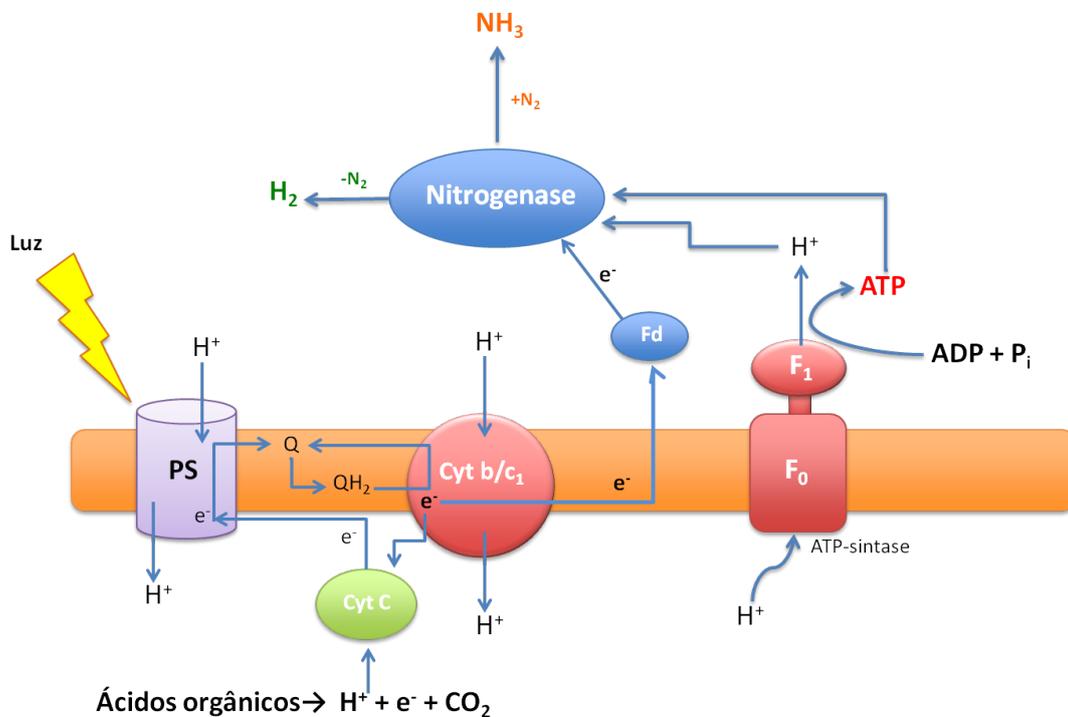


Figura 9: Representação esquemática da produção de hidrogênio biológico por bactérias púrpuras não sulfurosas. PS, fotossistema; Q, ubiquinona; Cyt, citocromo; Fd, ferridoxina; F0 e F1, sub-unidades da ATP-sintase. Adaptado de (HALLENBECK; GHOSH, 2009)

Além disso, podem utilizar diferentes resíduos como substrato, desde que não apresentem grande complexidade. Em contrapartida, esse sistema necessita de um biorreator adaptado para maximizar o aproveitamento da luz solar ou de alguma outra fonte luminosa, além de liberar grandes quantidades de CO₂ conjuntamente ao H₂ produzido (CHENG *et al.*, 2012; HEMSCHEMEIER; MELIS; HAPPE, 2009).

3.6.1. Aspectos gerais da fermentação anaeróbia

A fermentação anaeróbia é um processo biológico, que ocorre na ausência de oxigênio, durante o qual, bactérias transformam material orgânico em compostos de cadeias menores, tais como os ácidos acético, butírico, isobutírico e propiônico, etanol, butanol, metano, dióxido de carbono e, hidrogênio (URBANIEC; BAKKER, 2015).

Um sistema que faz uso de culturas puras para obtenção dos produtos de interesse é, por vezes, limitado quando o enfoque é o uso de resíduos complexos provenientes de indústrias (HILIGSMANN *et al.*, 2011; MISHRA; ROY; DAS, 2015). Isso se dá pelo fato de que uma mesma espécie de bactéria dificilmente pode promover a lise de diferentes moléculas complexas, visto que seu metabolismo é adaptado para degradar determinados substratos em energia e impossibilitado de fazer o mesmo para outros (MISHRA; ROY; DAS, 2015). Por este motivo, alguns processos fermentativos anaeróbios fazem uso de culturas mistas, o que promove uma maior robustez ao sistema (AHMED *et al.*, 2015a; MAMIMIN *et al.*, 2012; O-THONG *et al.*, 2008). O uso de consórcios microbianos permite a degradação de efluentes complexos, ricos em moléculas de cadeias maiores, como lipídios, proteínas e carboidratos, os quais são comumente encontrados em materiais residuais provenientes de indústrias (HUNG; CHANG; CHANG, 2011).

A fermentação de tais materiais complexos por consórcios microbianos pode ser dividida em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (GHIMIRE *et al.*, 2015). Na etapa de hidrólise, a matéria orgânica complexa é degradada em compostos menores devido a ação das enzimas extracelulares secretadas pelas bactérias hidrolíticas. Durante a acidogênese, microorganismos são capazes de metabolizar esses compostos

em ácidos orgânicos, que são comumente consumidos durante a acetogênese. O consumo dos ácidos orgânicos para formar acetato e butirato permite a co-produção de H_2 . Se o processo continuar, o H_2 é combinado com o dióxido CO_2 presente no meio e a formação de CH_4 é observada (Figura 10) (KAPDAN; KARGI, 2006; KUMARI, SINU; DAS, 2015; NTAIKOU; ANTONOPOULOU; LYBERATOS, 2010; ÖZGÜR; PEKSEL, 2013).

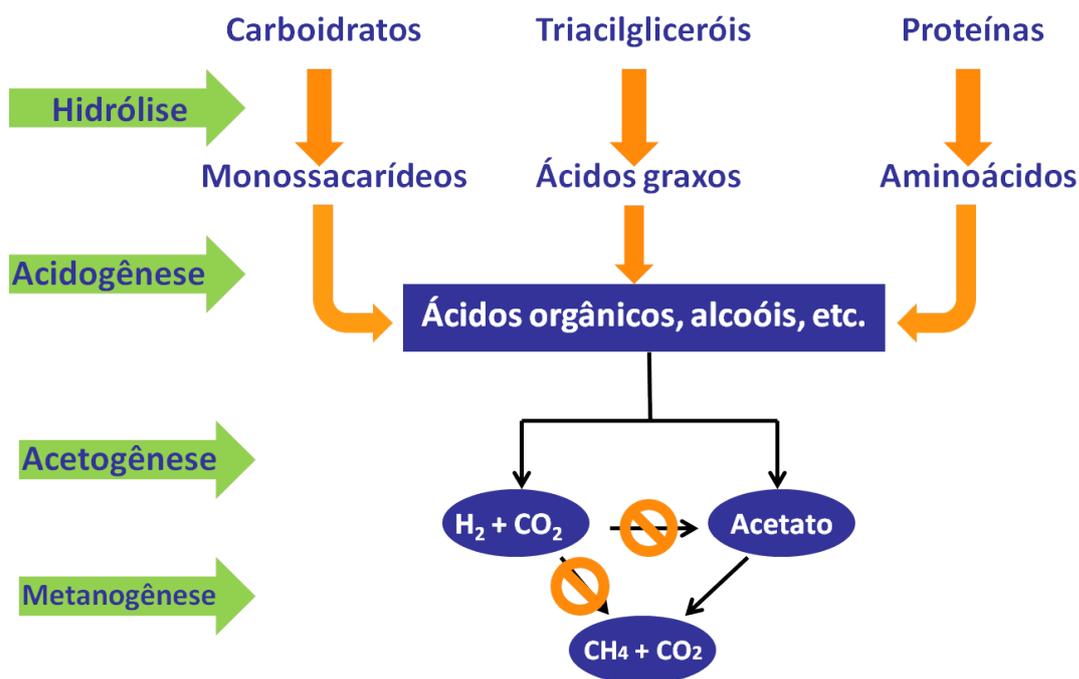


Figura 10: Representação esquemática da fermentação anaeróbia usando lodo de estação de tratamento de esgoto como inóculo. A etapa de metanogênese é inibida devido ao pré-tratamento do lodo. Fonte: (WONG; WU; JUAN, 2014)

A fermentação anaeróbia tem uma série de vantagens quando comparada com outros processos biológicos, não só devido ao seu maior rendimento em H_2 , mas também devido à co-geração de acetato, e outros metabólitos secundários com valor agregado. A desvantagem mais acentuada que deve ser ponderada é que se o processo não for realizado corretamente, pode haver a conversão do H_2 obtido em CH_4 (CHENG *et al.*, 2015; SARMA *et al.*, 2015).

Assim sendo, visando minimizar a conversão do H_2 obtido em CH_4 , a estratégia mais utilizada consiste no pré-tratamento do inóculo utilizado. Esta

etapa é extrema importância quando se utiliza lodo anaeróbio como inóculo para a produção de H₂

Um dos pré-tratamentos mais reportados na literatura é o pré-tratamento ácido, que se baseia na capacidade de esporulação de bactérias produtoras de H₂ (BAGHCHEHSARAEI *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2015; DE SÁ *et al.*, 2013). Diversas bactérias consumidoras de H₂ são incapazes de esporular, e quando submetidas as condições extremas de pH tem sua parede lisada e o conteúdo intra-celular extravasado (HAWKES *et al.*, 2002).

Além da possível conversão do produto de interesse em CH₄, a fermentação anaeróbia é um processo que pouco reduz a DQO do resíduo utilizado como matéria-prima, tornando necessário um tratamento do efluente após a fermentação (MOHAMMADI; IBRAHIM; SUF; *et al.*, 2011; O-THONG; PRASERTSAN; INTRASUNGKHA, 2008).

De modo a maximizar o rendimento de H₂ obtido nos processos fermentativos e evitar a obrigatoriedade de um pós-tratamento do efluente da fermentação anaeróbia, um processo seqüencial, combinando fermentação anaeróbia e foto-fermentação vem sendo estudado e resultados promissores são observados (CHAI PRAPAT; LAKLAM, 2011; CHENG *et al.*, 2012). Os organismos foto-fermentativos utilizam metabólitos secundários oriundos da fermentação anaeróbia como substrato para a produção de H₂, aumentando a produção de H₂. Embora alguns dos metabólitos secundários produzidos não prejudiquem o crescimento celular, a concentração de acetato é crítica nos meios de fermentação e pode reduzir a produção de H₂. O aumento da concentração de ácido no meio irá alterar a condição ideal para a produção de H₂ (ANDROGA *et al.*, 2012; BIANCHI *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2011).

Uma alternativa mais simples à foto-fermentação consiste na produção seqüencial de CH₄ a partir do efluente da produção de H₂ via fermentação anaeróbia. A produção de H₂ via processo fermentativo gera um efluente denominado *Hydrogen Production Liquid Waste* (HPLW), o qual é rico em ácidos orgânicos, como os ácidos acético e butírico. Sabe-se que aproximadamente 72% do CH₄ produzido via fermentação anaeróbia é proveniente do ácido acético, o que justifica o uso deste HPLW para obtenção deste combustível (Sarma *et al.*, 2015)

3.7. Catálise enzimática do POME

Como mencionado na seção 3.3, o POME é um material complexo, rico em TAGs, moléculas compostas por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol, que não são facilmente metabolizadas por bactérias anaeróbias (SUWANNO *et al.*, 2017). A clivagem das moléculas de TAG têm como produtos ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis (Figura 11), melhorando a digestibilidade do POME, (GHIMIRE *et al.*, 2015). Vale ressaltar, que a hidrólise dos TAGs, catalisada por lipases, ocorre em condições brandas de temperatura e pressão (45 °C, 1atm) (ZHANG *et al.*, 2016).

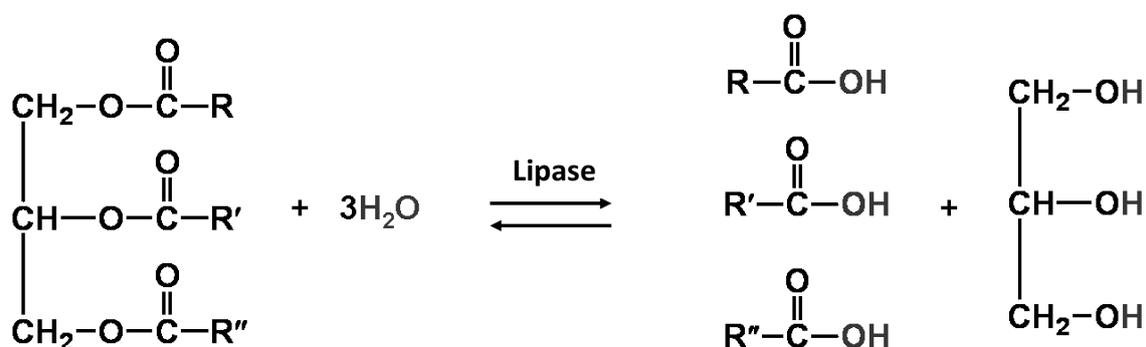


Figura 11: Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipase

O uso de lipases como catalisador vem sendo amplamente difundido em processos biotecnológicos devido à sua alta eficácia, superando o rendimento de processos sem a utilização de biocatalisadores em muitas vezes (referencia). Atualmente, existem muitas lipases disponíveis no mercado, porém são de custo muito elevado (Sigma-Aldrich, 2017; Biocatalysts, 2017). Uma forma de superar esta limitação é o emprego de preparados enzimáticos não comerciais (LANKA; PYDIPALLI; LATHA, 2015; OKWUTE; STEPHEN; ANYANWU, 2015; SUWANNO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

Para o desenvolvimento desse processo em grande escala, faz-se necessário a redução dos custos com biocatalisadores. Dessa forma, diversos estudos vem sendo realizados com o uso de preparados enzimáticos como alternativa para o pré-tratamento de efluentes ricos em gorduras oriundos da indústria alimentícia (CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001; VALLADÃO;

CAMMAROTA; FREIRE, 2011; ALEXANDRE et al., 2011; DAMASCENO; CAMMAROTA; FREIRE, 2012).

