



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB

Yasmim Arantes da Fonseca

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGVs) BIOBASEADOS A PARTIR
DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DO BAGAÇO DE OLIVA PRÉ-TRATADO
HIDROTERMICAMENTE**

Ouro Preto

2020



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB

Yasmim Arantes da Fonseca

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGVs) BIOBASEADOS A PARTIR
DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DO BAGAÇO DE OLIVA PRÉ-TRATADO
HIDROTERMICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de concentração Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F676p Fonseca, Yasmim Arantes Da .

Produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) biobaseados a partir da digestão anaeróbia do bagaço de oliva pré-tratado hidrotermicamente. [manuscrito] / Yasmim Arantes Da Fonseca. - 2020.

110 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto.

Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Bagaço de oliva. 2. Pré-tratamento hidrotérmico. 3. Digestão anaeróbia. 4. Acidificação. 5. Ácidos Graxos Voláteis. I. Baêta, Bruno Eduardo Lobo. II. Gurgel, Leandro Vinícius Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Angela Maria Raimundo - SIAPE: 1.644.803



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGVs) BIOBASEADOS A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DO BAGAÇO DE OLIVA PRÉ-TRATADO HIDROTERMICAMENTE

Autora: Yasmim Arantes da Fonseca

Dissertação defendida e aprovada, em 18 de fevereiro de 2020, pela banca examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto


Prof. Dr. Fábio de Ávila Rodrigues
Universidade Federal de Viçosa


Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ser o meu guia, o meu refúgio e a minha fortaleza. Obrigada Senhor, por ser luz nos dias escuros e por cuidar de cada passo do meu caminho, ainda que eu não entendesse os porquês de algumas voltas.

Aos meus pais, Cristina e Rubens, por se esforçarem tanto para que os meus sonhos fossem realizados, por apoiarem as minhas escolhas e por me ensinarem a confiar em Deus o tempo todo. Mãe, obrigada por todos os seus sacrifícios, por ser meu espelho de luta, determinação e pelo melhor colo do mundo.

Ao Juliano, por toda ajuda, afeto e generosidade.

Aos meus irmãos Bárbara, Lucas e Gustavo por nossa união, por acreditarem na carreira acadêmica, por vibrarem pelas minhas conquistas e por me proporcionarem os melhores sorrisos. Ao Ramon, por tanta consideração. Zira, não há palavras suficientes para expressar a gratidão por uma vida inteira de dedicação.

À Lavínea e João Miguel, por mostrarem que a minha capacidade de amar é infinita.

Ao Lucas, por tudo e por tanto.

Ao Bruno, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e pelo incentivo ao longo da caminhada. Ao professor Leandro Gurgel por confiar em meu potencial e por ser um exemplo de profissionalismo. À Ananda, pela solicitude e por toda ajuda no Lab Massas.

À minha família, por todo o carinho e por compreender as ausências. Em especial à minha avó Gersonita e aos meus padrinhos Janaína e Herbert.

Aos amigos do Proamb (especialmente Luisa, Grazi, Andressa, Mari e Elô) e do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (Aline, Oscar, Nayara, Adonai, André, Murilo, Isadora, Daianna, Gustavo, Natália, Elisa, Paula, Mayara, André R., Raissa e Marina) pelos momentos compartilhados. A companhia de vocês fez com que os dias fossem mais leves e divertidos! Em especial à Aline, Oscar, Nayara, Adonai e André pela acolhida no ambiente de trabalho e por toda a experiência compartilhada.

Aos amigos Carol, Carinna, Caique, Mayra, Victor e Yuri por se fazerem presente, mesmo que a distância física nos separe.

Às meninas do meu lar, por terem se tornado a minha família em Ouro Preto.

Àqueles que mesmo de longe torceram, confiaram, oraram.... Mil vezes obrigada.

RESUMO

Um resíduo lignocelulósico produzido em grande quantidade no Brasil é o bagaço de oliva gerado durante a extração do azeite. Estima-se que para cada tonelada de azeitona processada sejam gerados 800 kg do resíduo. Com o intuito de inserir a indústria do azeite nos propósitos da economia circular biobaseada, o presente trabalho investigou a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) a partir da fermentação do bagaço de oliva pré-tratado hidrotérmicamente. Nessa perspectiva, as condições experimentais do pré-tratamento hidrotérmico (PTH) do bagaço de oliva foram definidas por meio do planejamento experimental Doehlert, cujas variáveis independentes avaliadas foram temperatura (80 a 200 °C) e tempo (30 a 100 min). Três condições de PTH (C1: 125°C, 53min; C2: 161°C, 62min; C3: 191°C, 83min) foram selecionadas por meio da ferramenta desejabilidade do programa Statistica® para produzir substratos para a fermentação acidogênica em fase líquida (DA-L), semissólida (DA-Ss) e sólida (DA-S). Logo, a fração sólida (FS), a fração líquida (FL) e a mistura do bagaço bruto (B) pré-tratado foram avaliadas como substratos potenciais para acidificação durante a digestão anaeróbia (DA). O PTH melhorou a eficiência de acidificação (EA) em todos os sistemas de DA estudados, sendo que a C2 da DA-L apresentou 64,87% de EA. Em todos os cenários avaliados, o ácido acético foi o ácido predominante. Os compostos fenólicos, que apresentaram toxicidade a uma concentração maior que 6,34 g L⁻¹ para a DA-L, mudaram a rota metabólica dos microrganismos, aumentando a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) de cadeia longa nos sistemas em DA-L e DA-S. Além disso, o tipo de sistema de digestão anaeróbia e a severidade do PTH tiveram grande influência no perfil e na concentração dos AGVs produzidos, assim como na comunidade microbiana predominante. Os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram os mais representativos na DA acidogênica dos substratos oriundos do bagaço de oliva, com as espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei* dominando a DA-L e DA-Ss. De qualquer forma, a C2 da DA-Ss gerou a combinação de concentração (19770 mg L⁻¹) e perfil dos AGVs com maior rentabilidade econômica potencial (131\$/ton). A otimização dos parâmetros do bioprocessamento para essa condição foi realizada por uma matriz Doehlert que teve como variáveis independentes o pH (5-9) e a relação alimento/microrganismo (A/M) (0,5– 3 g SV g SV⁻¹). A função de desejabilidade foi aplicada e apontou que as maiores concentrações de AGVs com o maior percentual de ácidos de cadeia longa podem ser alcançados na condição pH=8 e relação A/M=3.

Palavras-chave: bagaço de oliva; pré-tratamento hidrotérmico; digestão anaeróbia; acidificação; ácidos graxos voláteis.

ABSTRACT

A lignocellulose residue produced in a large amount in Brazil is the olive mill solid waste (OMSW), which is generated during olive oil extraction. It is estimated that 800 kg of olive wastes are generated for each ton of olive processed. Aiming to insert the olive oil industry in the purposes of the biobased circular economy, the present work investigated the production of biobased volatile fatty acids (VFAs) from the fermentation of hydrothermally pretreated olive mill solid waste. The pretreated olive mill solid fraction (OMSF), pretreated olive mill liquid fraction (OMLF) and pretreated OMSW were evaluated as potential substrates for acidification during the anaerobic digestion (AD). Thus, the experimental conditions of the hydrothermal pretreatment (HP) of the olive mill solid waste were defined using the Doehlert experimental design and independent variables evaluated were temperature (80 to 200 °C) and time (30 to 100 min). Three HP conditions (C1: 125°C, 53min; C2: 161°C, 62min; C3: 191°C, 83min) were selected from desirability tool of the Statistica® to produce substrates for acidogenic AD in liquid (L-AD), semi-solid (Ss-AD) and solid (S-AD) phases. HP improved the acidification efficiency (AE) of all AD systems evaluated, with AD-L C2 showing 64.87% of AE. In all evaluated scenarios, acetic acid was the predominant acid. Phenolic compounds showed toxicity at a concentration higher than 6,34 g L⁻¹ for AD-L and changed the metabolic pathway of microorganisms, increasing the production of longer chain volatile fatty acids (VFAs) in the L-AD and S-AD systems. Moreover, the type of anaerobic digestion system and the HP severity had a major influence on the profile and concentration of VFAs produced, as well as on the predominant microbial community. The phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* were the most representative in acidogenic AD of the olive mill solid waste substrates, with the species *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter hormaechei* dominating the AD-L and AD-Ss. Anyway, the AD-Ss/C2 promoted the combination of VFA concentration (19770 mg L⁻¹) and profile with the highest potential economic profitability (131 \$/ton). The optimization of the bioprocess parameters for this condition was performed by a Doehlert matrix whose independent variables were pH (5-9) and the food/microorganism ratio (F/M) (0,5 – 3 g SV g SV⁻¹). The desirability function was implemented and showed that the highest concentrations of VFAs with the highest percentage of longer chain VFAs can be achieved at pH=8 and F/M=3.

Key-words: olive mill solid waste, hydrothermal pretreatment, anaerobic digestion; acidification; volatile fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas tecnológicas para biorrefinarias a partir de diferentes biomassas	16
Figura 2: Produção mundial de azeite	18
Figura 3: Diagrama do processo com sistema de extração contínuo de duas e três fases	20
Figura 4: Composição da parede celular vegetal.....	23
Figura 5: Representação estrutural de uma molécula de celulose.....	24
Figura 6: Estrutura de lignina de madeira mole	26
Figura 7: Ilustração das transformações que sofrem a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento.....	27
Figura 8: Mecanismo da digestão anaeróbia a partir de resíduos lignocelulósicos.....	32
Figura 9: Fluxograma gráfico do delineamento do trabalho.....	41
Figura 10: Distribuição granulométrica do bagaço de oliva bruto seco	56
Figura 11: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis independentes temperatura (T) e tempo (t) e seus efeitos: (a) solubilização de DQO ($Y1$,%), (b) razão de açúcares C5 mais C6 por inibidores (FF, HMF e compostos fenólicos) no hidrolisado ($Y2$) e (c) compostos fenólicos no hidrolisado ($Y3$)	62
Figura 12: Superfícies de resposta geradas a partir de modelos quadráticos para (a) solubilização de DQO ($Y1$), (b) razão de açúcares C5-C6 e inibidores no hidrolisado ($Y2$) e (c) compostos fenólicos no hidrolisado ($Y3$).....	65
Figura 13: Perfil (a) e concentração de AGVs (b) gerados para a DA-L, DA-S e DA-Ss para as três condições de desejabilidade (C1-C3) de PTH estudadas	68
Figura 14: a) Modelo gerado para relação da eficiência de acidificação com a concentração de compostos fenólicos na DA-L ; b) Correlação entre concentração de compostos fenólicos, fator severidade e percentual de ácidos de cadeia longa gerados na DA-L.....	71
Figura 15: Receitas potenciais para os AGV produzidos nos sistemas DA-L, DA-S e DA- Ss avaliados.....	75
Figura 16: Dados experimentais da produção bioquímica de metano a partir da fração líquida do bagaço bruto e da fração líquida gerado pelo bagaço de oliva pré-tratado a 161°C e 62 minutos (C2).....	78
Figura 17: Abundância relativa dos filos mais representativos na fermentação acidogênica dos substratos oriundos do bagaço de oliva.....	81

Figura 18: Perfil dos AGVs gerados em todas as condições experimentais apresentadas na Matriz Doehlert para otimização das condições do bioprocesso.....	90
Figura 19: Cromatogramas das amostras pós fermentação: a) ensaio realizado a pH 5,5 e relação A/M de 2 g SV g SV ⁻¹ , sem adição de tampão e b) ensaio realizado a pH 5 e relação A/M de 2,4 g SV g SV ⁻¹ , com adição de tampão.....	91
Figura 20: Superfícies de resposta geradas a partir de modelos quadráticos para (a) concentração total de AGVs (<i>Y4</i>), (b) ácidos de cadeia longa (%) (<i>Y5</i>).....	93
Figura 21: Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis independentes relação alimento / microrganismo (<i>A/M</i>) e <i>pH</i> e seus efeitos na (a) concentração de AGVs (<i>Y4</i> , g L ⁻¹); (b) ácidos de cadeia longa (<i>Y5</i> , %).....	94
Figura 22: Perfil para valores previstos e desejabilidade.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Breve revisão da literatura sobre trabalhos que usam o bagaço de oliva	21
Tabela 2: Aplicações e preço de mercado de alguns AGVs	36
Tabela 3: Trabalhos reportados na literatura que estudaram a produção de AGVs	38
Tabela 4: Caracterização físico-química das frações do bagaço de oliva moído retido e passante em 20 mesh.....	57
Tabela 5: Principais características físico-químicas do bagaço de oliva bruto (pasta), da fração sólida e da fração líquida.....	58
Tabela 6: Matriz de experimentos Doehlert utilizada para otimização do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva com as variáveis independentes decodificadas e as respostas avaliadas.....	60
Tabela 7: Coeficientes de regressão para as variáveis dependentes avaliadas no planejamento experimental Doehlert.....	61
Tabela 8: Composição química dos hidrolisados obtidos no PTH do bagaço de oliva utilizando as condições de desejabilidade (C1-C3)	66
Tabela 9: Eficiência na acidificação e DQO _{AGV} presente na fase líquida no final dos testes acidogênicos para os sistemas de digestão anaeróbica avaliados.....	67
Tabela 10: Algumas enzimas produzidas pelas espécies <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Enterobacter hormaechei</i> envolvidas em rotas metabólicas relacionadas à produção de ácidos orgânicos	85
Tabela 11: Algumas enzimas produzidas pelo gênero <i>Clostridium</i> envolvidas em rotas metabólicas relacionadas à produção de ácidos orgânicos	87
Tabela 12: Matriz de experimentos Doehlert utilizada para otimização da fermentação acidogênica do bagaço de oliva pré-tratado a 161°C e 62 minutos com as variáveis independentes decodificadas e as respostas avaliadas.....	90
Tabela 13: Coeficientes de regressão para as variáveis dependentes avaliadas no planejamento experimental Doehlert (DED)	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AGVs – Ácidos Graxos Voláteis

A/M – Alimento/ Microrganismo

B – Mistura do bagaço bruto

COA - Carga orgânica aplicada

C1 – Condição 1

C2 – Condição 2

C3 – Condição 3

DA – Digestão anaeróbia

DA-L – Digestão anaeróbia em estado líquido

DA-S – Digestão anaeróbia em estado sólido

DA-S – Digestão anaeróbia em estado semissólido

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EA – Eficiência de acidificação

FF – 2-furfuraldeído

FS – Fração sólida

FL – Fração líquida

HMF – 5-hidroximetil 2-furfuraldeído

PTH – Pré-tratamento hidrotérmico

RLS – Razão líquido-sólido

S₀ – Fator severidade

ST – Sólidos Totais

SV – Sólidos suspensos voláteis

TDH – Tempo de detenção hidráulica

T – Temperatura

t – tempo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Economia ciclo biobaseada e suas perspectivas	15
3.2. Indústria de azeite e bagaço de oliva	17
3.2.1. Processamento do azeite e geração do bagaço de oliva.....	19
3.2.2. Biomassa lignocelulósica.....	23
3.3. Pré-tratamento	26
3.3.1. Pré-tratamento hidrotérmico	28
3.4. Digestão anaeróbia para produção de AGVs	31
3.4.1. Ácidos graxos voláteis: importância, aplicações e tendências	35
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO	40
5. METODOLOGIA	41
5.1. Caracterização do bagaço de oliva	41
5.2. Determinação de sólidos totais, voláteis e fixos do bagaço úmido	41
5.3. Análise granulométrica	42
5.4. Teor de umidade	42
5.5. Lipídios	43
5.6. Extrativos	43
5.7. Teor de lignina insolúvel pelo método Klason e cinzas	44
5.7.1. Teor de lignina solúvel.....	44
5.7.2. Determinação dos teores de celulose e hemicelulose	45
5.7.3. Balanço de massa.....	46
5.8. Demanda química de oxigênio (DQO): refluxo aberto.....	46
5.9. Fenóis	48
5.10. Determinação de carbono e nitrogênio total	49
5.10.1. Determinação de Nitrogênio Kheldal e proteínas nas frações sólidas	49
5.11. Pré-tratamento hidrotérmico.....	50
5.12. Planejamento experimental e análises estatísticas	51

5.12.1.	Planejamento experimental aplicado ao pré-tratamento hidrotérmico.....	51
5.12.2.	Planejamento experimental aplicado à fermentação acidogênica.....	52
5.13.	Acidificação do bagaço de oliva pré-tratado.....	52
5.14.	Quantificação de ácidos graxos voláteis das frações líquidas após a DA.....	54
5.15.	Ensaio de potencial bioquímico de metano (PBM).....	54
5.16.	Metagenômica	55
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6.1.	Caracterização do bagaço de oliva	56
6.1.1.	Análise granulométrica e caracterização físico-química do bagaço de oliva	56
6.2.	Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva.....	59
6.3.	Testes de fermentação acidogênica.....	66
6.3.1.	Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-L.....	69
6.3.2.	Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-S.....	72
6.3.3.	Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-Ss	73
6.4.	Viabilidade econômica da produção de AGVs a partir do bagaço de oliva.....	74
6.4.1.	Avaliação do uso da fração sólida para produção de AGVs e da fração líquida para a produção de metano	76
6.5.	Metagenômica	80
6.5.1.	Análise microbiana na DA-L	82
6.5.2.	Análise microbiana da DA-S.....	86
6.5.3.	Análise microbiana da DA-Ss	88
6.6.	Otimização das condições do bioprocessamento para a produção de ácidos orgânicos considerando uma DA-Ss	89
7.	CONCLUSÃO.....	98
8.	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	99
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

O Relatório das Nações Unidas “World Population Projects” aponta que a população mundial está crescendo cerca de 1,10% ao ano, chegando a 9,8 bilhões de habitantes em 2050 (UNITED NATIONS, 2017). Esse aumento é acompanhado de uma crescente demanda por alimentos e bens de consumo, gerando uma grande quantidade de resíduos agroindustriais subutilizados, nos quais o potencial não é racionalmente aproveitado, gerando assim muitos passivos ambientais (MASSOLA; MAZIERO, 2017).

Um resíduo lignocelulósico produzido em grande quantidade no mundo é o bagaço de oliva gerado durante a extração do azeite. No Brasil, o azeite de oliva é apreciado na culinária e o seu consumo é crescente ao longo dos últimos anos. O país foi o segundo maior importador do produto na safra 2017/2018 e a produção interna começou a ter expansão notável a partir de 2008. Estima-se que em 2018 a produção de azeite de oliva foi de 136 toneladas, o que representa um aumento de 43% em relação às 95 toneladas produzidas em 2017. Uma vez que o rendimento da extração do azeite corresponde a apenas 20% do processo, sendo 80% da massa de entrada descartada ao final na forma de subproduto, a indústria oleícola brasileira gerou cerca de 600 toneladas de resíduos em 2018 (FERNANDES, A; COSTA, A.; SILVA, C.; SILVEIRA, 2015; CAETANO, 2018; INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL a., 2018; KIST, B; SANTOS, C; OLIVEIRA, 2018).

O cenário apresentado revela que o manejo dos resíduos sólidos e líquidos oriundos do processamento do azeite é um desafio econômico e ambiental para os produtores brasileiros, uma vez que esse segmento gera resíduos em grandes volumes inerentes ao processo industrial e que variam de acordo com o tipo de extração empregado, o tipo de azeitona e maturidade do fruto (KIST, B; SANTOS, C; OLIVEIRA, 2018). A geração desses resíduos associada a algumas de suas características, tais quais baixo pH, alta quantidade de poluentes orgânicos e compostos fenólicos, pode causar sérios problemas ambientais (RINCÓN et al., 2009)

Atualmente, grande parte do bagaço de oliva gerado no Brasil é destinado para a compostagem orgânica, processo que pouco aproveita o carbono presente na biomassa. Na União Europeia, local em que a produção de azeite de oliva é mais expressiva, ele pode ter diferentes finalidades. Alguns estudos apontam a possibilidade da utilização do resíduo como combustível direto para geração de energia ou para geração de biogás a partir da digestão anaeróbia (DA) (SICILIANO; STILLITANO; DE ROSA, 2016; SERRANO et al., 2017). No viés da economia ciclo biobaseada existem trabalhos que avaliam a produção de outros compostos produzidos por processos alternativos e sustentáveis, tais como compostos

fenólicos, etanol, furfural, carvões, ácidos orgânicos, dentre outros (RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; SERRANO *et al.*, 2017; YARIMTEPE *et al.*, 2018).

A digestão anaeróbia (DA) tem sido avaliada como um bioprocessamento alternativo para o tratamento dos resíduos gerados na extração de azeite. Nesse contexto, a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) em biodigestor anaeróbio acidogênico que utiliza o bagaço de oliva como substrato é uma alternativa promissora para as biorrefinarias, uma vez que os ácidos orgânicos são precursores de vários produtos químicos importantes, como ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois e alcanos (STRAZZERA *et al.*, 2018)

Atualmente, existe uma alta demanda e um mercado crescente de ácidos carboxílicos (acético, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, butírico e isobutírico). Esse mercado deve exceder 20 bilhões de dólares em 2024, representando um aumento de 5% em comparação a 2016 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016; ATASOY *et al.*, 2018). Além da relevância econômica, a atual produção de AGV é feita principalmente por oxidação ou carboxilação de precursores químicos, como aldeídos e alcenos, derivados do processamento de petróleo. Essas rotas químicas representam cerca de 90% da produção mundial, causando impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (STRAZZERA *et al.*, 2018). Norteada por esta ótica, a produção de AGVs por meio da digestão anaeróbia se insere nos propósitos de uma economia ciclo biobaseada, uma vez que a biotecnologia é utilizada para o desenvolvimento de cadeias de produção circulares que se valem de recursos renováveis como insumos (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010).

Para que a digestão anaeróbia alcance maiores rendimentos na produção de ácidos orgânicos voláteis a partir de biomassa lignocelulósica, recomenda-se que a mesma passe por uma etapa de pré-tratamento que visa diminuir a sua recalcitrância, contribuindo para uma melhor acessibilidade do substrato por parte do maquinário enzimático dos microrganismos. O tratamento hidrotérmico é promissor nesse sentido, uma vez que dispensa o uso de reagentes químicos e promove a solubilização de pentoses, hexoses e ácidos urônicos, tornando os açúcares mais disponíveis para os microrganismos acidogênicos (BAËTA, 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho teve o propósito de agregar valor ao bagaço de oliva, inserindo a cadeia produtiva do azeite no conceito das biorrefinarias. Para isso, foi avaliada a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) biobaseados a partir da digestão anaeróbia do bagaço de oliva pré-tratado hidrotérmicamente. Nesse sentido, a primeira etapa da pesquisa teve como meta avaliar as condições de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) para a produção de AGVs a partir do bagaço de oliva, analisando os efeitos do PTH na fermentação

acidogênica nas fases líquida, sólida e semissólida. A partir da condição de PTH/tipologia de DA estudada na primeira etapa que gerou maior rentabilidade econômica potencial, a segunda etapa do trabalho focou na otimização dos parâmetros do bioprocessamento (pH e relação alimento/microrganismo) para a produção de AGVs.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) biobaseados a partir da digestão anaeróbia do bagaço de oliva pré-tratado hidrotêrmicamente.

2.2. Objetivos específicos

- i. Avaliar o efeito das variáveis independentes tempo (t , min) e temperatura (T , °C) no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva;
- ii. Avaliar a influência do fracionamento do bagaço de oliva pré-tratado ou não na produção de ácidos graxos voláteis a partir da digestão anaeróbia em fase líquida (DA-L), sólida (DA-S) e semissólida (DA-Ss);
- iii. Estudar a influência da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na comunidade microbiana e no perfil dos ácidos orgânicos gerados em cada sistema de digestão anaeróbia;
- iv. Determinar a condição de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva e o sistema de digestão anaeróbia que apresentam melhor potencial para produção de AGVs;
- v. Otimizar durante a DA os parâmetros operacionais pH e relação alimento micro-organismo (A/M) para a produção dos AGVs.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Economia ciclo biobaseada e suas perspectivas

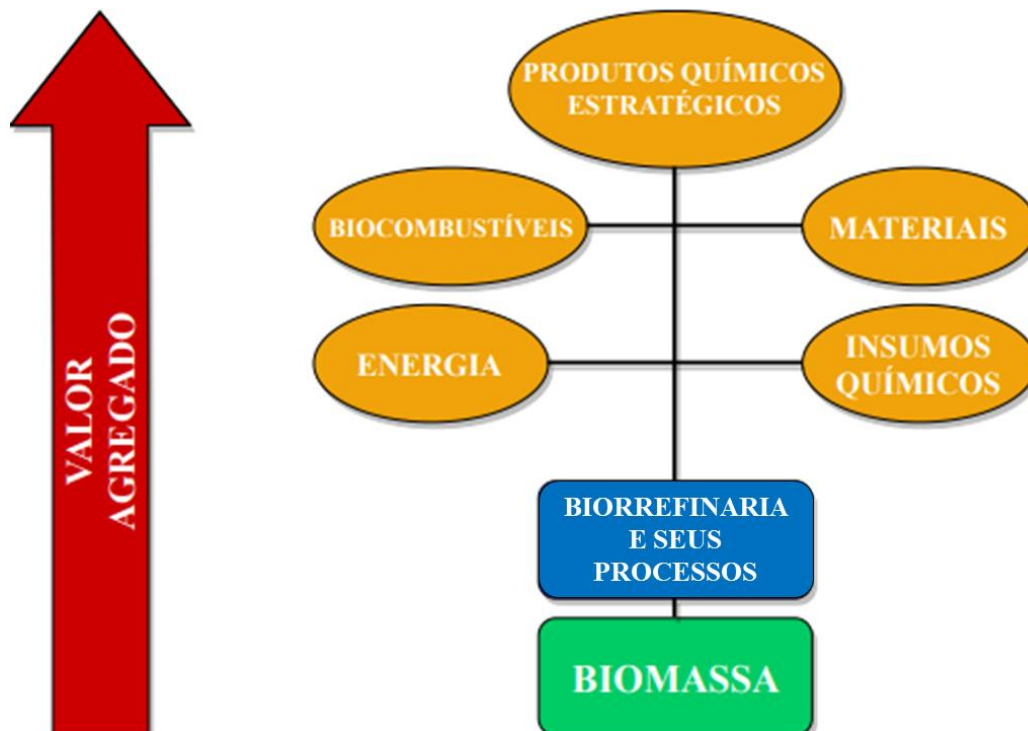
O aumento no consumo mundial de energia e alimentos, o aquecimento global e a dependência dos combustíveis fósseis tem alavancado uma mudança global na visão econômica linear para um modelo de economia circular biobaseada, definido como “a produção de recursos biológicos renováveis e a conversão desses recursos e resíduos em produtos de valor agregado, como alimentos, rações, produtos de base biológica e bioenergia, incluindo setores tradicionais e emergentes” (EUROPEAN COMMISSION a, 2018).

A economia biobaseada promete ser o pilar do desenvolvimento econômico global do futuro, gerando circularidade, sustentabilidade e progresso. Nessa perspectiva, a União Europeia, que possui uma pegada ecológica de 4,7 hectares por pessoa (o dobro do tamanho de sua biocapacidade), lançou em 2012 a “Estratégia Bioeconômica da Europa”, cuja política engloba cinco objetivos principais: 1) garantir a segurança alimentar; 2) gerir os recursos naturais de forma sustentável; 3) reduzir a dependência dos recursos não-renováveis; 4) mitigar e se adaptar às alterações climáticas; 5) criar novos empregos e manter a competitividade europeia (EUROPEAN COMMISSION b, 2015).

O documento foi revisado em 2018, visando acelerar a implantação da bioeconomia sustentável europeia, de modo a maximizar as contribuições desse campo para alcançar os objetivos propostos na Agenda 2030 e no Acordo de Paris. A Comissão Europeia afirma que a bioeconomia foi responsável pela circulação 2,3 trilhões de euros em 2015, o que representa um aumento de 5% em relação ao ano anterior. Além disso, as indústrias estimam a criação de mais de um milhão de empregos no setor até 2030 (EUROPEAN COMMISSION a, 2018).

As biorrefinarias são a base de sustentação da economia circular biobaseada e surgem como instrumentos importantes para a garantia da sustentabilidade e reversão da degradação ambiental, uma vez que se baseiam no aproveitamento integral da biomassa e sua conversão em energia, produtos químicos e materiais, conforme exposto na Figura 1. De acordo com Toivanen e Novotny (2017), o mercado estimado para os produtos biobaseados será de 40 bilhões de euros em 2020, podendo alcançar os 50 bilhões de euros em 2030.

Figura 1: Rotas tecnológicas para biorrefinarias a partir de diferentes biomassas



Fonte: (JÚNIOR, 2012)

O biorrefino em si não é um conceito essencialmente novo, considerando que a indústria de papel e celulose e açúcar por exemplo valem-se da mesma concepção em seus processos. (IEA BIOENERGY, 2009). De qualquer forma, as biorrefinarias ainda possuem muitos desafios, dentre eles o fato de que as rotas tecnológicas não são universais. As biomassas possuem características físico-químicas distintas que tornam as condições ótimas de processo até se chegar a um produto final de interesse muito específicas (IEA BIOENERGY, 2009). Além disso, os próprios produtos de interesse divergem em função das demandas do mercado. A sazonalidade é um outro aspecto bastante discutido, considerando o impacto financeiro da depreciação dos equipamentos e os possíveis entraves na estocagem da biomassa a longo prazo, dentre os quais a degradação ao longo do tempo (MAITY, 2015).

Diante do exposto, indústria e academia estão engajadas em superar os desafios no manejo de biomassas lignocelulósicas no contexto da economia circular biobaseada. No que tange ao âmbito acadêmico, cerca de 130–150 patentes são submetidas anualmente na indústria na área de biocombustíveis gerados a partir de materiais lignocelulósicos, e espera-se que esse número chegue a 200 registros anuais (TOIVANEN; NOVOTNY, 2017).

Apesar dos esforços, ainda há um hiato entre a ciência e o conhecimento aplicado, considerando que a maior parte das publicações não traz consigo balanços de massa e energia e estudos de viabilidade econômica que evidenciem a viabilidade comercial e técnica das

tecnologias disponíveis, levando em conta toda a cadeia de suprimentos e produção (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019)

A efetivação de uma economia circular biobaseada é uma temática atual e urgente. Sendo assim, estudos que visam desenvolver rotas alternativas e sustentáveis para produção de produtos de valor agregado tornam-se necessários e podem ser encarados como uma oportunidade para os pesquisadores, cujo desafio principal será desenvolver propostas sustentáveis em pesquisas multidisciplinares que consigam solucionar os problemas e responder aos questionamentos da indústria (MAITY, 2015).