As sementes de *Ricinus communis* são conhecidas por conterem grande quantidade de enzimas hidrolíticas, principalmente lipases (CAVALCANTI et al., 2007). Estudos indicam a presença de lipases ácidas e básicas nesta semente. As ácidas apresentam atividade ótima em pH 5, enquanto as básicas apresentam atividade ótima em pH 7 ou maior (SRIVASTAVA; MATHUR, 2016). Como forma de dar uma destinação viável, econômica e ambientalmente correta a este resíduo, o preparado enzimático vegetal (PEV), proveniente dos resíduos da mamona, representa um material de grande interesse para estudos.

O desenvolvimento de uma etapa de pré-hidrólise enzimática pode aumentar a sua superfície de contato, favorecendo assim a assimilação da matéria orgânica pelo consórcio microbiano durante o tratamento biológico e acelerando assim o crescimento e a síntese dos produtos de interesse (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; VALLADÃO; CAMMAROTA; FREIRE, 2011).

Hidrogênio é produzido a partir de ácidos graxos de cadeia longa por meio do processo de β -oxidação (PARTHASARATHY, SHRIDHARAN; GOMES; MANICKAM, 2016). Durante esse processo, a molécula de ácido graxo sofre sucessivas clivagens de duas unidades de carbono por vez, conforme demonstrado na Figura 12.

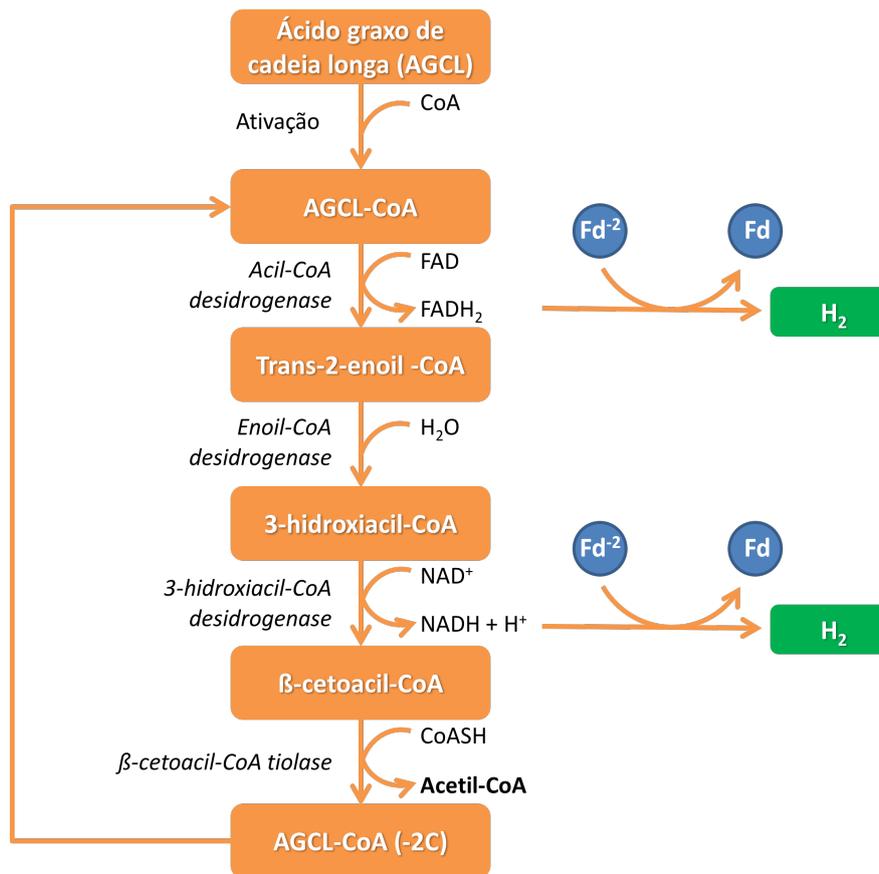
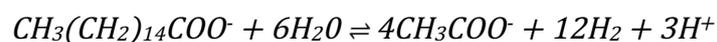


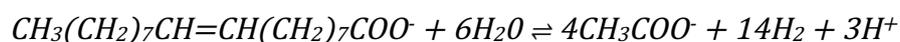
Figura 12: Representação esquemática da beta-oxidação de ácidos graxos e produção de H₂. Os ciclos de β-oxidação continuam até que sejam produzidas duas moléculas de acetil-CoA

Durante esse processo, um ácido graxo de cadeia longa sofre sucessivas reações, de modo a tornar a ligação entre o segundo e o terceiro carbono da molécula menos instável, facilitando sua clivagem ao final do processo (IRAM; CRONAN, 2006). A formação de H₂ se dá de acordo com as reações a seguir (MCINERNEY; BRYANT; PFENNIG, 1979):

Reação 1:



Reação 2:



3.8. Produção biológica de CH₄ utilizando como substrato o efluente líquido obtido após produção de H₂ (HPLW) a partir do POME

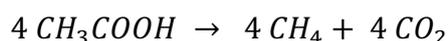
Assim como o H₂, o CH₄ obtido a partir da fermentação anaeróbia de diversos efluentes mostra-se uma alternativa ambientalmente correta de energia renovável, uma vez que as pesquisas nesta área vêm avançando, impulsionadas pelo impacto ambiental causado por combustíveis fósseis, obtidos a partir do petróleo (MCKAIN *et al.*, 2015).

O CH₄ consiste em um gás incolor, e, se misturado ao ar, altamente inflamável (PAWAR; BYRNE; NIEL, 2016). Geralmente, este gás é obtido a partir do gás natural e do carvão, aquecimento da biomassa e da decomposição anaeróbia da matéria orgânica. Suas principais aplicações são como gás de cozinha, combustível para automóveis, fonte de energia elétrica e insumo para outros produtos, como metanol (CABALLERO; PÉREZ, 2013; YACOB *et al.*, 2006). Possui elevado poder calorífico sendo este próximo ao do GLP (Gás Liquefeito de Petróleo), diesel e gasolina, portanto, pode ser utilizado como combustível (CABALLERO; PÉREZ, 2013; IGWE; ONYEBADO, 2007; YACOB *et al.*, 2006).

Conforme mencionado na seção 3.5.3, o efluente líquido gerado na produção de H₂ (HPLW) é rico em ácidos acético e butírico, os quais podem ser convertidos a CH₄ pelo processo de dismutação do ácido acético.

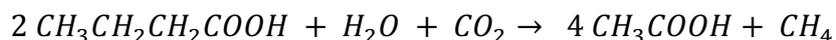
Sabe-se que, aproximadamente 72% do metano produzido via fermentação anaeróbia é proveniente do ácido acético, segundo a reação a seguir, o que justifica o uso do HPLW para obtenção de CH₄ (METCALF E EDDY, 2015).

Reação 3:

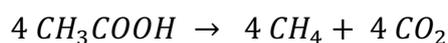


No entanto, o ácido butírico também contribui para a produção de CH₄, sendo convertido, primeiramente em ácido acético para, então, chegar ao metano, numa reação de duas etapas, conforme demonstrado abaixo ((KADNIKOV *et al.*, 2012; TAYLOR; TAKAI, 2012)):

Reação 4:



Reação 5:



Estudos apontam que apenas 30 a 40% da matéria-prima é utilizada na produção de H₂ via fermentação anaeróbia, e que de 60 a 70% dela é convertido a outros metabólitos, presentes no HPLW. Com isso, o HPLW mostra-se uma matéria-prima promissora para fermentação anaeróbia, visando a produção de CH₄ via conversão de acetato, por bactérias metanogênicas.

Algumas pesquisas avaliam a produção simultânea de H₂ e CH₄ (CHENG *et al.*, 2015; KRISHNAN *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2008). No entanto, este tipo de processo apresenta um rendimento inferior, se comparado à produção em duas etapas, uma vez que as bactérias metanogênicas podem consumir o H₂ formado, como apresentado anteriormente (Figura 10, seção 3.5.3).

Diversos estudos apontam uma significativa redução da DQO após a fermentação para obtenção de CH₄, portanto, este processo pode ser considerado como uma forma de tratar um efluente gerado e, ainda, fornecer compostos com valor agregado e de interesse comercial (CHAISRI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010).

O processo global (Figura 13), em que se realizam as produções de H₂ e CH₄ sequencialmente, é altamente relevante nos cenários energético e ambiental no âmbito mundial. Neste processo, um resíduo altamente poluente e abundante pode ser empregado como matéria-prima para a produção de dois biocombustíveis de grande interesse, H₂ e CH₄, tendo como efluente final, um líquido de características ambientalmente menos agressivas (AHMED *et al.*, 2015b).

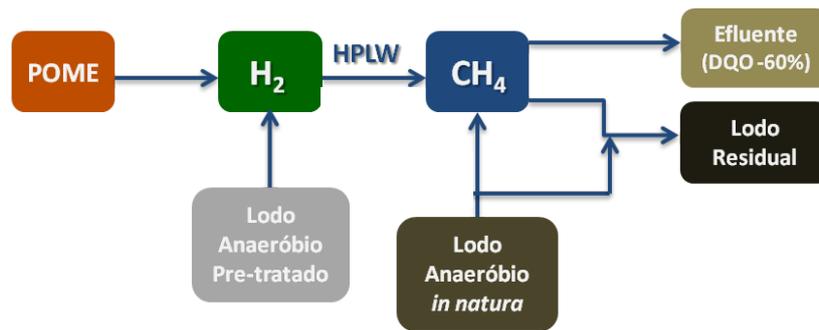


Figura 13: Representação esquemática do processo de produção sequencial de hidrogênio biológico e metano a partir do POME

Diante do exposto, é evidente a necessidade de estudos voltados para a produção de H₂ biológico, tendo em vista a possibilidade de utilização de um bicomcombustível baseado em fontes renováveis de energia. Neste estudo, o efluente de uma indústria em crescente expansão no Brasil e no mundo foi utilizado visando a produção de H₂ biológico em experimentos de pequena escala. A metodologia analítica foi adaptada para as necessidades do trabalho e satisfatoriamente calibrada.

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem e caracterização do *Palm Oil Mill Effluent* (POME)

O POME bruto foi gentilmente cedido pela Agropalma S/A (Tailândia, PA). O mesmo foi coletado do ponto de descarga final de uma fábrica de óleo de palma no estado do Pará (Brasil) e utilizado como matéria-prima para a produção de H₂. O POME apresenta coloração castanha, pH entre 4,0 e 4,5 e é armazenado sob-refrigeração, a 4 °C.

As análises de DQO, sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) e óleos e graxas foram realizadas de acordo com normas recomendadas por métodos oficiais (APHA, 1998)]. Açúcares redutores foram analisados pelo método de DNS e carbono e nitrogênio totais foram quantificados utilizando um CHN Analyzer (Leco, EU).

4.1. Origem e pré-tratamento do inóculo

Neste trabalho utilizou-se como inóculo lodo anaeróbio proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto da Penha, localizada no bairro Penha, na cidade do Rio de Janeiro e gentilmente cedido pela CEDAE. Para o estudo, foi coletado apenas um lote de lodo anaeróbio, o qual foi armazenado em temperatura ambiente.

A concentração de SSV do lodo foi determinada de acordo com as normas recomendadas na literatura (APHA, 1998). No pré-tratamento ácido, o pH do lodo anaeróbio *in natura* foi ajustado para 2 utilizando uma solução de HCl 10 mol/L e mantido neste pH durante 60 minutos.

4.2. Origem e/ou produção dos biocatalisadores

O preparado enzimático vegetal (PEV) utilizado foi extraído de *Ricinus communis* de acordo com metodologia proposta por Cavalcanti e colaboradores (2007). O mesmo foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Também foram utilizadas as lipases comerciais imobilizadas Novozym 435 (lipase B imobilizada de *Candida antarctica*) e Lipozyme RM IM (lipase

imobilizada de *Rhizomucor miehei*), Lipozyme TL IM (lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus*) Palatase 20000 L (lipase livre de *Rhizomucor miehei* em formulação líquida) e Lipomod 34 MDP (lipase em pó de *Candida cylindracea*). As enzimas comerciais foram gentilmente fornecidas pela Sigma (St. Louis, EUA).

4.3. Determinação da atividade do PEV

A atividade lipásica do PEV foi determinada por titulação dos ácidos graxos livres (AGF) liberados pela hidrólise de tributirina 5% (m/v) promovida pelo PEV, de acordo com metodologia de Cavalcanti *et al.*, 2007. Uma unidade (U) de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima, a qual libera 1 μmol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio. Verificou-se que a atividade de PEV era de 798 U/g em pH = 4 e 499 U/g em pH = 7.

4.4. Avaliação da hidrólise de POME por diferentes concentrações de PEV

Testaram-se diferentes concentrações de PEV (0,1 , 0,5 0,75, 1 e 2% m/v) de modo a determinar a faixa adequada de trabalho. Duas abordagens foram adotadas: uma hidrólise simultânea à fermentação anaeróbia (35 °C, 150 rpm, pH 6,5) e um procedimento de pré-hidrólise, durante o qual o POME foi submetido a ação dos biocatalisadores – em uma temperatura de 45°C, 200 rpm e em pH 7.

4.5. Avaliação preliminar da produção de H₂

A Figura 14 representa a abordagem experimental do trabalho nos três cenários estudados: fermentação bruta do POME, o processo de hidrólise simultâneo à fermentação (uma etapa) e o processo fermentativo sequencial à hidrólise do POME. Todas as fermentações realizadas neste trabalho foram conduzidas em frascos tipo penicilina de 100 mL, com volume útil de 45 mL, os quais foram purgados com N₂ por um minuto. O meio reacional era composto de 26 mL de lodo anaeróbio pré-tratado (SSV = 10000 mg/L) e 19 mL de

POME bruto ou pré-tratado. As fermentações foram realizadas em quintuplicata, a 35 °C, 150 rpm e em pH 5,5 ou 6,5, dois valores usualmente encontrados na literatura.