3.2. Indústria de azeite e bagaço de oliva

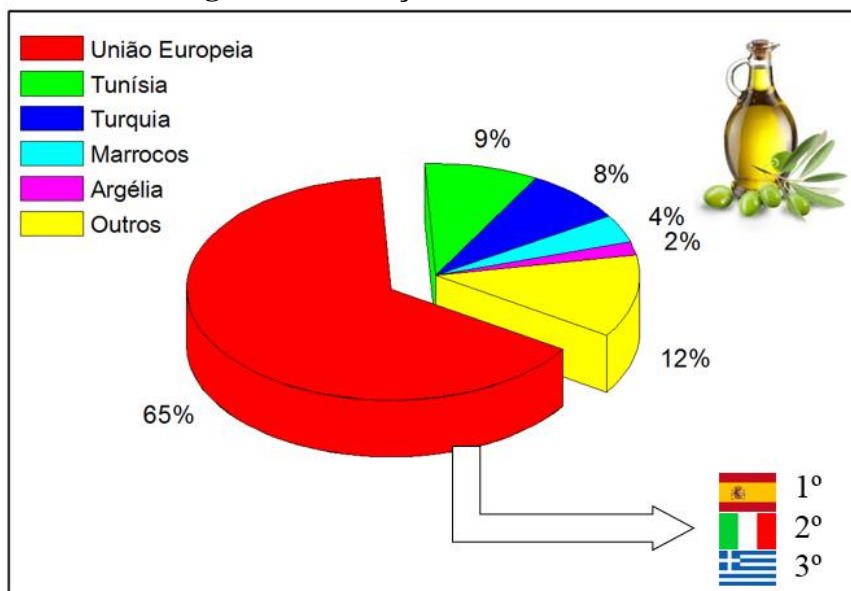
Os resíduos agroindustriais gerados durante o processamento de matérias-primas oriundas da agricultura, pecuária, aquicultura ou silvicultura configuram como uma das matérias-primas mais importantes para serem utilizadas em biorrefinarias (FARIA, O; PIRES, 2018). De acordo com a FAO, a projeção anual de crescimento no consumo de produtos agrícolas é de 1,1% ao ano de 2005-2050, o que significa um aumento de 60% da produção mundial ao fim desse período. No que tange ao Brasil, que é o terceiro maior exportador agrícola do mundo, as projeções do Ministério de Minas e Energia apontam que o país ofertará 1402 milhões de toneladas de biomassa em 2030, sendo responsável por gerar elevadas quantidades de resíduos agroindustriais (BRASIL - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007; FAO, 2018)

Um dos resíduos agroindustriais produzidos no Brasil é o bagaço de oliva gerado na produção do azeite. As primeiras mudas de oliveira chegaram ao Brasil durante a colonização portuguesa, trazida por imigrantes europeus. Na época, Portugal já era um importante produtor de olivas e por isso ordenou o corte de todas as oliveiras brasileiras em meados de 1700, como uma forma de eliminar a concorrência da colônia. Desde então, houve inúmeros obstáculos para a implantação da olivicultura no país, até que essa atividade conseguiu se consolidar em 2008, com a primeira extração de azeite de oliva brasileiro no município de Maria da Fé, em Minas Gerais (KIST; SANTOS; OLIVEIRA, 2018).

O mercado mundial de azeite é dominado pela União Europeia, que deteve 65% da produção mundial de azeite de oliva na safra 2016/2017, conforme observado na Figura 2. Espanha, Itália e Grécia são os produtores majoritários dentro do bloco econômico. De acordo com os dados do 51º Encontro do “*Advisory Committee on Olive Oil and Table Olive*”, o

cenário econômico positivo nos principais países produtores de azeite culminou em uma produção mundial da safra 2017/18 cerca de 27% maior do que o esperado no final do ano anterior, quando a expectativa era uma produção de 2,988 milhões de toneladas (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL b., 2018)

Figura 2: Produção mundial de azeite



Fonte: (International Olive Council b, 2018 – adaptado)

Ao longo dos últimos anos, o Brasil apresentou um salto significativo na produção de azeite. Na Serra da Mantiqueira, a primeira extração gerou 40 litros do produto em 2008, quantidade que superou os 80 mil litros em 2018 de acordo com as estimativas. Mesmo com a produção interna aquecida, o país ainda é dependente da importação, uma vez que a produção nacional corresponde a uma parcela de 2 a 3% do consumo interno (KIST; SANTOS; OLIVEIRA, 2018)

Diante do cenário econômico exposto, percebe-se que o mercado de produção interna de azeite de oliva é crescente e apresenta um grande potencial dentro da necessidade do mercado nacional. Entretanto, é válido ressaltar que durante o processo de beneficiamento do azeite, o bagaço de oliva é gerado em grande quantidade e torna-se um subproduto sólido do processo. Estima-se que para cada tonelada de azeitona processada sejam gerados 800 kg do bagaço de oliva. Este fato, associada a algumas características deste subproduto como baixo pH, grande quantidade de matéria orgânica, presença de inibidores e compostos fenólicos podem causar problemas ambientais de larga escala (RINCÓN et al., 2009).

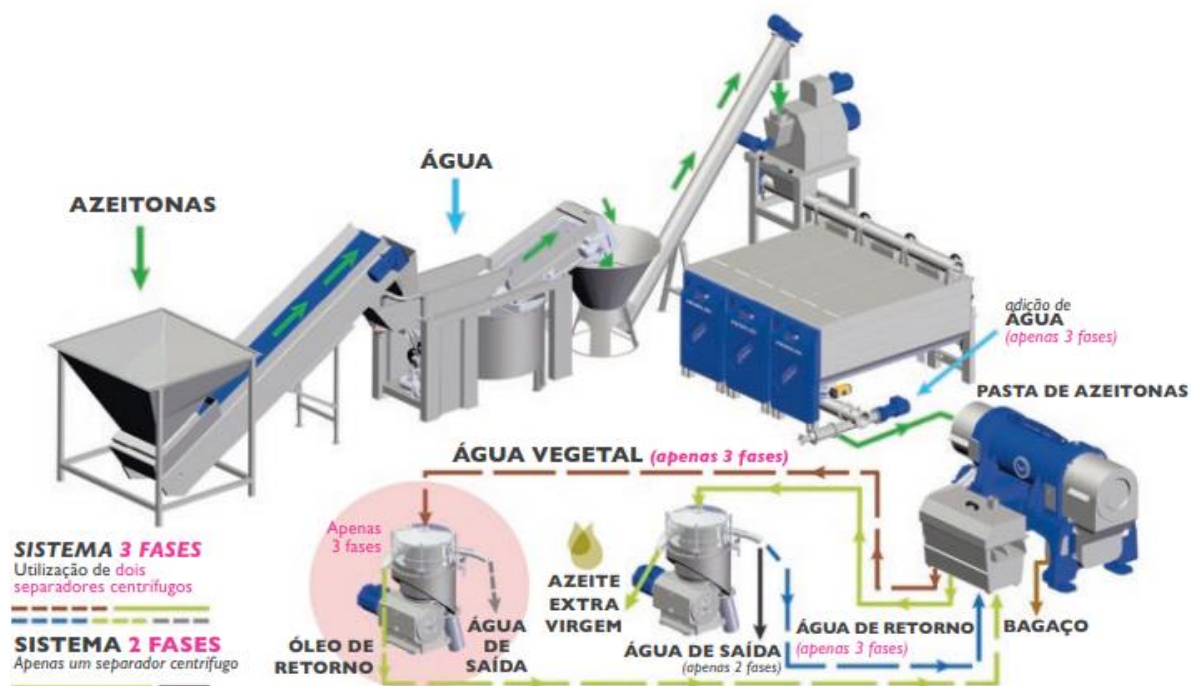
3.2.1. Processamento do azeite e geração do bagaço de oliva

As características físico-químicas dos subprodutos gerados na produção de azeite estão diretamente relacionadas ao tipo de processo empregado na extração. O ciclo de processamento das azeitonas começa com uma operação mecânica de limpeza para a remoção das folhas e ramos e posterior lavagem, de modo a garantir que as impurezas eventualmente presentes que possam interferir na qualidade do azeite sejam eliminadas. Em seguida, as azeitonas seguem para a etapa de moagem e posteriormente ocorre a operação de extração, que pode ser realizada pelo método tradicional de prensas ou pelo método contínuo de duas ou três fases. Depois da extração o mosto oleoso passa por uma centrifugação vertical para separação do azeite das águas residuais (WANG *et al*, 2004).

O método tradicional de extração por prensas começou a ser substituído pelos contínuos por volta da década de 1950, uma vez que o seu uso envolve maiores custos e trabalho manual. No entanto, ele ainda é utilizado em lagares com produção artesanal. As azeitonas passam por moendas que moem a polpa e o caroço. A pasta obtida é agitada e então espalhada sobre discos de filtração que são pressionados mecanicamente por cerca de 60 minutos para a separação do óleo do bagaço (PIERALISI, 2018).

O método contínuo de extração está ilustrado no fluxograma apresentado na Figura 3. Nele, a moagem das azeitonas é feita em trituradores de metal que operam em alta velocidade para que haja profunda ruptura das células que contém o azeite. Após moagem, a pasta de azeitona é encaminhada para o separador centrífugo (decanter), onde o processo pode ser de duas ou três fases. O sistema trifásico conta com dois separadores centrífugos, enquanto o sistema bifásico conta com apenas um (BORJA; RAPOSO; RINCON, 2006).

Figura 3: Diagrama do processo com sistema de extração contínuo de duas e três fases



Fonte: (PIERALISI, 2018)

Em relação à técnica de extração contínua de três fases, o método contínuo de duas fases apresenta as vantagens de reduzir consideravelmente a quantidade de água utilizada no processo, gerar menores custos operacionais, gastar menos energia e ainda produzir um azeite de melhor qualidade no que se refere a sua estabilidade para oxidação e às características organolépticas. Em contrapartida, o alto teor de umidade do bagaço úmido dificulta o seu manuseio, transporte e armazenamento, além de encarecer a recuperação de azeite residual (BORJA; RAPOSO; RINCON, 2006).

Na Espanha, líder mundial na produção de azeite, 90% dos produtores empregam a extração contínua de duas fases. De acordo com Borja e colaboradores (2002), o bagaço de azeitona oriundo desse processamento tem alto teor de umidade (60-70%) e é composto principalmente por lignina, celulose, hemicelulose, azeite retido na polpa e sólidos minerais. Ademais, açúcares, ácidos graxos voláteis de cadeia longa, poliálcoois e proteínas são os principais constituintes orgânicos do bagaço (BORJA et al., 2002).

Considerando que o mercado oleícola no Brasil se encontra em expansão, o volume de bagaço de azeitona gerado pela indústria de azeite é crescente, que é em sua maioria destinado para compostagem. Tendo em vista que esse subproduto ainda é pouco aproveitado, o estudo de novas aplicações tecnológicas são essenciais do ponto de vista econômico e ambiental

(KIST; SANTOS; OLIVEIRA, 2018). Alguns trabalhos desenvolvidos nos últimos anos e que vislumbram aplicações mais nobres para o bagaço de oliva são expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Breve revisão da literatura sobre trabalhos que usam o bagaço de oliva (início)

Objetivos/Condições	Resultados	Referências
<p>Produzir etanol a partir do bagaço de oliva úmido.</p> <p>Leveduras isoladas: <i>Issachenkia orientalis</i> e <i>Pichia galeiformis</i> / <i>manshurica</i></p> <p>Biomassa pré-tratada com H₂SO₄ 7.5% (m/v) a 100°C por 2 horas</p>	<p>Em termos de utilização de xilose e produção de etanol, todas as cepas foram capazes de usar xilose e produzir xilitol, mas nenhum etanol foi detectado. Usando o processo simultâneo de sacarificação e fermentação após o pré-tratamento, o rendimento médio de etanol foi de 3 g / 100 g de bagaço seco.</p>	<p>Abu Tayeh et al., 2014</p>
<p>Estudar uma microalga, <i>Dunaliella salina</i>, como co-substrato para a digestão anaeróbia do bagaço (OMSW), a fim de diminuir a relação C/N e aumentar a biodegradabilidade do bagaço úmido. Diferentes combinações OMSW/<i>D. salina</i> foram testadas: 100% OMSW; 75% OMSW-25% <i>D. salina</i>; 50% OMSW-50% <i>D. salina</i>; 25% OMSW-75% de <i>D. salina</i> e 100% de <i>D. salina</i></p>	<p>A maior biodegradabilidade foi encontrada para a mistura (m/m) de 50% bagaço-50% <i>D. salina</i>. No entanto, a produção máxima de metano, 330 mL CH₄ / g SVadicionado, e a maior taxa de produção de metano foram obtidos para a mistura de 75% bagaço-25% <i>D. salina</i>, mantendo uma relação C/N perto de 26,7/1</p>	<p>Fernández-Rodríguez et al., 2014</p>
<p>Estudar o pré-tratamento térmico utilizando ácido acético e ácido fórmico (0,6M) entre 100-170°C, como uma etapa anterior à hidrólise enzimática</p>	<p>O ácido fórmico foi mais eficaz do que o HAc em toda a faixa de temperaturas testadas. O rendimento da hidrólise enzimática aumentou (> 2 vezes) a temperaturas acima de 140 ° C. A concentração de HMF_{FF} aumentou com a temperatura, pressão e adição de ácidos orgânicos, porém, não ultrapassou os valores relatados como inibidores da fermentação de açúcares em etanol por leveduras ou bactérias.</p>	<p>Abu Tayeh et al., 2016</p>
<p>Investigar a influência do pré-tratamento alcalino na digestão anaeróbia do bagaço de oliva seco.</p> <p>Experimentos de hidrólise com diferentes concentrações de NaOH (0–4 mmol NaOH/gSV), durações de processo (1–24 h) e temperaturas (25 e 90 °C)</p>	<p>Os resultados evidenciaram que o pré-tratamento foi eficiente no sentido de melhorar a solubilização do bagaço. A concentração e a temperatura exercem um efeito conjunto na biodegradabilidade do substrato e na produção de metano</p>	<p>Pellera et al., 2016</p>

Tabela 1: Breve revisão da literatura sobre trabalhos que usam o bagaço de oliva (final)

Objetivos/Condições	Resultados	Referências
Produzir carvão a partir de resíduos sólidos de azeitona de dois cultivares de oliveira (Picual e Souri) de dois processos de extração (duas ou três fases) e duas temperaturas (350 e 450 ° C)	O rendimento do biocarvão foi de 24 a 35% da biomassa, com uma área superficial de 1,65–8,12 m ² g ⁻¹ . O carvão produzido a partir do resíduo do cultivar Picual, duas fases e a 350°C apresentou remoção cumulativa dos metais Cu ⁺² , Pb ⁺² , Cd ⁺² , Ni ⁺² e Zn ⁺² 85% maior em relação aos outros carvões.	Abdelhadi et al., 2017
Estudar a recuperação de fenóis por sistema cromatográfico industrial sob patente após o pré-tratamento térmico a 170°C e 60 minutos	O pré-tratamento térmico induziu a solubilização da matéria orgânica e a geração de fenol em relação ao bagaço úmido não tratado, com aumentos de 26,3% e 60,4%, respectivamente. Além disso, a produção de metano e sua taxa de produção aumentaram 16,9% e 6,9%, respectivamente. A extração de fenóis permitiu a recuperação de 1600 mg de hidroxitirosol por 1 kg de bagaço úmido.	Serrano et al., 2017
O pré-tratamento fenton foi realizado em modo batelada a 25°C, para várias razões H ₂ O ₂ / [Fe ²⁺] (100-1200), concentração de catalisador ([Fe ²⁺]) variando de 0,25 a 2 mM, tempo de reação variando de 30 a 150 min e pH entre (3-11)	O melhor desempenho foi obtido com H ₂ O ₂ /[Fe ²⁺] =1000, [Fe ²⁺] = 1,5mM, 120 min e pH 3. Testes do PBM (37 °C) mostraram que a produção cumulativa de biogás e metano foi maior sem tratamento fenton, e correspondem a 699 e 416 mL/g SV respectivamente	Maamir et al., 2017
Estudar a pirólise catalítica e não-catalítica rápida do bagaço de azeitona seco e de sementes de azeitona em leito fixo e fluidizado	Um rendimento máximo de bio-óleo de 47,35% foi obtido de amostras não catalíticas para pirólise rápida a uma temperatura de reação de 450 °C, enquanto a produção de bio-óleo foi reduzida em 37,14% em massa quando a temperatura foi aumentada para 500 °C.	Christoforou; Fokaides., 2017
Avaliar a valorização da polpa e da semente do bagaço de oliva por meio do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática. Pré-tratamento realizado a 130°C e 30 minutos. Foram utilizadas as enzimas comerciais Saczyme Yield, Ultimase BWL 40 and Celluclast 1.5 L para três cargas de biomassa (10,20 e 30% m/v)	O pré-tratamento hidrotérmico conseguiu remover 75% das hemiceluloses. As enzimas Saczyme e Ultimase foram eficientes em altas cargas sólidas (30%), atingindo entre 80-90% de conversão de glicanas para a polpa e entre 40-55% nas sementes, respectivamente, após 5 h.	Miranda et al., 2019

Fonte: (ABU TAYEH et al., 2014, 2016; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014; PELLERA et al., 2016; ABDELHADI et al., 2017; CHRISTOFOROU et al., 2017; MAAMIR et al., 2017; MIRANDA et al., 2019)

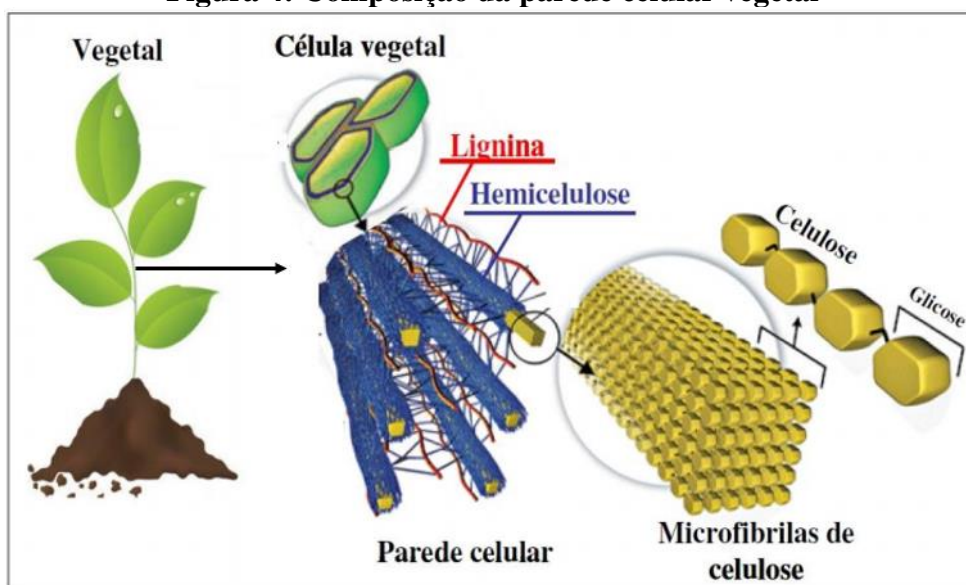
Conforme ilustrado na Tabela 1, diferentes rotas tecnológicas têm sido propostas para o bagaço de oliva dentro do contexto das biorrefinarias. Logo, tem sido aplicado processos diversos, tais quais hidrólise enzimática, digestão anaeróbia, pirólise, gaseificação, combustão, dentre outros.

3.2.2. *Biomassa lignocelulósica*

Um dos gargalos que pode ser encontrado quando se deseja produzir bioprodutos a partir de substratos orgânicos lignocelulósicos, como é o caso do bagaço de oliva, é a sua recalcitrância provocada por sua estrutura tridimensional composta majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina, podendo apresentar ainda proteínas, lipídios, fenóis, extrativos e minerais (VASSILEV et al., 2010). O teor de cada componente varia de acordo com a matéria-prima em questão, idade, região da colheita e estágio de maturação (JEFFRIES et al., 1990).

As células vegetais são compostas por lamela média, membrana plasmática e parede celular, que é formada por microfibrilas de celulose revestidas com hemiceluloses, conforme pode ser observado na Figura 4. A lignina atua como elemento ligante dos componentes da parede celular, conferindo resistência mecânica e proteção dos tecidos contra o ataque de microrganismos (ALVES, 2011; CHRISTOPHER, 2012).

Figura 4: Composição da parede celular vegetal

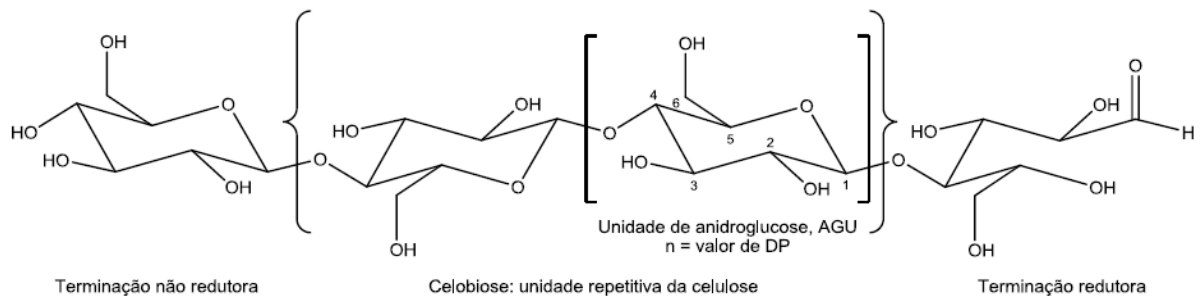


Fonte: (FACUNDES, 2014)

3.2.2.1. Celulose

A celulose é um homopolímero linear e não ramificado, composto por anéis de β -D- glicopiranosose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). A celobiose pode ser considerada a unidade de repetição da celulose, cujo tamanho da cadeia é determinado pelo grau de polimerização. Dentro de cada anidroglicose presente na cadeia de celulose, existem três grupos hidroxila reativos como mostra a Figura 5: um primário em C6 e dois secundários em C2 e C3 (ROJAS, 2016).

Figura 5: Representação estrutural de uma molécula de celulose



Fonte: (GURGEL, 2011; KLEMM et al, 2005)

A presença das hidroxilas na cadeia de celulose facilita a formação de ligações de hidrogênio na mesma cadeia ou em cadeias vicinais conduzindo a formação de microfibrilas, que são responsáveis pelas propriedades mecânicas da célula, promovendo assim o suporte e resistência à parede celular (EMONS; SCHEL; MULDER, 2002).

3.2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos compostos por pentoses (tais como xilose, arabinose), hexoses (tais como manose, glicose, galactose) e ácidos urônicos. Elas são depositadas na parede celular numa etapa anterior à lignificação. As cadeias de hemiceluloses podem ser constituídas por uma unidade monossacarídica na cadeia central, como ocorre nas xilanas, ou por duas ou mais unidades, como é o caso das xiloglucanas, arabinoxilanas e 4- O- metil-glucuronoxilanas (FENGEL, D; WEGENER, 1984). De acordo com Taherzadeh (2008), os açúcares dominantes das hemiceluloses de madeiras macias são as manoses, enquanto nas madeiras duras e resíduos agroindustriais são as xiloses.

As cadeias das polioses são menores que as da celulose, porém, apresentam ramificações, que reagem facilmente com a celulose, conferindo ao conjunto estabilidade e

flexibilidade. A hidrólise das hemiceluloses em relação às celuloses é facilitada, considerando que as mesmas possuem estrutura amorfa constituída de cadeias laterais curtas de diferentes açúcares e menor massa molar (OLIVEIRA, 2016).

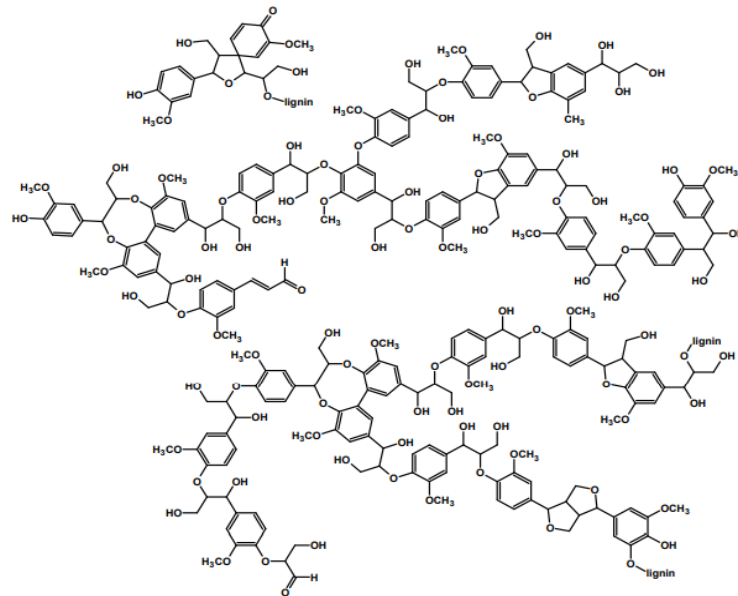
A celulose juntamente com a hemiceluloses constituem a porção de holocelulose da biomassa, ou seja, a fração de açúcares. Em função disso, a mesma é considerada como um substrato altamente interessante para ter seu uso direcionado para os bioprocessos que visam produzir bioprodutos e biocombustíveis (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

3.2.2.3. *Lignina*

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. As características deste biopolímero amorfo variam consideravelmente com diversos fatores, tais como o tipo da madeira (conífera ou folhosa), seu local de cultivo, idade do vegetal, estação do ano, dentre outros. A polimerização desidrogenativa dos álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico geram as unidades monoméricas fenilpropânicas da lignina: a p-hidroxifenila (H), lignina guaiacila (G) e siringila (S) (FENGEL, D; WEGENER, 1984; GURGEL, 2011).

Os anéis aromáticos e as cadeias alifáticas constituem a estrutura básica da lignina, que tem como grupos funcionais principais as metoxilas (-OCH₃), as hidroxilas (-OH), as carbonilas (-C=O), os ácidos carboxílicos (-COOH), o éter (R-O-R), as duplas ligações e a função éster (-CO-O-R), conforme pode ser observado na Figura 6. Devido a essa variedade de grupos funcionais, essa macromolécula está sujeita a várias reações como oxidação, hidrólise, redução e reações enzimáticas (HOLLADAY et al., 2007).

Figura 6: Estrutura de lignina de madeira mole



Fonte:(HOLLADAY et al., 2007)

Por ser um polímero amorfo, a lignina se comporta como um material termoplástico, o que significa que em altas temperaturas ela apresenta alta viscosidade, podendo ser conformada e moldada. As temperaturas as quais a lignina sofre a transição vítrea podem variar de acordo com seu método de isolamento (FENGEL, D;WEGENER, 1984). Dentre os compostos majoritários da biomassa, em função da sua complexidade estrutural, a lignina é considerada como a fração mais recalcitrante para os microrganismos, o que dificulta a sua transformação em produtos de valor agregado usando bioprocessos. No entanto, a lignina pode ser amplamente explorada por processos químicos e termoquímicos (HOLLADAY et al., 2007).

3.3.Pré-tratamento

Os carboidratos da parede celular na forma de celulose (glicose) e hemiceluloses (arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) representam substratos que podem ser convertidos em bioprodutos por meio de bioprocessos. Contudo, a complexidade das interações dos três constituintes principais na parede celular constitui o principal desafio tecnológico para a recuperação e conversão dos carboidratos presentes em produtos de interesse (SUN; CHENG, 2002).

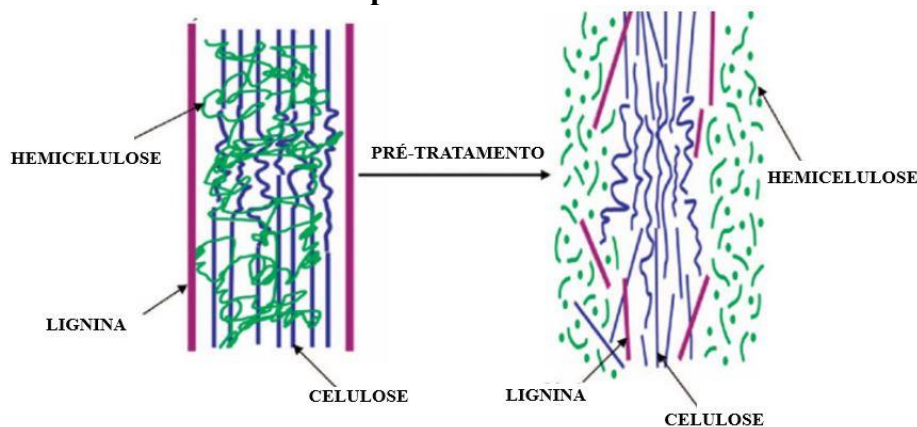
Nessa perspectiva, o desenvolvimento de processos que buscam a produção de bioprodutos de valor agregado como os AGVs a partir da digestão anaeróbia do bagaço de oliva,

passa pela otimização integrada das etapas de caracterização química e do pré-tratamento do resíduo. A ausência de pré-tratamentos pode dificultar o processo de produção de bioprodutos a partir deste tipo de biomassa, provocando principalmente limitações cinéticas ao bioprocessamento (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica podem ser divididos em diferentes métodos: físicos (mecânico, extrusão), químicos (alcalino, ácido, organossolve, ozonólise, etc.), físico-químicos (explosão a vapor, auto hidrólise, hidrotérmico, oxidação húmida, micro-ondas, ultrassom, etc.) e biológicos (fungos, consórcios de bactérias, etc.). Em alguns casos, as técnicas podem ser combinadas para a obtenção de melhores resultados (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ALVIRA et al., 2010).

Ainda que as propriedades da biomassa sejam afetadas de formas distintas por cada pré-tratamento, uma vez que os mesmos apresentam diferentes mecanismos, todos eles objetivam tornar a celulose e/ou a hemicelulose mais acessíveis por meio da desconstrução da estrutura lignocelulósica e da remoção da cristalinidade das microfibrilas de celulose, como ilustra a Figura 7 (FACUNDES, 2014).

Figura 7: Ilustração das transformações que sofrem a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento



Fonte:(FACUNDES, 2014 - adaptado)

O pré-tratamento físico visa aumentar a área superficial, a porosidade, o tamanho e a acessibilidade dos poros, diminuindo os graus de polimerização da celulose. Geralmente, esse método apresenta alto custo, em razão da elevada demanda energética (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; FACUNDES, 2014). Em 2016, Donoso-Bravo e outros autores estudaram o impacto da moagem do bagaço de oliva para obtenção de partículas com 3 mm na produção de metano. Os autores concluíram que houve aumento na taxa de produção do gás, mas a quantidade máxima produzida não se alterou significativamente quando comparado ao bagaço não moído (DONOSO-BRAVO *et al*,2016).

Os métodos químicos são responsáveis pelas modificações químicas e estruturais na biomassa, que culminam em melhores acessos para as enzimas (OGEDA et al., 2010). Podem ser usados diversos agentes, tais como ácidos, hidróxido de sódio, dióxido de enxofre, sais inorgânicos com propriedades ácidas, álcoois, dentre outros. O processo é caracterizado como ácido, alcalino ou oxidativo de acordo com o seu mecanismo de ação na parede celular (FACUNDES, 2014).

O pré-tratamento biológico vale-se de microrganismos como fungos de podridão branca e marrom para alteração na estrutura de materiais lignocelulósicos por meio da degradação da lignina e hemicelulose. Quando aplicada sozinha, a técnica não apresenta rendimentos expressivos devido ao elevado tempo de degradação da biomassa e a baixa taxa de hidrólise. (FACUNDES, 2014; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Os fungos de podridão branca *Pleurotus ostreatus* foram usados por Fountoulakis *et al.*, (2002) para degradação dos compostos fenólicos das águas residuais da produção de azeite. Os resultados revelaram 78,3% de remoção dos fenóis para a condição de esterilização a 100°C e diluição de 50% da água de lavagem. Em um segundo estudo, Ko *et al.* (2016) avaliaram a co-fermentação de glicose e xilose em hidrolisado de pré-tratamento com ácido diluído (1% m/v; RLS 7mL g⁻¹) de palha de arroz (121°C, 30 minutos) e carvalho (180°C, 20 minutos) utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores obtiveram 0,43-0,46 g de etanol / g de açúcar, mostrando um cenário promissor para a produção de etanol por meio de fungos.

O pré-tratamento ideal depende de aspectos como a composição e a futura aplicação da biomassa. O custo benefício da técnica também deve ser levado em conta, considerando que o pré-tratamento é uma das etapas mais caras da bioconversão, chegando a custar 30% do custo total de biocombustíveis (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018). Ademais, o processo escolhido deve promover o fracionamento dos componentes da parede celular, evitando a formação de compostos inibitórios tais quais 5-hidroxi metil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF) em concentrações que inibam a hidrólise e as etapas posteriores da fermentação (BAËTA et al., 2016)

3.3.1. Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) ou auto-hidrólise (AH) é um processo físico-químico baseado no fracionamento da biomassa por meio da remoção parcial da lignina e solubilização das hemiceluloses. Neste método, a biomassa lignocelulósica é colocada em

contato com a água e a mistura é submetida a alta temperatura (100-200°C) e pressão (10-20 bar) (BAËTA, 2016; MOSIER *et al.*, 2005).

A decomposição da hemicelulose é dividida em três etapas: reações que ocorrem na superfície da biomassa para produção dos produtos primários, dissolução desses produtos na água e por fim a decomposição dos mesmos (ZHUANG *et al.*, 2016). Em altas temperaturas, a autoionização da água gera o íon hidrônio (H_3O^+), que ocasiona a clivagem das ligações entre os grupos substituintes das hemiceluloses: *O*-acetil e ácido urônico. Os ácidos orgânicos gerados no meio atuam como catalisadores na solubilização dos oligossacarídeos e açúcares monoméricos, junto aos íons hidrônio. Após o rompimento das ligações glicosídicas, as pentoses e hexoses podem ser degradadas a compostos furânicos, que são inibidores da fermentação microbiana (MOSIER *et al.*, 2005). Daí a importância de se otimizar as condições do pré-tratamento por AH de forma a maximizar a biodegradabilidade do substrato e minimizar a geração de inibidores.

O pré-tratamento hidrotérmico produz duas frações: a) uma fase líquida (hidrolisado) que contém os produtos oriundos da hemicelulose tais como oligossacarídeos, ácidos orgânicos, furfural e 5-hidroxi-2-furfuraldeído e os compostos fenólicos derivados da lignina; b) uma fase sólida rica em celulose (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018). Segundo Zhuang (2016), a maior parte da lignina insolúvel fica depositada na parte sólida, uma vez que a macromolécula sofre reações simultâneas de despolimerização e repolimerização.

Temperatura, tempo de residência, pH e razão líquido sólido são parâmetros importantes no tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica. Alguns autores como Donoso-Bravo (2016) defendem que o tamanho das partículas também é uma variável importante, uma vez que partículas de tamanho maior podem apresentar um gradiente de temperatura entre as fases externa e interna, acarretando diferenças na hidrólise. No entanto, outros pesquisadores como Mosier (2005) defendem que a cominuição não é uma etapa necessária ao pré-tratamento e inclusive apontam esse fato como uma vantagem do processo. O principal argumento usado por essa corrente de estudiosos é que o próprio aquecimento causa a desintegração das partículas da biomassa (BAËTA, 2016; DONOSO-BRAVO *et al.*, 2016; MOSIER *et al.*, 2005).

A constituição do hidrolisado hemicelulósico está relacionada à severidade do pré-tratamento hidrotérmico. Em condições intermediárias, os oligossacarídeos são predominantes, enquanto em condições severas os monossacarídeos e produtos de degradação como compostos furânicos e fenólicos aparecem em maiores quantidades. Nas condições de elevada severidade,

o furfural pode se repolimerizar, representando uma pseudo lignina contabilizada na fração sólida (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018).

A temperatura tem efeitos diferentes para os três constituintes da biomassa. A solubilização da hemicelulose é favorecida por altas temperaturas, enquanto a lignina pode se acumular mais na fração sólida nessas condições. Já a celulose é pouco afetada por esse parâmetro em relação à hemicelulose e à lignina, visto que as temperaturas do processo variam de 100 a 200°C e a sua solubilização em oligossacarídeos e hexoses geralmente começa em temperaturas mais altas, em alguns casos maior que 230°C, alcançando a completa decomposição aos 295°C (AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018).

Dentre as principais vantagens do PTH, destaca-se o fato do mesmo não requerer o uso de produtos químicos, tais como ácidos, bases ou solventes orgânicos. Dessa forma, são gastos menos reagentes para a neutralização do hidrolisado e o uso de materiais resistentes à corrosão para a confecção dos reatores é dispensado. Além disso, o teor de inibidores gerados é menor quando comparado a outros tipos de pré-tratamento (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

De acordo com Ahmad, Silva e Varesche (2018), além do elevado consumo de água e energia, as principais limitações da auto-hidrólise residem na sua implantação em escala industrial, sendo as principais dificuldades a separação e extração das correntes do processo; a construção de grandes reservatórios de água; a complexidade para realizar o processo contínuo e o alto investimento do projeto.

A aplicação do pré-tratamento hidrotérmico com o objetivo de aumentar a produção de AGVs por meio da fermentação acidogênica foi estudada por Yin, Wang e Yang (2014), que usaram resíduos alimentares como substrato. Os autores concluíram que entre 0,294 - 0,411 g AGVs poderia ser obtido por grama de resíduo alimentar pré-tratado por via hidrotérmica (em base seca) para as condições estudadas.

Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a auto-hidrólise do bagaço de oliva para a produção de ácidos orgânicos. Entretanto, Rincón *et al.*, (2013) avaliou o efeito do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de azeitona para a produção de metano, usando temperaturas de 100, 120, 160 e 180 °C, que foram aplicadas durante 60, 120 e 180 min. Os pesquisadores não notaram diferenças estatísticas significativas nos volumes de metano produzidos depois de 20 dias. Além disso, os testes de produção de metano revelaram dois estágios: um primeiro estágio exponencial e uma zona sigmoideal após um período de latência. No segundo estágio verificou-se uma taxa de produção de metano 22% maior para o bagaço tratado a 180°C e 180 min em relação ao resíduo não tratado.

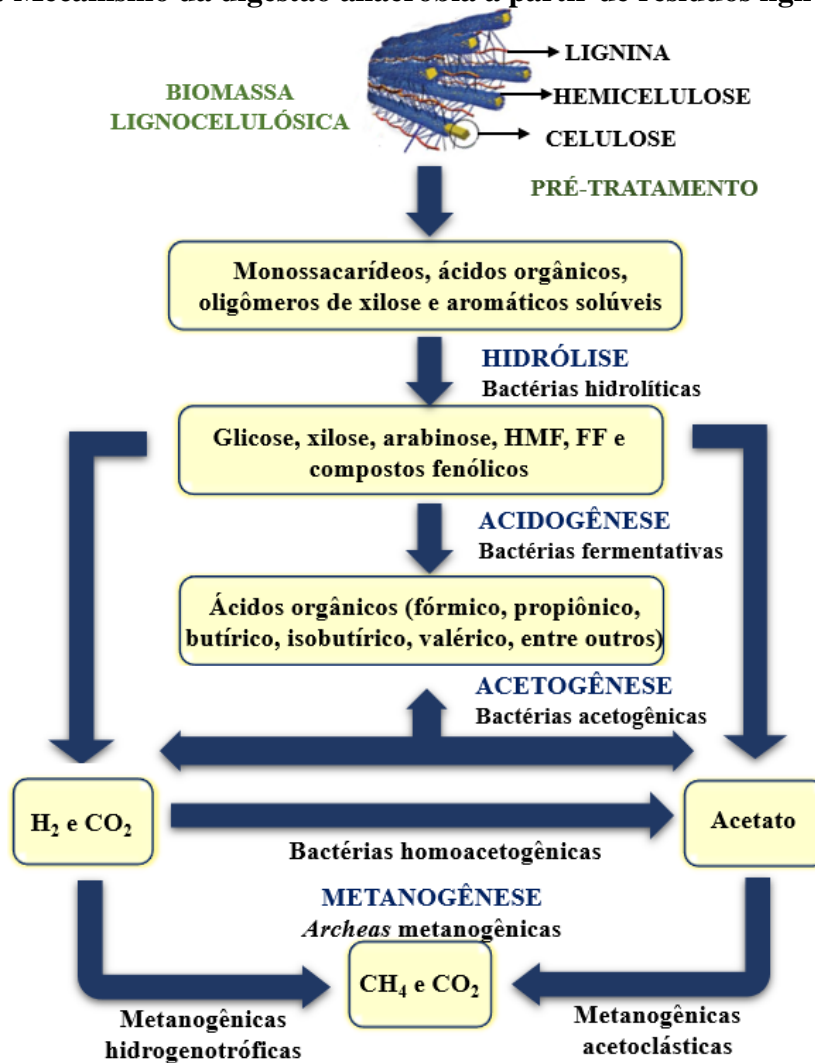
A revisão da literatura ratifica que o presente trabalho tem um caráter inovador e atual. Ainda que o pré-tratamento hidrotérmico para a produção de AGVs a partir da digestão anaeróbia tenha sido avaliada para algumas biomassas, a proposta é inédita no caso do bagaço de oliva.

3.4. Digestão anaeróbia para produção de AGVs

A digestão anaeróbia tem sido reportada pela literatura como uma das técnicas aplicadas no tratamento dos resíduos da indústria de azeite. Neste processo biológico os microrganismos degradam a matéria orgânica na ausência de oxigênio, produzindo metano e gás carbônico como produtos finais. Este processo fermentativo pode ser aplicado para o tratamento de resíduos, produção de biofertilizantes e biogás. Dentre as vantagens apresentadas pelo mesmo, estão o baixo consumo energético, baixa produção de lodo e boa eficiência de degradação dos poluentes orgânicos presentes em água residuárias. (CHERNICHARO, 2007)

O mecanismo de decomposição anaeróbia se dá pela simbiose dos microrganismos, que agem de forma interativa na conversão da matéria orgânica, garantindo os nutrientes necessários para o seu próprio crescimento e reprodução. As reações bioquímicas que ocorrem no processo podem ser divididas em 4 fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, conforme evidenciado na Figura 8 (SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017).

Figura 8: Mecanismo da digestão anaeróbia a partir de resíduos lignocelulósicos

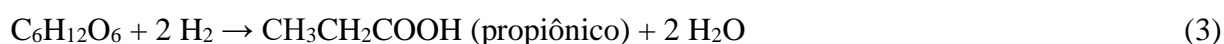


Fonte: (BAÊTA, 2016; FACUNDES, 2014; MONLAU *et al.*, 2011 - adaptado)

O processo começa com a hidrólise bacteriana, que transforma a matéria orgânica complexa (carboidratos, proteínas e lipídios) em monômeros solúveis como açúcares e ácidos graxos de cadeias longas. Na acidogênese, as bactérias fermentativas acidogênicas metabolizam os produtos da etapa anterior em substâncias como álcoois, CO₂, H₂, NH₃, H₂S e ácidos graxos voláteis de cadeia curta. Então, esses ácidos orgânicos resultantes são transformados em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, que serão metabolizados pelas *archeas* metanogênicas para a produção direta de metano e dióxido de carbono (MILANESE *et al.*, 2014; SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017).

As bactérias fermentativas acidogênicas possuem baixo tempo mínimo de geração (~30 minutos), com elevadas taxas de crescimento em relação a outros microrganismos do consórcio microbiano. Nesse sentido, a acidogênese só é uma etapa limitante na digestão anaeróbia se o substrato a ser degradado não for facilmente hidrolisado. (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

A conversão de glicose em ácido acético é a reação que fornece às bactérias acidogênicas maior rendimento de energia para o crescimento, conforme a equação (1). Todavia, o acúmulo de hidrogênio pode acarretar em desvios na rota metabólica para a produção de ácido butírico e propiônico, como um mecanismo de manter o equilíbrio do sistema, conforme as equações (2) e (3) (MOSEY, 2018).



Como observado na Figura 8, a digestão anaeróbia é um processo que depende de um conjunto de microrganismos trabalhando de forma sinérgica para que o processo ocorra. Quando se deseja a obtenção maximizada do biometano o sistema deve ser otimizado de forma a manter as condições ideais para as classes dos microrganismos de baixa taxa de crescimento, ou seja, os acetogênicos e metanogênicos (CHERNICHARO, 2007). Além do biometano, a DA é um processo capaz de produzir como produtos intermediários o bio-hidrogênio e os ácidos graxos voláteis (AGVs), cuja recuperação pode ter um grande interesse econômico. Comparando com o gás, a estocagem e transporte dos AGVs é mais segura. Além disso, o valor agregado dos AGVs o qual está na faixa de 600-4250 \$ ton⁻¹ pode ser maior que o do metano, o qual está próximo de 1100 \$ ton⁻¹ (ATASOY et al., 2018). Sendo assim, os AGVs podem ser considerados substâncias atrativas para serem produzidas a partir da DA acidogênica de resíduos orgânicos, tais como o bagaço de oliva (OLESKOWICZ-POPIEL et al., 2012; ZACHAROF; LOVITT, 2013; CALT, 2015; FEI et al., 2015; DUAN et al., 2018).

A fermentação acidogênica de resíduos agroindustriais ocorre em função de uma série de reações químicas catalisadas por diferentes enzimas. Dentro do digestor coexistem diversas rotas metabólicas nas quais o piruvato é convertido em uma ampla faixa de produtos como acetato, propionato, butirato, etanol, propanol, butanol, H₂ e CO₂. As proporções de piruvato dirigido para cada via metabólica varia com o substrato utilizado, as condições de operação do meio e as propriedades dos micro-organismos. As rotas metabólicas acidogênicas são denominadas de acordo com os principais produtos líquidos formados, sendo geralmente classificadas como: (1) acetato-etanol, (2) propionato, (3) metabólico do tipo butirato, (4) ácido misto (5) lactato e (6) homoacetogênica (BHATIA; YANG, 2017; LYU et al., 2018).

Durante a DA, os AGVs são consumidos rapidamente quando uma população de bactérias metanogênicas se encontra presente em quantidade suficiente e as condições

ambientais no interior do sistema de tratamento são favoráveis (CHERNICHARO, 2007). Dessa forma, uma das formas de aumentar o controle das reações que ocorrem no sistema para melhorar a eficiência do processo e/ou direcionar a formação dos produtos é a divisão espacial do processo em dois estágios. No primeiro estágio ocorrem a hidrólise e a acidogênese, enquanto a acetogênese e a metanogênese ocorrem no segundo estágio. É importante ressaltar que a produção dos ácidos orgânicos requer o controle de algumas variáveis, com destaque para pH, temperatura, tempo de detenção hidráulica e a carga orgânica aplicada (STRAZZERA et al., 2018).

O pH é uma variável crucial na produção dos AGVs por fermentação ácida e deve ser favorável tanto para a hidrólise quanto para a acidogênese, podendo ser ajustado para a produção direcionada de determinado ácido orgânico (LYU et al., 2018). De acordo com Liu e colaboradores (2012), a atividade dos microrganismos é afetada por esse parâmetro, uma vez que muitas enzimas são intolerantes a meios extremamente ácidos ($\text{pH} < 3$) ou alcalinos ($\text{pH} > 12$). Dessa forma, os valores ótimos de pH para produção de AGVs a partir de resíduos orgânicos encontram-se frequentemente numa faixa entre 5,25-11, sendo que os intervalos específicos dependem das características específicas de cada substrato (LEE et al., 2015).

No que se refere à temperatura, a condição mesofílica (35°C) é usada com frequência em função dos altos rendimentos na produção de AGVs, sendo eficiente e econômica quando comparada a temperaturas mais elevadas e que demandariam um gasto maior de energia para a manutenção do sistema (JIANG et al., 2013; LYU et al., 2018). Em relação à influência da temperatura na composição dos AGVs produzidos, a literatura mostra divergência de opinião e resultados entre alguns autores. Lyu *et al.*, (2018), suportado pelo trabalho de Jiang *et al.*, (2013), afirma que a temperatura de trabalho muda radicalmente a composição individual dos AGV na solução gerada. Já Khan *et al.*, (2016), baseado nos resultados de Yuan (2011), acredita no contrário.

Alguns estudos relataram que a temperatura tem menor influência na produção de AGVs em comparação com o tempo de detenção hidráulica (TDH), que deve ser suficientemente longo para que os microrganismos tenham tempo para reagir com o substrato e produzir os AGVs. Porém, chega um determinado momento em que o aumento no TDH não contribui para uma maior produção de ácidos, visto que o rendimento dos mesmos se mantém estável em razão da limitação na disponibilidade do substrato (KHAN et al., 2016; ATASOY et al., 2018; LYU et al., 2018).

De forma análoga ao TDH, o aumento da carga orgânica aplicada (COA) tende a aumentar a produção de AGVs em razão da disponibilidade do substrato. Entretanto, o aumento da viscosidade do meio pode ocorrer de forma concomitante, culminando na operação instável do sistema (LYU et al., 2018). Em 2008, Rincón e colaboradores realizaram um estudo de fermentação acidogênica do bagaço de oliva para COA que variaram de 3,2 a 15,1 g DQO (L.d)⁻¹. O resultado indicou que a concentração máxima de AGV ocorreu para a COA de 12,9 g DQO (L.d)⁻¹.

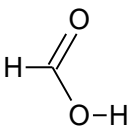
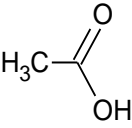
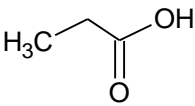
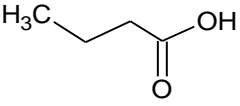
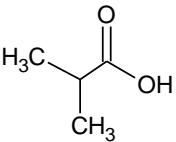
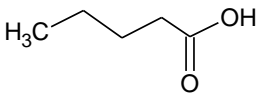
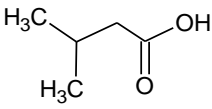
Além do controle dos parâmetros citados, algumas ações podem ser tomadas para aumentar a produção de AGVs. Dentre elas, estão a adição de inibidores do crescimento dos microrganismos metanogênicos ao sistema (exemplo: ácido 2-bromoetanosulfônico, lumazina) e o pré-tratamento térmico do inóculo para enriquecimento das bactérias acidogênicas. Segundo Shida (2008), os parâmetros do pré-tratamento térmico variam para o inóculo, sendo comuns faixas de temperatura entre 90-105°C e tempos de exposição de 10 minutos a 2 horas.

3.4.1. Ácidos graxos voláteis: importância, aplicações e tendências

Conforme mencionado anteriormente, um dos produtos possíveis de serem produzidos a partir da DA acidogênica do bagaço de oliva são os ácidos graxos voláteis, os mesmos são ácidos orgânicos de cadeia curta, baixa massa molar e elevado caráter hidrofílico que contêm de dois a seis átomos de carbono. Estes compostos são amplamente utilizados na indústria química, alimentícia, farmacêutica e biológica, sendo aplicados para a produção de biopolímeros e biocombustíveis (SINGHANIA et al., 2013).

Os ácidos carboxílicos são precursores de alguns outros grupos funcionais, tais como ésteres, cetonas, aldeídos, álcoois e alcanos. Logo, os AGVs fazem parte de um grupo de compostos químicos conhecidos como construtores, uma vez que servem como base para a formação de outros produtos. Esta característica faz com que eles tenham uma demanda elevada e crescente no mercado, cujas movimentações deverão ultrapassar os 20 bilhões de dólares em 2024, representando um aumento de 5% em relação a 2016 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016; ATASOY et al., 2018). Algumas aplicações e preço de mercado de alguns AGVs (fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) estão sintetizados na Tabela 2.

Tabela 2: Aplicações e preço de mercado de alguns AGVs

AGV	Estrutura	Aplicações	Preço (\$/ton)
Fórmico		Agente antibacteriano; Indústria têxtil; Processamento de borracha;	800
Acético		Produção de aditivos e conservantes; produção de vinagre; Síntese de polímeros, adesivos e corantes; Indústria de cosméticos;	600
Propiônico		Aditivo alimentar; Aromatizante; Produtos farmacêuticos; Suplemento alimentar para animais, Produção de herbicidas;	2000
Butírico		Produtos farmacêuticos (perfumes); Suplemento alimentar animal; Agente flavorizante; Fabricação de fibras, de alimentos e bebidas	2163
Isobutírico		Insumo na produção de cosméticos; Aditivos alimentares; Produção de solventes;	3210
Valérico		Intermediário na produção de ésteres, cetonas e álcoois secundários).	4251
Isovalérico		Agentes plastificantes; Indústria de perfumes; Intermediário para a síntese de inseticidas, fungicidas e depressores;	3387

Fonte: (ZACHAROF; LOVITT, 2013; CALT, 2015; BHATIA; YANG, 2017; ATASOY et al., 2018; STRAZZERA et al., 2018)

Atualmente, a produção dos AGVs se dá principalmente por oxidação ou carboxilação de precursores químicos, tais como aldeídos e alcenos, que são derivados do processamento

de petróleo (STRAZZERA et al., 2018). As rotas químicas baseadas em produtos não renováveis de fontes petroquímicas representam cerca de 90% da produção mundial, ocasionando efeitos negativos à saúde e ao meio ambiente (ATASOY et al., 2018)

Alguns autores como Atasoy e colaboradores (2018) apontam que a emissão de gases de efeito estufa registrada pela produção do ácido acético, um dos ácidos graxos voláteis mais usados na indústria petroquímica, é de aproximadamente 3,3 tCO₂ eq/t de ácido produzido. Em 2009, no relatório “Energy Savings 2020”, a União Europeia se comprometeu a reduzir as suas emissões de gases de efeito estufa entre 80% e 95% até 2050 (ATASOY et al., 2018).

Além dos compromissos ambientais, a menor disponibilidade dos recursos não renováveis no futuro e os riscos geopolíticos provenientes da dependência do petróleo por países politicamente instáveis, corroboram para a busca de técnicas de produção de AGVs alternativas que sejam sustentáveis e utilizem matérias-primas renováveis. Nesse sentido, as rotas biológicas que utilizam a DA acidogênica de resíduos agroindustriais como substrato, surgem como uma alternativa promissora e real, convergindo para o conceito de economia circular ciclo biobaseada, tema relevante e amplamente estudado nos últimos anos (BHATIA; YANG, 2017).

Na base do Scopus (2019), é perceptível como as produções bibliográficas inclinadas para estudos que envolvem os ácidos orgânicos cresceram substancialmente na última década. Enquanto em 2009 foram publicados 48 artigos que continham o termo “volatile fatty acids” na base, em 2019 esse número foi de 152 artigos, que é uma quantidade maior do que os 132 artigos publicados em 2018. Dentre os resíduos que já foram usados como matéria-prima para a produção de AGVs incluem as microalgas, resíduos sólidos municipais, palha de milho, cama de frango, manipueira e soro de queijo (JANKE et al., 2016; MURALI; FERNANDEZ; AHRING, 2017; ATASOY et al., 2018). Alguns trabalhos que estudaram a produção de AGVs a partir de resíduos são apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Trabalhos reportados na literatura que estudaram a produção de AGVs

Resíduo	Condições de processo	Produção de AGVs	Composição (%)			
			Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico	Outros
Lodo granular	pH 10; 35 °C; batelada	2,10 g L ⁻¹	40,3	3,4	56,3	-
Águas residuárias da produção de azeite	pH 5,5; 35 °C; contínuo, COA 20 g DQO. (L.d) ⁻¹ ; TDH 2 dias	27,51 g L ⁻¹	57	21	8	14
Resíduos sólidos municipais	pH 10; 35 °C; batelada	~ 7,4 g L ⁻¹	70	7	13	10
Melaço	pH 7; 37°C; batelada	3,26 g L ⁻¹	46	41	13	-
Restos de atum	pH 8; 35 °C; contínuo	25,07 g L ⁻¹	60	15	10	15
Resíduos alimentares	pH 6; 35 °C; TDH 6 dias; COA 9 g (L d) ⁻¹ semicontínuo	25,0 g L ⁻¹	48	36	11	5
Resíduos alimentares	PTH (160°C; 30 min, RLS 3,2); Fermentação: pH 6; 30°C; batelada	34,1 g L ⁻¹	31,1	-	41,2	27,7
Resíduos alimentares	PTH (140°C; 30 min, RLS 3,2); Fermentação: pH 6; 30°C; batelada	30,8 g L ⁻¹	35,2	-	38,6	26,2
Palha de milho	Explosão a vapor (RLS 9; 190°C; 30 min); Fermentação: pH 6,5; 37°C; semicontínuo	40,80 g L ⁻¹	67	22	9	2
Cama de frango	PTH com ácido diluído (120 °C - 1% H ₂ SO ₄ - 90 min); Fermentação: pH 5,5; 30 °C; batelada	~ 15,0 g L ⁻¹	-	-	-	-

Fonte: (LIM et al., 2008; SILVA et al., 2013; YIN; WANG; YANG, 2014; BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES; VEIGA, 2017; GARCIA-AGUIRRE et al., 2017; KURUTI et al., 2017; MURALI; FERNANDEZ; AHRING, 2017; YARIMTEPE; OZ; INCE, 2017; ATASOY et al., 2019)

No que tange aos subprodutos da indústria de azeite, poucos trabalhos na literatura visaram a produção e recuperação dos AGV's a partir destes substratos. Yaritempe e seus colaboradores (2017) investigaram o perfil da produção de ácidos graxos voláteis a partir da acidogênese das águas residuais oriundas do processamento do azeite. O resíduo passou por um pré-tratamento de eletrocoagulação que visava a redução da quantidade de sólidos suspensos para desintoxicação do efluente. A taxa máxima de acidificação foi de 68% e o ácido acético foi o composto produzido em maior proporção para todas as condições estudadas (YARIMTEPE; OZ; INCE, 2017).

Além da avaliação das características do substrato a ser utilizado para produção dos AGVs a partir de resíduos lignocelulósicos e as condições operacionais do processo de digestão anaeróbia, a recuperação dos AGVs produzidos a partir dos resíduos é tão importante quanto o processo de fermentação e otimização da produção desses ácidos. No entanto, em um sistema complexo, a recuperação é a parte mais desafiadora da cadeia de produção dos AGVs, se tornando ainda mais difícil quando a recuperação é feita de forma individual (ZACHAROF; LOVITT, 2014).

Um amplo número de técnicas é utilizado para recuperação dos AGVs, dentre elas podem ser citadas algumas como stripping gasoso com absorção, adsorção, extração por solventes, eletrodíálises, osmose reversa, nanofiltração e separação por membrana. Até o presente momento não existe um consenso em relação à qual é a técnica mais recomendada para recuperação dos AGVs. (ATASOY *et al.*, 2018).

O cenário exposto revela que a produção dos AGVs a partir da digestão anaeróbia dos resíduos da indústria de azeite é um assunto ainda inexplorado e que merece a atenção dos pesquisadores, considerando o grande volume desses resíduos gerado a nível global e as atuais perspectivas de um mercado dominado pela economia circular biobaseada.

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO

A produção de azeite no Brasil apresentou evolução crescente nos últimos anos, ganhando destaque no cenário nacional. Entretanto, na indústria oleícola apenas 20% (em massa) das azeitonas que dão entrada no processo são convertidas em azeite. Os outros 80% correspondem aos resíduos gerados (RINCÓN et al., 2009). Nessa perspectiva, o projeto proposto vislumbrou estudar uma alternativa tecnológica para produção de AGVs a partir do bagaço de oliva, buscando a valorização do resíduo ao mesmo tempo que o mesmo é inserido em uma cadeia produtiva circular biobaseada. Além disso, a produção de substâncias até então produzidas a partir de fontes não renováveis como é o caso dos AGVs a partir de matéria prima renovável, preferencialmente resíduo, é extremamente interessante sob a ótica da sustentabilidade.

Os AGVs possuem diversas aplicações, o que garante a eles um lugar de destaque entre os produtos químicos considerados dos blocos construtores. Logo, a sua produção a partir de correntes residuais corresponde perfeitamente a um tipo de economia circular. Por exemplo, enquanto a capacidade potencial de produção de AGV dos países da União Europeia a partir de águas residuais da indústria de laticínios é projetada como 10 Mt/ano (ácido acético eq), estima-se que 2 Mt de acetato, 1,28 Mt de butirato e 1,54 Mt de propionato poderiam ser recuperados anualmente. Na escala global, os valores são 9,15 Mt de acetato, 5,39 Mt de butirato e 6,47 Mt de propionato (ATASOY et al., 2018).

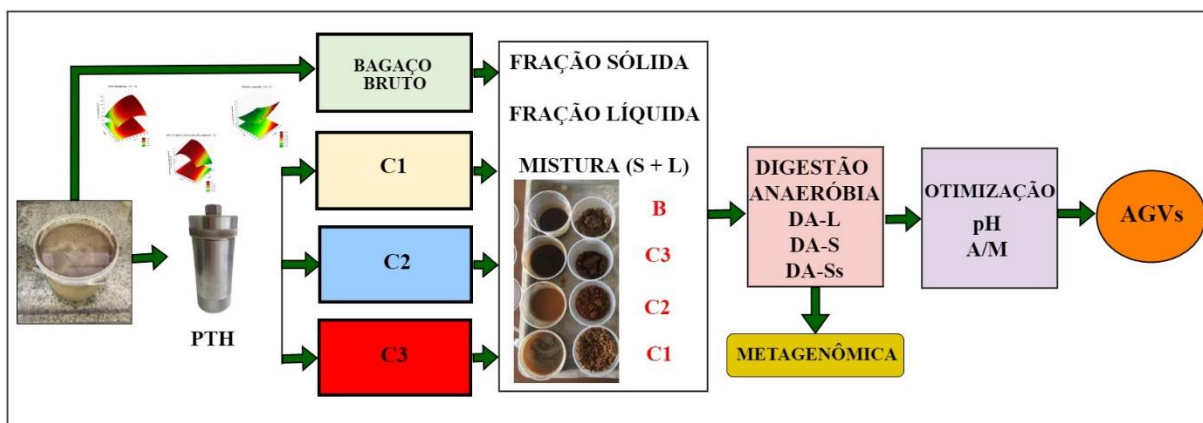
Alguns trabalhos já apontam a utilização de resíduos agrícolas para produção de produtos de valor agregado como os AGVs considerando o conceito de biorrefinaria. No entanto, os pesquisadores atribuem algumas dificuldades para efetivação desta prática. Dentre os problemas citados, estão as atividades metabólicas descontroladas, presença de microrganismos metanogênicos ocasionadas pelas características do substrato e das condições de fermentação ácida e recuperação dos AGVs (ATASOY et al., 2018)

O presente trabalho abordou o primeiro item, pois pretende avaliar o efeito das características do substrato, bem como as condições ótimas de acidificação na geração de AGVs. É importante ressaltar que existem na literatura poucos trabalhos que utilizam o bagaço de oliva como matéria prima para produção de AGVs. Dentre os estudos avaliados nenhum deles discutiu o efeito do pré-tratamento hidrotérmico no grau de acidificação e na concentração e perfil das espécies ácidas produzidas. Portanto, os resultados do presente trabalho contribuirão de maneira importante para aqueles que pretendem utilizar o bagaço de oliva como matéria prima de uma biorrefinaria.

5. METODOLOGIA

As etapas sequenciais que nortearam o delineamento experimental do trabalho estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9: Fluxograma gráfico do delineamento do trabalho



5.1. Caracterização do bagaço de oliva

O bagaço de oliva foi cedido pela cooperativa “Serra que chora”, localizada no município de Barbacena, Minas Gerais, Brasil, durante a safra de 2018. O bagaço úmido proveniente de um sistema de duas fases foi armazenado em baldes de polipropileno e acondicionado em câmara fria para preservação do material. Para caracterização, o bagaço de oliva bruto, que é naturalmente uma pasta, foi submetido a um processo de prensagem em uma prensa hidráulica da marca SOLAB, modelo SL-10 a uma pressão aplicada de trabalho de 9 toneladas. Tal ação visou promover a separação da fração sólida (FS) e da fração líquida (FL) da mistura. Dessa forma, tanto a mistura do bagaço de oliva bruto (B) quanto as frações sólida e líquida foram caracterizados.