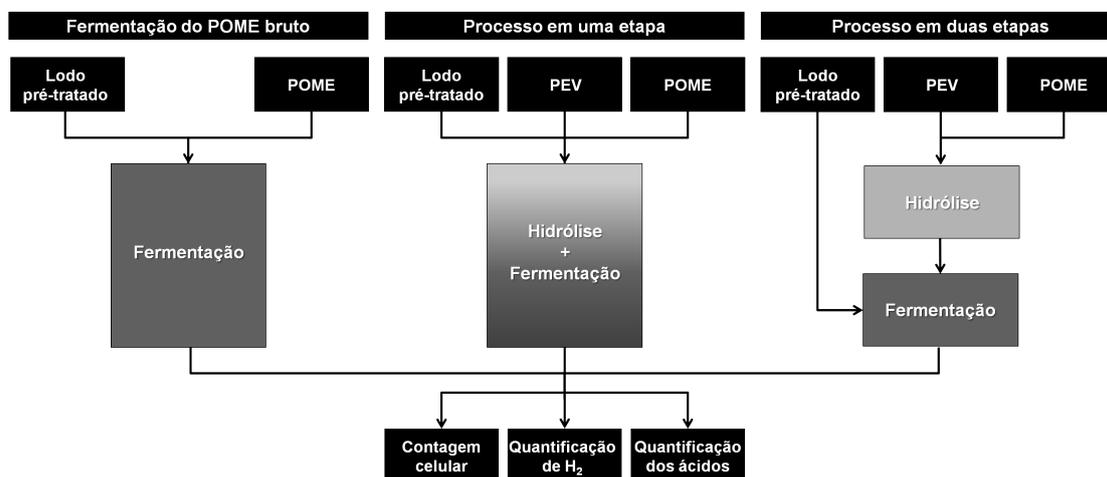


Figura 14: Representação esquemática das três abordagens utilizadas para avaliar a produção de hidrogênio biológico utilizando PEV como biocatalisador

4.5.1. Avaliação da produção de H₂ com diferentes diluições de POME

Diferentes diluições de POME (1, 3 e 5 vezes) foram testadas de modo a determinar a concentração de matéria orgânica inicial mais propícia ao processo de produção de H₂. A produção foi monitorada durante 24 h e as amostras de biogás foram amostradas a cada 4 h.

4.5.2. Avaliação da produção de H₂ simultânea à hidrólise do POME (processo em uma etapa)

Adicionou-se ao meio fermentativo descrito em 4.5.1; 0,75% m/v de PEV de modo a promover a hidrólise do POME. Foi utilizada a relação $DQO_{POME}:SSV_{LODO}$ de 2:1 v/v, definida no ensaio anterior e discutida. Assim sendo, foi definido que a hidrólise ocorreu simultaneamente à fermentação anaeróbia, em um processo de uma única etapa, a 35 °C, 150 rpm e pH 6,5.

4.5.3. Avaliação da produção de H₂ posterior à hidrólise do POME (processo em duas etapas)

Adicionou-se 0,75% m/v de PEV ao POME, o qual foi incubado durante 2 h, a 45 °C; pH 7,0 e 200 rpm (Serri et al., 2008). Após hidrólise, o lodo pré-tratado foi adicionado ao POME nas mesmas proporções utilizadas nas fermentações anteriores, compondo assim o meio reacional, o qual foi incubado a 35 °C e 150 rpm. O mesmo procedimento foi realizado para testar a hidrólise do POME por meio da utilização de enzimas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Palatase 20.000L e Lipomod 34 MDP.

4.6. Fixação das células presentes no meio fermentativo

Um mL do meio fermentativo foi resuspenso em 9 mL de tampão fosfato salino (0,4 mol/L de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 150 mmol/L de NaCl; pH 7,2). A suspensão celular foi duas vezes centrifugada a 3200 xg durante 10 min. . As bactérias foram ressuspensas em 1 mL de tampão de fixação (PBS, azida de sódio a 10%, 5 mmol/L de BaCl₂ e NiCl₂ a 5 mmol/L) e todas as amostras foram armazenadas em microtubos a 4 °C.

4.7. Imunohistoquímica, citometria de fluxo e contagem celular

O lodo é um material particulado, com uma alta absorvância e coloração escura, portanto, as medições da densidade óptica não podem ser usadas para determinar o crescimento celular. Os sólidos suspensos voláteis foram úteis para definir a composição do meio de fermentação, por constituírem uma medida indireta da população microbiana ali presente, porém o POME contém matéria orgânica que pode ser vaporizada e mascarar o resultado real. Dessa forma, para obter um acompanhamento preciso do crescimento celular, utilizou-se a citometria de fluxo devido a sua acurácia.

As amostras foram lavadas e ressuspensas em 0,5 mL de solução DAPI/TX-100 recentemente preparado e incubadas durante 30 minutos a 35 °C. Antes da análise de citometria de fluxo, as amostras coradas com DAPI foram filtradas através de filtros com um diâmetro de poro de 30 µm para

remover agregados. Introduziu-se um padrão interno de células bacterianas também coradas com DAPI para ajustar o dispositivo até um valor de coeficiente de variação não superior a 5%.

As análises foram realizadas utilizando um FACS Canto™ II (BD Biosciences, San José, CA, EUA) com um laser emissor de 488 nm. As amostras foram processadas em velocidade média (aproximadamente 75 mL/min) e os dados foram registrados até cerca de 100.000 eventos terem sido adquiridos.

4.8. Origem e caracterização do efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW)

Foram realizadas bateladas de fermentações anaeróbias sequenciais para obtenção de H₂ e CH₄. Visando a produção de H₂, o POME foi submetido à hidrólise enzimática para, então, ser preparado o mosto fermentativo, composto deste POME hidrolisado, água e lodo pré-tratado com tratamento ácido. A fermentação ocorreu em pH 6,5 a 35 °C e 150 rpm, por 21 h, em um shaker, com 45 mL deste meio distribuído igualmente em frascos de penicilina, devidamente purgados com N₂ e lacrados.

Após a fermentação, o volume dos frascos de penicilina foi centrifugado, de forma a decantar o meio fermentativo, e o sobrenadante deste processo, HPLW, foi reservado, conforme Figura 15.

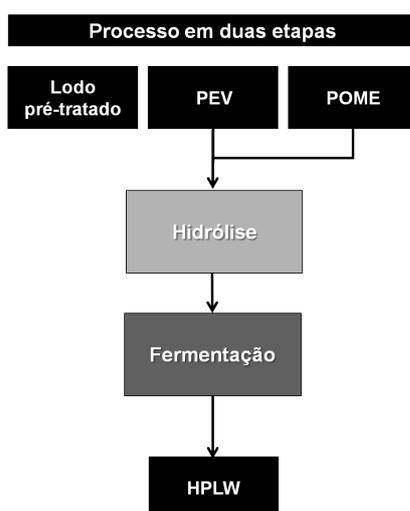


Figura 15: Fermentação em duas etapas para produção de hidrogênio e origem do HPLW

O gás produzido foi analisado por cromatografia gasosa. Para a fermentação do CH₄, o meio fermentativo foi composto de HPLW e inóculo *in natura*, também em frascos de penicilina, mas com volume de 15 mL, devidamente purgados com N₂ e lacrados. O processo foi conduzido em pH 7 a 35 °C, condições ótimas para bactérias metanogênicas, por 34 dias, em um shaker ((KRISHNAN *et al.*, 2016; NATHOA; SIRISUKPOCA; PISUTPAISAL, 2014)).

4.9. Metodologia para determinação dos ácidos orgânicos por Cromatografia Gasosa

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: ácido acético (VETEC, 99,7%), ácido butírico (Sigma-Aldrich, 99,0%), ácido láurico, palmítico e oléico (VETEC, 99,0%)O solvente utilizado foi isopropanol, grau espectroscópico (Cromato Produtos Químico, 99,9%).

Soluções estoque 0,1 mol/L de ácido acético, butírico, láurico, palmítico e oleico foram preparadas em isopropanol e em seguida diluídas para preparação das respectivas curvas analíticas. A Tabela 3 apresenta as faixas utilizadas para construção das curvas analíticas.

Tabela 3: Concentração, em ppm, dos analitos utilizados para construção da curva analítica

Ácido	Concentração (ppm)						
Acético	1500	1750	2000	2500	3000	4000	5000
Butírico	250	500	1000	1500	1750	2000	2500
Láurico	100	250	500	1000	1500	1750	2000
Palmítico	250	500	1000	1500	1750	2000	2500
Oleico	250	500	1000	1500	1750	2000	2500

O biogás foi analisado em um micro-cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 3000) com detector de condutividade térmica (TCD). Utilizou-se N₂ como gás de arraste. A quantificação do H₂ foi realizada a partir de duas misturas gasosas, contendo 40 e 70% de H₂ padrão. As colunas cromatográficas utilizadas foram HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 mm) e HP-PLOT Peneira Molecular 5A (10 m x 0,32 mm x 12 mm).

Os ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 7890B) equipado com detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se uma coluna capilar empacotada com polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico (DB-FFAP) com um comprimento de 30 m. A temperatura de injeção e do detector foi de 250 °C. A rampa utilizada foi: 100 °C durante 5 min, aquecimento a 10 °C/min até 220 °C e mantido constante a 220 °C durante 12 min.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo fermentativo consiste na sucessão de eventos biológicos, que culmina na produção de H_2 , CH_4 e CO_2 a partir de moléculas orgânicas complexas. Em condições de cultura pura, é recomendado usar substratos simples para alcançar máxima conversão de substrato. Já para materiais complexos brutos, uma cultura mista é mais indicada, devido a ação sinérgica das hidrolases, secretadas por diferentes organismos, que tornam os nutrientes facilmente disponíveis. Dentro deste contexto, o lodo anaeróbico tem sido reportado como um ponto de partida apropriado para a produção de H_2 biológico a partir de diferentes materiais complexos (ATIF *et al.*, 2005; NITIPAN *et al.*, 2014). Para este tipo de inóculo, a suplementação com micro ou macronutrientes não se faz necessária e ainda sim, o processo apresenta aceitável rendimento e produtividade. O POME foi utilizado como material bruto, não apenas por ser um efluente agroindustrial, mas também devido à sua alta carga orgânica, a qual é adequada à produção de H_2 biológico via fermentação anaeróbia. De modo a superar um dos principais gargalos do processo fermentativo para produção de H_2 , foi utilizado um PEV com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de nutrientes do POME, reduzindo o tempo necessário para a etapa hidrolítica do processo. A fermentação anaeróbia gera, como um de seus sub-produtos, o HPLW, um líquido rico em ácidos acético e butírico e que foi utilizado para a produção de metano.

5.1. Caracterização do POME

A caracterização do POME é apresentada na Tabela 4. Como pode ser observado, o POME possui um alto valor de DQO, em torno de 47000 mg O_2/L , evidenciando assim o seu potencial como substrato para a produção de H_2 . Foi observado um pH típico para este efluente, 4,7, uma vez que o pH ácido está relacionado aos ácidos graxos voláteis produzidos durante o processo extrativo (Chong *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2016b; Singh *et al.*, 2013). Este efluente também possui constituintes dissolvidos, como uma alta concentração de lipídios, compostos de nitrogênio, carboidratos, proteínas e minerais, que podem ser assimilados por bactérias durante o processo fermentativo.

Portanto, o POME constitui uma opção interessante e promissora para a produção biológica de H₂ via processo fermentativo anaeróbio (Badiei et al., 2011; Parthasarathy et al., 2016; Rasdi et al., 2012).

Tabela 4: Características químicas do POME utilizado neste trabalho.

Características do POME	Resultado da caracterização
DQO (mg O ₂ /L)	47.200
Sólidos Suspensos Totais (mg/ L)	37.000
Sólidos Suspensos Voláteis (mg/ L)	20.000
pH	4,7
Óleos e Graxas (mg/ L)	2.100
Açúcares Redutores Totais (mg/ L)	2.300
Carbono Total (mg/ L)	21.700
Nitrogênio Total (mg/ L)	1.480

5.2. Adaptação e Padronização da metodologia para uso do Cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890B

As curvas de calibração geradas resultaram num R² próximo de 1. O resultado do R² expressa o quanto os pontos obtidos desviam da equação da regressão linear gerada para os mesmos, ou seja, o quanto as medidas desviam do modelo previsto, ou seja, qual a porcentagem dos dados obtidos são explicados pela variável numa relação linear. O resíduo calculado contém informações sobre o motivo do modelo não ter se ajustado bem aos dados e verificar, por exemplo, se há uma falta de linearidade em algum intervalo da reta. Ambos são indicativos de confiabilidade da metodologia e estão demonstrados nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20, que apresentam as curvas de calibração dos analitos de interesse sobre os ácidos acético, butírico, láurico, palmítico e oleico, respectivamente.

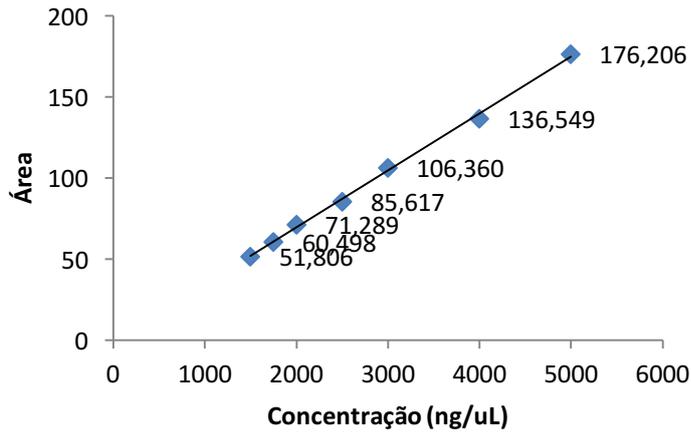


Figura 16: Curva de calibração do ácido acético. R2 = 0,99982 e residuo = 1,842

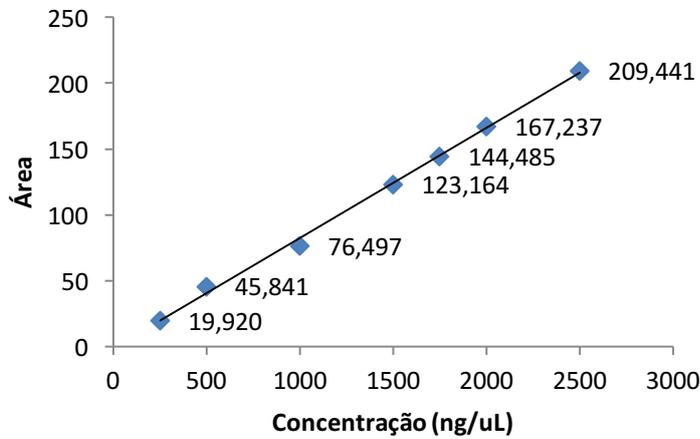


Figura 17: Curva de calibração do ácido butírico. R2 = 0,99972 e residuo = 3,724

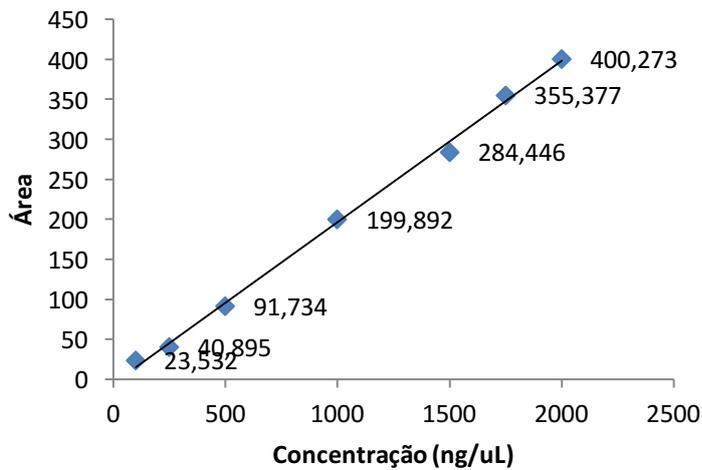


Figura 18: Curva de calibração do ácido láurico. R2 = 0,99952 e residuo = 8,151

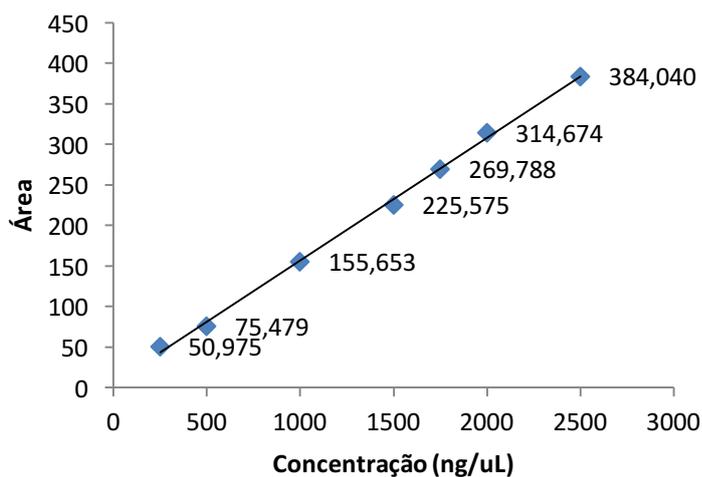


Figura 19: Curva de calibração do ácido palmítico. R2 = 0,99971 e resíduo = 6,224

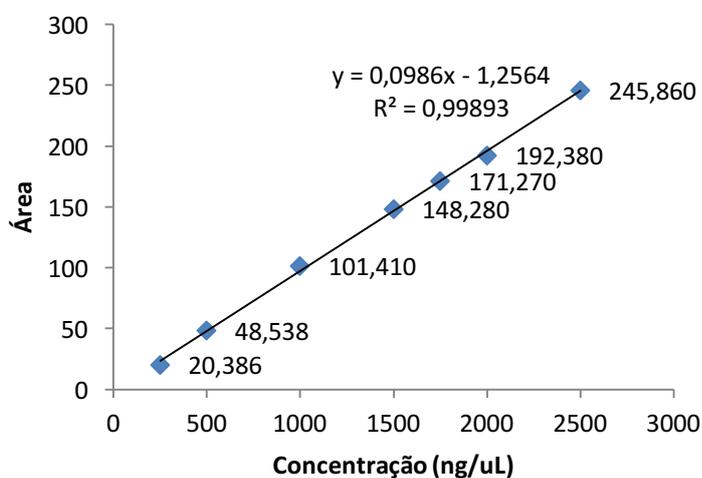


Figura 20: Curva de calibração do ácido oleico. R2 = 0,99986 e resíduo = 2,713

Utilizando o método ajustado, não houve co-eluição de nenhum analito, conforme Figura 21.

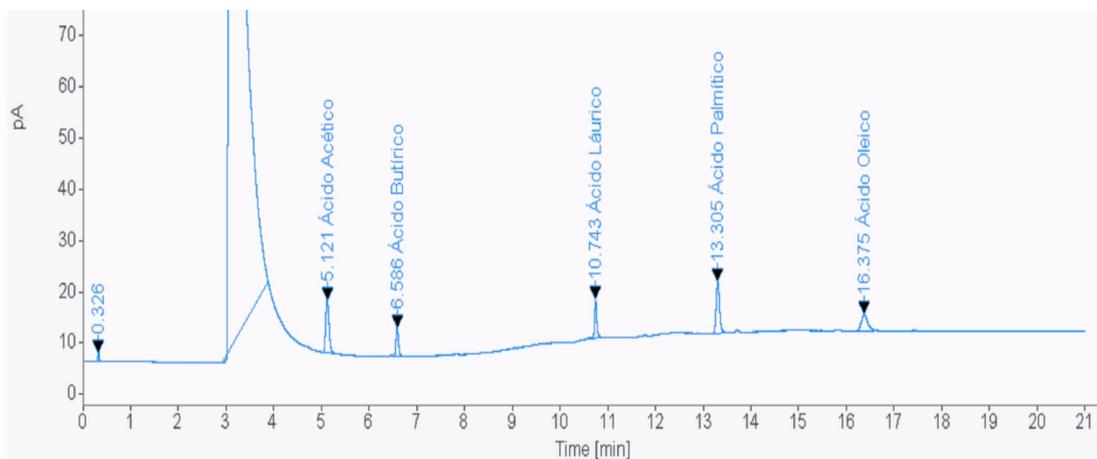


Figura 21: Cromatograma da mistura dos padrões utilizados na calibração do método analítico e seus respectivos tempos de retenção

5.3. Testes de pH para fermentação anaeróbia do POME

É reportado na literatura que o pH ótimo em termos de produção de H₂ se encontra na faixa de 5 a 7, entretanto o pH no qual é reportado o maior rendimento de H₂ se encontra em torno de 6,5 (KHANAL *et al.*, 2004; GINKEL E SUNG *et al.*, 2001). Os efeitos de pH dentro da faixa acima favorece não somente o crescimento dos microorganismos, como também a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H₂ (YOSSAN; O-THONG; PRASERTSAN, 2012a). Além desses dois aspectos, é mencionada a inibição dos micro-organismos consumidores de H₂ presentes no meio fermentativo, menos robustos que os produtores de H₂ (VALDEZ-VAZQUEZ E POGGI-VARALDO, 2009; LI E FANG, 2007).

Um estudo da cinética de produção de H₂ foi realizado para confirmar as condições mais propícias para fermentação do POME sem diluição. A Figura 22 apresenta as curvas cinéticas obtidas ao longo de 32 h de fermentação, onde foram avaliados o pH 5,5 e 6,5, valores mais comumente reportados na literatura (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016; O-THONG *et al.*, 2008).

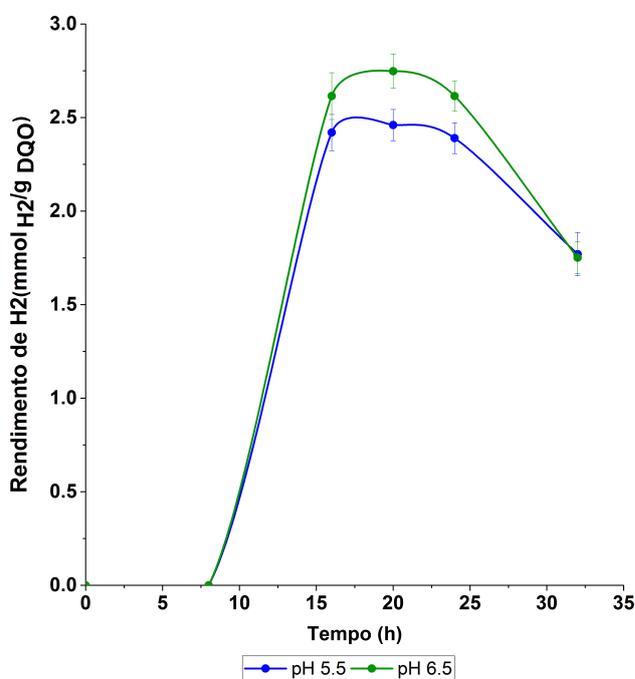


Figura 22: Avaliação da produção de H₂ a partir do POME em função do pH a 35 °C, 150 rpm por 32h.

Por meio da Figura 22 é possível observar que ao longo do processo fermentativo, o pH 6,5 propiciou um maior rendimento de H₂ quando comparado ao meio com pH 5,5. Dessa forma, para os experimentos subsequentes visando a produção de H₂, o meio fermentativo foi ajustado para pH 6,5.

5.4. Fermentação do POME *in natura* visando a produção de H₂

O perfil de produção do H₂ biológico pela fermentação em batelada do POME bruto usando lodo anaeróbico como inóculo está representado na Figura 23.

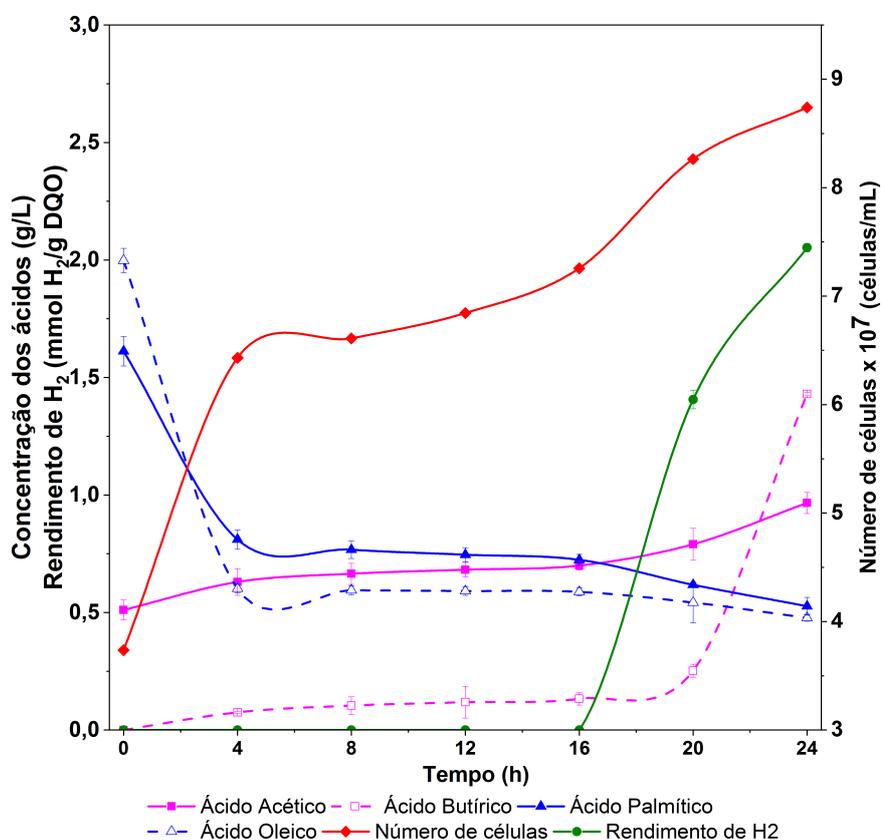


Figura 23: Fermentação anaeróbica do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h.

Os ácidos graxos de cadeia longa mais abundantes no POME são palmítico e oleico, apresentando concentrações iniciais de 1,61 e 1,99 g/L, respectivamente. Durante o processo, 1,08 g/L de ácido palmítico e 1,52 g/L de ácido oleico foram consumidos, o que corresponde a 67 e 76% da

concentração inicial, produzindo 2,26 mmol H₂ /g DQO com uma produtividade de 0,09 mmol H₂/g DQO durante 24 h. Nas primeiras 4 h de fermentação, os resultados experimentais de citometria de fluxo revelaram que uma fase de crescimento bacteriano primário é diretamente relacionada ao consumo destes ácidos. Leañó e Babel (2012) reportaram que os ácidos oleico e palmítico em altas concentrações (maiores que 1 g/L) são capazes de promover crescimento bacteriano sob condições anaeróbias.

O crescimento celular na fermentação de POME bruto foi caracterizado por uma primeira fase de crescimento exponencial, que durou 4 h, seguida de uma maior e mais lenta fase de crescimento, que durou aproximadamente 12 h. A fase de crescimento mais lenta pode estar relacionada com a fase hidrolítica da fermentação anaeróbia, durante a qual o consórcio bacteriano promove a degradação de triglicerídeos, proteínas e açúcares complexos presentes no POME. Neste sentido, a maquinaria celular estaria sintetizando proteínas hidrolíticas, levando a uma divisão celular mais lenta. A produção de H₂ e ácidos graxos voláteis foi mínima até as 16 h de fermentação e o rendimento de H₂ aumentou nas 8 h subsequentes, alcançando o valor máximo em 24 h. Como esperado, as concentrações de ácido acético e butírico aumentaram em associação à produção de H₂.

5.5. Dosagem de atividade do PEV e avaliação de sua concentração no sistema

A atividade do PEV de *R. communis* foi avaliada em pH 4 e em pH 7. É reportado que sementes dormentes tem atividade ótima em pH ácido, ao passo que sementes germinadas apresentam o pico de atividade em pH neutro (CAVALCANTI *et al.*, 2007). As atividades obtidas foram de 799 e 499 U/g, respectivamente.

Na hidrólise do POME foram testadas diferentes concentrações de PEV (0,1; 0,5; 1 e 2% m/v) de modo a determinar a faixa adequada de trabalho. Os aumentos de produtividade foram, respectivamente, de 16, 25 e 34%, indicando um possível excesso de enzima a partir da concentração de 1% m/v, conforme Tabela 5. Testou-se, então, uma concentração intermediária, de 0,75% de PEV, a qual aumentou a produtividade do processo em 32%. Essa

concentração foi selecionada para os experimentos seguintes de modo a gastar a menor quantidade possível do biocatalisador sem perda significativa de rendimento ou produtividade no processo.