5.2. Determinação de sólidos totais, voláteis e fixos do bagaço úmido

Os cadinhos de porcelana foram identificados e levados para calcinar na mufla (Magnu's[®], microprocessado de 1100°C) à 525°C por 2 horas. Assim que a mufla atingiu a temperatura de segurança (abaixo de 150°C), os cadinhos foram resfriados em dessecador, pesados (P₀) e uma massa de 10,0000 g do bagaço de azeitona foi usada para realização do teste. Posteriormente eles foram colocados na estufa (SOLAB[®], modelo SL-102/100) à 105°C por 24 horas, sendo resfriados em dessecador e pesados (P₁) novamente. Em seguida, as

cápsulas seguiram novamente para a mufla a uma temperatura de 525°C por 2 horas a uma taxa de aquecimento de 2°C min⁻¹. A última etapa consistiu em resfriar os cadinhos em dessecador e pesá-los (P₂). O cálculo dos sólidos totais, voláteis e fixos é realizado respectivamente de acordo com as equações (4), (5) e (6):

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{(P_1 - P_0)}{P_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Sólidos totais voláteis} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ Sólidos totais fixos} = \frac{(P_2 - P_0)}{P_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (6)$$

5.3. Análise granulométrica

Foram pesados aproximadamente 150,0000g do bagaço de oliva bruto seco e previamente macerado. A amostra foi quarteada e submetida a um agitador de peneiras (Bertel[®]) com uma série de peneiras cujas aberturas eram: 10, 32, 48, 60 e 100 mesh. O sistema foi mantido em agitação por dez minutos, na posição 2. Ao fim do ensaio, a massa retida em cada peneira foi pesada, possibilitando a observação da distribuição granulométrica do material.

5.4. Teor de umidade

O teor de umidade no bagaço de oliva foi determinado utilizando uma balança de umidade da marca OHAUS, modelo MB25. Foram pesados aproximadamente 0,500 g da biomassa na balança termogravimétrica, que aquece a amostra a temperaturas de 110°C até que a variação da massa seja desprezível. Dessa forma, o equipamento calcula o teor de umidade automaticamente pela relação percentual entre a massa perdida durante o aquecimento e a massa inicial utilizada por meio da seguinte relação:

$$U(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (7)$$

Em que: U é o teor de umidade da biomassa; m_i é a massa em base seca (g) e m_f é a massa final.

5.5. Lipídios

A metodologia utilizada na determinação de lipídios segue a norma EEC (Comunidade Econômica Europeia) N° 2568/91, adaptada conforme descrito a seguir. Foi utilizado um extrator de óleos e gorduras da marca Solab (Modelo SL 202/6) e ciclo-hexano como solvente. Os frascos reboiler foram previamente secos em estufa por uma noite, colocados em um dessecador e pesados (Po). A umidade do bagaço foi medida em uma balança de umidade e posteriormente foram pesadas cerca de 10,0000 g da amostra em base seca num cartucho de papel filtro previamente pesado e tarado, que ficou em refluxo por 4 horas com o solvente. Decorrido esse tempo, o tubo recuperador de solvente foi encaixado e assim permaneceu por 2 horas. Os fracos reboiler seguiram para a estufa de circulação à 105°C por dez minutos, foram resfriados em dessecador e pesados. Esse procedimento de colocar os tubos na estufa, resfriar e pesar foi repetido até que se obtivesse peso constante (P₁).

O teor de lipídios foi calculado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{(\text{Peso frasco final } (P_1) - \text{Peso frasco inicial } (P_0))}{M \text{ amostra em base seca}} \times 100 \quad (8)$$

5.6.Extrativos

A umidade do bagaço de oliva remanescente da análise do teor de lipídios foi medida em balança de umidade. Então, a massa restante foi pesada e colocada em um cartucho Soxhlet feito com papel filtro. Foram adicionados 125 mL de etanol e 125 mL de ciclo-hexano em balão volumétrico de fundo redondo de 1000 mL. O sistema Soxhlet foi montado e a extração ocorreu por 48 horas. A amostra restante dos extrativos foi filtrada a vácuo em funil de Buchner, sendo lavada com 300 mL de água destilada corrente. Posteriormente, a biomassa foi seca em estufa de circulação da marca Solab (Modelo SL 102) por 24 horas à 40°C. Depois da secagem a amostra foi pesada e sua umidade novamente medida na balança de umidade. O cálculo do percentual de extrativos foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$(\% \text{ Extrativos}) = \frac{\text{Massa inicial (base seca)} - \text{Massa final (base seca)}}{\text{Massa inicial (Base Seca)}} \times (100 - \% \text{ Lipídios}) \quad (9)$$

5.7. Teor de lignina insolúvel pelo método Klason e cinzas

O teor de lignina Klason da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T222 om-02 (*Acid-insoluble lignin in wood and pulp*), modificada de acordo com o descrito a seguir. Pesou-se aproximadamente 0,7133 g em base seca de bagaço de oliva previamente moído (20 mesh) e transferiu-se para um tubo autoclavável de 500 mL contendo 10,7 mL de solução de ácido sulfúrico 72% ($d = 1,6338 \text{ g mL}^{-1}$). A mistura foi agitada moderadamente em chapa magnética (Fisatom[®], modelo 751) por duas horas. Posteriormente, foram adicionados aos tubos autoclaváveis 400 mL de água destilada para que o ácido fosse diluído a uma concentração de 3% (m v^{-1}). Em seguida, os tubos foram levados a uma autoclave (PRISMATEC[®], modelo CS) previamente aquecida a uma temperatura de 121°C por 1 hora. Finalizada a hidrólise, iniciou-se a filtração a quente da solução em funil de placa sinterizada do tipo ASTM 10-15M previamente seco em estufa a 105°C por 1 hora e pesado (m_0). O material insolúvel foi seco em estufa a 80°C por 4 horas e resfriado em dessecador até peso constante (m_1). Após esta etapa o cadinho pesado foi levado a mufla, programada para atingir 525°C em uma taxa de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Os cadinhos permaneceram a 525°C por 2 horas e foram retirados assim que a mufla atingiu a temperatura de segurança, sendo resfriados no dessecador por 30 minutos e pesados (m_2). O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente e calculado segundo a equação (10), enquanto o teor de cinzas da lignina foi calculado conforme a equação (11):

$$(\%Lignina\ Insolúvel) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_i} \times (100 - (\%Lipídios) - (\%Extrativos)) \quad (10)$$

$$\%Cinzas = \frac{(m_2 - m_0)}{m_i} \times (100 - (\%Lipídios) - (\%Extrativos)) \quad (11)$$

Em que m_0 é a massa do cadinho após a calcinação, m_1 a massa do cadinho com a amostra após a estufa, m_2 a massa do cadinho com amostra após a mufla e m_i é a massa inicial(g) de amostra livre de umidade.

5.7.1. Teor de lignina solúvel

Para determinação da lignina solúvel foi utilizado o filtrado obtido durante a determinação da lignina insolúvel pelo método Klason, que foi diluído 5 vezes em balões volumétricos de 50 mL. A quantificação da lignina solúvel foi feita por meio da medida de absorbância em 215 nm e 280 nm, em um espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific, modelo

G10S UV-VIS. As concentrações de lignina solúvel foram calculadas utilizando a equação (12), modificada para a diluição utilizada.

$$C_{LS} = \left(5x \left(\frac{4,53 \cdot Abs_{215 \text{ nm}} - Abs_{280 \text{ nm}}}{300} \right) \right) x \frac{0,5}{m_e} \quad (12)$$

Em que 0,5 = volume do balão volumétrico utilizado no teste Klason e m_e = massa de entrada da biomassa no teste Klason. Em base seca

A equação (12) é resultante da resolução do seguinte sistema de equações:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$$

Nas quais:

A_{280} = valores de absorbância da solução a 280 nm

A_{215} = valores de absorbância da solução a 215 nm

C_D = concentração de carboidratos (g L^{-1})

C_L = concentração de lignina solúvel (g L^{-1})

Cabe ressaltar que os valores 0,68 e 0,15 são respectivamente as absorptividades molares dos carboidratos em 280 nm e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são absorptividades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente.

5.7.2. Determinação dos teores de celulose e hemicelulose

As soluções resultantes do método de determinação da lignina Klason (5.7) foram filtradas com membranas de nitrato de celulose (Unifill) com poros de tamanho igual a 0,22 μm e injetadas em vials para determinação dos teores de celulose e hemiceluloses por meio de análise cromatográfica, que detectou os seguintes compostos: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE), da marca Shimadzu[®], equipado com sistema quaternário de bombas (LC-20AD), injetor automático (SIL-20AC), detector de índice de refração (Shimadzu[®], model RID-6A), detector UV-Vis (SPD-20A), forno (CTO-20A) e uma coluna do modelo Aminex HPX 87H (300 \times 7.8 mm BIO-RAD), mantida em 55°C. A fase móvel utilizada para separação dos compostos foi ácido sulfúrico 0,005 mol L⁻¹, bombeado em um fluxo isocrático de 0,6 mL min⁻¹.

Os açúcares foram analisados e quantificados pelo detector de índice de refração, enquanto os ácidos orgânicos e os aldeídos foram detectados e quantificados pelo detector UV-Vis operado em canal duplo com comprimentos de onda iguais a 210 nm para determinação de ácidos e 274 nm para determinação de FF e HMF.

Depois da quantificação dos compostos, as massas de celobiose, glicose, ácido fórmico e HMF foram convertidos em teor de celulose, conforme a equação (13). As massas de xilose, arabinose, ácido acético e FF foram convertidas em teor de hemicelulose, de acordo com a equação (14):

$$Celulose (\%) = \frac{(0,95.C_C + 0,9.C_G + 3,52.C_{\acute{a}c f} + 1,286.C_{HMF})xV_f}{m_i} \times (100 - \% Lipídios - \% Extrativos) \quad (13)$$

$$Hemicelulose (\%) = \frac{(0,88.C_x + 0,88.C_A + 0,717.C_{A.A.} + 1,375.C_{FF})xV_f}{m_i} \times (100 - \% Lipídios - \% Extrativos) \quad (14)$$

Em que: C_C é a concentração de celobiose, C_G é a concentração de glicose, C_{HMF} é a concentração de HMF, $C_{\acute{a}c f}$ é a concentração de ácido fórmico, C_x é a concentração de xilose, C_A é a concentração de arabinose, $C_{A.A.}$ a concentração de ácido acético, C_{FF} é a concentração de furfuraldeído e V_f é o volume total aferido no balão durante o teste Klason, conforme descrito anteriormente.

5.7.3. Balanço de massa

O balanço de massa para os componentes do bagaço de oliva foi calculado por meio da equação (15).

$$Balanço de massa (\%) = Cel + Hem + Lig + Cinzas + Extrativos + Lipídios \quad (15)$$

A equação (15) corresponde à soma dos teores de celulose, hemicelulose, lignina total, cinzas, extrativos e lipídios.

5.8. Demanda química de oxigênio (DQO): refluxo aberto

A quantificação de DQO nas amostras foi feita por meio da metodologia UNE 77004:2002, procedimento apropriado para amostras que contém grande quantidade de sólidos em suspensão. Primeiramente foi preparado um branco, que passou pelos mesmos

procedimentos que as amostras, acrescentando-se ao tubo digestor 10 mL de água. Para a quantificação da DQO nas amostras sólidas foi adicionado ao tubo digestor 0,1000g da biomassa em base seca e 10 mL de água. Já para os hidrolisados obtidos após o pré-tratamento por auto hidrólise foi adicionado ao tubo 1,00 mL da fração líquida resultante do pré-tratamento e 9 mL de água. O restante do método é comum para os dois tipos de amostra.

Sendo assim, foram adicionados lentamente 20 mL da solução de digestão (0,2 M de $K_2Cr_2O_7$) e 30 mL da solução catalítica (10g L^{-1} de $AgSO_4$ em H_2SO_4). Depois que as soluções foram adicionadas, um condensador de bolas foi acoplado ao tubo digestor. Os tubos foram adicionados ao bloco digestor da marca TECNAL modelo 040/25, previamente aquecido a uma temperatura de $151 \pm 2^\circ C$. A digestão foi realizada na capela, por duas horas. Posteriormente, os tubos digestores foram retirados do bloco digestor e colocados em um suporte para resfriarem até temperatura ambiente. Depois do resfriamento dos tubos, os condensadores foram desacoplados e o conteúdo digerido foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, onde se adicionou 440 mL de água destilada. Além disso, adicionou-se 10 gotas de indicador de ferroína. Os erlenmeyers seguiram para a titulação cujo titulante foi uma solução de sulfato ferroso amoniacal (FAS) previamente normalizada conforme descrito no próximo parágrafo. O procedimento de titulação foi realizado com auxílio de uma lâmpada branca para facilitar a observação da viragem. Dessa forma, os erlenmeyers ficaram sobre agitação magnética moderada e a FAS foi adicionada até o ponto de viragem, caracterizado por um tom de marrom. O volume de titulante gasto foi anotado.

A solução de sulfato ferroso amoniacal utilizada como titulante foi preparada por meio da dissolução de 200 g de $Fe(NO_3)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ em 500 mL de água destilada, sendo adicionado lentamente um volume de 40 mL de H_2SO_4 (96%). O volume da solução foi completado com água destilada até 1,0 L. Na normalização do FAS, adicionou-se a um erlenmeyer de 500 mL: 10mL de solução padrão de $K_2Cr_2O_7$ (1 N; $0,166 \text{ mol } L^{-1}$), 30 mL de H_2SO_4 (96%) e 460 mL de água destilada. A titulação foi realizada conforme descrito para as amostras da digestão e o volume de FAS consumido foi anotado. Assim, o cálculo da normalização foi realizado por meio da equação (16):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (16)$$

Em que: C_1 é a concentração da solução padrão de $K_2Cr_2O_7$ (1N);

V_1 é o volume da solução padrão utilizado (10 mL);

C_2 é a concentração da solução FAS (N); e

V_2 é o volume de FAS gasto na titulação (10 mL).

Sabendo a normalização da solução de FAS, a demanda química de oxigênio (DQO) das amostras sólidas é calculada pela equação (17):

$$DQO = \frac{(V_b - V_a) \cdot 8 \cdot N}{m_{BS}} \quad (17)$$

Em que: DQO é a demanda química de oxigênio da amostra ($\text{mgO}_2 \text{ g}^{-1}$);

V_b é o volume de FAS gasto na titulação do branco (mL);

V_a é o volume de FAS gasto na titulação da amostra (mL);

N é a normalidade da solução de FAS (N); e

m_{BS} é a massa de bagaço em base seca (g).

8 representa o fator de conversão do oxigênio expresso em mg.

Já a demanda química de oxigênio (DQO) das amostras líquidas é dada pela equação (18):

$$DQO = \frac{(V_b - V_a) \cdot 8000 \cdot N}{V_H} \quad (18)$$

Em que: DQO é a demanda química de oxigênio da amostra ($\text{mgO}_2 \text{ g}^{-1}$);

8000 representa o fator de conversão do oxigênio expresso em mg.

V_b é o volume de FAS gasto na titulação do branco (mL);

V_a é o volume de FAS gasto na titulação da amostra (mL);

N é a normalidade da solução de FAS (N); e

V_H é o volume de amostra líquida (hidrolisado) utilizado (mL).

5.9. Fenóis

A quantificação do teor de fenóis totais segue a metodologia proposta por Rosseti, (2007), modificada de acordo com o descrito a seguir. A primeira etapa é a de extração. Para as frações sólidas foi adicionado a um tubo falcon de 15 mL, 1,0000g da amostra em base seca e 10 mL de acetona 70% ($v v^{-1}$). Para hidrolisados hemicelulósicos foram adicionados 1 mL da amostra e 9 mL de acetona 70% ($v v^{-1}$). Em seguida, os tubos contendo as misturas foram colocados em um bequer contendo água com gelo, que foi submetido ao ultrassom por 20 minutos. Posteriormente, os tubos falcon foram levados a uma centrífuga a 3000 rpm por 10 minutos. Para a etapa de análise foram coletados do tubo falcon 50 μL do extrato (sobrenadante após centrifugação) e adicionados em um tubo de ensaio com tampa juntamente com 450 μL de água deionizada, 520 μL do reagente Folin Ciocalteu (solução contendo molibdato,

tungstato e ácido fosfórico) e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio 7% ($m v^{-1}$). Em seguida, os tubos foram levados para agitação em vortex por 5 minutos, sendo deixados em local sem incidência de luz por 35 minutos. Finalizado esse tempo, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 725 nm. A quantificação de fenóis totais foi realizada a partir do método de calibração externa usando soluções padrões de ácido tânico em diferentes concentrações. Para curva de calibração foram adicionados em tubos de ensaios volumes crescentes (20, 60, 80, 100, 250 e 500 μL) de solução de ácido tânico 0,1 $g L^{-1}$ em tubos de ensaio e completados com água deionizada até completar 500 μL , as outras etapas foram as mesmas descritas anteriormente para o extrato. Uma curva de calibração relacionando a absorbância pela concentração de ácido tânico como fenóis foi construída, e a equação da reta foi utilizada para determinação de fenóis totais nas amostras de biomassa e de hidrolisado hemicelulósico.

5.10. Determinação de carbono e nitrogênio total

As análises de Carbono Orgânico Total (COT) nas frações sólidas e líquidas foram realizadas por um Analisador de Carbono Total (TC/Módulo de amostra sólida SSM-5000A). As análises de Nitrogênio Total das frações líquidas foram realizadas pelo mesmo equipamento, que possui módulo TNM-L acoplado.

5.10.1. Determinação de Nitrogênio Kheldal e proteínas nas frações sólidas

A determinação do teor de proteínas foi realizada de forma indireta pelo método do Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), conforme descrito por Assis, (2018). Dessa forma, 0,1000 g da biomassa em base seca foi transferida para um erlenmeyer com 300 mL de água destilada onde foram adicionados 50 mL de solução digestora. Após a digestão ácida em chapa aquecedora a 400°C, foi realizada a destilação. No destilador de nitrogênio foram adicionados 50 mL de solução de hidróxido de sódio e tiosulfato de sódio. A destilação foi realizada para um erlenmeyer contendo 50 mL de solução de ácido bórico com solução mista de indicadores. A solução obtida após a destilação foi titulada com solução aquosa de ácido sulfúrico 0,02 N. O teor de nitrogênio foi determinado pela equação (19) e a partir do teor de nitrogênio, foi obtido o teor de proteínas pela equação (20).

Em que:

$$\text{Nitrogênio} \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{(Va-Vb) \times Ntit \times 0,014}{mbiomassa} \times 100 \quad (19)$$

Va: volume de titulante utilizado na amostra (mL)

Vb: Volume de titulante utilizado no branco (mL)

Ntit: concentração da solução aquosa de ácido sulfúrico (N)

mbiomassa: massa da amostra (g)

$$\text{Proteínas} \left(\frac{g}{100g} \right) = \text{Nitrogênio} \times \text{FCNP} \quad (20)$$

Em que:

FCNP: fator de conversão do conteúdo de nitrogênio em proteína. O valor utilizado foi de 6,25 g g⁻¹ de nitrogênio total.

5.11. Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva foi realizado em reatores cilíndricos de aço 316 L do tipo autoclave, com anel de vedação de politetrafluoretileno (PTFE) e volume útil de 420 mL. Durante todas as condições experimentais a razão líquido:sólido (RLS) foi fixada em 4 mL g⁻¹ de bagaço (em base seca), uma vez que o bagaço de oliva apresenta essa razão líquido-sólido naturalmente em função do elevado teor de umidade (~80%). Nesse sentido, aproveitar a própria umidade da biomassa é uma vantagem para o processo, que dispensaria a adição de água para realização do PTH. A massa de biomassa utilizada durante os ensaios foi de 225 g (em base úmida). O sistema foi aquecido nas temperaturas planejadas em um banho termostizado que usa glicerina como fluido de aquecimento. Decorrido o tempo determinado para condição, o reator foi imediatamente imerso em um recipiente com gelo e água fria com o objetivo de cessar a conversão dos carboidratos a compostos indesejados para os microrganismos, como os compostos furânicos. O bagaço de oliva pré-tratado foi fracionado em uma prensa hidráulica (SOLAB, modelo SL-10) usando uma pressão de 9 toneladas para a separação da fração sólida pré-tratada e fração líquida pré-tratada. A fração líquida (FL) do pré-tratamento foi caracterizada de acordo com as metodologias descritas nos itens 5.8, 5.9 e 5.10. A fração sólida (FS) foi caracterizada de acordo com as metodologias descritas nas seções 5.2, 5.8 e 5.9.

A FS pré-tratada foi usado nos testes DA-S, enquanto a FL pré-tratada foi usada nos testes DA-L. A mistura (FS mais FL) foi utilizado nos testes DA-Ss.

5.12. Planejamento experimental e análises estatísticas

5.12.1. Planejamento experimental aplicado ao pré-tratamento hidrotérmico

Na primeira etapa do trabalho, as condições experimentais para o PTH do bagaço de oliva foram definidas pelo planejamento experimental Doehlert, conforme matriz de experimento apresentada na Tabela 6, na seção 6.2. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura (T , °C) e tempo (t , min). As variáveis dependentes avaliadas foram a solubilização de DQO ($Y1$,%), a razão de açúcares C5 mais C6 (glicose, xilose e arabinose) para inibidores (FF, HMF e compostos fenólicos) no hidrolisado ($Y2$) e compostos fenólicos no hidrolisado ($Y3$,% em massa). Essas variáveis foram escolhidas por estarem diretamente relacionadas à produção de AGVs por DA acidogênica e por obedecerem aos critérios da Análise de Variância (ANOVA): independência, normalidade (averiguada pelo teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade.

A severidade do pré-tratamento hidrotérmico foi calculada de acordo com a Equação 21:

$$\log S_0 = \log \left\{ t * \exp \left(\frac{T - T_{ref}}{14,75} \right) \right\} \quad (21)$$

Em que:

t = tempo empregado no pré-tratamento (minutos)

T = temperatura do pré-tratamento °C

T_{ref} = temperatura de referência (100°C)

14,75 = parâmetro empírico relacionado à energia de ativação, assumindo uma cinética de pseudo-primeira ordem.

Após analisar os resultados obtidos pelo planejamento Doehlert, a ferramenta de desejabilidade foi utilizada para selecionar três condições diferentes de PTH, o que representou diferentes cenários em relação à disponibilidade de açúcares e inibidores no hidrolisado. As condições de C1, C2 e C3 geradas pela ferramenta de desejabilidade diferem entre si pela severidade do pré-tratamento (S_0), com a condição C1 de baixa severidade, a condição C2 de severidade intermediária e a condição C3 de alta severidade. O planejamento experimental e a ferramenta de desejabilidade foram executados usando o programa Statistica® (StatSoft, Inc., versão 12.0) usando erro puro com um nível de confiança de 95%.

5.12.2. Planejamento experimental aplicado à fermentação acidogênica

Na segunda etapa do trabalho, as condições experimentais para a otimização das condições da digestão anaeróbia para produção de AGVs também foram definidas pelo planejamento experimental Doehlert de acordo com matriz experimental apresentado na Tabela 12, na seção 6.6. As variáveis independentes avaliadas foram *pH* e relação *A/M* (gSV gSV⁻¹). As variáveis dependentes avaliadas foram concentração total de AGVs (*Y4*, mg L⁻¹) e percentual total de ácidos de cadeia longa (isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) (*Y5*, %). As variáveis obedeceram aos critérios da Análise de Variância (ANOVA): independência, normalidade (averiguada pelo teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade. O planejamento experimental foi executado usando o programa Statistica® (StatSoft, Inc., versão 12.0) usando erro puro com um nível de confiança de 95%.

5.13. Acidificação do bagaço de oliva pré-tratado

Os testes de digestão anaeróbia acidogênica em batelada foram realizados em condições mesofílicas, utilizando frascos de vidro de 120 mL com 60 mL de headspace. Os reatores foram colocados em agitador orbital termostático, sendo mantidos a (35,0 ± 1,0 °C) e 150 rpm. Para a digestão anaeróbia em fase sólida (DA-S) e semissólida (DA-Ss) foram mantidas proporções de 15 e 12% de sólidos totais, respectivamente, sendo mantida uma relação alimento microrganismo (*A/M*) de 2,0 gSV_{substrato} gSV_{inóculo}⁻¹ em ambos os casos. De acordo com Yang (2015), relações *A/M* entre 2,0–3,0 gSV gSV⁻¹ são frequentemente usadas em testes de DA-S e DA-Ss que empregam biomassa lignocelulósica como substrato. Para testes de DA-L (ST<10%), foram adicionados aos reatores 3 mL de hidrolisado e inóculo em quantidade necessária para manter uma relação *A/M* de 0,5 gDQO gSV⁻¹. Essa razão *A/M* está dentro da faixa de valores utilizados em testes de DA usando bagaço de oliva (Rincón et al., 2013; Rincón et al., 2008). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Os testes de otimização dos parâmetros do bioprocessamento (relação alimento microrganismo (*A/M*) e *pH*) foram realizados de forma análoga ao descrito para a primeira etapa do trabalho. Contudo, o *pH* variou de 5-9 e a relação alimento/microrganismo de 0,5 a 3 gSV gSV⁻¹. Além disso, houve a adição de uma solução de bicarbonato de sódio de forma que a concentração de NaHCO₃ nos reatores se manteve em 2,5g L⁻¹ (IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2019). A adição da solução tampão ocorreu com o intuito de se evitar alterações bruscas no *pH* do meio.

O pH inicial das suspensões foi ajustado adicionando gotas de soluções aquosas de 1 mol L⁻¹ de HCl ou NaOH. Após o ajuste do pH, todos os frascos foram selados com tampas de borracha e lacres de alumínio, sendo purgados com N₂ por 3 min para eliminar a concentração de O₂, promovendo condições anaeróbias ao sistema. Uma solução- micronutriente foi adicionada a cada frasco na proporção de 58 µL.g SV inóculo⁻¹, de acordo com Rincón et al. (2013). A composição da solução contendo os elementos traço foi: FeCl₂ · 4H₂O (2000 mg L⁻¹), CoCl₂ · 6H₂O (2000 mg L⁻¹), MnCl₂ · 4H₂O (500 mg L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50 mg L⁻¹), H₃BO₃ (50 mg L⁻¹), ZnCl₂ (50 mg L⁻¹), CuCl₂·2H₂O (38 mg L⁻¹), NiCl₂ · 6H₂O (50 mg L⁻¹) e EDTA (1000 mg L⁻¹). Para cada tipo de teste de DA, reatores contendo inóculo e solução-traço sem adição de substrato foram usadas como controle.

O inóculo utilizado nos testes de DA consistiu em uma mistura de 50% (g SV) de lodo anaeróbio e 50% (g SV) de esterco bovino fresco (Lima et al, 2018). O esterco bovino foi coletado em uma fazenda local (Ouro Preto, MG, Brasil) e o lodo anaeróbio foi coletado de um reator UASB em escala piloto alimentado com esgoto sanitário no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) (UFMG / Copasa, Estação de Tratamento de Águas Residuais de Arrudas, Belo Horizonte, MG, Brasil). Tratamento térmico (100°C por 120 min) foi aplicado à mistura de inóculos para eliminar os metanogênicos consumidores de hidrogênio e enriquecer o inóculo com microrganismos produtores de hidrogênio (BAÊTA; LIMA; FILHO; et al., 2016).

Uma vez que a produção de hidrogênio é um indicador indireto da produção de AGVs, os testes de acidificação foram encerrados quando não houve uma variação de produção de hidrogênio superior a 5%. A produção de hidrogênio foi monitorada diariamente medindo-se a pressão acumulada no frasco reator com um manômetro diferencial da marca CCE capaz de medir pressões em uma faixa de pressão de 0 a 5 atm. Para a composição de hidrogênio no biogás, uma amostra de 0,5 mL do gás produzido foi coletada após a medida de pressão e injetada posteriormente com uma seringa *gastight* em um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu (equipado com um detector de condutividade térmica operando em uma temperatura de 120°C, uma coluna capilar de peneira molecular (5A) da Marc Restek preenchida com fase estacionária Msieve 5Å trabalhando a uma temperatura de 120 °C com nitrogênio 5.0 como gás de arraste, em velocidade linear de 23,8 mL.min⁻¹ . Uma curva analítica foi construída com uma mistura gasosa padrão para quantificação de metano e hidrogênio (24,99 mol CH₄ mol⁻¹ e 25,40 mol H₂ mistura mol⁻¹ (LIMA et al., 2018).

A eficiência de acidificação (EA) após os testes acidogênicos de DA foi calculada de acordo com a Equação (22), enquanto a DQO_{AGV} foi calculada de acordo com a Equação (23) (YARIMTEPE; OZ; INCE, 2017):

$$EA /(\%) = \left(\frac{DQO_{AGV} - DQO_{AGVi}}{DQO_t} \right) \times 100 \quad (22)$$

Em que: DQO_{AGV} é a quantidade de DQO presente na fase líquida como AGV no final do teste acidogênico da DA, DQO_{AGVi} é a quantidade de DQO presente após o pré-tratamento hidrotérmico e DQO_{total} é a quantidade de DQO fornecida no início do teste de fermentação acidogênica.

$$DQO_{AGV} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 0,35[HF] + 1,07[HAc] + 1,5[HPr] + 1,82[HIsoBut] + 1,82 [HBut] + 2,04[HIsoVal] + 2,04 [HVal] \quad (23)$$

Em que: [HF], [HAc], [HPr], [HIsoBut], [HBut], [HIsoVal] e [HVal] são as concentrações em mg L^{-1} dos ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico, respectivamente.

5.14. Quantificação de ácidos graxos voláteis das frações líquidas após a DA

No final dos testes DA-S, DA-Ss e DA-L foram coletadas amostras líquidas das garrafas de vidro, centrifugadas por 30 min a 14.000 rpm (força centrífuga relativa de $12.709 \times g$) (Eppendorf®, modelo 5410) e filtrado em membranas de nitrocelulose (Unifill-0,20 μm). A quantificação dos AGV foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), nas condições descritas no item 5.7.2.

5.15. Ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM)

Os testes de digestão anaeróbia para avaliação do potencial de produção de CH_4 a partir das frações líquidas bruta e do substrato pré-tratado a 161°C e 62 min foram realizados para a DA-L (ST<10%). Para realização dos ensaios de PBM em uma única etapa foram utilizados frascos reatores de vidro de 120 mL, sendo 60 mL de volume útil e o restante como *headspace*. A relação alimento:microorganismo (A/M) foi de 0,5 g DQO/g SV. A solução-traço descrita no item 5.13 foi adicionada a cada reator, numa proporção de 58 $\mu\text{L.g SV inóculo}^{-1}$. O pH foi ajustado para 9,0, utilizando soluções de HCl ou NaOH (1 mol L^{-1}). Após o ajuste de pH os

frascos foram purgados com $N_{2(g)}$ durante 3 minutos e lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Em seguida, os frascos foram levados para uma incubadora Shaker (Thoth®, modelo 6440) sob uma agitação de 150 rpm e a uma temperatura controlada de $35\pm 2^\circ\text{C}$. Um branco foi preparado para a quantificação do metano endógeno. O inóculo anaeróbio usado para os testes de PBM foi o mesmo utilizado nos ensaios acidogênicos (esterco bovino e lodo UASB numa proporção 1:1 (SV)), porém nos testes de PBM não passou por tratamento térmico. O monitoramento da produção de biogás foi feito de forma análoga ao descrito no item 5.13.