Tabela 5: Produtividade de H₂ de acordo com diferentes concentrações de PEV utilizadas no processo fermentativo.

Concentração de PEV	Produtividade (mmol H₂/g DQO.h)	Diferença percentual (%)
0% m/v PEV	0,082 ± 0,005	0
0,1% m/v PEV	0,095 ± 0,008	16
0,5% m/v PEV	0,102 ± 0,008	25
0,75% m/v PEV	0,108 ± 0,008	32
1,0% m/v PEV	0,110 ± 0,009	34
2,0% m/v PEV	0,110 ± 0,009	34

5.6. Fermentação anaeróbia do POME com adição do PEV (uma etapa) visando a produção de H₂

A semente de mamona (*Ricinus communis*) é conhecida por conter várias enzimas hidrolíticas, dentre as quais as lipases são as mais abundantes (referencia). É reportado que ambas as lipases ácidas e alcalinas estão presentes nestas sementes (SRIVASTAVA; MATHUR, 2016). Enquanto a lipase ácida tem sua atividade ótima em pH 5, a enzima alcalina tem sua atividade ótima a um pH 7 ou mais alto. Desta maneira, como o pH tende a cair durante a degradação do triacilglicerol (TAG) devido à liberação de ácidos graxos livres (FFA – do inglês *free fatty acids*) na fermentação em batelada, a lipase ácida tornaria o processo possível em uma ampla faixa de pH. A possibilidade de extrair ambas as enzimas da mesma semente, combinada ao seu baixo valor de mercado, torna a semente de *Ricinus c.* uma alternativa muito interessante para realizar a hidrólise de óleo em larga escala.

O POME, por sua vez, é rico em TAG, moléculas complexas, que precisam ser hidrolisadas para serem assimiladas pelas bactérias. Portanto, um PEV que possa disponibilizar mais rapidamente os nutrientes presentes no POME e, conseqüentemente, reduzir o tempo requerido para a fase hidrolítica de fermentação anaeróbia é uma abordagem interessante. Os resultados obtidos no processo simultâneo de hidrólise enzimática e fermentação em batelada do POME estão apresentados na Figura 24.

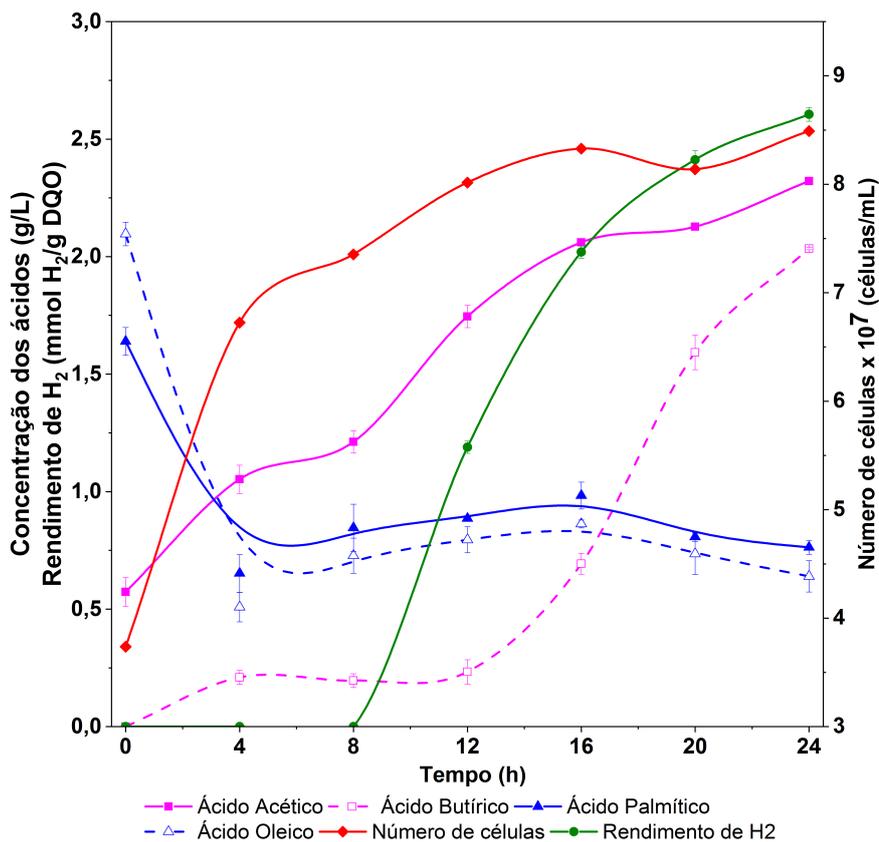


Figura 24: Hidrólise e Fermentação simultânea do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h.

Comparando os resultados com aqueles obtidos para a fermentação do POME bruto (Figura 23), o consórcio bacteriano apresentou uma redução da fase adaptativa em 8 h, bem como uma maior taxa de produção de H₂. Nas primeiras 4 h, foi observada uma fase de crescimento exponencial associada ao consumo do FFA.

A produção de H₂ se inicia em 8 h, associada à produção de ácido acético e a uma segunda fase de crescimento exponencial mais lenta. Esta fase de crescimento exponencial secundária é mais lenta e a produção de H₂ começou em 16 h, aproximadamente, na fermentação de POME bruto, levando a um aumento de 48% na produtividade de geração de H₂ quando comparada aos resultados da fermentação do POME bruto. A produção máxima de H₂ alcançou 2,58 mmol H₂/g DQO (produtividade de 0,13 mmol H₂/g DQO.h) nas primeiras 16 h, reduzindo em 50% o tempo de fermentação necessário para começar a produção de H₂. Esse resultado sugere que POME

pode ser hidrolisado de forma eficiente pelo preparado enzimático e *Ricinus communis*.

Além disso, a concentração de ácidos graxos livres presente no início da fermentação foi quase duas vezes mais alta quando comparada com a concentração em POME sem PEV. Na literatura encontra-se que maiores rendimentos de H_2 são observados quando os principais metabólitos fermentados no efluente (HPLW) são o acetato e o butirato, ainda que esses ácidos também foram correlacionados com a inibição da produção de H_2 ((BUNDHOO; MOHEE, 2016; HAN; WANG; *et al.*, 2015)). Se os principais metabólitos na fase líquida fossem alcoóis ou outros ácidos (como por exemplo, ácido láctico), o processo não seria direcionado para a obtenção de H_2 . Essa declaração pode ser explicada pela via de metabolização do piruvato, conforme Figura 25.

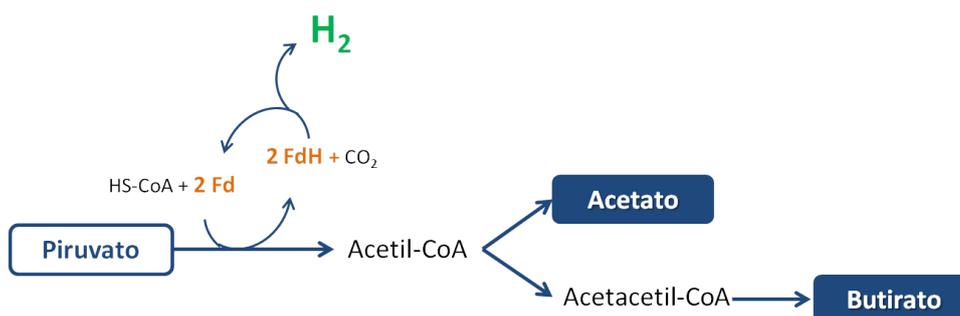


Figura 25: Bactérias anaeróbicas produtoras de hidrogênio são capazes de transformar o piruvato em acetil-Co A reduzindo Ferredoxina. De modo a retornar ao seu estado de valência, a ferredoxina transfere os elétrons recebidos na oxidação do piruvato à acetil-Co A

Esse metabólito é convertido em ácido acético, reduzindo 2 moléculas de ferredoxina. A ferredoxina reduzida pode converter 4 íons H^+ em 2 moléculas de H_2 .

5.7. Pré-hidrólise do POME seguida de fermentação anaeróbia (duas etapas) visando a produção de H_2

A hidrólise da POME antes da fermentação anaeróbia também foi quantificada. Um pré tratamento hidrolítico do POME poderia ser interessante,

visto que o inóculo seria adicionado em um meio mais rico em nutrientes, capaz de promover um crescimento celular acelerado. Durante a etapa hidrolítica, na presença de PEV, observou-se a hidrólise de TAGs presentes no POME, aumentando a concentração de ácidos graxos de cadeia longa ali presentes.

A concentração de ácido palmítico livre foi aumentada em 43% e a concentração de ácido oleico livre foi aumentada em 33%, conforme Figura 26. Depois da adição do inóculo, esses ácidos foram consumidos de forma rápida, levando a uma fase de crescimento exponencial associada com a produção de H₂, como ilustrado na Figura 26. A produção de ácidos orgânicos não foi observada até 8 h de fermentação.

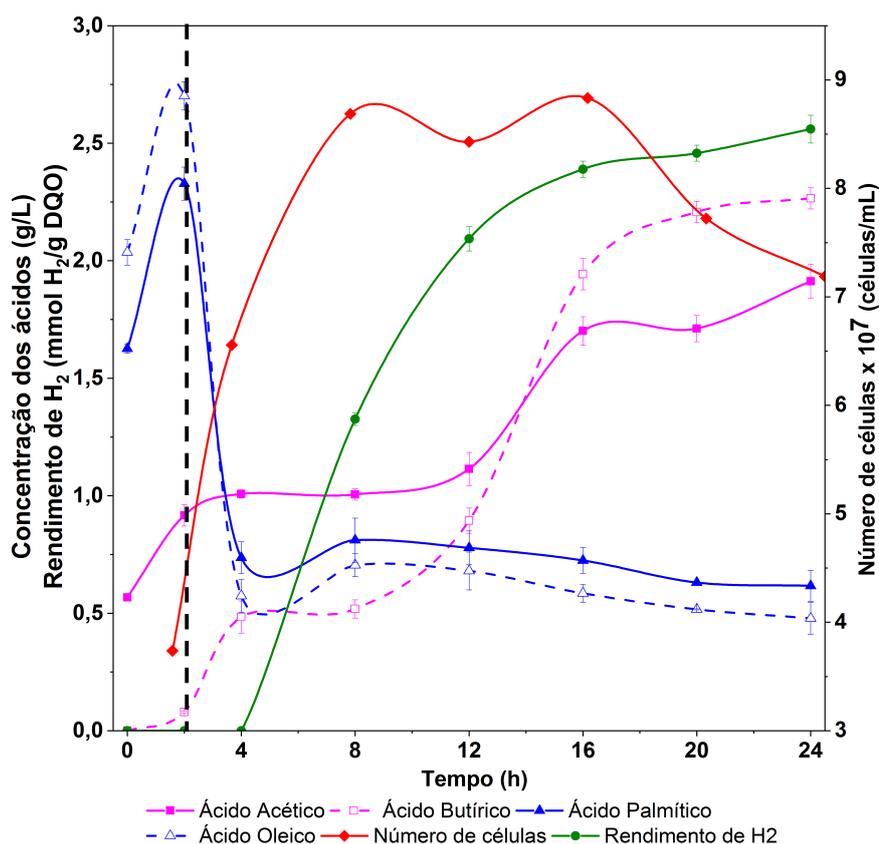


Figura 26: Pré-hidrólise seguida de fermentação anaeróbica do POME bruto para produção de hidrogênio biológico utilizando lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C, 150 rpm por 24 h. A linha tracejada marca a duração da pré-hidrólise.

No processo em duas etapas, o H₂ foi produzido dentro de 4 h de fermentação, o que leva a um grande aumento de produtividade (aproximadamente de 102%). Também é importante enfatizar que a hidrólise do POME na presença de PEV dura 2 h, permitindo um acentuado aumento na produtividade, de H₂ (74%) Isso pode ser atribuído não somente ao crescimento celular mais acelerado e a maior disponibilidade dos nutrientes, mas também à produção tardia dos ácidos orgânicos.. O aumento significativo de produtividade observado tanto no processo em uma etapa quanto no processo em duas etapas sugere que os nutrientes complexos presentes em POME se tornam mais facilmente disponíveis para o consumo das bactérias, o que levaria a um rápido crescimento celular e a produção de H₂.

Em contraste com o ganho significativo em termos de produtividade (48% no processo em uma etapa e 102% no processo de duas etapas), o rendimento cresceu somente 14% nas duas condições. Isso sugere uma possível inibição no sistema. Já se sabe que os ácidos acético e butírico são produtos comuns da fermentação anaeróbia, os quais suprimem a rota metabólica fermentativa (BUNDHOO; MOHEE, 2016). A produção desses ácidos começa em torno de 8 h de fermentação tanto para o processo em uma etapa, quanto para o processo em duas etapas, alcançando concentrações máximas de, aproximadamente, 2,00 e 2,25 g/L para ácido acético e butírico, respectivamente, o que pode explicar o baixo aumento de rendimento.

Esses ácidos podem ser produzidos por diversas rotas metabólicas, em particular durante o crescimento celular, o que pode levar a uma produção mais rápida deles em um curto período de tempo. Dessa maneira, mesmo a produção de H₂ sendo associada à produção dos ácidos orgânicos, não iria acompanhar proporcionalmente o aumento das concentrações desses ácidos. Adicionalmente, a fase adaptativa da bactéria foi reduzida em, aproximadamente, 12 e 4 h, respectivamente, quando comparada com a fermentação contendo o POME bruto e com o processo de fermentação em uma etapa.

Apesar do rendimento de H₂ não apresentar diferença nos processos conduzidos em uma ou duas etapas, não se pode associar esta fato a indisponibilidade de nutrientes, considerando a elevada DQO do meio ao final

do processo fermentativo (em torno de 30.000 mg O₂/L). Os resultados obtidos são resumidos na Tabela 6, a qual evidencia as diferenças entre as três diferentes abordagens para produção biológica de H₂ utilizando POME como substrato.

Esses resultados sugerem que as lipases, que estão presentes no PEV, foram as responsáveis pela redução da fase adaptativa. A atividade da lipase pode ser fundamental para um crescimento microbiano mais rápido, reduzindo a duração da fase hidrolítica das bactérias, enquanto substratos complexos são degradados pelo PEV. Vale destacar, também, que o consumo de óleos e graxas totais ao longo de 12 h foi de aproximadamente 50%, caindo de 2091 mg/L para 1217 mg/L.

Tabela 6: Parâmetros de produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia do POME nas três condições estudadas

Parâmetros	Sem PEV	Com PEV (uma etapa)	Com PEV (duas etapas)
Fase adaptativa (h)	16	8	4
Rendimento máximo de H₂ (mmol H₂/g DQO)	2,26 ± 0.05	2,58 ± 0.02	2,56 ± 0.05
Produtividade máxima de H₂ (mmol H₂/g DQO.h)	0,086 ± 0.001	0,127 ± 0.001	0,174 ± 0.004
Aumento da produtividade de H₂ (%)	-	48	102

Tanto a produção e a produtividade obtida com o uso da PEV são mais expressivas quando comparadas com resultados anteriores da literatura com a reutilização de POME para produção de H₂ como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Comparação da produção, produtividade e rendimento no processo de produção de hidrogênio biológico utilizando POME como matéria-prima.

Pré-tratamento do POME	Temperatura (°C)	pH	Produção H ₂ (mL H ₂ /L POME)	Produtividade máxima (mLH ₂ /LPOME.h)	Rendimento de H ₂ (mLH ₂ /gDQO)	Referências
Ozonização	55	6,0	21,42	0,49	3,44	Tanikkul & Pisutpaisal, 2014
-	36	5,8	58,97	6,43	0,74	Rasdi et al., 2012
Sonicação	44	7,0	-	-	0,76	Leaño et al., 2012
-	35	5,5	48,4	3,73	0,45	Mohammadi et al., 2011
-	37 - 55	6	43,99	3,39	1,21	Yossan et al., 2012
-	35	6,5	118,95	5,69	2,26	Neste estudo
Processo em uma etapa	35	6,5	134,74	8,42	2,56	Neste estudo
Processo em duas etapas	35	6,5	135,79	11,32	2,58	Neste estudo

Tanikkul e Pisutpaisal (2014) alcançaram um rendimento máximo de 3,44 mLH₂ / gDQO em 44 h, enquanto esse estudo obteve um rendimento máximo de 2,58 mLH₂ / gDQO em 12 h. O obstáculo do processo de Tanikkul e Pisutpaisal (2014) é a quantidade de tempo necessário para a produção de H₂, o que resulta em uma diferença de produtividade de 23 vezes quando comparado com este estudo. Ainda, no presente estudo, o resultado da produção obtida na melhor condição foi 130% maior do que o obtido por Rasdi et AL., (2012) enquanto a produtividade supera em 5,2 vezes a observada pelo mesmo autor.

Mesmo com os promissores resultados obtidos no presente estudo utilizando o POME com substrato e o PEV como biocatalisador para a disponibilização mais rápida e eficiente dos nutrientes, ainda há um grande caminho para que o H₂ seja um produto praticável comercialmente.

Estudos posteriores em processos contínuos em busca da produção de H₂ são necessários para o desenvolvimento de um projeto eficiente e que maximize a geração deste biocombustível. Em um processo contínuo, VFAs podem ser monitorados e removidos para a prevenção da inibição de produção

de hidrogênio biológico. Outra possibilidade para melhorar o processo global de produção de H₂ é uma produção integrada com CH₄, no qual o (HPLW) gerado pode ser utilizado para a produção deste gás.

Esta abordagem é bastante interessante do ponto de vista ambiental, já que durante a produção de H₂ a redução da DQO de um efluente como o POME não é significativa. Adicionalmente, a associação da produção de H₂ e CH₄ é também relevante do ponto de vista energético (DE SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA, 2014).

5.8. Comparação da eficácia do PEV na fermentação anaeróbia visando produção de H₂ com as enzimas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Palatase and Lipomod 34 MDP

A hidrólise do POME com enzimas comerciais foi realizada com o intuito de comparar a efetividade do PEV de *R. communis* visando a produção biológica de hidrogênio. O processo em duas etapas foi utilizado, já que o mesmo se mostrou o mais eficiente. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 27.

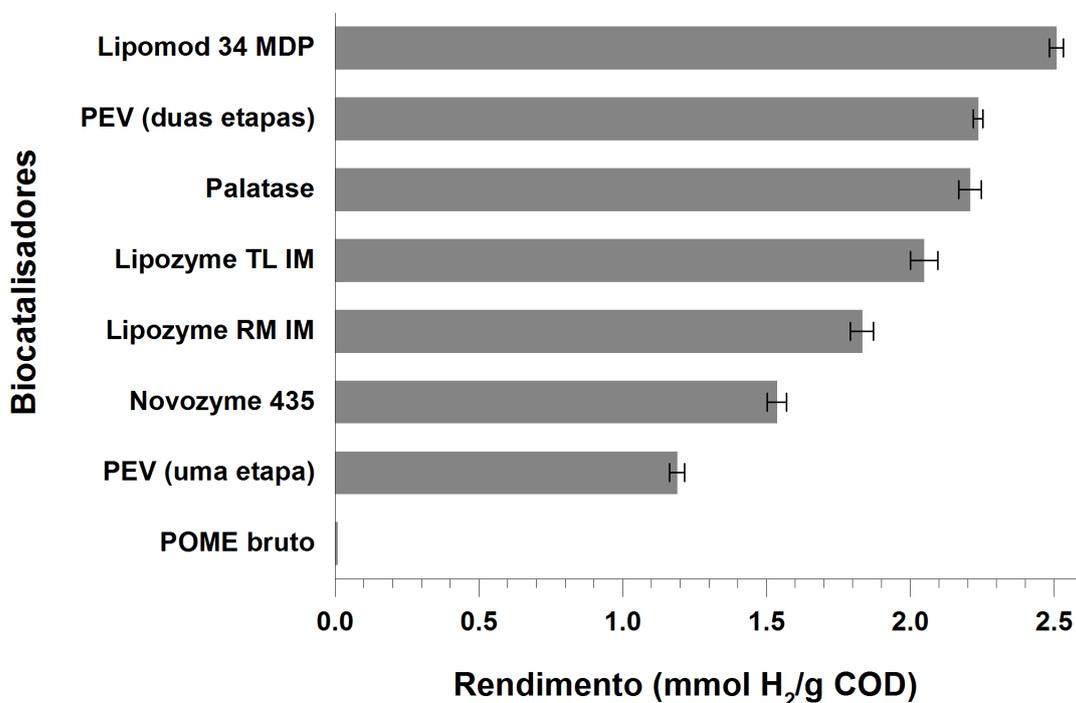


Figura 27: Comparação entre a fermentação do POME bruto com os sistemas onde a o POME foi primeiramente hidrolisado e posteriormente fermentado para a obtenção de hidrogênio. Cinco diferentes enzimas comerciais foram utilizadas na etapa hidrolítica para efeito comparativo. Posteriormente a fermentação foi conduzida por apenas 12 h em pH 7, 45 °C e 200 rpm.

Não foi detectada a produção H₂ via fermentação anaeróbia do POME bruto em 12 h, uma vez que já foi relatado que nestas condições a fase adaptativa dura 16 h. Por meio da Figura 27 é possível observar que o PEV, um *pool* de enzimas não comerciais, promoveu uma hidrólise satisfatória quando comparada com os 5 preparados enzimáticos comerciais mais frequentemente utilizados e citados na literatura (referencia). Mesmo que Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM sejam lipases, essas enzimas são conhecidas por catalisar reações de esterificação de forma mais eficiente do que hidrólise, sendo esperado um rendimento inferior ao PEV (LÓPEZ *et al.*, 2015; ROBERTO; GONC, 2017; TRAN; CHANG; LEE, 2016; YAN *et al.*, 2015). Por outro lado, Patalase e Lipomod 34 MDP são enzimas extremamente ativas na hidrólise de TAGs (KRAEHENBUEHL *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

O rendimento de H₂ obtido após 12 h de fermentação utilizando PEV e Patalase foi similar. Comparando PEV com Lipomod 34 MDP, a enzima comercial promoveu um aumento de rendimento de H₂ de 12%. Mesmo que o rendimento obtido quando a pré hidrólise foi realizada com Lipomod 34 MDP tenha sido 12% maior, a relação custo e benefício de usar um preparado enzimático não comercial, tal como o PEV parece mais atraente.

A Patalase, enzima comercial que promoveu a hidrólise enzimática onde posteriormente a produção biológica de H₂ foi similar à obtida com o PEV, custa, de acordo com o catálogo Sigma-Aldrich, 918 USD/L (Sigma-Aldrich, 2017). O valor de mercado da Lipomod 34 MDP, a enzima comercial que promoveu a hidrólise de POME superando em 12% o rendimento de hidrogênio biológico obtido quando comparado com a PEV, custa, de acordo com a companhia Biocatalysts, 383 USD/kg. De acordo com Cavalcanti *et al.*, 2014 e Aguiéiras *et al.*, 2015, o custo de produção da PEV é de 5,84 USD/kg. Esse preço foi encontrado por uma análise preliminar econômica feita no programa Super Pro Designer V. 8.5. Isso representa uma diferença de 210 vezes entre os preços da PEV e Lipomod 34 MDP e uma diferença de 504 vezes entre os preços da PEV e da Patalase.

Dessa forma, o PEV não só é uma preparação enzimática com alta atividade lipolítica, mas também uma alternativa consideravelmente mais barata do que as enzimas comerciais. Mesmo que o preço obtido seja para escalas laboratoriais, o que indica que os preços industriais podem ser mais baixos, sua diferença não justifica o uso de uma enzima comercial para obter um aumento de rendimento de 12%. Como mencionado anteriormente, esse aumento de rendimento pode estar relacionado com a fase hidrolítica lenta de fermentação anaeróbia. Nesse passo, os grupos bacterianos presentes no inóculo promovem a degradação da TAG presente no POME. Esse processo dura, aproximadamente, 16h para a fermentação do POME bruto, como pode ser observado na Figura 23. No processo em uma etapa, o rendimento obtido antes de 12h de fermentação foi de $1,19 \pm 0,02$ mmol H₂/g DQO, aproximadamente 75% maior do que o obtido sob hidrólise simultânea e fermentação.

5.9. Fermentação anaeróbia do HPLW visando a produção de metano

O HPLW bruto, antes da centrifugação, apresenta 1,91, 2,26, 0,53 e 0,47 g/L, respectivamente de ácidos acético, butírico, palmítico e oleico, enquanto o HPLW centrifugado, usado na fermentação do metano, apresenta 1,23, 0,93, 0,38 e 0,30 g/L dos mesmos ácidos, respectivamente. A queda da concentração de ácidos é causada, provavelmente, pela centrifugação e por adsorção destes compostos a biomassa microbiana.

A Figura 28 sintetiza os resultados obtidos para produção de metano a partir do HPLW. No começo da fermentação é possível notar a presença de diversos ácidos orgânicos, provenientes da produção de H₂, e que os mesmos são consumidos ao longo do tempo, conforme o rendimento do metano vai aumentando, o que indica que estes ácidos podem estar sendo convertidos a metano.

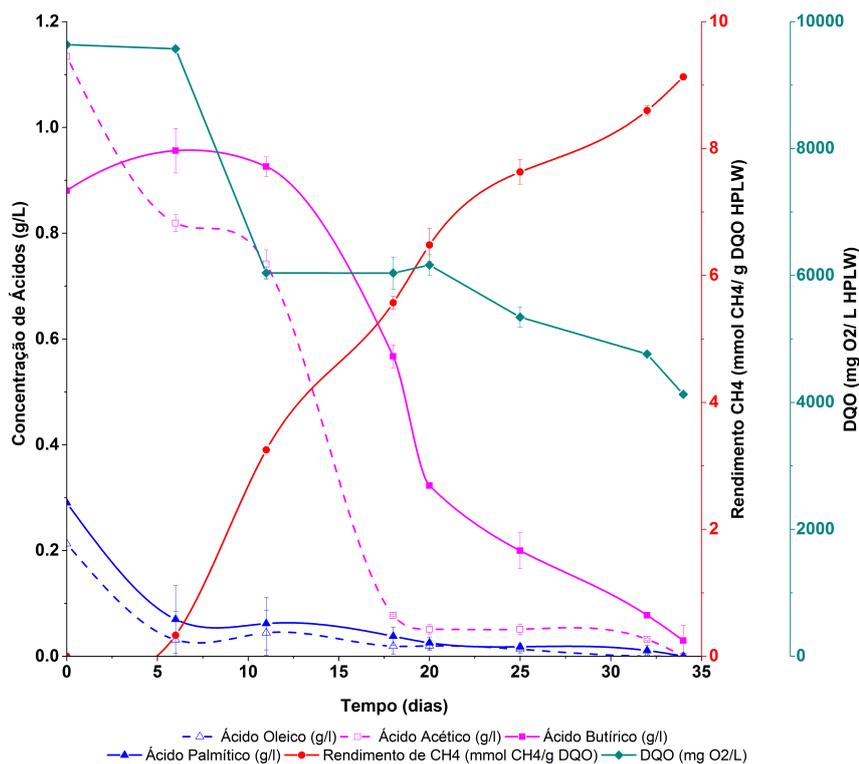


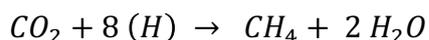
Figura 28: Acompanhamento da produção de metano utilizando HPLW da fermentação do POME como matéria-prima lodo anaeróbico como inóculo a 35 °C por 34 dias.

Nota-se que o ácido acético foi o primeiro a ser consumido, provavelmente por sua estrutura mais simples se comparado ao ácido butírico. A partir do quinto dia de fermentação, é possível observar que o ácido butírico também começa a ser consumido. O decréscimo dos ácidos palmítico e oleico corresponde ao aumento do ácido butírico, portanto, é provável que estes ácidos estejam sendo convertidos em burítico para serem, então, consumidos, gerando metano.

Ao final do processo, aproximadamente, 97, 92, 96 e 100 % dos ácidos acético, butírico, palmítico e oleico, respectivamente, foram consumidos.