5.16. Metagenômica

Com o objetivo de relacionar as comunidades microbianas ao pré-tratamento hidrotérmico aplicado aos substratos e conseqüentemente às possíveis rotas metabólicas de produção dos AGVs, foi realizada uma análise metagenômica após os testes de acidificação. Para a DA-L e DA-S foram escolhidas as condições que utilizaram substratos da condição de pré-tratamento de baixa e alta severidade (1 e 3). Para a DA-Ss foi escolhida a condição de severidade intermediária (2), visto que foi a que apresentou melhores resultados. A metodologia seguiu o protocolo descrito por Christoff *et al.*, (2017) e a análise funcional preditiva foi realizada usando a plataforma KEGG.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

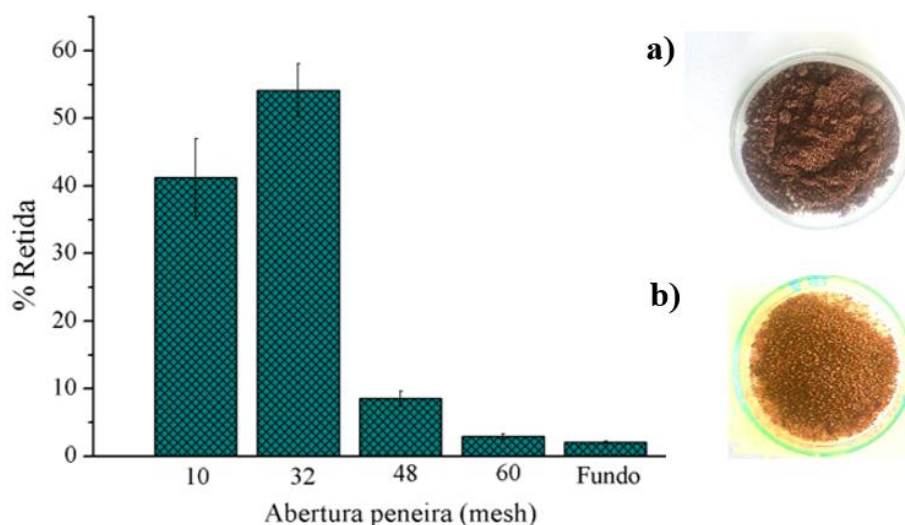
6.1. Caracterização do bagaço de oliva

6.1.1. Análise granulométrica e caracterização físico-química do bagaço de oliva

A distribuição granulométrica do bagaço de oliva é uma característica importante que deve ser considerada no que se refere aos bioprocessos, haja vista que o tamanho das partículas se relaciona diretamente com as partes que compõem o fruto e conseqüentemente com a composição química da biomassa. De acordo com Braadbaart, Marinova e Sarpaki (2016), a azeitona é uma drupa e pode ser separada em quatro partes anatômicas: epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semente. O mesocarpo é a principal parte do fruto, uma vez que representa entre 60-85% do seu peso.

Conforme exposto na Figura 10, 87,47% das partículas do bagaço bruto ficaram retidas em uma peneira de 32 mesh, ou seja, são maiores que 0,5 mm. A biomassa retida na peneira de 10 mesh apresentou distribuição heterogênea de tamanho e cor clara. Em função dessas características e da resistência que o caroço oferece ao processo de cominuição, sugere-se que essa fração seja majoritariamente constituída pelo caroço das azeitonas. Em contrapartida, a fração retida/passante em 32 mesh apresentou partículas mais uniformes e cor escura (marrom), indicando que as frações retidas em peneiras de menor abertura sejam constituídas principalmente pela polpa (mesocarpo).

Figura 10: Distribuição granulométrica do bagaço de oliva bruto seco



Em função das diferenças físicas observadas na análise granulométrica do bagaço de oliva, optou-se por caracterizar as duas frações mais representativas da biomassa antes de

proceder com a caracterização do bagaço bruto. Assim, o bagaço seco foi moído em um moinho acoplado com peneira de 20 mesh, e as frações do bagaço bruto passante em 20 mesh (Figura 10-a) (0,85mm) e retido em 20 mesh (Figura 10-b) foram caracterizadas de acordo com os parâmetros expostos na Tabela 4:

Tabela 4: Caracterização físico-química das frações do bagaço de oliva moído retido e passante em 20 mesh

Parâmetro	Fração passante	Fração retida
Lignina solúvel / (%)	1,77±0,06	1,45±0,09
Lignina insolúvel / (%)	19,32±0,55	41,79±1,28
Lignina total / (%)	21,09±0,49	43,24±1,34
Celulose / (%)	8,94±0,02	7,64±0,89
Hemicelulose / (%)	6,90±0,29	17,81±0,38
Fenóis / (%)	0,21±0,01	0,13±0,07
Lipídios / (%)	27,68±0,85	8,90±0,20
Extrativos livres de lipídios / (%)	24,78±0,79	12,76±0,28
Balanço / (%)	90,2±0,55	91,29±1,03
DQO (gO ₂ /g)	1,73±0,01	1,42±0,03
COT (%)	58,37±1,17	48,96±0,80

Conforme elucidado, existem diferenças significativas em relação ao teor de lignina, hemiceluloses e lipídios nas granulometrias estudadas (p -valor <0,05 pelo teste de hipóteses de *Tuckey*). A fração retida em 20 mesh, composta majoritariamente por caroço, apresenta aproximadamente o dobro de lignina e 2,5 vezes mais hemiceluloses em relação a fração passante. Tal observação apresenta coerência do ponto de vista biológico, visto que o caroço dos frutos de fato tende a apresentar mais lignina, considerando que as sementes precisam estar bem protegidas para garantir a reprodução das angiospermas. Por outro lado, o maior teor de hemiceluloses no caroço também está relacionado a presença das sementes, que apresentam quantidades apreciáveis de arabinanas e glicomananas, que são constituintes das hemiceluloses (PÉREZ et al., 2008).

No que tange ao teor de lipídios, é perceptível que a maior contribuição para o teor de óleos e gorduras do bagaço bruto advém da polpa das azeitonas (fração passante em 20 mesh). Esse aspecto é coerente, visto que segundo Braadbaart, Marinova e Sarpaki (2016), o óleo armazenado nos oleoplastos é produzido no mesocarpo, onde se encontra cerca de 75% dos lipídios das olivas (HARALAMPIDIS et al., 1998)

Uma vez que a caracterização química da polpa e do caroço das azeitonas que compõe o bagaço de oliva seco foi conhecida, procedeu-se para a caracterização integral do resíduo, que naturalmente é uma pasta. Dessa forma, as principais características físico-químicas da mistura do bagaço bruto (B), da fração sólida (FS) e fração líquida (FL) que o constituem estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Principais características físico-químicas do bagaço de oliva bruto (pasta), da fração sólida e da fração líquida

Parâmetro	Amostra		
	B	FS	FL
ST / (g kg ⁻¹) ¹	211,54±4,63	347,74±1,26	67,67±0,87
SV/ (g kg ⁻¹) ²	199,14±7,69	340,19±0,88	56,41±0,14
SF / (g kg ⁻¹) ³	12,40±3,09		
DQO / (gO ₂ g ⁻¹) ⁴ ou DQO _L / (gO ₂ L ⁻¹)	1,64±0,03	1,32±0,13	84,10±0,12
Hemiceluloses / (%)		13,54±0,28	
Celulose / (%)		8,19±0,48	
Lignina / (%)		33,80±0,37	
Lipídios / (%)		16,81±0,39	
Extrativos / (%)		36,39±0,97	
NTK / (%)		0,73±0,03	
Proteínas / (%)		4,58±0,20	
C/N		64,28	44,64
Fenóis totais / (%)		0,15±0,04	
Fenóis totais / (g L ⁻¹)			3,76±0,38
pH			5,30± 0,02
Balanço de massa / (%)		91,89±0,86	

¹ Sólidos totais; ² Sólidos totais voláteis; ³ Sólidos totais fixos ⁴ Demanda Química de Oxigênio (DQO_L para FL e DQO para B e FS).

As principais características físico-químicas do bagaço bruto (B) estão de acordo com o reportado por Rincón *et al.* (2013) e Cabrera *et al.* (2019), que encontraram valores médios de (244 – 254 g.kg⁻¹) ST e (228 – 229 g.kg⁻¹) SV. A caracterização da fração líquida (FL) também está em concordância com o que foi relatado na literatura por Azbar *et al.* (2008); Yarimtepe *et al.* (2017) e Gameiro *et al.* (2015), os quais obtiveram valores médios para a fração líquida de (56,33 – 62,20 g.kg⁻¹) ST, (39,85 – 62,00 g.kg⁻¹) SV, (50,30 - 110,4 mg.L⁻¹) DQO, e (4,80 – 5,32) pH.

A composição química da fração sólida (FS) está consoante com os valores relatados por Elalami *et al.* (2018) e Lammi *et al.* (2018), que utilizaram as mesmas metodologias do

presente estudo para caracterizar o bagaço de oliva. No entanto, algumas diferenças nos conteúdos de celulose, hemiceluloses e lignina foram observadas em comparação com Albuquerque *et al.* (2004) e Rincón *et al.* (2013), que relataram (19,36-19,62%) de celulose, (35,08-42,64%) de hemiceluloses e (42,60-74,33%) de lignina. É importante ressaltar que os autores utilizaram diferentes metodologias de caracterização. Além disso, as diferenças na composição química também estão relacionadas a condições geográficas e climáticas, variedade de azeitonas e estágio de maturidade do fruto (WANG *et al.*, 2004). De qualquer forma, o balanço de massa obtido no presente estudo foi de $91,89\% \pm 0,86$. Isso indica que a caracterização da biomassa foi realizada com êxito. Em contrapartida, o balanço de massa obtido no estudo de Rincón *et al.* (2013) foi de 136,59% considerando apenas hemiceluloses, lignina e celulose, evidenciando que as metodologias utilizadas pelos autores não foram adequadas para a caracterização da biomassa.

A fração sólida apresentou um baixo teor de carboidratos na forma de hemiceluloses e celulose em comparação com outras biomassas, como bagaço de cana, palha de arroz e casca de café (BITTENCOURT *et al.*, 2019; PARANHOS *et al.*, 2020). Além disso, a FS apresentou um alto teor de lignina e extrativos e a FL apresentou um alto teor de fenólicos. É importante conhecer a concentração de compostos recalcitrantes em substratos pré-tratados, pois esses compostos têm uma grande influência no desempenho da DA acidogênica (MONLAU, *et al.*, 2014; YARIMTEPE; OZ; INCE, 2017).

A quantidade de lipídios retidos no bagaço de oliva pode ser muito variável, sobretudo conforme o grau de maturação das azeitonas e o tipo de processo de extração empregado na produção do azeite. A caracterização evidenciou que o teor de lipídios se encontra dentro do intervalo observado na literatura, que reporta valores entre 3,76 - 18% (DERMECHE *et al.*, 2013). No entanto, o valor de aproximadamente 16% encontrado para a fração sólida do bagaço usado no presente trabalho é considerado alto para uma extração em duas fases. Sendo assim, uma das hipóteses é que esteja ocorrendo perdas de óleo durante o processo, indicando que o mesmo pode ser otimizado para maior recuperação de azeite.

6.2. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) teve como objetivo produzir substratos (B, FS e FL) com maior capacidade de acidificação em comparação ao bagaço bruto. Para isso, é importante definir as condições de processo que permitem uma solubilização eficaz dos

açúcares C5-C6 sem gerar compostos furânicos e fenólicos em concentrações que inibam a fermentação acidogênica. Além disso, a solubilização de DQO após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva também é um parâmetro importante que indica se a hidrólise térmica foi eficaz para solubilizar a matéria orgânica contida na biomassa (BAËTA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2004)

As condições experimentais para o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva bruto foram definidas pelo planejamento experimental Doehlert (DED), cuja matriz de experimentos é apresentada na Tabela 6. Os ensaios do ponto central foram realizados em cinco replicatas.

Tabela 6: Matriz de experimentos Doehlert utilizada para otimização do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva com as variáveis independentes decodificadas e as respostas avaliadas

Ensaio	<i>T</i> / (°C)	<i>t</i> / (min)	Fator severidade	Solubilização de DQO / (%)	(g C5-C6)/ (g compostos furânicos e fenólicos)	Compostos fenólicos / (%)
1	200	65	4,76	16,76±1,13	0,20±1,3x10 ⁻³	1,99±0,25
2	170	100	4,06	16,67±1,70	0,45±3,4x10 ⁻³	2,11±0,20
3	80	65	1,22	0,09±0,05	3,22±0,02	0,50±0,10
4	110	30	1,77	5,30±0,18	3,34±0,08	0,64±0,04
5	170	30	3,59	11,31±2,34	2,05±0,01	1,26±0,20
6	110	100	2,29	1,33±0,50	2,89±0,04	0,86±0,08
7	140	65	2,99	15,00±0,10	2,34±0,08	0,95±0,04
7	140	65	2,99	12,58±0,22	2,10±0,03	1,12±0,03
7	140	65	2,99	19,10±3,44	2,48±0,02	1,07±0,09
7	140	65	2,99	12,74±0,99	3,06±0,10	1,00±0,20
7	140	65	2,99	15,32±2,36	2,11±0,04	1,00±0,03

A análise de variância (ANOVA) para as três variáveis resposta avaliadas mostrou uma regressão significativa para os modelos quadráticos ajustados em função do erro puro a um nível de confiança de 95%, com valores de *p* inferiores a 0,05, coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,92 e valores de R^2_{adj} superiores a 0,84. Ademais, os modelos não apresentaram falta de ajuste aos dados experimentais (valor de $p > 0,05$). Nesse sentido, é possível inferir que os modelos quadráticos foram bons descritores matemáticos para os dados experimentais. Os coeficientes obtidos da análise de regressão dos modelos quadráticos aos dados experimentais, assim como os valores de R^2 , R^2_{adj} e $p_{regressão}$ e $p_{faltadeajuste}$ são apresentados na Tabela 7.

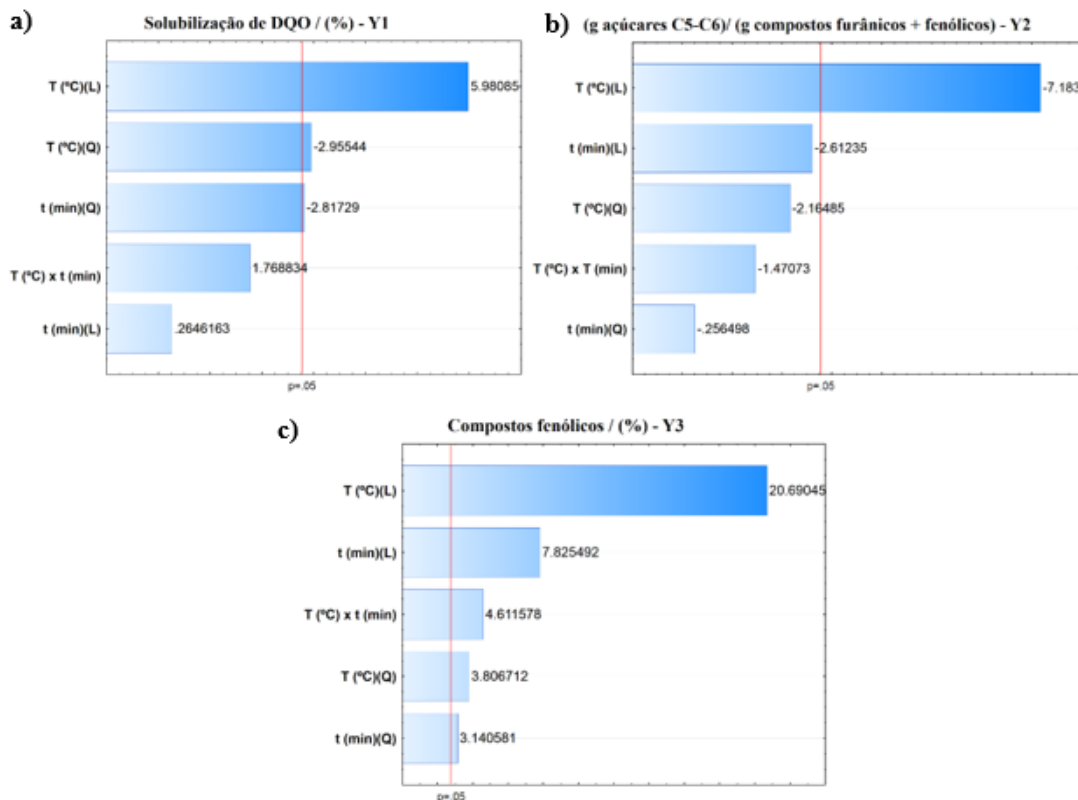
Tabela 7: Coeficientes de regressão para as variáveis dependentes avaliadas no planejamento experimental Doehlert

Coeficientes de regressão*	Solubilização de DQO / (%)	(g C5-C6 sugars)/ (g compostos fenólicos+furânicos)	Compostos fenólicos/ (%)
b_0	14,9489	2,4208	1,0301
b_1	9,1134	-1,6281	0,8094
b_{11}	-6,5260	-0,7110	0,2158
b_2	0,3492	-0,5128	0,2651
b_{22}	-4,6658	-0,0631	0,1335
b_{12}	4,6683	-0,5774	0,3125
R^2	0,9238	0,9349	0,9834
R^2_{adj}	0,8477	0,8698	0,9668
$p_{regressão}$	0,0082	0,0046	0,0008
$p_{faltadeajuste}$	0,4941	0,4857	0,0886

*Todos os modelos são escritos como: $y=b_0+b_1(T)+b_{11}(T^2)+b_2(t)+b_{22}(t^2)+b_{12}(T)(t)$

Os efeitos estatisticamente significativos das variáveis independentes T e t nas variáveis dependentes $Y1$, $Y2$, $Y3$ são apresentados no diagrama de Pareto de efeitos padronizados (Figura 11).

Figura 11: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis independentes temperatura (T) e tempo (t) e seus efeitos: (a) solubilização de DQO (Y_1 ,%), (b) razão de açúcares C5 mais C6 por inibidores (FF, HMF e compostos fenólicos) no hidrolisado (Y_2) e (c) compostos fenólicos no hidrolisado (Y_3)



A solubilização de DQO é um parâmetro de processo usado para avaliar a quantidade de matéria orgânica solúvel em relação à matéria orgânica total. A análise do gráfico de Pareto dos efeitos padronizados mostrou que o coeficiente de regressão linear da variável T e os termos quadráticos de T e t apresentaram efeito significativo na variável resposta solubilização de DQO (Y_1). Além disso, a variável T apresentou efeito de maior magnitude em relação a t , indicando que a temperatura apresenta maior influência na solubilização da matéria orgânica. A interação entre T e t (1,77) não teve efeito significativo na solubilização de DQO (Y_1).

O emprego da temperatura em níveis mais altos aumentou a solubilização da DQO; entretanto, como observado no gráfico de Pareto de efeitos padronizados, os termos quadráticos das variáveis temperatura (T^2) (-2,95) e tempo (t^2) (-2,81) apresentaram efeitos significativos negativos. Esse comportamento indica que, em níveis mais altos de temperatura e tempo, a solubilização da DQO pode diminuir, uma hipótese para tal redução é a polimerização dos furanos e fenóis, bem como a repolimerização da lignina em meio ácido sobre a superfície da biomassa (MEIGHAN et al., 2017). Dessa maneira, parte da DQO solubilizada provavelmente

foi repolimerizada na superfície da biomassa, reduzindo a quantidade de DQO solúvel nas condições de reação em que se empregavam níveis mais altos de temperatura e tempo.

Neste estudo, os experimentos multivariados resultaram em uma solubilização de DQO na faixa de 17 a 35% em base úmida ou de 0,1 a 19% em base seca, com o menor valor obtido no experimento 3 (80°C, 65 min) e o valor mais alto obtido no experimento 2 (170°C, 100 min). Esses resultados estão de acordo com os valores relatados por Rincón et al. (2013), que encontraram uma solubilização de DQO de 42% (em peso úmido) para o bagaço de oliva pré-tratado por auto-hidrólise a 120°C e 180°C por 180 min. A baixa solubilização de DQO observada após a o PTH do bagaço bruto pode estar relacionada ao alto teor de lignina desse resíduo que foi de 33,80% (Tabela 5) e, além disso, a outros compostos que normalmente não são hidrolisados e solubilizados nas condições de PTH estudadas no presente estudo. Vale ressaltar que o PTH é eficiente na hidrólise da fração de hemiceluloses e, dependendo das condições, pode levar à hidrólise da maior parte da celulose amorfa. Como pode ser visto na Tabela 5, a quantidade de holocelulose (celulose mais hemiceluloses) contida no bagaço bruto não excedeu 25%.

Para a variável resposta relação de açúcares C5-C6 por inibidores no hidrolisado (Y_2), a variável independente T foi a única que apresentou significância estatística, tendo efeito negativo (-7,18) em Y_2 . Isso sugere que o uso dessa variável no nível mais alto diminuiu o valor de Y_2 . A variável t também apresentou efeito negativo (-2,61) no valor de Y_2 . A relação entre a temperatura da reação e a razão (açúcares C5-C6 / inibidores) foi coerente do ponto de vista físico-químico, pois a constante de ionização da água (K_w) aumenta com o aumento da temperatura da reação. Isso resulta em um aumento na concentração de íons hidrônio no meio de reação, levando a um aumento na clivagem dos grupos substituintes quimicamente ligados a cadeias de hemicelulose, como grupos acetil e ácidos urônicos. O rompimento dessas ligações gera ácidos orgânicos que atuam como catalisadores das reações de hidrólise das hemiceluloses, levando à solubilização de mais açúcares C5-C6. No entanto, o acúmulo de pentoses e hexoses em meio ácido sobre altas temperaturas e longos períodos durante o PTH, torna esses açúcares mais suscetíveis à degradação em FF e HMF, respectivamente. Isso se deve ao deslocamento de equilíbrio relacionado às reações de desidratação para a formação desses inibidores (RUIZ et al., 2013; AHMAD; SILVA; VARESCHE, 2018).

Os resultados obtidos do PTH do bagaço de oliva bruto estão de acordo com os relatados por Baêta *et al.* (2016), que otimizou o PTH do bagaço de cana para produzir metano por DA. Nesse estudo, os autores avaliaram como variáveis resposta a massa de açúcares C5-C6 e

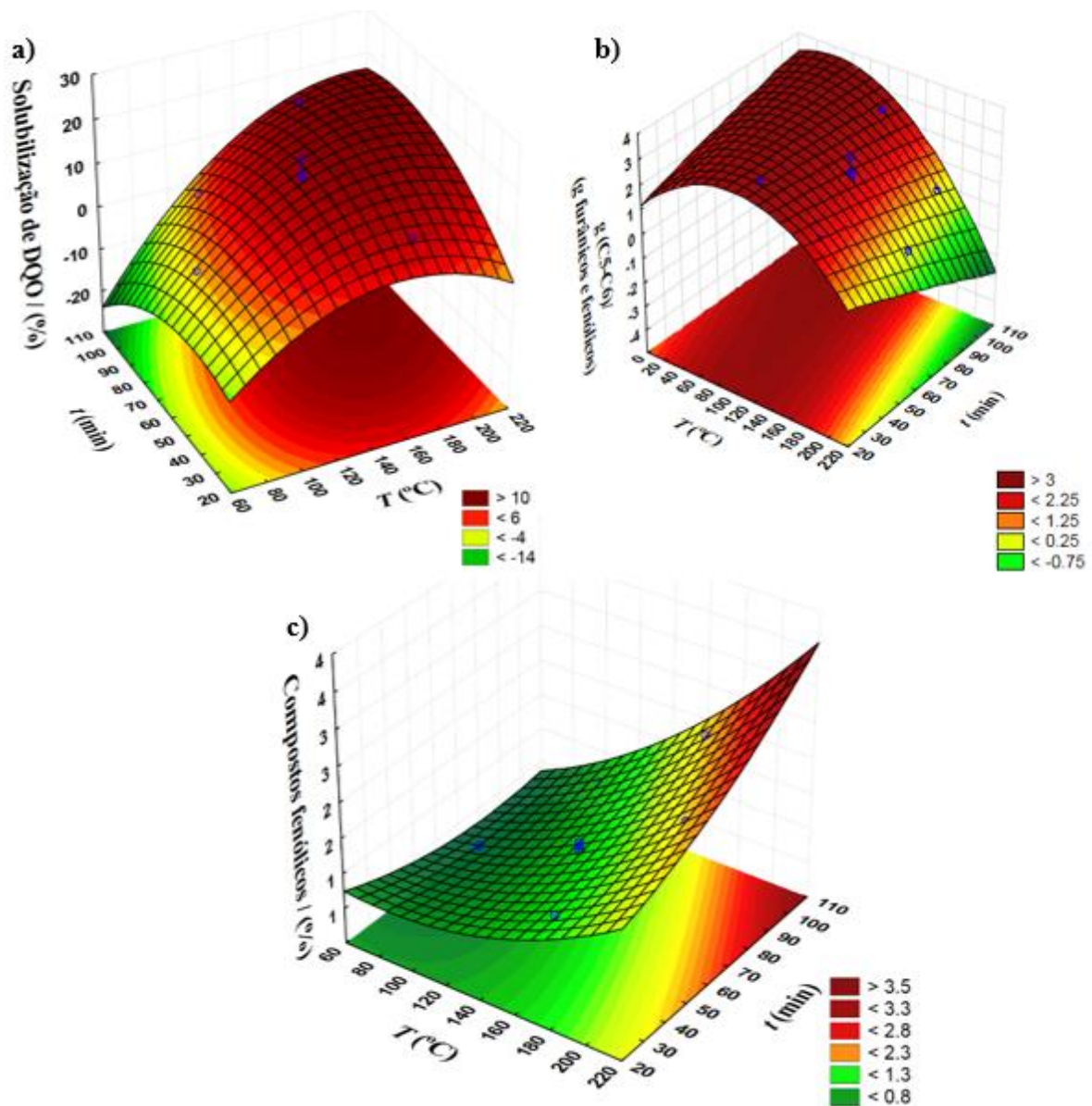
furanos no hidrolisado hemicelulósico e observaram que a quantidade de ambos os compostos aumentou quando a temperatura da reação foi aumentada. A mesma tendência também foi observada por Batista *et al.*, (2019), que avaliou o efeito da severidade do PTH da palha de cana e observou maior remoção de hemiceluloses da fração sólida e maiores quantidades de FF e HMF nos hidrolisados gerados sob condições mais severas de PTH.

Para a variável resposta compostos fenólicos no hidrolisado por massa de entrada de bagaço de oliva (Y_3), todas as variáveis independentes foram estatisticamente significativas, incluindo os termos T e t linear e quadrático e a interação (Txt). As variáveis independentes tiveram um efeito significativo positivo no valor de Y_3 , indicando que PTH mais severos estão relacionados com a maior geração de compostos fenólicos no hidrolisado. O termo T linear foi o termo que apresentou o maior efeito padronizado (20,69) em comparação aos outros termos ($t = 7,83$, $T \times t = 4,61$, $T^2 = 3,81$, $t^2 = 3,14$). A mesma influência da temperatura da reação na liberação de compostos fenólicos totais foi observada por Conde *et al.* (2009), que estudou o PTH das podas de oliveiras a 170, 190, 210 e 230°C por 10 min. Neste estudo, o PTH das podas de oliveira a 170°C produziu 1,46 g de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de biomassa, enquanto a 230°C produziu 2,29 g de GAE. Tais valores estão próximos dos observados no presente estudo que variou em uma faixa de 0,5 a 2,0%.

A caracterização da FS do bagaço de oliva mostrou que a biomassa apresenta alta quantidade de lignina (33,80%) e extrativos (36,39%). Portanto, espera-se que o hidrolisado gerado pelo PTH do bagaço bruto apresente uma alta concentração de compostos fenólicos a partir da solubilização dos extrativos e da despolimerização parcial da lignina. Além disso, a decomposição do complexo lignina-hemiceluloses também pode gerar ácido ferúlico (GULLÓN *et al.*, 2010). Segundo Rubio-Senent *et al.* (2012), o aumento da concentração de compostos fenólicos de baixa massa molar, como hidroxitiroso, tirosol e 3,4 - di- hidroxifenilglicol, pode ser explicado pela decomposição de moléculas complexas de alta massa molar, como oleuropeína, dimetiloleuropeína, verbascosídeo, entre outros.

As superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental Doehlert são apresentadas na Figura 12 (a-c). As curvas mostram como as variáveis independentes T e t influenciaram nas respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 . Para todas as respostas avaliadas, a variável T teve maior influência em comparação à variável t para o PTH do bagaço de oliva bruto. Esse comportamento também foi observado por Mesa *et al.* (2017), que avaliou a influência da temperatura da reação, tempo e concentração de ácido sulfúrico no pré-tratamento com ácido diluído da palha de cana-de-açúcar.

Figura 12: Superfícies de resposta geradas a partir de modelos quadráticos para (a) solubilização de DQO (Y_1), (b) razão de açúcares C5-C6 e inibidores no hidrolisado (Y_2) e (c) compostos fenólicos no hidrolisado (Y_3)



Dentro das faixas de temperatura e tempo avaliadas, a solubilização da DQO (%) apresentou um valor crítico ($18,98 \pm 5,46$) em 192°C e 81 min (Figura 12-a). No entanto, esse parâmetro não deve ser a única resposta avaliada para determinar a melhor condição de PTH para a produção de AGVs, uma vez que condições mais severas culminaram em maior geração de compostos inibitórios para o processo de DA.

Dessa maneira, a função algorítmica de desejabilidade global foi usada para gerar três condições de PTH que diferem entre si em termos da disponibilidade de açúcares e inibidores no hidrolisado. A ferramenta de desejabilidade transforma cada resposta do sistema em uma escala adimensional de desejabilidades individuais (d_i) que varia de 0 (para uma resposta não

desejável) a 1 (para a resposta desejada). As desejabilidades individuais tornam possível obter a desejabilidade global (D), definida como a média geométrica das desejabilidades individuais (d_i) (NOVAES et al., 2018). As principais características dos hidrolisados gerados pelas condições de pré-tratamento obtidas a partir da ferramenta de desejabilidade são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Composição química dos hidrolisados obtidos no PTH do bagaço de oliva utilizando as condições de desejabilidade (C1-C3)

	Valor de desejabilidade de entrada ^a			Condições de PTH			Composição do hidrolisado					
	Y1	Y2	Y3	S ₀ ^b	T / (°C)	t / (min)	Y1 / %	Y2 / g g ⁻¹	Y3 / %	HMF / g L ⁻¹	FF / g L ⁻¹	Fenóis / g L ⁻¹
C1	1,0	1,0	0,0	2,46	125±1	53	12,60±1,27	3,24±0.09	1,16±0.05	0,01±1,1×10 ⁻⁵	0,10±2,3×10 ⁻⁴	4,56±0,20
C2	1,0	0,5	0,5	3,59	161±1	62	17,41±2,15	1,87±0.00	1,34±0.26	0,28±2,4×10 ⁻³	0,19±1,2×10 ⁻³	6,34±1,39
C3	1,0	0,0	1,0	4,59	191±1	81	21,13±2,23	0,34±0.02	1,75±0.12	1,67±0.01	1,10±0.06	8,15±0,52

^a Níveis codificados: 0 – mínimo, 0.5 – médio e 1 – máximo.

^b FS: Fator severidade.

A análise da caracterização das frações sólidas geradas pelo PTH nas condições de desejabilidade confirma a hipótese de que condições severas promovem a repolimerização de fragmentos de lignina, haja vista que as condições C1, C2 e C3 apresentaram os seguintes percentuais mássicos (% m m⁻¹) de compostos fenólicos na fração sólida: (0,22±3,2×10⁻²; 0,32±0,04 e 1,19±0,14 %, respectivamente).

A condição de desejabilidade C1 representa o PTH de menor severidade e maior disponibilidade de açúcares C5-C6 em relação aos compostos tóxicos. Por outro lado, a condição de desejabilidade C2 apresenta um valor mediano para a variável Y2, mesmo que essa conjuntura possa gerar mais compostos recalcitrantes. Finalmente, a condição C3 corresponde a um cenário com a maior quantidade de HMF, FF e compostos fenólicos. Essa é uma condição de desejabilidade interessante para confirmar a influência negativa dos compostos tóxicos e recalcitrantes na DA acidogênica visando a produção de AGVs.

6.3. Testes de fermentação acidogênica

Os testes de DA acidogênica em fases líquida, sólida e semissólida das condições de desejabilidade (C1-C3) e do bagaço bruto foram encerrados quando a produção diária de hidrogênio foi menor que 5% do total acumulado, que aconteceu com 20 dias. As eficiências de acidificação (EA) e DQO_{AGV} obtidas ao fim dos ensaios são apresentadas na Tabela 9.

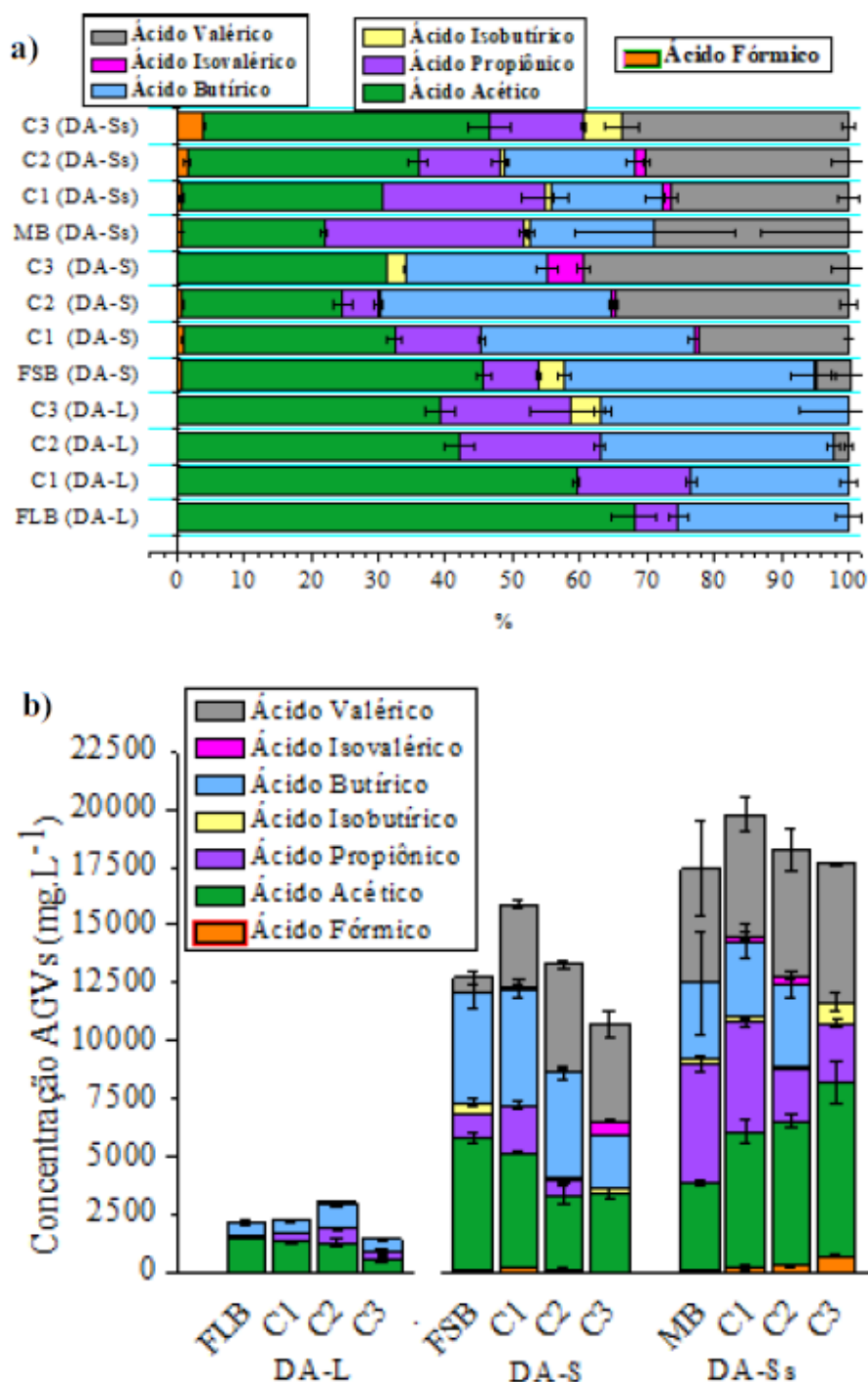
Tabela 9: Eficiência na acidificação e DQO_{AGV} presente na fase líquida no final dos testes acidogênicos para os sistemas de digestão anaeróbica avaliados

Sistema de digestão anaeróbia	Condição	EA / %	DQO _{AGV} / mg L ⁻¹
DA-L	Bruto	22,36±5,86	2718,55±241,24
	C1	56,72±4,80	2921,66±175,59
	C2	64,87±7,22	4304,51±384,94
	C3	17,26±5,96	2048,40±294,14
DA-S	Bruto	8,91±0,83	18527,34±1178,95
	C1	13,87±1,54	25103,62±1489,92
	C2	14,96±0,90	22477,41±1263,81
	C3	13,35±0,20	18064,71±1265,84
DA-Ss	Bruto	15,44±0,28	28231,11±801,89
	C1	20,20±2,33	31003,89±2883,47
	C2	22,04±2,58	28631,71±2871,22
	C3	19,60±0,62	25928,22±682,24

A DA-L apresentou maiores valores de EA em comparação com a DA-S e a DA-Ss. Isso pode estar relacionado às limitações de transferência de massa causadas pelo alto conteúdo de sólidos na DA-S e DA-Ss. Essa hipótese foi confirmada pelo sistema DA-Ss (sólido mais líquido), que apresentou valores mais altos de EA em comparação com DA-S, considerando o mesmo valor da razão A/M (YANG et al., 2015). Sendo assim, no presente estudo foi possível perceber que quanto menor a concentração de sólido no meio reacional maior é a EA durante a DA do bagaço de oliva. Independentemente dos valores mais baixos de EA, os sistemas DA-S e DA-Ss apresentaram maior concentração de AGVs em comparação com o sistema DA-L, conforme mostrado na Figura 13-b. Isso pode ser explicado considerando que, nos sistemas DA-S e DA-Ss, a proporção A/M, em termos de $\text{gDQO}_{\text{substrato}} \text{gSV}_{\text{inóculo}}^{-1}$, era cerca de seis e oito vezes maior que a do sistema DA-L, respectivamente. Portanto, mesmo com limitações de transferência de massa, há mais substrato disponível para os microrganismos nos sistemas DA-S e DA-Ss.

O perfil dos AGVs é muito relevante quando se pensa na produção biobaseada e recuperação desses produtos, uma vez que estão intimamente ligados às rotas metabólicas que predominaram em cada sistema e ainda quais tipos de ácidos seriam passíveis de recuperação considerando a sua disponibilidade e concentração. Nessa perspectiva, o perfil de produção dos ácidos e a concentração dos mesmos nos sistemas DA-L, DA-S e DA-Ss para todas as condições estudadas são apresentadas na Figura 13-a e Figura 13-b, respectivamente.

Figura 13: Perfil (a) e concentração de AGVs (b) gerados para a DA-L, DA-S e DA-Ss para as três condições de desejabilidade (C1-C3) de PTH estudadas



O perfil de produção de AGVs nos sistemas DA-S e DA-Ss foi mais diversificado em comparação ao sistema DA-L. Enquanto a DA-L levou à produção predominante de ácido acético, propiônico e butírico, a DA-S e o DA-Ss levaram à produção de ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. Esse aspecto é importante,

considerando que os preços dos ácidos graxos de cadeia mais longa são mais altos que os dos ácidos graxos de cadeia mais curta, conforme mostrado na Tabela 2 (ZACHAROF; LOVITT, 2013; ATASOY et al., 2018).

6.3.1. Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-L

As condições de desejabilidade C1 e C2 geraram hidrolisados (fração líquida) com valores de EA de 56,72 e 64,87%, respectivamente. Esses valores de EA foram os mais altos para todos os sistemas acidogênicos testados. Além disso, esses valores de EA mostraram que o PTH da fração líquida melhorou a produção de AGVs, pois o valor de EA para a fração líquida pré-tratada aumentou 34,36% para a condição de desejabilidade C1 e 42,51% para a condição de desejabilidade C2 em comparação com a fração líquida bruta.

A eficiência de acidificação máxima entre as condições de DA-L observada para C2 (65%) ficou muito próxima aos 68% alcançada por Yarimtepe *et al.* (2017), que estudou a acidificação da fração líquida do bagaço de oliva. O autor propôs uma etapa de pré-tratamento do resíduo por eletrocoagulação para remover a influência negativa dos compostos fenólicos na fermentação acidogênica. Considerando que os testes realizados no presente estudo aconteceram sob a influência dos compostos fenólicos, pode-se considerar que a eficiência alcançada para a C2 é um resultado expressivo. Além disso, o PTH é uma tecnologia mais fácil de ser implementada em um processo em larga escala em comparação ao processo de eletrocoagulação. Diante disso, é possível assumir que o PTH é promissor quando o objetivo é melhorar a produção de ácidos a partir da fração líquida do bagaço de oliva.

O maior valor de EA obtido a partir da condição de desejabilidade C2 mostrou que, embora essa condição tenha uma menor proporção de açúcares C5-C6 / inibidores (HMF, FF e fenólicos) no hidrolisado, a maior solubilização de DQO em comparação com a condição de desejabilidade C1 sugere que o cenário C2 favoreceu a solubilização da matéria orgânica, gerando outros compostos que poderiam ser facilmente degradados pelo consórcio de microrganismos, como os oligômeros de açúcar.

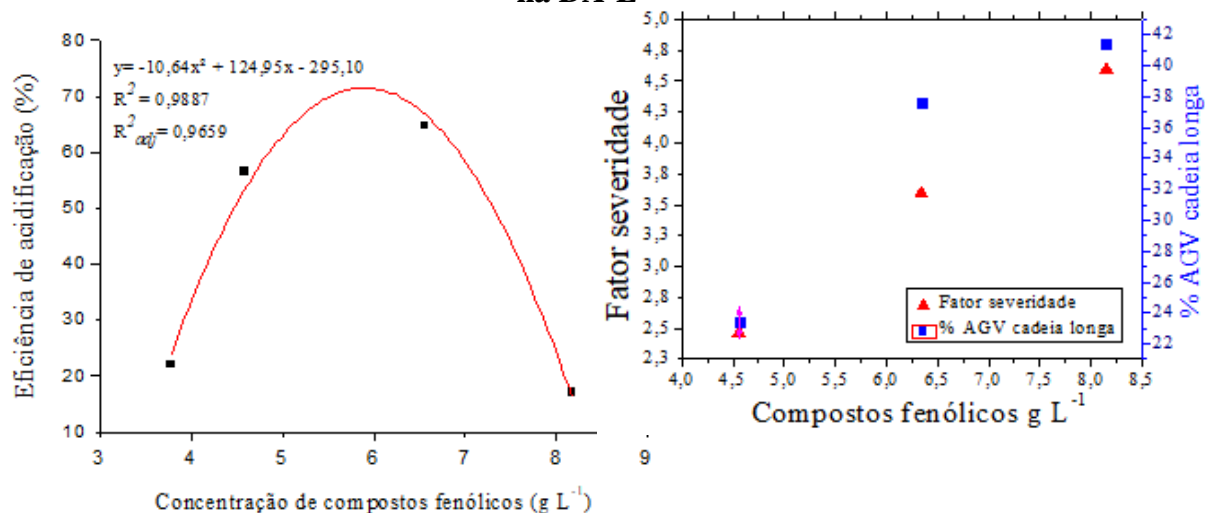
A condição C3 teve o menor valor de EA dentre todas as condições de desejabilidade testadas no sistema DA-L, sendo inclusive inferior à EA obtida a partir da fração líquida bruta. Nesta condição (C3), a proporção de açúcares C5-C6 para inibidores (HMF, FF e fenólicos) no hidrolisado foi a mais baixa dentre todas as condições de desejabilidade testadas no sistema de DA-L, com a concentração de compostos furânicos cerca de seis vezes maior em relação à condição de desejabilidade C2, como pode ser visto na Tabela 8. No processo de digestão

anaeróbia, a inibição de bactérias acidogênicas fermentativas usadas para a produção de biogás por alta concentração de compostos recalcitrantes, sobretudo fenóis, foi relatada na literatura (MONLAU et al., 2014). Logo, isso também foi confirmado no presente estudo para a produção de AGVs.

Os maiores valores de EA e DQO_{AGV} obtidos no sistema alimentado com a fração líquida gerada pela condição de desejabilidade C2 mostraram que HMF, FF e compostos fenólicos em concentrações de 0,28 g L⁻¹, 0,19 g L⁻¹ e 6,34 g L⁻¹, respectivamente, não demonstraram inibição expressiva para a conversão da matéria orgânica pelo consórcio de microrganismos. Entretanto, o valor de EA obtido a partir da condição de desejabilidade C3 indicou que uma concentração de HMF, FF e compostos fenólicos iguais ou superiores a 1,67 g L⁻¹, 1,10 g L⁻¹ e 8,15 g L⁻¹, respectivamente, causaram uma forte inibição das bactérias fermentativas acidogênicas.

A relação entre eficiência de acidificação e concentração de compostos fenólicos pode ser explicada por um modelo polinomial de segunda ordem. De acordo com a Figura 14-a, fica evidente que a eficiência de acidificação não é prejudicada até que a concentração de compostos fenólicos atinja 5,87 g L⁻¹ (ponto de máximo da curva com 71,74% de eficiência de acidificação), que marcou o início da toxicidade para o consórcio de microrganismos. De acordo com Yarimtepe *et al.* (2017), concentrações de fenóis inferiores a 5 g L⁻¹ não interferiram na acidificação dos efluentes líquidos gerados pela indústria de azeite. Contudo, o autor não deixa clara a relação entre compostos fenólicos e eficiência de acidificação, conforme fica claro no presente estudo. Portanto, há um avanço na literatura no sentido do esclarecimento dos efeitos dos compostos fenólicos na acidificação da fração líquida oriunda do bagaço de oliva.

Figura 14: a) Modelo gerado para relação da eficiência de acidificação com a concentração de compostos fenólicos na DA-L ; b) Correlação entre concentração de compostos fenólicos, fator severidade e percentual de ácidos de cadeia longa gerados na DA-L



Os perfis de produção de AGVs para todas as condições estudadas no sistema DA-L (Figura 13) mostraram que os ácidos acético, butírico e propiônico foram produzidos predominantemente, sendo o ácido acético produzido em maior quantidade seguido pelos ácidos butírico e propiônico. Alguns estudos avaliaram a acidogênese da fração líquida do bagaço de oliva e relataram o mesmo perfil de produção de AGVs com a mesma ordem de predominância dos ácidos orgânicos observados no presente estudo (BERTIN et al., 2010; FEZZANI; CHEIKH, 2010). Portanto, sugere-se que a fermentação acidogênica do substrato ocorreu preferencialmente pela via metabólica acetato-butirato-propionato (ZHOU et al., 2018)

O aumento na severidade do PTH resultou em uma alteração na concentração de ácidos orgânicos produzidos por bactérias fermentativas acidogênicas, como mostrado na Figura 13- b. Observou-se que a quantidade de ácido acético produzido pelas bactérias acidogênicas diminuiu no meio fermentativo quando foi utilizado como substrato hidrolisados obtidos em condições mais severas de pré-tratamento hidrotérmico. Um comportamento oposto foi observado para a quantidade de ácidos propiônico e butírico, uma vez que a concentração de tais ácidos orgânicos aumentou nos meios fermentativos em que se utilizou hidrolisado gerado em condições de maior severidade. Nessa perspectiva, fica evidente que os microrganismos mudaram sua via metabólica preferencial em resposta à adaptação às condições de estresse nas quais foram submetidos. (ZHOU et al., 2018).

O estresse microbiano pode estar relacionado ao aumento da concentração de compostos fenólicos no meio fermentativo. Para as condições de desejabilidade estudadas (Figura 14 -b), quanto maior o fator de severidade do PTH, maior a concentração de polifenóis nos hidrolisados e, conseqüentemente, maior a porcentagem de AGVs de cadeia longa (butírico, isobutírico,

valérico e isovalérico) produzidos. Além disso, a presença de compostos fenólicos no sistema DA-L mostrou maior influência nos valores de EA em comparação com os sistemas DA-S e DA-Ss. Na fase líquida, a diferença entre os valores mais altos e mais baixos de EA foi de 47,61%, enquanto nos sistemas DA-S e DA-Ss a diferença foi menor que 7%.

Uma segunda possibilidade de estresse do consórcio microbiano pode estar relacionada à concentração de ácido acético nos meios fermentativos, considerando que a condição mais severa de PTH gerou uma maior concentração de ácido acético no hidrolisado usado como substrato para a fermentação (C1 - $15,68 \pm 0,34$ C2 - $15,79 \pm 0,07$ C3 - $22,34 \pm 0,50$ g L⁻¹ de ácido acético). Além disso, considerando que os microrganismos metanogênicos acetoclásticos foram eliminados no tratamento térmico do inóculo, o ácido acético tende a se acumular. Portanto, a mudança na via metabólica preferida dos microrganismos acidogênicos pode ter ocorrido para minimizar o acúmulo de hidrogênio e garantir a reciclagem interna de espécies portadoras de elétrons, como o NAD. A conversão de propionato ($\Delta G^\circ = +76,1$ kJ mol⁻¹) e butirato ($\Delta G^\circ = +48,1$ kJ mol⁻¹) em acetato não é termodinamicamente favorável nas condições padrão e, por esse motivo, os AGVs de cadeia longa foram acumulados no meio fermentativo (AQUINO; CHERNICHARO, 2005b; SANTOS et al., 2018).

6.3.2. Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-S

A FS bruta e a FS pré-tratada obtida a partir da condição de desejabilidade C3 apresentaram os valores mais baixos de EA no sistema DA-S. Estas frações sólidas também exibiram os piores valores de EA entre todos os sistemas acidogênicos de DA testados para todos os tipos de substratos avaliados. Para a DA-S da FS bruta, o consórcio microbiano provavelmente teve dificuldade em acessar os componentes da biomassa devido à recalcitrância do complexo lignocelulósico do bagaço de oliva não pré-tratado.

Por outro lado, a condição desejável C3 levou a uma grande solubilização dos carboidratos da fração sólida para a fração líquida, permitindo a conversão das macromoléculas de carboidratos em açúcares monoméricos. Provavelmente, isso reduziu a quantidade de substrato considerado mais facilmente degradado pelos microrganismos na fração sólida. Além disso, a repolimerização da lignina com o aumento do número de ligações C-C na estrutura condensada na fase sólida sob condições mais severas de PTH, provavelmente teve um papel importante na acessibilidade da fração de carboidrato pelo coquetel enzimático produzido pelos microrganismos. Isso juntamente com a presença de compostos tóxicos aderidos à superfície

da fibra, como compostos fenólicos e furânicos, pareceu limitar ainda mais o acesso dos microrganismos ao substrato (LIMA et al., 2018).

Em comparação com a condição desejável C2, a condição de desejabilidade C1 de menor severidade apresentou maior DQO_{AGV} , o que pode estar relacionado a maior quantidade de matéria orgânica de fácil degradação na fração sólida remanescente ao PTH, haja vista que nesta condição observou-se uma menor solubilização da matéria orgânica e, conseqüentemente, à menor solubilização dos açúcares. Portanto, mais carboidratos estariam disponíveis na fração sólida para serem consumidos por microrganismos na condição de desejabilidade C1, resultando em maior acidificação.

Para o perfil de produção de AGVs no sistema DA-S, observou-se que o aumento da severidade da PTH está relacionado a uma maior produção de ácido valérico. Isso reforça a hipótese de que condições mais desfavoráveis ao consórcio de microrganismos, como a presença de compostos fenólicos e furânicos, causaram um distúrbio metabólico (ZHOU et al., 2018). Isso levou à produção de ácidos carboxílicos de cadeia longa, como também observado no sistema DA-L.

6.3.3. Comparação das condições de desejabilidade para o sistema DA-Ss

Para o sistema DA-Ss, os maiores valores de eficiência de acidificação e concentração dos AGVs obtidos em comparação com o sistema DA-S foram possivelmente associados à presença de fração líquida pré-tratada no sistema DA-Ss, uma vez que os açúcares e oligômeros monoméricos contidos no hidrolisado estão prontamente disponíveis para o consumo pelo consórcio de microrganismos. Além disso, a fração sólida pré-tratada presente na mistura pode ser usada como suporte para imobilização e substrato para o crescimento de microrganismos (HESSELTINE, 1987).

Uma clara mudança de rotas metabólicas com a severidade do PTH é notada quando se observa que quanto mais severo o pré-tratamento, maior o percentual de ácido fórmico (Figura 13). Além disso, a quantidade de ácido acético produzido no sistema de DA-Ss para as condições desejáveis C1, C2 e C3 (Figura 13) aumentou com o aumento da severidade do PTH, em contraste com o que foi observado no sistema DA-L e DA-S. Em relação ao ácido propiônico, observa-se uma redução em seu percentual quando são comparadas a biomassa bruta (30%) e a pasta gerada pela C1 (24%) em relação à pasta pré-tratada na C2 (12%) e C3 (14%). Uma outra questão interessante é que o ácido butírico deixou de ser produzido na C3, dando lugar ao ácido isobutírico, que não tinha sido detectado nas condições anteriores.

Na DA-Ss todas as condições de pré-tratamento apresentaram concentrações superiores à concentração de AGVs gerada a partir da pasta bruta, evidenciando que o PTH foi eficiente para melhorar o potencial de acidificação do substrato bruto. Além disso, nota-se que a concentração dos ácidos orgânicos diminuiu à medida que a severidade do PTH aumentou, de forma análoga à DA-S. Uma possível explicação para esse fato, além dos compostos inibidores presentes na fração sólida, é que ainda que a transferência de massa seja dificultada, o teor de sólidos na DA- S e DA-Ss é maior, tornando os compostos tóxicos mais concentrados no meio fermentativo. Além disso, conforme foi relatado, o maior teor de sólidos na DA está relacionado à uma menor EA.

A recuperação individual dos ácidos orgânicos em uma etapa posterior à fermentação é o objetivo dos processos industriais que visam a produção biobaseada dos AGVs, cujo preço varia de 600 a 4251\$/ton (Tabela 2). Diante dessa ampla faixa de preço e dos diferentes perfis e concentrações dos ácidos orgânicos gerados pelos sistemas de DA e condições de PTH estudadas, é necessário utilizar um parâmetro que permita comparar os cenários investigados. Nesse sentido, sugere-se considerar o possível valor de retorno que poderia ser gerado a partir dos ácidos produzidos em cada situação, considerando a massa de entrada da biomassa no PTH.

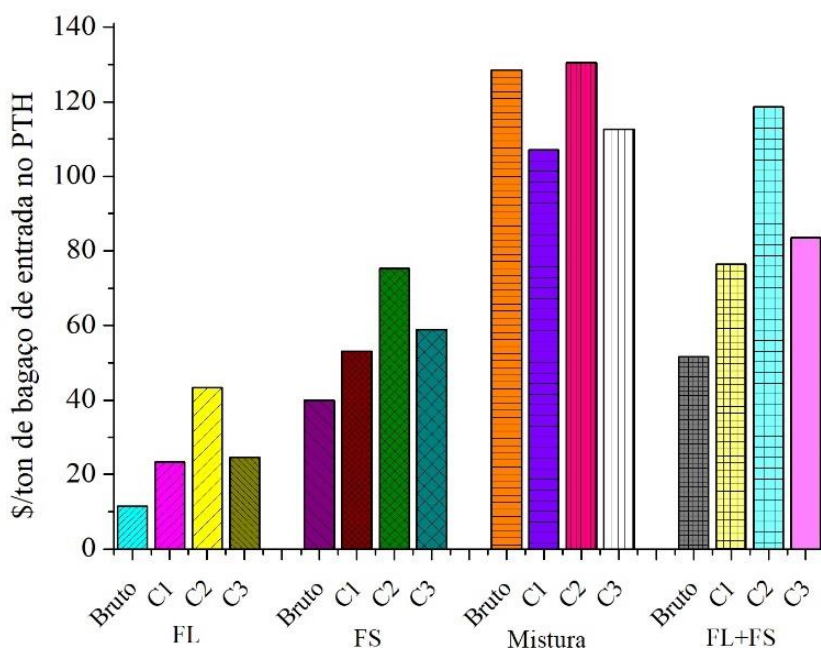
6.4. Viabilidade econômica da produção de AGVs a partir do bagaço de oliva

A partir dos dados obtidos no presente estudo, foi feita uma avaliação econômica simplificada para identificar quais dos processos avaliados poderiam ter maior potencial de agregar valor ao bagaço de oliva bruto, considerando uma economia circular de base biológica. A avaliação da rentabilidade potencial foi estimada (Figura 15) considerando-se a massa de AGV produzido por tonelada de substrato (FS, FL ou mistura; C1, C2 e C3) em cada sistema acidogênico de DA (DA-L, DA-S e DA-Ss) estudado, descontando a produção de AGVs do inóculo. Foi considerada uma recuperação de 100% dos AGVs produzidos em cada sistema acidogênico de DA avaliado e os preços dos AGVs (US \$ por tonelada de AGV) relatados por Calt (2015) e Zacharof; Lovitt, (2013) (ácido fórmico-US \$ 800.00 ácido acético-US \$ 600.00 ácido propiônico-US \$ 2,000.00 ácido isobutírico-US \$ 3,210.00 ácido butírico-US \$ 2,163.00 ácido isovalérico US \$ 3,363.00 ácido isovalérico-US \$ 3,387.00 ácido valérico-US \$ 4,251.00). Os cálculos de receita específica foram efetuados com base na massa de entrada de bagaço de oliva no pré-tratamento. Essa avaliação econômica negligenciou os custos envolvidos na operação de uma planta industrial e, portanto, teve como objetivo fornecer um parâmetro para avaliar de forma normalizada as condições estudadas.

A condição de desejabilidade C2 apresentou a maior receita potencial por tonelada de substrato entre todos os sistemas de DA acidogênica estudados. Essa condição também apresentou o maior valor de EA entre todos os sistemas de digestão anaeróbia avaliados. O melhor desempenho da condição desejável C2 em relação à receita potencial e a EA indicou que essa condição era a condição de PTH mais eficiente dentre todas as condições investigadas, confirmando que o PTH melhorou a biodigestibilidade do bagaço de oliva para a produção de AGVs de base biológica.

Conforme mostrado na Figura 15, as receitas específicas potenciais estimadas para os sistemas DA- L foram as mais baixas entre os três sistemas acidogênicos estudados, com exceção da condição de desejabilidade C2. No entanto, parâmetros de bioprocessos, como pH e razão A/M, devem ser investigados para melhorar o rendimento de acidificação, bem como a possível lucratividade econômica potencial da produção de AGVs da fração líquida.

Figura 15: Receitas específicas potenciais para os AGV produzidos nos sistemas DA-L, DA-S e DA- Ss avaliados, além da soma das receitas geradas pela fração líquida (FL) e fração sólida (FS) estudadas separadamente (FL+FS)



Por outro lado, para o sistema DA-S as condições desejáveis C2 e C3 foram as que apresentaram a maior receita potencial por tonelada de substrato (US \$ 75,33 e US \$ 58,96 respectivamente). Isso mostra que, embora as condições desejáveis C2 e C3 tivessem baixos valores de EA, o perfil de AGVs produzidos pelo sistema DA-S é economicamente interessante porque essas condições geraram uma quantidade maior de AGVs de cadeia longa por massa de substrato de entrada no PTH. A produção de ácido valérico teve uma contribuição importante

no potencial econômico para as condições desejáveis C2 e C3 aplicadas ao sistema DA-S, pois esse ácido possui o maior valor de mercado entre todos os AGVs avaliados neste estudo. O ácido valérico foi o ácido com a maior porcentagem entre os AGVs produzidos pelas condições desejáveis C2 e C3 aplicadas ao sistema DA-S em comparação com os outros cenários de DA acidogênica avaliados.

Além disso, a maior concentração de AGVs produzidos pelos sistemas DA-S e DA-Ss pode favorecer a recuperação de ácidos nos processos de separação, aumentando a viabilidade da aplicação desse tipo de alternativa para valorização do bagaço de oliva. Esses processos podem ter vantagens e desvantagens para cada sistema, como tempo de acidificação, preço dos ácidos produzidos, métodos utilizados para separação e purificação, entre outros.

As características físicas da fração sólida bruta (78,85% de umidade) e a eficiência de separação das frações sólidas e líquidas na prensa hidráulica limitaram o potencial financeiro máximo a ser alcançado pela soma das receitas geradas pela fração sólida e fração líquida separadamente. A prensa hidráulica usada para separar as frações sólida e líquida (hidrolisado) teve uma eficiência média de 78% para o bagaço de oliva pré-tratado por auto-hidrólise. Essa limitação foi levada em consideração no cálculo da lucratividade total por tonelada de bagaço de oliva, considerando a separação das frações sólida e líquida para a produção de AGVs (Figura 15).

Portanto, os resultados apresentados na Figura 15 indicam que a concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas frações sólida (DA-S) e líquida (DA-L) não era suficientemente alta para justificar a implantação de uma unidade de separação para processar essas frações separadamente, o que pode ser considerado uma vantagem do ponto de vista técnico e econômico. Nessa perspectiva, a condição que apresentou um maior potencial econômico foi a mistura do bagaço pré-tratado na condição 2 (161°C e 62 minutos).

6.4.1. Avaliação do uso da fração sólida para produção de AGVs e da fração líquida para a produção de metano

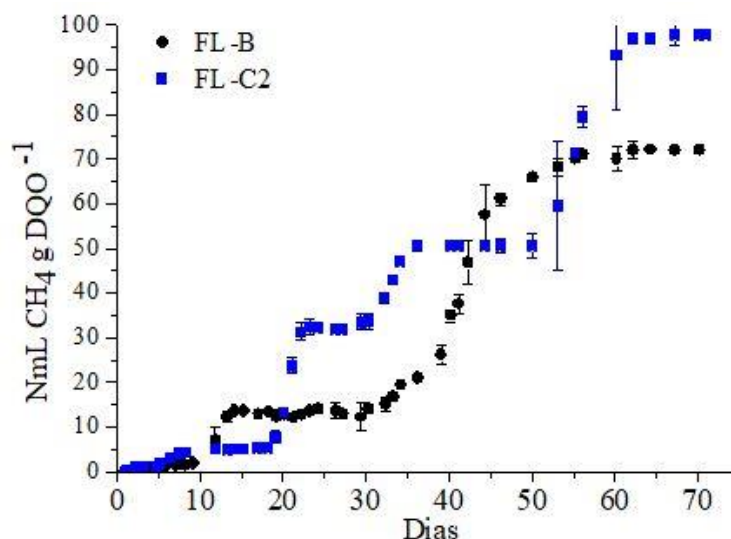
Ainda que a separação das frações sólida e líquida não tenha sido vantajosa num primeiro momento quando analisada apenas a produção de AGVs, ela pode ser avaliada para agregar mais valor ao processo, produzindo biogás ou recuperando compostos furânicos e fenólicos da fração líquida (SERRANO et al., 2017c; YARIMTEPE et al., 2017; CABRERA et al., 2019). Dessa forma, considerando o tipo e a concentração de ácidos carboxílicos produzidos nos sistemas DA-S e DA-Ss em comparação com o sistema DA-L, diferentes

processos podem ser projetados em uma biorrefinaria para a produção de AGVs de base biológica a partir do bagaço bruto. Na Figura 15, observa-se que o bagaço bruto apresentou uma boa receita potencial sem nenhum pré-tratamento. Isso ocorreu devido à maior quantidade de AGVs de cadeia longa produzidos, como os ácidos valérico, butírico e propiônico. Esses resultados mostraram como uma biomassa lignocelulósica complexa como o bagaço de oliva, com alto teor de compostos fenólicos, pode ser considerada uma boa opção para produzir ácidos com alto valor de mercado. Se o objetivo é usar a fração líquida para obter outros produtos, a fração sólida gerada pela condição desejável C2 apresentou a melhor receita potencial considerando a produção de AGVs.

Nessa perspectiva, o potencial bioquímico de metano das frações líquidas do material bruto e pré-tratado na condição C2 foi testado em condições previamente definidas na literatura (BUJALANCE *et al.*, 2013; FEZZANI; 2010). Esses testes foram executados a fim de avaliar se a separação das frações para a produção de metano a partir da fração líquida e ácidos graxos voláteis a partir da fração sólida seria uma rota tecnológica atrativa ou não.