Além disso, nos primeiros dias de fermentação, foi possível notar uma discreta produção de H₂ que pode estar sendo formado a partir dos ácidos palmítico e oleico, como na fermentação do POME para obtenção de H₂. Este hidrogênio residual não foi observado mais ao fim do processo, portanto, provavelmente utilizado da produção de metano, segundo a reação a seguir (Whiticar, Faber e Schoell, 1986).

Reação 6:



A DQO inicial foi reduzida em 57% ao final do processo e também acompanha o consumo dos ácidos e, conseqüentemente, o aumento do rendimento de metano. No período entre os dias 11 e 20 do processo fermentativo, a DQO se mantém constante. Uma possível explicação para esta ocorrência pode ser a mudança de substrato disponível, visto que a concentração de ácido acético está caindo rapidamente e faz-se necessária a adaptação do metabolismo para o consumo do ácido butírico presente no meio, o que ocasionaria um período de menor atividade produtora de CH₄. A cada grama de DQO, são produzidos 9,13 mmol de CH₄. Sabemos que 1 mol de CH₄ libera 890 KJ de energia (ENERGY, 2011). Assim sendo, os 9,13 mmol de CH₄ liberados correspondem a 8,12KJ, energia suficiente para, por exemplo, manter uma lâmpada de LED de 7 W acesa por, aproximadamente, 17 minutos.

O valor máximo de metano obtido no biogás analisado durante a fermentação foi de 26,53 %, no 34º dia. Em comparação com a literatura, esta porcentagem mostrou-se abaixo do esperado, uma vez que há relatos de 45 % em batelada (Charsi et al, 2007) e de até 65 % em processos contínuos (Krishnan et al, 2016). Este valor poderia ter sido maior caso a fermentação fosse realizada em maior tempo, idealmente, uma vez que, pelo gráfico, o rendimento de metano não se estabilizou nesse período. Uma possível causa para tais resultados é o volume de lodo e de meio final empregados nesta etapa fermentativa.

A redução da DQO ao longo do processo fermentativo mostra que a produção sequencial de H₂ e metano pode ser também, uma forma de tratar o efluente da etapa de produção de H₂. O resultado de 57% da redução de DQO pode ser considerado satisfatório, visto que estudos realizados, também em batelada, obtiveram valores próximos a 41% de remoção (Liu et al, 2013).

Considerando o processo sequencial, tem-se uma fermentação de 12 h de POME resultando em 2,56 mmolH₂/gDQO e uma fermentação de 34 dias de HPLW resultando em 9,13 mmolCH₄/gDQO. A energia liberada pelo H₂ produzido corresponde a 0,73 KJ, ao passo que a energia liberada pelo metano

corresponde a 8,12 KJ. A energia global resultante do processo sequencial é de 8,85 KJ/gDQO, o que seria suficiente para manter acesa uma lâmpada de LED de 7W por 21 min. Considerando a fermentação de 1 L de POME (47,2 g O₂ / L), teria-se a liberação de 471,72 KJ, o que seria suficiente para manter uma televisão de 21" ligada por 90 min, conforme esquema representativo da Figura 29.

Dessa forma, podemos dizer que a produção biológica de hidrogênio e metano é um processo que trata o efluente ao longo do processo – em especial na metanogênese.

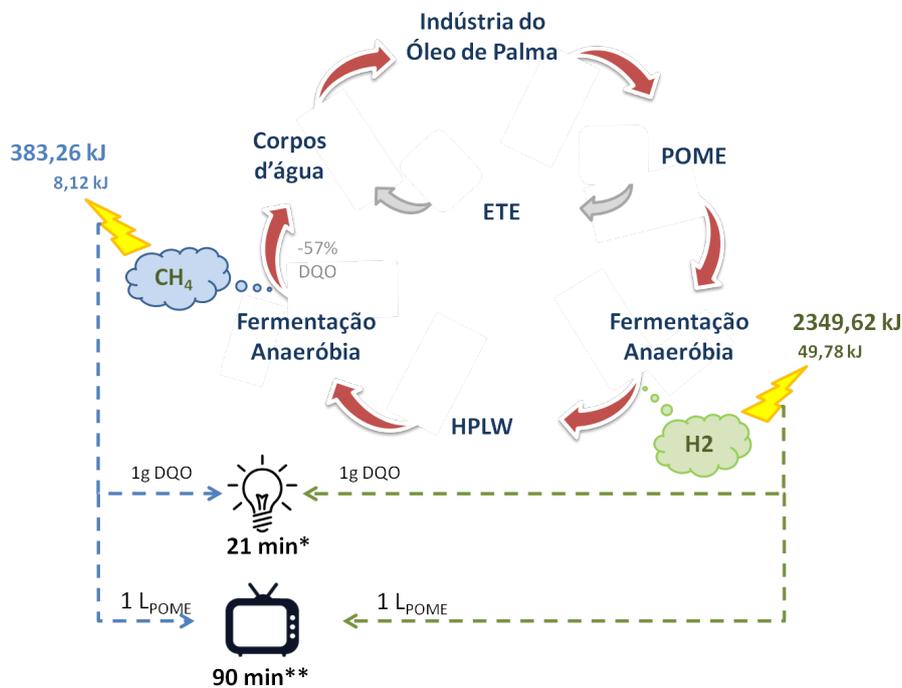


Figura 29: Aproveitamento da energia gerada ao longo de 34 dias da produção biológica de hidrogênio e metano via fermentação anaeróbia para 1 g de DQO ou 1 L de POME. 1 mol H₂ = 286 KJ; 1 mol CH₄ = 890 KJ. * valor referente à uma lâmpada de 100 W ** valor referente a um aparelho de televisão cujo consumo é de 90 W.

Capítulo 6: Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível verificar que o POME é fermentável sem prévia diluição;
- ✓ O pH inicial de 6,5 mostrou-se mais favorável para produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia;
- ✓ Observou-se a máxima produtividade de hidrogênio, nas condições de estudo, em 20 h ($0,086 \pm 0,004$ mmol H₂/g_{DQO}.h) para a fermentação do POME bruto;
- ✓ A concentração ideal do preparado enzimático vegetal (PEV) no meio fermentativo foi de 0,75% m/v,

A produtividade de hidrogênio no processo de fermentação simultânea à hidrólise foi de $0,127 \pm 0,001$ mmol H₂/g_{DQO}.h em 16 h

- ✓ Observou-se a máxima produtividade de hidrogênio em 12 h ($0,174 \pm 0,004$ mmol H₂/g_{DQO}.h) para a fermentação em duas etapas;
- ✓ Foi possível reduzir a fase adaptativa em 12 h, aumentar o rendimento em 14 % e a produtividade em 102% no processo em duas etapas, quando comparado às condições da fermentação do POME bruto;
- ✓ O rendimento e a produtividade de H₂ obtidos com o uso de PEV foram superiores àqueles com as enzimas comerciais, excetuando a LIPOMOD 34 MDP, a qual promoveu ao final do processo um rendimento 12% maior, porém com um custo de obtenção 65 vezes mais elevado.
- ✓ A fermentação do Efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW) visando à produção de metano foi satisfatória, alcançando 9 mmol_{CH₄}/g_{DQO}, correspondendo a valores previamente reportados na literatura. A DQO total do POME foi reduzida em 57% ao final da metanogênese.

Capítulo 7: Sugestões para trabalhos futuros

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar o reciclo do inóculo utilizando na fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio
- ✓ Realizar um estudo metagenômico das bactérias presentes no lodo visando a identificação dos principais gêneros
- ✓ Avaliar microscopicamente a entrada dos ácidos graxos de cadeia longa nas bactérias presentes no inóculo
- ✓ Avaliar a reutilização do HPLW para produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia
- ✓ Otimizar a produção de metano a partir do HPLW;
- ✓ Estudar outros meios de aproveitamento de HPLW;
- ✓ Analisar economicamente a produção total de biogás a partir do POME.

Capítulo 8: Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, Yunus *et al.* Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 42, p. 1260–1278, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.073>>.
- AHMED, Yunus *et al.* Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 42, p. 1260–1278, 2015b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114008983>>.
- AMAT, N A Ali *et al.* Tackling colour issue of anaerobically-treated palm oil mill effluent using membrane technology. **Journal of Water Process Engineering** v. 8, p. 221–226, 2015.
- ANDRÉ CREMONEZ, Paulo *et al.* Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 42, p. 415–428, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114008211>>.1364-0321.
- ANDROGA, Dominic Deo *et al.* Photofermentative Hydrogen Production in Outdoor Conditions. , 2012.
- ATIF, A. a Y *et al.* Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 30, n. 13–14, p. 1393–1397, 2005.
- BABITA, K.; SRIDHAR, S.; RAGHAVAN, K. V. Membrane reactors for fuel cell quality hydrogen through WGSR - Review of their status, challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, n. 11, p. 6671–6688, 2011.0360-3199.
- BAE, Dong Hun *et al.* Microcrystalline Cellulose added Carbonyl Iron Suspension and its Magnetorheology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.11.052>>.
- BAGHCHEHSARAEI, Bitaa *et al.* The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. v. 33, p. 4064–4073, 2008.
- BALAT, Havva; KIRTAY, Elif. Hydrogen from biomass e Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 14, p. 7416–7426, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.137>>.
- BIANCHI, Lucia *et al.* Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). **International Journal of Hydrogen Energy** v. 35, n. 22, p. 12216–12223, 2010.0360-3199.
- BOCKRIS, John O M. The hydrogen economy: Its history. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 6, p. 2579–2588, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.026>>.0360-3199.
- BRAGA, Lúcia Bollini *et al.* Hydrogen production by biogas steam reforming: A technical, economic and ecological analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 28, p. 166–173, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113005285>>.1364-0321.
- BUNDHOO, M A Zumar; MOHEE, Romeela. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production : A review. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 1, n. 41, p. 6713–6733, 2016.
- CABALLERO, Ana; PÉREZ, Pedro J. Methane as raw material in synthetic chemistry: the final frontier. **Chemical Society Reviews** v. 42, n. 23, p. 8809, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs60120j>>.0306-0012; 1460-4744.

CASTIBLANCO, Carmenza; MORENO, Alvaro; ETTER, Andrés. Impact of policies and subsidies in agribusiness: The case of oil palm and biofuels in Colombia. **Energy Economics** v. 49, p. 676–686 , 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140988315000997>>.

CAVALCANTI, Elisa *et al.* Acetone Powder From Dormant Seeds of *Ricinus communis* L. **Applied Biochemistry Biotechnology** v. 136, p. 57–65 , 2007.

CHAIPRAPAT, Sumate; LAKLAM, Tanyaluk. Enhancing digestion efficiency of POME in anaerobic sequencing batch reactor with ozonation pretreatment and cycle time reduction. **Bioresource Technology** v. 102, n. 5, p. 4061–4068 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.033>>.0960-8524.

CHAI SRI, Ronnachai *et al.* Effect of organic loading rate on methane and volatile fatty acids productions from anaerobic treatment of palm oil mill effluent in UASB and UFAF reactors. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** v. 29, n. SUPPL. 2, p. 311–323 , 2007.

CHENG, Jun *et al.* Combination of dark- and photo-fermentation to improve hydrogen production from *Arthrospira platensis* wet biomass with ammonium removal by zeolite. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 18, p. 13330–13337 , 2012.

CHENG, Jun *et al.* Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: effect of pretreatment on structural characterization and fermentation performance. **Bioresource technology** v. 179, p. 407–13 , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553572>>.

CHIN, May Ji *et al.* Biogas from palm oil mill effluent (POME): Opportunities and challenges from Malaysia’s perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 26, p. 717–726 , 2013.1364-0321.

CHING, Teck Wei; HARITOS, Victoria; TANKSALE, Akshat. Microwave Assisted Conversion of Microcrystalline Cellulose into Value Added Chemicals Using Dilute Acid Catalyst. **Carbohydrate Polymers** , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.066>>.

CHONG, M *et al.* Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, n. 2, p. 764–771 , 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.095>>.0360-3199.

COMBRES, Jean Claude *et al.* Simulation of inflorescence dynamics in oil palm and estimation of environment-sensitive phenological phases: A model based analysis. **Functional Plant Biology** v. 40, n. 3, p. 263–279 , 2013.1445-4408.

DAS, Debabrata *et al.* Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. **CURRENT SCIENCE** v. 90, n. 12, p. 1627–1637 , 2006.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos *et al.* Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 38, n. 7, p. 2986–2997 , 2013.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos; CAMMAROTA, Magali Christe; FERREIR. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA – ASPECTOS GERAIS E POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS. **Química Nova** v. 37, n. 5, p. 857–867 , 2014.

EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition** v. 57, n. 3–4, p. 319–341 , 2002.0921-9668 (Print)r0921-9668 (Linking).

ENERGY, U.S. Department of. **Biomass Energy Data Book**. [S.l: s.n.], 2011. 254 p. The Biomass Energy Data Book is a statistical compendium prepared and published by Oak Ridge National Laboratory (ORNL) under contract with the Biomass Program in the Energy Efficiency and Renewable Energy (EERE) program of the Department of

Energy (DOE). Designed for use as a convenient reference, the book represents an assembly and display of statistics and information that characterize the biomass industry, from the production of biomass feedstocks to their end use, including discussions on sustainability. This is the fourth edition of the Biomass Energy Data Book which is only available online in electronic format. There are five main sections to this book. The first section is an introduction which provides an overview of biomass resources and consumption. Following the introduction to biomass, is a section on biofuels which covers ethanol, biodiesel and bio-oil. The biopower section focuses on the use of biomass for electrical power generation and heating. The fourth section is on the developing area of biorefineries, and the fifth section covers feedstocks that are produced and used in the biomass industry. The sources used represent the latest available data. There are also two appendices which include frequently needed conversion factors, a table of selected biomass feedstock characteristics, and discussions on sustainability. A glossary of terms and a list of acronyms are also included for the reader's convenience.

FABER, Mariana De Oliveira; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana Santana. Bioresource Technology Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology** v. 219, p. 365–370, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.141>>.

FAOSTATS, U.N. Food and Agriculture Organization. *No Title*. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistics/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

FAOSTATS, U.N. Food and Agriculture Organization. *No Title*. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistics/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

FERREIRA-LEITÃO, Viridiana Santana *et al.* The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry. **Catalysts** v. 7, n. 9, 2017.