Os resultados de PBM (Figura 16) demonstraram que as produções de metano a partir das frações líquidas foram muito baixas, mesmo após 70 dias de biodigestão (B=72 NmL CH₄ g DQO⁻¹, C2=98 NmL CH₄ g DQO⁻¹). A produção de metano a partir do hidrolisado hemicelulósico de outras biomassas pré-tratadas por auto-hidrólise levaram a produção de cerca de 267 NmL CH₄ g DQO⁻¹ (em S₀=4,57) para a cana-de-açúcar (ADARME *et al.*, 2019) e 130 NmL CH₄ g DQO_{alimentada}⁻¹ (em S₀=4,57) para a casca de café (SILVA, 2019), cuja composição química é mais recalcitrante que o bagaço de cana em função da presença de compostos complexos como a cafeína (SILVA, 2019).

Figura 16: Dados experimentais da produção bioquímica de metano a partir da fração líquida do bagaço bruto e da fração líquida gerado pelo bagaço de oliva pré-tratado a 161°C e 62 minutos (C2)



Acredita-se que a baixa produção de metano em relação a outras biomassas esteja relacionada, dentre outros fatores, a composição mais diversa e recalcitrante do bagaço de oliva em razão do elevado teor de extrativos, compostos fenólicos e lipídios. Nessa perspectiva, as curvas (Figura 16) de produção acumulada de metano sugerem que a hidrólise foi uma etapa limitante da metanogênese e os microrganismos tiveram dificuldade em degradar a matéria orgânica complexa. De qualquer forma, é possível observar que mesmo com baixas produções, o PTH em uma condição de severidade intermediária melhorou a biodigestibilidade do substrato, aumentando a produção de biometano em 26 NmL CH₄/g DQO em relação ao material bruto. Apesar das vantagens supracitadas, a demanda energética do PTH para elevar a temperatura do processo deve ser considerada na análise energética-econômica para ver se os ganhos em termos de produção de biogás pagam a energia consumida para elevar a temperatura aplicada ao PTH.

Além disso, é possível perceber a partir da Figura 16 que o processo para produção de biogás usando a FL da condição C2 possui mais patamares do que a FL bruta, apesar de possuir um maior potencial de produção de biogás. Uma possível explicação para os patamares decorre do fato que, em condições intermediárias de PTH (161°C e 62 min) parte da hemicelulose solubilizada durante o PTH encontra-se na sua forma oligomérica. Tais moléculas apesar de serem constituídas de carboidratos facilmente degradáveis pelos microrganismos anaeróbios, para serem consumidas pelo consórcio microbiano precisam ser hidrolisadas. Como as condições intermediárias de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica são conhecidas por gerarem maiores concentrações de oligômeros no meio (AHMAD;SILVA;VARESCHE, 2018),

o hidrolisado gerado pela condição C2 para ser convertido em metano precisou de passar por um processo de hidrólise mais complexo. Os patamares observados para FL-C2 podem ser classificados como o momento em que a concentração dos carboidratos monoméricos no meio reacional estava limitada e os microrganismos hidrolíticos precisaram de um tempo para hidrolisarem os oligômeros presentes no meio gerando os monômeros dos carboidratos. Ao gerar novamente os carboidratos, o processo é retomado na sua fase de produção e os açúcares voltam a ser convertidos em biogás. Resultados similares foram observados por outros autores que avaliaram a produção de biogás utilizando como substrato os hidrolisados hemicelulósicos obtidos por condições de PTH com severidades intermediárias do bagaço de cana-de-açúcar (BAËTA et al., 2016; LIMA et al., 2018; ADARME et al., 2019).

A produção de metano a partir da fração líquida do bagaço de oliva bruto reportada no presente estudo é inferior ao alcançado por outros autores, como Azbar e colaboradores (2008), que alcançaram 204 NmL CH₄/g DQO_{alimentada}. Ainda que se trate do mesmo substrato, as diferenças composicionais em termos de teor de lipídios e açúcares podem explicar as diferentes produtividades volumétricas do metano. Conforme discutido, o bagaço de oliva brasileiro apresenta um teor de lipídios maior e um teor de carboidratos menor quando comparado ao bagaço produzida na Europa. Além dos fatores geoclimáticos, as condições de processo (tempo de batadura, temperatura, dentre outras) que vem sendo empregadas nos lagares brasileiros, que têm pouco mais de dez anos, influenciam na composição do resíduo.

As baixas produções de biogás (CH₄) a partir da fração líquida do bagaço de oliva evidenciam como o substrato é resistente à biodegradação, reforçando que as rotas tecnológicas para a produção e recuperação de AGVs possam ser uma boa alternativa para agregar valor aos resíduos da indústria de azeite sob a ótica da economia circular biobaseada. Além disso, os resultados mostraram que a separação das frações sólida e líquida não era atrativa para a produção de metano a partir da fração líquida e AGVs a partir da fração sólida, reforçando que a mistura do bagaço de oliva pré-tratado na condição 2 (161°C e 62 minutos) ofereceu o melhor potencial econômico de retorno. Nesse contexto, um dos fatores que mais influenciam a produção de insumos de valor agregado a partir da digestão anaeróbia é a comunidade microbiana atuante no processo, que deve ser cuidadosamente analisada a fim de entender as condições nas quais os microrganismos possam trabalhar em capacidade plena para gerar os produtos de interesse.

6.5. Metagenômica

A metagenômica forneceu informações significativas a respeito da diversidade da comunidade microbiana nos reatores anaeróbios após os testes de fermentação em batelada, permitindo demonstrar o efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na seleção das espécies e nas possíveis rotas metabólicas que levaram a produção dos ácidos orgânicos. Nessa perspectiva, foram escolhidos os inóculos usados nas condições que utilizaram substratos da condição de pré-tratamento de baixa e alta severidade (1 e 3) na DA-L e DA-S, com intuito de verificar o efeito do pré-tratamento. Para a DA-Ss foi escolhida a condição de severidade intermediária (2), visto que dentre todas as condições estudadas foi aquela que apresentou a maior rentabilidade potencial considerando a quantidade e perfil de AGVs presentes ao final do ensaio.

A matriz do inóculo utilizado no presente estudo (esterco bovino + lodo UASB) demonstrou ter uma diversidade de microrganismos, sendo composta pelos filos *Firmicutes* (84,20%), *Euryarchaeota* (9,70%), *Actinobacteria* (3,27%) e *Proteobacteria* (2,81%). Dentro do filo *Firmicutes*, o gênero *Clostridium* foi o mais representativo (64,76%). Uma vez que o inóculo consiste em uma mistura 50% (g SV) de lodo anaeróbio e 50% (g SV) de esterco bovino fresco, é coerente que os *Clostridium* apareçam, considerando que elas fazem parte da microflora intestinal dos ruminantes (GIRIJA et al., 2013). Este táxon está envolvido na hidrólise de matéria orgânica complexa, graças à sua capacidade de produzir proteases, celulases, lipases e outras enzimas extracelulares que fornecem a capacidade de usar eficientemente os substratos disponíveis na digestão anaeróbia (KOCHOLATY; HOOGERHEIDE, 1937; GIRIJA et al., 2013).

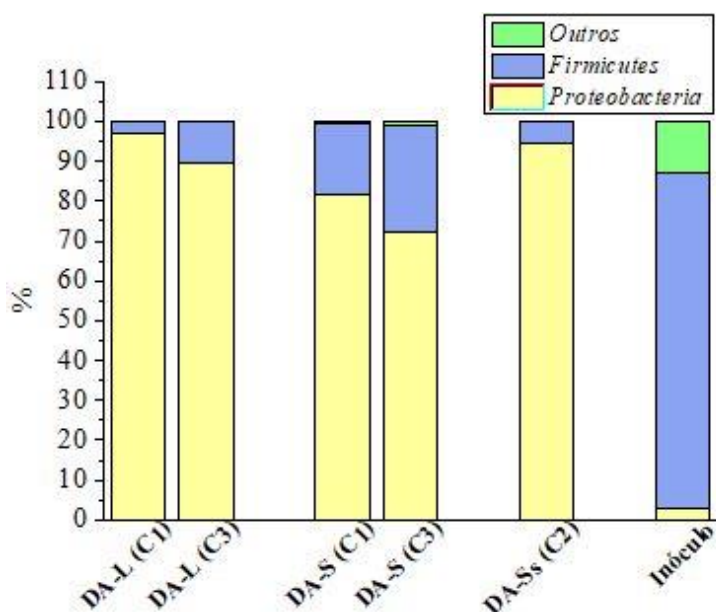
A análise dos reinos presentes nas amostras analisadas evidenciou que a eliminação das *archaeas* pelo pré-tratamento térmico do inóculo e pelas condições de operação (pH=5,5) foi alcançada. O maior percentual das *archaeas* nas amostras analisadas foi de 0,61%, enquanto na matriz do inóculo antes do pré-tratamento térmico o domínio correspondia a 9,70% da população. As *archeas* metanogênicas não são formadoras de esporos, e por isso a sua maioria é eliminada durante o pré-tratamento térmico do inóculo. Além disso, elas têm o crescimento ótimo em uma faixa de pH entre 6-8, sendo muito sensíveis a variações desse parâmetro. Em contrapartida, as bactérias acidogênicas têm uma maior tolerância a valores mais baixos de pH (CHERNICHARO, 2007).

Além das *archaeas*, o pré-tratamento térmico do inóculo associado a fermentação dos substratos oriundos do bagaço de oliva, que é uma biomassa recalcitrante e complexa, atuaram

na seleção natural dos microrganismos antes presentes na matriz do inóculo. Nessa perspectiva, algumas espécies de bactérias, tais quais *Bosea minatitlanensis*, *Bosea thioxidans*, *Enterococcus italicus*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mucans* e *Weissella paramesenteroides*, foram completamente eliminadas após o processo de digestão anaeróbia.

Os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* foram os mais representativos na fermentação acidogênica dos substratos oriundos do bagaço de oliva, representando 99% da comunidade microbiana em todas as condições, com as *Proteobacteria* aparecendo em maior proporção, conforme exposto na Figura 17. Iglesias-Iglesias *et al.* (2019), ao estudar a produção de AGVs a partir de lodo de esgoto, relatou que *Proteobacteria* (37%), *Bacteroidetes* (33%) e *Firmicutes* (25%) foram os filos mais abundantes na fermentação acidogênica do lodo de esgoto. O filo *Firmicutes* também foi de extrema relevância no trabalho de Greses; Tomás-Pejó e González-Fernández (2020), correspondendo a mais de 80% de abundância relativa no consórcio microbiano.

Figura 17: Abundância relativa dos filos mais representativos na fermentação acidogênica dos substratos oriundos do bagaço de oliva



A severidade do pré-tratamento hidrotérmico influenciou na proporção dos filos nos sistemas de DA-L e DA-S para as mesmas condições de PTH. Quando a condição de desejabilidade C1 é comparada à condição C3, percebe-se que há um aumento no percentual das *Firmicutes* em relação as *Proteobacteria* para ambos os sistemas de digestão anaeróbia (Figura 17). Conforme exposto na Tabela 8, os substratos oriundos da condição 3 de PTH apresentaram maior concentração de compostos tóxicos fenólicos e furânicos, que

provavelmente tiveram maior influência na sobrevivência das espécies do filo *Proteobacteria* em comparação com as espécies do filo *Firmicutes*.

De acordo com Monlau *et al.* (2014), o HMF e o FF podem inibir o crescimento celular, induzindo danos ao DNA e inibindo várias enzimas que participam da rota da glicólise dos microrganismos, em concentrações tóxicas que são específicas para cada espécie. Já os compostos fenólicos podem alterar seletivamente a permeabilidade da membrana das células microbianas, causando uma inativação de maquinários enzimáticos essenciais (ALMEIDA *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2009; MONLAU *et al.*, 2014).

A partir da Figura 17 é possível observar que a abundância relativa para os filós sempre alterou quando o sistema foi alimentado com um substrato da mesma condição de PTH, alterando somente o percentual de sólidos no sistema, tal fato, pode ser confirmado avaliando a mudança de perfil para condição C1 e C3 na DA-L e DA-S. Isto evidencia que a concentração de sólidos no meio reacional é um fator que exerce pressão sobre a seleção dos microrganismos durante a digestão anaeróbia acidogênica.

6.5.1. Análise microbiana na DA-L

Na DA-L, o filo *Proteobacteria* é representado por três diferentes classes taxonômicas: *Gammaproteobacteria* (C1-90,54%; C3-76,64%), *Betaproteobacterias* (C1-5,02%; C3-8,22%) e *Alphaproteobacteria* (C1-1,02%; C3-5,01%). As *Gammaproteobacteria* têm a habilidade de degradar a matéria orgânica em condições ambientais de limitação nutricional e na presença de xenobióticos (NWODO *et al.*, 2019), enquanto as *Betaproteobacteria* realizam a degradação de substratos ricos em proteínas (Wu *et al.*, 2015).

No que tange ao filo *Firmicutes* durante a DA-L, a família *Clostridiaceae* foi a principal representante. Ao nível de espécies, um aspecto que chama atenção é a diminuição da representatividade das espécies *Clostridium disporicum* (14,00%) e *Clostridium butyricum* (10,19%) presentes nas amostras pós-fermentação (<4,17% e <0,34%, respectivamente). Uma vez que essa é uma espécie presente na matriz do inóculo e produz endósporos, ela é resistente ao pré-tratamento térmico. Logo, as condições do bioprocessamento foram responsáveis pela diminuição da representatividade da *Clostridium butyricum* no sistema.

Os efeitos inibitórios dos compostos furânicos (HMF) e fenólicos (vanilina e siringaldeído) na fermentação escura (“dark fermentation”) da glicose a partir de cepas isoladas de *Clostridium butyricum* foram avaliados por Lin *et al.* (2015). Nesse estudo, os autores reportaram inibição total na produção de hidrogênio em concentrações de compostos fenólicos

superiores a $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Nesse sentido, acredita-se que a alta concentração de compostos fenólicos encontradas nos substratos oriundos do bagaço de oliva, que é uma biomassa de elevada complexidade, tenham influenciado na redução da presença da espécie *Clostridium butyricum*.

Dentro do nível taxonômico *Gammaproteobacteria*, que teve maior participação no processo de DA-L, o gênero *Enterobacter* foi o mais representativo (84,76% (C1) e 53,84% (C3) de participação). De acordo com Zhang; Lv; Xing, (2011), o gênero *Enterobacter* tem se destacado para aplicação em fermentação escura devido à algumas vantagens, tais quais elevada taxa de crescimento, facilidade de cultivo e ampla utilização de substratos. Além disso, o fato de ser uma anaeróbia facultativa torna sua manipulação mais fácil em relação aos anaeróbios estritos (ZHANG; LV; XING, 2011).

As duas espécies de bactérias dominantes do gênero *Enterobacter* são: *Enterobacter cloacae* (73,37% (C1) e 34,97% (C3)) e *Enterobacter hormaechei* (10,97% (C1) e 18,52% (C3)). As *Enterobacter cloacae* são bactérias gram-negativas, ou seja, contêm duas membranas celulares. Este organismo é anaeróbio facultativo, que excreta enzimas como a β -frutofuranosidase e a aldose-1-epimerase, presente no metabolismo de glicose, galactose, amido e sucrose. Além disso, a bactéria produz a enzima beta-lactamase, que apresenta importante ação de resistência a antibióticos. Por isso, a *Enterobacter cloacae* é apontada como uma bactéria oportunista de importância clínica, que se destaca como agente patógeno causador de infecções hospitalares (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015). Por ter característica tão resistente ela se apresentou de forma predominante nos sistemas alimentados com substratos complexos como os gerados pelo PTH do bagaço de oliva.

A *Enterobacter hormaechei* foi agrupada na família *Enterobacter* em 1989. Nos últimos trinta anos, essa espécie foi responsável pela infecção nosocomial em pacientes adultos e em crianças internadas em unidades neonatal no Brasil, Estados Unidos e Marrocos (O'HARA et al., 1989; TOWNSEND et al., 2008). Assim como a *Enterobacter cloacae*, a *Enterobacter hormaechei* também é produtora da enzima beta-lactamase e de outras enzimas que tornam possível a produção de ácidos orgânicos a partir de D-glicose, L-arabinose, celobiose, D-galactose, maltose, D-manitol, D-manose, L-ramnose, sacarose e D-xilose (O'HARA et al., 1989). Dentre as enzimas produzidas pela *Enterobacter hormaechei* envolvidas na produção dos AGVs a partir dos açúcares, destacam-se a α -glicosidase, β -glicosidase e α -amilase.

O fato das *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei* terem sido as espécies dominantes da DA-L chama a atenção por essas espécies não estarem presentes na matriz do

inóculo utilizado. Nesse sentido, elas advêm da comunidade autóctone presente na fração líquida do bagaço de oliva. Como essas bactérias são termotolerantes, elas não foram removidas durante o PTH da biomassa. De fato, os estudos de Ntougias; Bourtzis e Tsiamis (2013) mostram que a *Enterobacter cloacae* está presente na fração líquida do bagaço de oliva bruto. Inclusive, espécies da família *Enterobacteriaceae* foram isoladas da fração líquida do bagaço de oliva para a produção de etanol a partir da fermentação da glicose, conforme o estudo de Asli *et al.*, (2002).

Em um outro estudo que vislumbrava a produção de hidrogênio a partir de glicose, a *Enterobacter cloacae* foi isolada de um lodo granular de um reator UASB que tratava as águas residuais de uma cervejaria. Os resultados demonstraram que foram produzidos 0,8 mol H₂ / mol_{glicose}, sendo os principais metabólitos líquidos ácido acético (367 mg L⁻¹), metanol (437 mg L⁻¹) e etanol (1101,26 mg L⁻¹), após 9 h de fermentação. Logo, as cepas isoladas mostraram-se eficientes para a produção de hidrogênio em condições mesofílicas. (MAINTINGUER *et al.*, 2017).

No que se refere à produção de ácidos orgânicos biobaseados, algumas enzimas produzidas pela *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei* são apresentadas na Tabela 10. Os dados apresentados foram encontrados por meio da plataforma KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), que é tradicionalmente aplicada em análises investigativas de rotas metabólicas e características genéticas dos seres vivos (PARANHOS *et al.*, 2020).

Tabela 10: Algumas enzimas produzidas pelas espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei* envolvidas em rotas metabólicas relacionadas à produção de ácidos orgânicos

Rota metabólica	Espécie	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>
Amido e sucrose	β -frutofuranosidase α -glicosidase β -glicosidase α -amilase maltose-6'-fosfato glicosidase	β -glicosidase 6-fosfo- β -glicosidase maltooligosileralose trealohidrolase amido-sintase 1-4, α -glicana
Glicólise	glicose-1-fosfatase-glicoquinase 6-fosfo- β -glicosidase glicose-6-fosfato isomerase frutose-bifosfato-aldolase fosfoglicomutase	glicose-1-fosfatase fosfenolpiruvato carboxiquinase acil-CoA sintetase frutose-1,6-bifosfatase fosfogliceratoquinase
Pentoses fosfato	quinoproteína glicose desidrogenase glicanaquinase riboquinase ribulose-fosfato 3-epimerase fosfopentomutase	glicose-6-fosfato isomerase glicose-6-fosfato-1dehidrogenase 6-fosfoglicanalactonase ribulose-fosfato-3-epimerase transaldolase
Açúcar amino e açúcar nucleotídeo	1,4- β -xilosidade quitinase galactoquinase glicose-1-fosfatoadenililtransferase frutoquinase	1,4- β -xilosidade quitinase acetilglicosamina 2epimerase manose 4,6-dehidratase acetilmuramato dehidrogenase
Propanoato	enoil-CoA hidratase 2,3-dehidroadipil-CoA hidratase α -acetil-CoA carboxilase carboxil transferase acetatoquinase fosfatoacetiltransferase formato C-acetiltransferase dihidrolipoamide dehidrogenase	enoil-CoA hidratase acrilil-CoA redutase (NADPH) acetil-CoA sintetase α -acetil-CoA carboxilase carboxil transferase β -succinil-CoA sintetase
Biossíntese de AGVs a partir de lipídios	α -acetil-CoA carboxilase carboxil transferase acil-CoA sintetase de cadeia longa malonil CoA-ACP transacilase enoil-redutase S-manolil transferase	α -acetil-CoA carboxilase malonil CoA-ACP transacilase 3-oxoacil-ACP sintase 6-fosfogliconato dehidrogenase 3-hydroxiacil-dehidratase

De acordo com a Tabela 10, as cepas de bactérias dominantes na DA-L são capazes de excretar diversas enzimas que participam de rotas metabólicas diretas ou indiretas que levam a produção de AGVs a partir de carboidratos. Considerando o perfil gerado (acético, propiônico e butírico) sugere-se que os polissacarídeos presentes no hidrolisado foram quebrados em monossacarídeos, que foram depois convertidos em piruvato para finalmente formar ácido acético, propiônico, butírico, H₂ e CO₂, bem como pequenas moléculas orgânicas com a participação de acetil-CoA (YUAN et al., 2019). Ademais, foi observado que os microrganismos produzem enzimas capazes de produzir outros ácidos de cadeia longa que não foram quantificados no presente estudo, tais como os ácidos succínico (C₄H₆O₄), fumárico (C₄H₄O₄), cítrico (C₆H₈O₇) e palmítico (C₁₆H₃₂O₂). Nesse sentido, infere-se que a capacidade de acidificação do substrato possa ser ainda maior do que o foi reportado.

6.5.2. Análise microbiana da DA-S

Embora os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* tenham sido dominantes tanto na DA-L quanto na DA-S, o perfil das classes dominantes alteraram entre os sistemas de digestão anaeróbia. Nessa perspectiva, a DA-S contou com uma maior representatividade da classe *Clostridia* (17,86%-C1 e 26,14%-C3), que continuaram a dominar o filo *Firmicutes*. A mudança na microbiota entre as tipologias de digestão anaeróbia também foi observada por Yi et al. (2014), que estudou o perfil microbiano na digestão anaeróbia de resíduos alimentares em diferentes porcentagens de sólidos totais (5, 15 e 20%). Os pesquisadores perceberam mudanças significativas na microbiota com o aumento de sólidos totais, com destaque para o decréscimo do filo *Chloroflexi*.

As *Betaproteobacteria* fazem parte da população autóctone do bagaço de oliva sendo algumas espécies capazes de degradar compostos fenólicos e outros poluentes, como tolueno, benzoato e clorocatecol por exemplo (SUVOROVA; GELFAND, 2019). O percentual de *Betaproteobacteria* entre as condições de desejabilidade C1 e C3 na DA-S não se alterou, provavelmente devido a essa capacidade de adaptação em meios fermentativos contendo elevados teores de compostos fenólicos.

Dentre as classes dominantes na DA-S, o gênero *Clostridium* (14,57%-C1 e 21,11%-C3) da classe *Clostridia* apresentou grande diversidade em relação as espécies, considerando que 25 cepas foram encontradas, com destaque para a participação da *Clostridium ruminantium* e *Clostridium perfringens*. Algumas enzimas produzidas pelo gênero *Clostridium* que são

importantes nas rotas tecnológicas que levam a produção dos AGVs são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11: Algumas enzimas produzidas pelo gênero *Clostridium* envolvidas em rotas metabólicas relacionadas à produção de ácidos orgânicos

Gênero: <i>Clostridium</i>		
Rota metabólica	Metabolismo amido e sucrose	Metabolismo glicólise
Enzimas	β -glicosidase frutoquinase 6-fosfo- β -glicosidase fosfoglicomutase 6-fosfobeta-glicosidase	L-lactato desidrogenase piruvatoquinase alcooldesidrogenase glicose-6-fosfato isomerase
Rota metabólica	Metabolismo pentoses fosfato	Açúcar amino e açúcar nucleotídeo
Enzimas	fosfopentomutase transquetolase ribose 5-fosfato- isomerase transaldolase ribulose-fosfato3-epimerase	L-fucose sintase α -L-arabinofuranosidase manose 4,6-dehidratase β -acetilhexosaminidase manose-6-fosfato-isomerase
Rota metabólica	Metabolismo propanoato	Metabolismo de formação de AGVs a partir de lipídios
Enzimas	acetil-CoA sintetase C-acetiltransferase metilglioal sintase gliceroldesidrogenase L-lactato desidrogenase	acil-CoA sintetase de cadeia longa manoiltransferase 3-oxoacil-ACP sintase-II 3-oxoacil-ACP sintase-III enoilreductase

De acordo com a Tabela 11, as bactérias do gênero *Clostridium* são importantes na fermentação acidogênica de materiais lignocelulósicos, considerando que possuem enzimas capazes de hidrolisar fontes diversas de carbono: polissacarídeos como amido e xilanas, oligossacarídeos como sacarose e lactose e monossacarídeos como glicose e xilose. Ademais, esses microrganismos são capazes de produzir diversas enzimas envolvidas em rotas metabólicas acidogênicas, podendo produzir ácido acético e propiônico pela rota propiônica por exemplo. Nesse interim, muitos estudos reportam as *Clostridium* como grupo representativo em sistemas hidrolíticos-acidogênicos (CHEN et al., 2007, 2017; LIU et al., 2012).

6.5.3. Análise microbiana da DA-Ss

O perfil microbiano presente na DA-Ss (C2) em termos de espécie é muito semelhante ao observado na DA-L de C3, com predominância do gênero *Enterobacter* (60,59%), que é representado majoritariamente pelas espécies *Enterobacter cloacae* (38,64%) e *Enterobacter hormaechei* (21,43%). Em relação à DA-L de C3, percebe-se que o gênero *Enterobacter* aumentou a sua representatividade, que antes era de 53,84% da população, com predominância das *Enterobacter cloacae* (34,97%) e *Enterobacter hormaechei* (18,52%).

A literatura reporta que algumas cepas de bactérias do gênero *Enterobacter* tem sido isoladas para a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis a partir de substratos como a vinhaça (PAESI, 2020). Alguns autores inclusive apontam que a combinação de bactérias estritamente anaeróbias como as do *Clostridium* à anaeróbias facultativas como as do gênero *Enterobacter* e *Bacillus* melhoraram a produção de hidrogênio e AGVs (CHANG et al., 2008; CHOU et al., 2011; WAINAINA et al., 2019).

Além das *Enterobacter*, algumas espécies de bactérias apareceram em menor proporção (<2%). Dentre elas estão a *Sarcina ventriculi*, que tem habilidade de crescer em ambientes com pH extremamente ácido (<1) (CANALE-PAROLA, 1970); a *Enterobacter ludwigii*, que é uma bactéria fermentativa oportunista de importância clínica (HOFFMANN et al., 2005), e a *Klebsiella oxytoca*, que é encontrada nas mucosas de mamífero e causa infecções nosocomiais graves, tais como pneumonia e infecções primárias da corrente sanguínea (SINGH; CARIAPPA; KAUR, 2016).

Ainda que as *Enterobacter* tenham sido o gênero dominante da DA-Ss, assim como as condições C1 e C3 da DA-L, o sistema de digestão anaeróbia e o substrato foram determinantes para o perfil dos AGVs gerados e para a melhor rentabilidade econômica apresentada para a DA-Ss. A condição DA-Ss / C2 caracterizou-se pelo maior percentual de ácidos de cadeia longa, sobretudo ácido valérico. O teor de sólidos totais exerce um papel importante nas rotas metabólicas, considerando que a solvência é um parâmetro essencial na transferência de massa dos substratos, intensificando também a toxicidade dos compostos fenólicos, cuja disponibilidade é facilitada na DA-L (MOTTE et al., 2013).

O consórcio microbiano é um dos fatores que influencia a produção de ácidos graxos voláteis por digestão anaeróbia. Entretanto, a concentração e o perfil dos AGVs produzidos estão intimamente ligados a outros parâmetros de processo que afetam a concentração e o perfil gerado. Dentre esses fatores, destacam-se o pH e a relação A / M, que podem ser otimizados para gerar maiores produções de AGVs (STRAZZERA et al., 2018; ATASOY et al., 2019).

6.6.Otimização das condições do bioprocesso para a produção de ácidos orgânicos considerando uma DA-Ss

A otimização das variáveis independentes pH e relação A/M na fermentação acidogênica do bagaço de oliva (PTH: 162°C; 62 min) em estado semissólido (12 % ST) teve o objetivo de compreender os efeitos desses parâmetros no processo a fim de gerar condições com o melhor potencial para a geração de AGVs. Portanto, foram avaliadas as seguintes variáveis dependentes: concentração total de AGVs (Y_4) e percentual de ácido de cadeia longa (isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (%)) (Y_5), a escolha da última variável deve-se ao maior valor de mercado dos ácidos acima de 3C, conforme visto na Tabela 2.

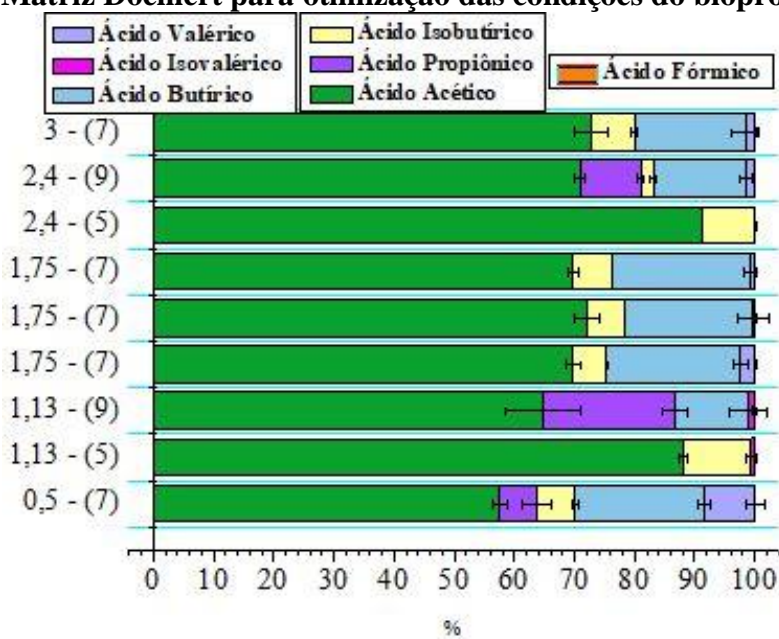
Os ensaios foram delineados por um planejamento Doehlert (DED), cuja matriz de experimentos é apresentada na Tabela 12. Os ensaios no ponto central foram realizados em triplicata. Uma vez que a variável pH foi investigada, os ensaios de otimização dos parâmetros do bioprocesso, diferente dos primeiros ensaios de acidificação discutidos no item 6.3, contaram com a adição de uma solução de bicarbonato de sódio de forma que a concentração de NaHCO_3 nos reatores fosse $2,5\text{g L}^{-1}$ (IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2019). A adição da solução tampão ocorreu com o intuito de se evitar variações bruscas no pH do meio.

Os testes foram finalizados após 15 dias de fermentação (5 dias a menos que os ensaios anteriores), quando a produção de hidrogênio nas condições de pH 7 e 9 já tinha se estabilizado, mas a produção de hidrogênio nas condições de pH 5 ainda eram observadas. Com intuito de manter um critério para facilitar a comparação entre as condições experimentais, optou-se por finalizar o teste em pH 5 no mesmo tempo das condições de pH 7 e 9, uma vez que as condições que produzem AGVs em maiores concentrações e em menores tempos de contato são preferíveis. Sendo assim, todos os testes foram interrompidos ao mesmo tempo para evitar uma subestimativa da produção de AGVs. O perfil dos AGVs gerados em cada condição experimental estudada no Planejamento Experimental Doehlert está representado na Figura 18.

Tabela 12: Matriz de experimentos Doehlert utilizada para otimização da fermentação acidogênica do bagaço de oliva pré-tratado a 161°C e 62 minutos com as variáveis independentes decodificadas e as respostas avaliadas.