GHIMIRE, Anish *et al.* Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. **Journal of Environmental Management** v. 152, p. 43–48, 2015.

GUO, Zhen *et al.* Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. p. 0–3, 2013.

HABIB, M. A B *et al.* Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. **Aquaculture** v. 158, n. 1–2, p. 95–105, 1997.0044-8486.

HALLENBECK, Patrick C.; GHOSH, Dipankar. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology** v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009.0167-7799.

HAN, Wei; YE, Min; *et al.* Bioresource Technology Batch dark fermentation from enzymatic hydrolyzed food waste for hydrogen production. **Bioresource Technology** v. 191, p. 24–29, 2015.

HAN, Wei; WANG, Xiaonan; *et al.* Fermentative hydrogen production using wheat flour hydrolysate by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy** n. 40, p. 4474–4480, 2015.

HANSEN, Sune Balle *et al.* Trends in global palm oil sustainability research. **Journal of Cleaner Production** v. 100, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652615002723>>%5Cn<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652615002723>>.0959-6526.

HAWKES, F. R. *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 27, n. 11–12, p. 1339–1347, 2002.0360-3199.

HEMSHEMEIER, Anja; MELIS, Anastasios; HAPPE, Thomas. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae.

Photosynthesis Research v. 102, n. 2, p. 523–540 , 2009.1112000994155.

HILIGSMANN, Serge *et al.* Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. **Bioresource Technology** v. 102, n. 4, p. 3810–3818 , 2011.1873-2976 (Electronic)r0960-8524 (Linking).

HUNG, Chun Hsiung; CHANG, Yi Tang; CHANG, Yu Jie. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. **Bioresource Technology** v. 102, n. 18, p. 8437–8444 , 2011.0960-8524.

IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. **Produção Agrícola Municipal** v. 39, p. 101 , 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_%5Banual%5D/2012/pam2012.pdf>.

IGWE, J C; ONYEGBADO, C C. A Review of Palm Oil Mill Effluent (Pome) Water Treatment. **Global Journal of Environmental Research** v. 1, n. 2, p. 54–62 , 2007.1992-0075.

IRAM, Surtaj Hussain; CRONAN, John E. The μ -Oxidation Systems of Escherichia coli and Salmonella enterica Are Not Functionally Equivalent. v. 188, n. 2, p. 599–608 , 2006.

IZU, Kyoku *et al.* Aeration Conditions Affecting Growth of Purple Nonsulfur Bacteria in an Organic Wastewater Treatment Process. **Systematic and Applied Microbiology** v. 24, p. 294–302 , 2001.

JOHNSON, Matthew. Pyrolysis : A method for Mixed Polymer Recycling. **Combustion** , 2010.

KADNIKOV, Vitaly V *et al.* Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. v. 79, p. 348–358 , 2012.

KAMARUDIN, Kamrul Fakir *et al.* A review on wastewater treatment and microalgal by-product production with a prospect of palm oil mill effluent (POME) utilization for algae. **Der Pharma Chemica** v. 7, n. 7, p. 73–89 , 2015.

KAPDAN, Ilgi Karapinar; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology** v. 38, n. 5, p. 569–582 , 2006.0141-0229.

KRAEHENBUEHL, Karin *et al.* Selective enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid lactones in a model system and in a coffee extract . Application to reduction of coffee bitterness. **Food Chemistry** v. 218, p. 9–14 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.055>>.

KRISHNAN, Santhana *et al.* Process enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill effluent using two-stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 41, n. 30, p. 12888–12898 , 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319916302178>>.

KUMAR, Krithika; MELLA-HERRERA, Rodrigo a.; GOLDEN, James W. Cyanobacterial heterocysts. **Cold Spring Harbor perspectives in biology** v. 2, n. 4, p. 1–19 , 2010.1943-0264 (Electronic).

KUMARI, Sheena; NASR, Mahmoud; KUMAR, Santhosh. Technological Advances in Biohydrogen Production from Microalgae. p. 347–360 , 2017.9783319510101.

KUMARI, Sinu; DAS, Debabrata. Bioresource Technology Improvement of gaseous energy recovery from sugarcane bagasse by dark fermentation followed by biomethanation process. **Bioresource Technology** v. 194, p. 354–363 , 2015.

KUSS, Vivian Vicentini *et al.* Potential of biodiesel production from palm oil at

Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 50, p. 1013–1020, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115005249>>.

LANKA, Suseela; PYDIPALLI, Muralidhara; LATHA, J. Naveena Lavanya. Optimization of Process Variables for Extracellular Lipase Production from *Emericella nidulans* NFCCI 3643 Isolated from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites Using OFAT Method. **Research Journal of Microbiology** v. 10, n. 2, p. 38–53, 2015. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2015.38.53>>.

LEAÑO, Emmanuel P.; ANCENO, Alfredo J.; BABEL, Sandhya. Ultrasonic pretreatment of palm oil mill effluent: Impact on biohydrogen production, bioelectricity generation, and underlying microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 17, p. 12241–12249, 2012.

LEE, Dong Yeol *et al.* Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. **Bioresource Technology** v. 101, n. 1 SUPPL., p. 42–47, 2010.0960-8524.

LIU, Huanhuan; HUANG, Di; WEN, Jianping. Integrated intracellular metabolic profiling and pathway analysis approaches reveal complex metabolic regulation by *Clostridium acetobutylicum*. **Microbial Cell Factories** p. 1–14, 2016.

LÓPEZ, Beatriz Castillo *et al.* Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 119, n. 6, p. 706–711, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.11.002>>.

MAMIMIN, Chonticha *et al.* Simultaneous thermophilic hydrogen production and phenol removal from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 20, p. 15598–15606, 2012.0360-3199.

MBA, Ogan I.; DUMONT, Marie-Josée; NGADI, Michael. Palm Oil: Processing, Characterization and Utilization in the Food Industry – A Review. **Food Bioscience** v. 10, p. 26–41, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221242921500005X>>.

MCINERNEY, Michael J; BRYANT, Marvin P; PFENNIG, Norbert. Microbiology. v. 135, p. 129–135, 1979.

MCKAIN, Kathryn *et al.* Methane emissions from natural gas infrastructure and use in the urban region of Boston, Massachusetts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 112, n. 7, p. 1941–6, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/112/7/1941.short>>.2014072914.

MERSCH, Dirk *et al.* Wiring of Photosystem II to Hydrogenase for Photoelectrochemical Water Splitting. , 2015.

MISHRA, Preeti; ROY, Shantonu; DAS, Debabrata. Comparative evaluation of the hydrogen production by mixed consortium, synthetic co-culture and pure culture using distillery effluent. **Bioresource Technology** v. 198, p. 593–602, 2015.

MOHAMMADI, Parviz; IBRAHIM, Shaliza; SUF, Mohamad; *et al.* Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. v. 19, p. 1654–1658, 2011.

MOHAMMADI, Parviz; IBRAHIM, Shaliza; MOHAMAD ANNUAR, Mohamad Suffian; *et al.* Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. **Journal of Cleaner Production** v. 19, n. 14, p. 1654–1658, 2011.0959-6526.

NATHOA, Chananchida; SIRISUKPOCA, Ubonrat; PISUTPAISAL, Nipon. Production of hydrogen and methane from banana peel by two phase anaerobic

fermentation. **Energy Procedia** v. 50, p. 702–710 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.086>>.

NITIPAN, Supachai *et al.* Microbial community analysis of thermophilic mixed culture sludge for biohydrogen production from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 9 , 2014.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. **Waste and Biomass Valorization** v. 1, n. 1, p. 21–39 , 2010.1877-2641.

NURLIYANA, M. Y. *et al.* Effect of C/N ratio in methane productivity and biodegradability during facultative co-digestion of palm oil mill effluent and empty fruit bunch. **Industrial Crops and Products** v. 76, p. 409–415 , 2015.

O-THONG, Sompong *et al.* Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, n. 4, p. 1221–1231 , 2008.

O-THONG, Sompong; PRASERTSAN, Poonsuk; INTRASUNGKHA, Nugul. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium -rich sludge. v. 33, p. 1221–1231 , 2008.

OH, You Kwan *et al.* Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. **Bioresource Technology** v. 102, n. 18, p. 8357–8367 , 2011.0960-8524.

OKWUTE, O.; STEPHEN, E.; ANYANWU, P. Biodegradation of Palm Oil Mill Effluent (POME) and Lipase Activity by *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. **British Microbiology Research Journal** v. 9, n. 5, p. 1–10 , 2015. Disponível em: <<http://sciencedomain.org/abstract/10071>>.

ÖZGÜR, Ebru; PEKSEL, Begüm. Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation. **Journal of Cleaner Production** v. 52, p. 14–20 , 2013.

PARTHASARATHY, Prakash; NARAYANAN, K. Sheeba. Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield - A review. **Renewable Energy** v. 66, p. 570–579 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.025>>.

PARTHASARATHY, Shridharan; GOMES, Rachel L.; MANICKAM, Sivakumar. Process intensification of anaerobically digested palm oil mill effluent (AAD-POME) treatment using combined chitosan coagulation, hydrogen peroxide (H₂O₂) and Fenton's oxidation. **Clean Technologies and Environmental Policy** v. 18, n. 1, p. 219–230 , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10098-015-1009-7>>.

PAWAR, Sudhanshu S; BYRNE, Eoin; NIEL, Ed W J Van. Enriched Methane. p. 111–127 , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22192-2>>.978-3-319-22191-5.

PUDUKUDY, Manoj *et al.* Renewable hydrogen economy in Asia – Opportunities and challenges: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 30, p. 743–757 , 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113007648>>.1364-0321.

RASDI, Zatilfarihiah *et al.* Kinetic analysis of biohydrogen production from anaerobically treated POME in bioreactor under optimized condition. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 23, p. 17724–17730 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.095>>.

REGINATTO, Valeria; ANTÔNIO, Regina Vasconcellos. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. v. 335, p. 323–335 , 2015.

RESEARCH, Grand View. *Palm Oil Market Analysis By Derivative (Crude Palm Oil, Palm Kernel Oil, Palm Kernel Cake), By Application (Edible Oil, Cosmetics, Biodiesel, Lubricants, Surfactants) And Segment Forecasts To 2022* . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/palm-oil-market>>. , 2015

RESNICK, Richard J. **The economics of biological methods of hydrogen production**. Massachusetts Institute of Technology, 2004. 108 p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1721.1/17885>>.

ROBERTO, Gilmar; GONC, José Eduardo. Enzymatic interesterification of crambe oil assisted by ultrasound. v. 97, p. 218–223 , 2017.

RUPANI, Pf; SINGH, Rp. Review of current palm oil mill effluent (POME) treatment methods: Vermicomposting as a sustainable practice. **World Applied Sciences ...** v. 11, n. 1, p. 70–81 , 2010. Disponível em: <<http://www.academia.edu/download/30492048/12.pdf>>.1818-4952.

SARMA, Saurabh Jyoti *et al.* Hydrogen biorefinery: Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 50, p. 942–951 , 2015.1364-0321.

SINGH, Lakhveer; WAHID, Zularisam a. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry** v. 21, p. 70–80 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>>.

SINGH, Rajinder *et al.* Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature** v. 500, n. 7462, p. 335–9 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3929164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nature12309>>.1476-4687 (Electronic)n0028-0836 (Linking).

SRIVASTAVA, Alka; MATHUR, Mohan. Studies on Ricinus Lipase Enzyme Isolated from Castor Seeds. , 2016.

SUKSONG, Wantanasak; KONGJAN, Prawit; O-THONG, Sompong. Biohythane Production from Co-Digestion of Palm Oil Mill Effluent with Solid Residues by Two-Stage Solid State Anaerobic Digestion Process. **Energy Procedia** v. 79, n. Dc, p. 943–949 , 2015.

SUWANNO, Saowakon *et al.* The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. **Fuel** v. 195, p. 82–87 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.049>>.

TANIKKUL, Pinanong; PISUTPAISAL, Nipon. Biohydrogen Production under Thermophilic Condition from Ozonated Palm Oil Mill Effluent. **Energy Procedia** v. 61, p. 1234–1238 , 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876610214028963>>.

TAYLOR, Publisher; TAKAI, Yasuo. Soil Science and Plant Nutrition The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil. n. October 2014, p. 37–41 , 2012.

TEE, Si Yin *et al.* Recent Progress in Energy-Driven Water Splitting. , 2017.

TRAN, Dang-thuan; CHANG, Jo-shu; LEE, Duu-jong. Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification processes. **Applied Energy** , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.11.006>>.

URBANIEC, Krzysztof; BAKKER, Rob R. Biomass residues as raw material for dark

hydrogen fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 0, p. 3648–3658 , 2015.

WONG, Yee Meng; WU, Ta Yeong; JUAN, Joon Ching. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 34, p. 471–482 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>>.

YACOB, Shahrakbah *et al.* Baseline study of methane emission from anaerobic ponds of palm oil mill effluent treatment. **Science of the Total Environment** v. 366, n. 1, p. 187–196 , 2006.0048-9697.

YAKUB, Mohammed Isah *et al.* Pyrolysis of Oil Palm Residues in a Fixed Bed Tubular Reactor. n. April, p. 185–193 , 2015.

YAN, Jinyong *et al.* Critical Reviews in Biotechnology Harnessing biodiesel-producing microbes : from genetic engineering of lipase to metabolic engineering of fatty acid biosynthetic pathway Harnessing biodiesel-producing microbes : from genetic engineering of lipase to metabolic engineering of fatty acid biosynthetic pathway. v. 8551, n. November , 2015.

YOSSAN, Siriporn; O-THONG, Sompong; PRASERTSAN, Poonsuk. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 18, p. 13806–13814 , 2012a.0360-3199.

YOSSAN, Siriporn; O-THONG, Sompong; PRASERTSAN, Poonsuk. Effect of initial pH , nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 37, n. 18, p. 13806–13814 , 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.151>>.

ZHANG, X M *et al.* Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. p. 1–15 , 2016.

ZHU, Huguang *et al.* Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology** v. 99, n. 11, p. 5078–5084 , 2008.0960-8524.

Anexos