Ensaio	A/M	pH	Concentração total de AGVs mg L ⁻¹	Ácido de cadeia longa (%)
1	3	7	8543,52	27,2355
2	2,4	9	11302,27	19,004
3	0,5	7	5228,63	36,4028
4	1,13	5	3623,56	11,8589
5	2,4	5	5527,89	8,7815
6	1,13	9	8816,38	13,3594
7	1,75	7	7605,27	30,2569
8	1,75	7	6517,65	27,9936
9	1,75	7	7880,88	30,2319

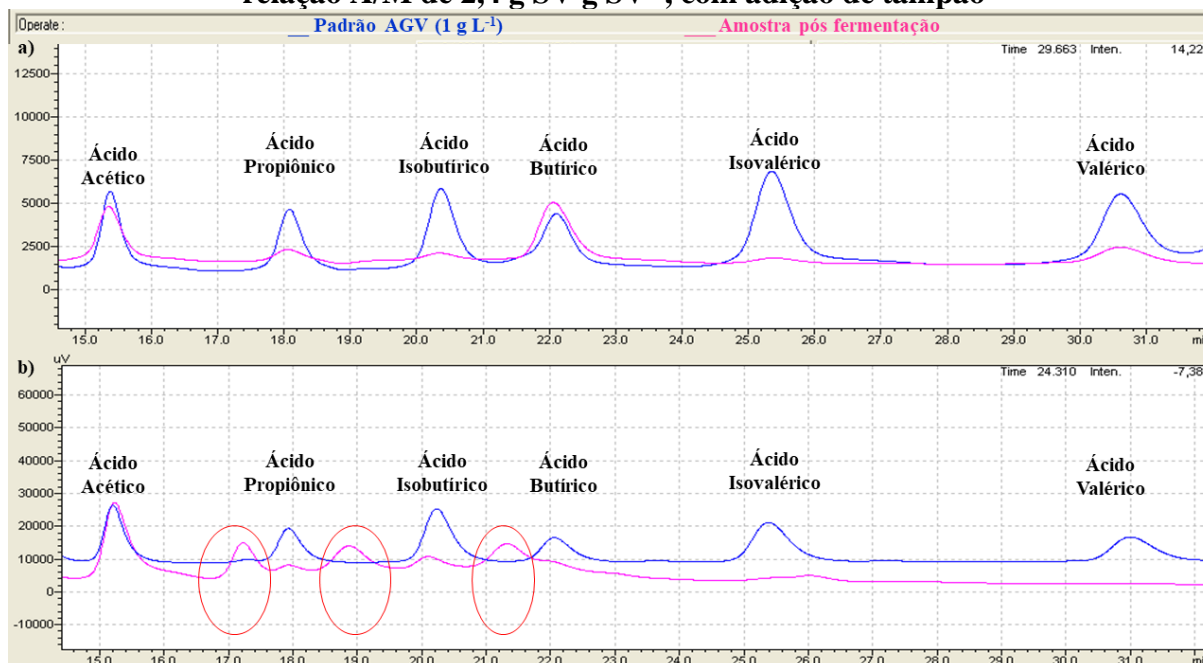
Figura 18: Perfil dos AGVs gerados em todas as condições experimentais apresentadas na Matriz Doehlert para otimização das condições do bioprocesso



Os diferentes percentuais de ácido valérico e butírico em condições de processo muito parecidas para os testes encerrados em 20 dias (A/M=2 e pH 5,5) e 15 dias (A/M=2,4 e pH 5, com adição de tampão) sugerem que a adição de tampão e o tempo de fermentação influenciaram na concentração e na composição dos ácidos gerados. A adição de tampão na segunda etapa dos ensaios de acidificação fez com que a concentração de Na⁺ no meio reacional atingisse uma concentração (> 0,7 g/L). Logo, a adição de tampão alterou substancialmente a salinidade no meio. Sabe-se que uma baixa concentração de sódio é essencial para o crescimento celular, regulação do pH, produção de eletrólitos e energia. No entanto,

concentrações superiores a 0,5 g/L podem provocar, por exemplo, em microrganismos do gênero *Clostridium* uma maior energia para manutenção do que para geração de novas células, o que altera o mecanismo durante a fermentação escura (*dark fermentation*) de butírico para acético (TAHERI et al., 2018). Alguns autores como Xia *et al.*, (2015) apontam que elevadas concentrações de Na⁺ contribuíram para uma elevada produção de etanol, uma inibição na utilização de substrato e uma menor produção de hidrogênio. Além disso, Taheri et al (2018) observaram em seu estudo que o aumento da concentração de NaCl superiores a 0,5 g/L pode provocar uma mudança na via metabólica do processo de acidogênica para solvatogênica. Resultados similares foram observados no presente estudo e podem ser vistos na Figura 19.

Figura 19: Cromatogramas das amostras pós-fermentação: a) ensaio realizado a pH 5,5 e relação A/M de 2 g SV g SV⁻¹, sem adição de tampão e b) ensaio realizado a pH 5 e relação A/M de 2,4 g SV g SV⁻¹, com adição de tampão



A partir da Figura 19 é possível perceber que em condições similares, percebe-se no cromatograma das amostras obtidas após os ensaios acidogênicos utilizando tampão uma maior quantidade de picos, evidenciando a presença de outros compostos. As mesmas amostras (pós- fermentação com tampão) foram analisadas em uma coluna Fermentation Monitoring (Bio Rad), de acordo com o método aplicado por Bueno, (2019), onde se detectou a presença de compostos como 1,3 propanodiol, um dos produtos produzidos durante a solvatogênese. Alguns autores como Le *et al.*, (2012), apontam que quando a concentração de Na⁺ é elevada no meio reacional, a célula bacteriana bombeia Na⁺ através da membrana celular para ajustar o gradiente de Na⁺, tal processo é caracterizado por consumir energia. Sendo assim, a alteração

do metabolismo em ambientes com elevada concentração de Na^+ pode estar atribuído ao efeito inibitório provocado pelos sais contendo sódio, baixa conversão de substrato, alto consumo de energia e lise celular.

Em relação ao tempo de fermentação, nos ensaios realizados em 20 dias foi observada a presença de ácido valérico e butírico, o que pode ser decorrente do desvio das rotas metabólicas sob condições de estresse. Essa hipótese ganha força quando se observa que as condições experimentais 4 e 5 (da otimização das condições do bioprocessamento) apresentaram o menor percentual de AGVs de cadeia longa dentre todas as condições estudadas.

A comparação entre o perfil das condições nas quais foi aplicada a mesma relação A/M (2,4-(condições 2 e 5)/(1,13- condições 4 e 6) permite inferir que o aumento do pH de 5 para 9 refletiu na maior produção de ácidos de cadeia longa, induzindo a produção de ácido propiônico e butírico ao invés de ácido isobutírico. Por outro lado, a relação A/M demonstrou ter pouca influência em pH=5, visto que o perfil dos AGVs nas condições 4 (A/M=2,4 e pH 5) e 5 (A/M=1,13 e pH 5) foram semelhantes e não tiveram alterações significantes para o percentual de ácido isobutírico (p -valor $>0,05$ pelo teste de hipóteses de *Tuckey*). Em contrapartida, a razão substrato / inóculo demonstrou-se importante em pH 9, considerando que a comparação das condições 2 e 6 mostram a diminuição no percentual de ácido propiônico quando a relação A/M aumentou de 1,13 para 2,4.

As condições 1,2,3,6,7,8 e 9 (pH=7 e pH=9) apresentaram um perfil mais heterogêneo no que tange a diversidade de ácidos produzidos quando comparadas as condições 4 e 5 (pH=5). Dessa forma, seria de se esperar que para rotas tecnológicas que vislumbram a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) por exemplo, o perfil de AGV obtido em pH neutro-alcálico favoreceria a produção de polihidroxibutirato (PHB) (CABRERA et al., 2018).

A análise de variância (ANOVA) para as três variáveis resposta avaliadas mostrou uma regressão significativa ($p < 0,05$) para os modelos quadráticos utilizados para ajustar os dados experimentais, coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,9808 e valores de R^2_{adj} superiores a 0,9079. Ademais, não houve falta de ajuste (valor de $p > 0,05$). Portanto, os modelos quadráticos foram bons modelos preditivos para os dados experimentais. Os coeficientes obtidos da análise de regressão dos modelos quadráticos aos dados experimentais, assim como os valores de R^2 , R^2_{adj} e $p_{regressão}$ e $p_{falta de ajuste}$ são apresentados na Tabela 13. As superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental Doehlert são apresentadas na Figura 20.

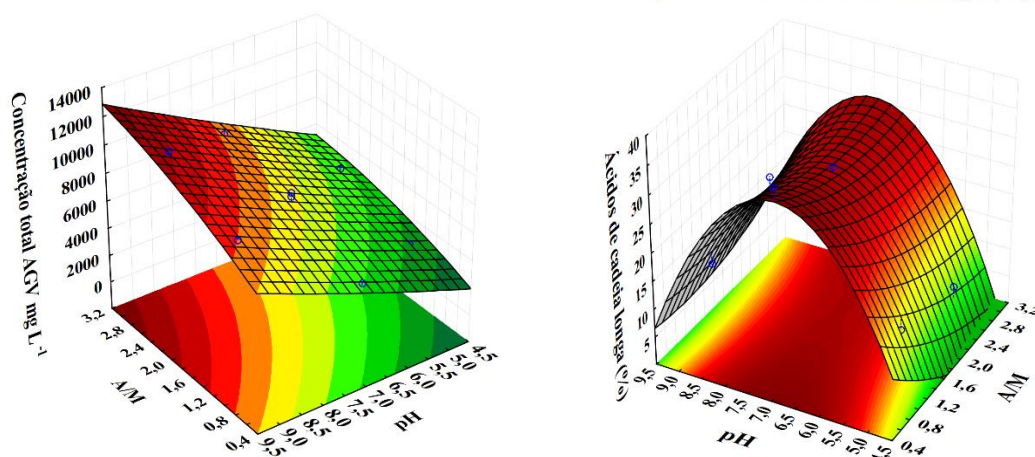
Tabela 13: Coeficientes de regressão para as variáveis dependentes avaliadas no planejamento experimental Doehlert (DED).

Coeficientes de regressão*	Concentração total de AGVs	Ácido de cadeia longa (%)
b_0	7334,6333	29,4941
b_1	1836,6667	-2,6279
b_{11}	-448,5833	2,3250
b_2	2741,8000	2,9308
b_{22}	95,0625	-16,8244
b_{12}	290,8000	4,3610
R^2	0,9704	0,9655
R^2_{adj}	0,9214	0,9079
$p_{regressão}$	0,0167	0,0211
$p_{faltadeajuste}$	0,6044	0,0663

*Todos os modelos são escritos como: $y=b_0+b_1(A/M)+b_{11}(A/M)^2+b_2(pH)+b_{22}(pH)^2+b_{12}(A/M)(pH)$

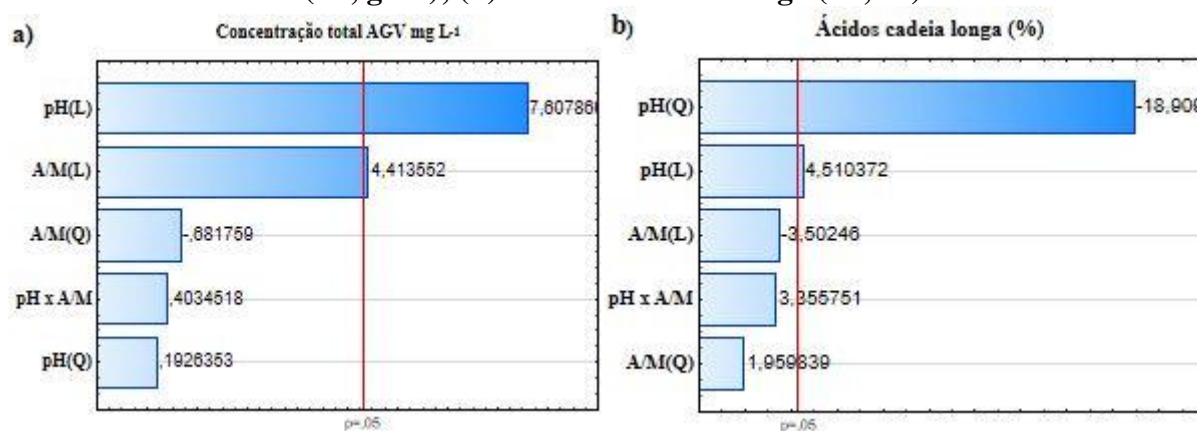
Figura 20: Superfícies de resposta geradas a partir de modelos quadráticos para (a) concentração total de AGVs (Y_4), (b) ácidos de cadeia longa (%) (Y_5)

a) Concentração total de AGVs g L⁻¹ b) Ácidos de cadeia longa (%)



Os efeitos estatisticamente significativos das variáveis independentes pH e A/M nas variáveis dependentes Y_4 e Y_5 são apresentados no diagrama de Pareto de efeitos padronizados (Figura 21).

Figura 21: Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para as variáveis independentes relação alimento / microrganismo (*A/M*) e *pH* e seus efeitos na (a) concentração de AGVs (*Y4*, g L⁻¹); (b) ácidos de cadeia longa (*Y5*, %)



A concentração total de AGVs é uma variável importante quando se almeja a produção industrial de AGVs biobaseados, uma vez que baixas concentrações limitam muitas técnicas de recuperação desses ácidos, como a destilação e a separação por membranas. Nesse contexto, a análise do gráfico de Pareto (Figura 20) evidencia que tanto o *pH* quanto a relação *A/M* tiveram efeitos estatísticos significativos (*p*-valor < 0,05) e positivos em *Y4* (7,60 e 4,41 respectivamente), com o *pH* exercendo maior influência. Isso quer dizer que meios alcalinos com altas relações substrato:inóculo levaram a um aumento na concentração dos ácidos no meio reacional.

A análise das condições 1 (*A/M*=3 e *pH*=7) e 3 (*A/M*=0,5 e *pH*=7) mostram que um aumento de seis vezes na relação *A/M* causou um incremento de 58% na concentração dos ácidos carboxílicos. Por outro lado, a observação das condições experimentais 4 (*A/M*=1,13 e *pH*=5) e 6 (*A/M*=1,13 e *pH*=9) aponta que o aumento do *pH* para uma mesma relação *A/M* culminou no aumento da concentração de ácidos orgânicos de 3,62 g L⁻¹ para 8,82 g L⁻¹, o que representa um aumento de mais de 100% na variável resposta. Logo, o *pH* tem maior influência na concentração total de AGVs gerados em relação ao parâmetro *A/M*.

Por muito tempo a literatura postulou que o *pH* em torno de 5,5 era propício para processos fermentativos acidogênicos, como forma de eliminar a influência das *archeas* metanogênicas (YARIMTEPE; OZ; INCE, 2017; WAINAINA et al., 2019). Entretanto, trabalhos recentes focados na produção de ácidos graxos voláteis constataram que meios alcalinos podem favorecer o acúmulo de AGVs, conforme foi demonstrado no presente estudo. De acordo com Rincon (2018), os ácidos orgânicos podem penetrar na parede celular microbiana em *pH* extracelular baixo e se dissociar dentro do protoplasma, causando o

abaixamento do pH intracelular e conseqüentemente inibindo a utilização do substrato e do crescimento microbiano.

Norteados por essa ótica, autores que utilizaram substratos diversos como lodo granular e resíduos alimentares concluíram que as maiores concentrações de ácidos carboxílicos foram favorecidas pela alcalinidade (STRAZZERA et al., 2018; ATASOY et al., 2019; CABRERA et al., 2019; IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2019). Em relação ao bagaço de oliva, Cabrera (2019) e colaboradores estudaram o acúmulo de AGVs em sistemas metanogênicos em diferentes pH (5,7 e 9), relataram que o maior acúmulo de AGVs (3.69 g DQO_{AGV}/L) se deu em pH 9, onde o perfil dos ácidos gerados foi representado majoritariamente pelo ácido acético (79,3%).

Em relação à variável Y_5 (ácidos de cadeia longa, %) os termos pH e pH^2 apresentaram significância estatística na variável resposta. Entretanto, o primeiro termo teve efeito positivo (4,51), enquanto o segundo demonstrou uma contribuição negativa (-18,91) na variável independente Y_5 . Isso significa que para uma mesma relação A/M, inicialmente o aumento do pH acarreta em um maior percentual de ácidos de cadeia longa (butírico, isobutírico, valérico e isovalérico), mas o aumento excessivo da alcalinidade para regiões extremas levará a uma menor representatividade desses ácidos no meio, conforme ilustrado na Figura 20-b. Para o domínio experimental de pH explorado (5-9), regiões extremas de pH promoveram aumento do percentual de ácido acético e propiônico em relação aos ácidos de cadeia maior, indicando que o perfil dos AGVs foi alterado com o pH devido à mudanças nas rotas metabólicas.

O modelo quadrático descritivo gerado aponta que as condições experimentais que geram maior percentual de AGVs de cadeia longa estão situadas em pH neutro (6,5-7,5), em condições de relação A/M muito baixas ou muito altas ($\sim 0,5$, ~ 3). Isso sugere que as condições de stress geradas pela baixa ou alta disponibilidade de alimento resultaram em desvios das rotas metabólicas preferenciando a formação de AGVs de cadeia mais longa como um mecanismo de sobrevivência do consórcio microbiano. É importante ressaltar que mesmo que o pH em torno da neutralidade favoreça a produção de AGVs, essa faixa também favorece a sobrevivência das metanogênicas-acetoclásticas, que tem a habilidade de transformar o acetato em metano, podendo reduzir o acúmulo de ácidos.

De acordo com Zhou *et al.* (2018), uma das hipóteses para a influência do pH no perfil dos ácidos gerados se relaciona à mudanças na razão $NADH/NAD^+$ causada pelo potencial hidrogeniônico do meio. O NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) é uma coenzima cuja principal função é a produção de energia celular para o organismo, sendo a forma reduzida

do transportador de elétrons mais comum na degradação de carboidratos, o (NAD⁺) (AQUINO; CHERNICHARO, 2005a).

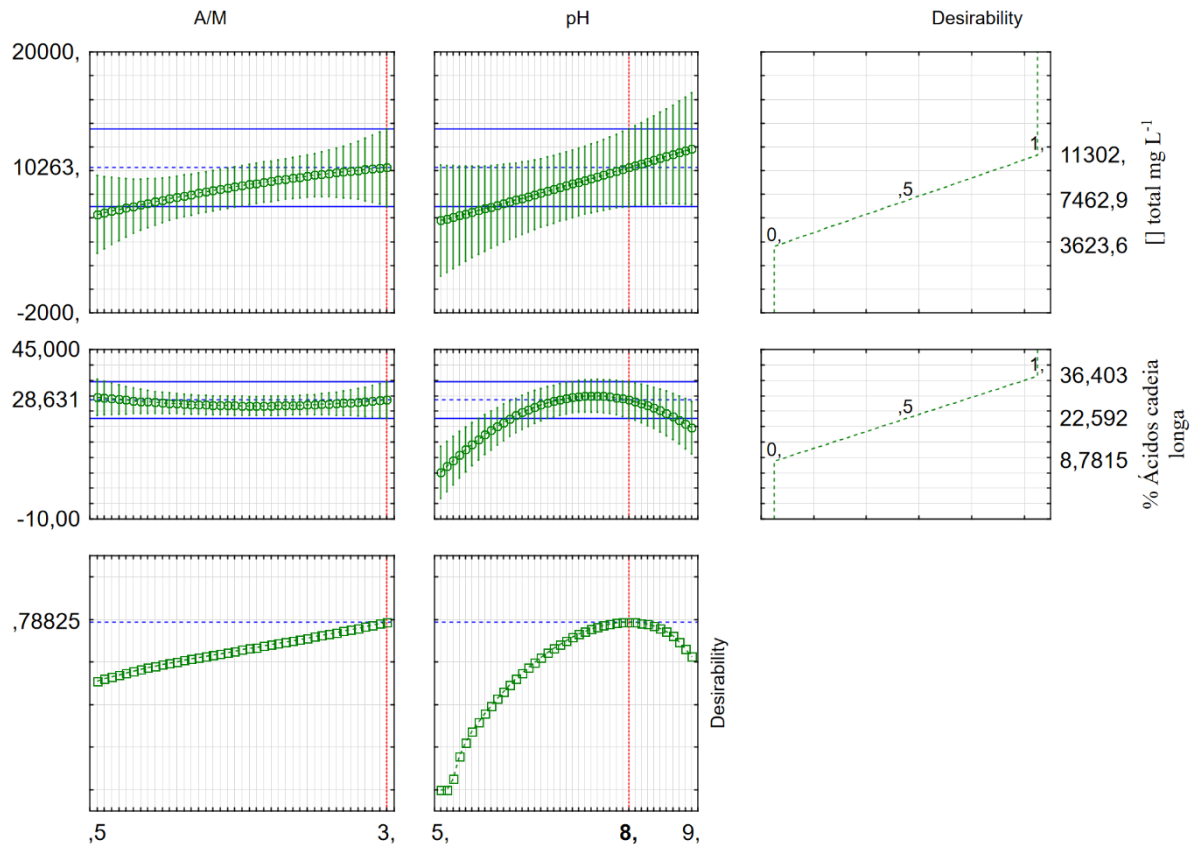
A literatura apresenta resultados muito contrastantes para a modificação do perfil dos AGVs produzidos em função da mudança de pH. Dessa forma, os diferentes substratos, inóculos e condições de processo aplicados dificultam a comparação dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que esses outros parâmetros de processo também influenciam nas rotas bioquímicas da fermentação acidogênica.

Diante do exposto, o *pH* apresentou maior influência para a fermentação acidogênica do bagaço de oliva para as variáveis estudadas, demonstrando ser um parâmetro chave no processo. Ao estudar os parâmetros que influenciam a produção de AGVs a partir das águas residuárias da produção do azeite para a produção de poli-hidroxicarboxilatos, Gameiro *et al.* (2015) e colaboradores relataram a mesma tendência observada: a alcalinidade é o parâmetro mais importante para a produção de AGVs, tendo um efeito maior na acidificação quando comparado a relação alimento-microrganismo aplicada ao sistema.

No sentido de alcançar melhores produções de AGVs a partir do bagaço de oliva, almejando altas concentrações de ácido carboxílico e perfis com grande percentual de cadeia longa, a ferramenta estatística de desejabilidade foi aplicada para verificar qual combinação de pH e relação A/M seriam mais adequadas para gerar esse cenário. Nesse interim, a variável *Y4* foi configurada em nível não desejável (= 0) de 3623,6 mg L⁻¹, em nível parcialmente desejável (= 0,5) 7464,0 mg L⁻¹ e totalmente desejável (= 1) de 11302,0 mg L⁻¹; a variável *Y5* foi configurada em nível não desejável (= 0) de 8,78%, em nível parcialmente desejável (= 0,5) 22,59% e totalmente desejável (= 1) de 36,40%.

A função desejabilidade (Figura 22) apontou que a melhor condição de processo para o cenário proposto é *A/M*=3 e *pH*=8. Nessa conjuntura, os modelos preditivos renunciaram uma concentração total de AGVs de 10263 mg L⁻¹ e um percentual de AGVs de cadeia longa de 29%. Considerando que maiores relações A/M estão associadas a menores eficiências de acidificação e que os reagentes alcalinizantes representam importantes gastos na indústria química, esses dois aspectos precisam ser levados em consideração quando se pensa na aplicação industrial da tecnologia.

Figura 22: Perfil para valores previstos e desejabilidade



De qualquer forma, as investigações do presente estudo concluíram que o melhor cenário para a produção de AGVs a partir do bagaço de oliva seriam: Pré-tratamento hidrotérmico a 161°C e 62 minutos; Digestão em fase semissólida (DA-Ss) utilizando a mistura pré-tratada; bioprocesso realizado com A/M=3 e pH=8.

7. CONCLUSÃO

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de oliva seguido pela digestão anaeróbia acidogênica para a produção de AGVs mostrou-se uma rota tecnológica alternativa para a cadeia de produção de azeite no contexto das biorrefinarias. Os testes de fermentação acidogênica mostraram que o PTH da biomassa realizado em condições de severidade baixa ($S_0 = 2,46$) e intermediária ($S_0 = 3,59$) promoveu as maiores eficiências de acidificação (EA) e concentrações dos AGVs em todos os sistemas de digestão anaeróbia estudados (DA-S), (DA-Ss) e (DA-L). Além disso, o presente trabalho traz um avanço na literatura ao mostrar a influência da severidade do PTH no perfil dos ácidos orgânicos produzidos, em função do estresse microbiano causada pela presença de compostos tóxicos no meio, com destaque para os compostos fenólicos.

O bagaço de oliva mostrou-se uma biomassa muito recalcitrante em função do elevado teor de compostos fenólicos e lipídios. Nessa perspectiva, quando avaliada a separação da fração sólida para a produção de AGVs e da fração líquida para a produção de biogás, os resultados da produção de metano demonstraram que o fracionamento da biomassa para esse cenário não era vantajoso, e por isso, dentro do escopo do presente trabalho, o cenário que apresentava maior rentabilidade econômica era trabalhar com a própria mistura pré-tratada na condição de desejabilidade C2 (161°C, 62 min), na DA-Ss.

A metagenômica mostrou que a severidade do PTH e o percentual de sólidos nos sistemas de DA influenciou na seleção da comunidade microbiana atuante nos testes de fermentação acidogênica. Para os sistemas DA-L e DA-S, houve um aumento no percentual do filo *Firmicutes* em relação ao filo *Proteobacteria* para ambos os sistemas de digestão anaeróbia quando a severidade do PTH foi aumentada. Além disso, a comparação da diversidade microbiana da matriz do inóculo e ao final dos testes de fermentação permitem inferir que a elevada concentração de compostos fenólicos no substrato levou a uma redução na diversidade dos microrganismos, que não suportaram a toxicidade do meio fermentativo.

A otimização do pH e da relação alimento/microrganismo (A/M) para a condição de PTH C2 na DA-Ss apontou que o pH é a variável que mais influencia na fermentação acidogênica do bagaço de oliva. Além disso, a condição de processo recomendada para se obter altas concentrações de AGVs e um perfil com alto percentual de ácidos de cadeia longa é $pH=8$ e $A/M=3$. Essa informação é importante para pesquisas futuras, que terão subsídio para trabalhar nas condições ótimas de processo para a produção de AGVs a partir do bagaço de oliva pré-tratado, que é uma temática atual e relevante no contexto da economia circular biobaseada.

8. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar o programa computacional Aspen para realizar uma análise econômica mais sofisticada para o processo proposto;
- Realizar a metagenômica das condições experimentais de otimização do *pH* e da relação alimento microrganismo (*A/M*), a fim de conhecer a influência dessas variáveis na comunidade microbiana presente no meio fermentativo;
- Avaliar a recuperação dos AGVs produzidos a partir das técnicas de adsorção e separação por membranas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHADI, S. O. et al. Production of biochar from olive mill solid waste for heavy metal removal. **Bioresource Technology**, v. 244, n. August, p. 759–767, 2017.
- ABU TAYEH, H. et al. Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 152, n. November 2017, p. 24–30, 2014.
- ABU TAYEH, H. et al. Subcritical hydrothermal pretreatment of olive mill solid waste for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 199, n. December, p. 164–172, 2016.
- ADARME, O. F. H. et al. Use of anaerobic co-digestion as an alternative to add value to sugarcane biorefinery wastes. **Bioresource Technology**, v. 287, n. May, p. 121443, 2019.
- AHMAD, F.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 98, n. December 2017, p. 108–124, 2018.
- ALBURQUERQUE, J. A. et al. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 195–200, 2004.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625–638, 2009.
- ALVES, R. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 2011. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-11082011-143629/pt-br.php>>.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152–161, 2005.
- ASLI, A. El et al. Conversion of xylose to ethanol by a novel phenol-tolerant strain of *Enterobacteriaceae* isolated from olive mill wastewater. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 13, p. 1101–1105, 2002.
- ASSIS, T. **Utilização de emissões atmosféricas como fonte de CO2 no cultivo de microalgas: produtividade de biomassa e viabilidade econômica**. 2018. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/19470>>.
- ATASOY, M. et al. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. **Bioresource Technology**, v. 268, n. July, p. 0–1, 2018.
- ATASOY, M. et al. Fatty Acids Production via Mixed Culture Fermentation: Revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition. **Bioresource Technology**, v. 292, n. May, p. 121889, 2019.

- AZBAR, N.; KESKIN, T.; YURUYEN, A. Enhancement of biogas production from olive mill effluent (OME) by co-digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1195–1201, 2008.
- BAÊTA et al. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137–146, 2016.
- BAÊTA, B. E. L. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria**. 2016. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/7124>>.
- BATISTA, G. et al. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 275, n. December 2018, p. 321–327, 2019.
- BERMÚDEZ-PENABAD, N.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. **Waste Management**, v. 68, p. 96–102, 2017.
- BERTIN, L. et al. Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4537–4549, 2010.
- BHATIA, S. K.; YANG, Y.-H. Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 2, p. 327–345, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11157-017-9431-4>>.
- BITTENCOURT, G. A. et al. Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 292, n. August, 2019.
- BORJA, R. et al. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 733–742, 2002.
- BORJA, R.; RAPOSO, F.; RINCON, B. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. **Grasas y Aceites**, v. 57, n. 1, 2006.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Plano Nacional de Energia 2030**. Brasília, 2007.
- BRAADBAART, F.; MARINOVA, E.; SARPAKI, A. Charred olive stones: experimental and archaeological evidence for recognizing olive processing residues used as fuel. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 25, n. 5, p. 415–430, 2016.
- BUENO, M. **Avaliação do potencial celulolítico e fermentativo de bactérias do gênero Clostridium e da microbiota autóctone na fermentação do bagaço de cana bruto**. 2019. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.
- BUJALANCE, L. et al. **Influence of thermal pre-treatment on the anaerobic digestion of olive mill solid waste**. 13th World Congress on Anaerobic Digestion, v. 140, p. 249–255, 2013.
- CABRERA, F. et al. The accumulation of volatile fatty acids and phenols through a pH-controlled fermentation of olive mill solid waste. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 1501–1507, 2019.

- CAETANO, M. **Produção de azeite de oliva no Brasil deve crescer mais de 40% em 2018.** *Diário do Comércio, Indústria e Serviços*. Disponível em: <<https://www.dci.com.br/agronegocios/producao-de-azeite-de-oliva-no-brasil-deve-crescer-mais-de-40-em-2018-1.674572>>.
- CALT, E. A. Products produced from organic waste using Managed Ecosystem Fermentation. *Journal of Sustainable Development*, v. 8, n. 3, p. 43–51, 2015.
- CAMPOS, F. M. et al. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, n. 2, p. 144–151, 2009.
- CANALE-PAROLA, E. Biology of the sugar-fermenting Sarcinae. *Bacteriological reviews*, v. 34, n. 1, p. 82–97, 1970.
- CHANG, J. J. et al. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 19, p. 5137–5146, 2008.
- CHEN, Y. et al. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, v. 41, n. 3, p. 683–689, 2007.
- CHEN, Y. et al. Enhanced volatile fatty acids (VFAs) production in a thermophilic fermenter with stepwise pH increase – Investigation on dissolved organic matter transformation and microbial community shift. *Water Research*, v. 112, p. 261–268, 2017.
- CHERNICHARO, C. **Reatores Anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 2007.
- CHOU, C. H. et al. Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 21, p. 13972–13983, 2011.
- CHRISTOFF, A. P. et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*, n. May 2017, p. 1–5, 2017.
- CHRISTOFOROU, E. A. et al. Comparative Study on Catalytic and Non-Catalytic Pyrolysis of Olive Mill Solid Wastes. *Waste and Biomass Valorization*, v. 9, n. 2, p. 301–313, 2017.
- CHRISTOPHER, L. et al. **Integrated Forest Biorefineries: Challenges and Opportunities - Lignin recovery and lignina-based products**. RSC Green Chemistry: Cambridge, 2013.
- CONDE, E. et al. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, v. 114, p. 806–812, 2009.
- DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. MAY, p. 1–10, 2015.
- DERMECHE, S. et al. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 10, p. 1532–1552, 2013.
- DONOSO-BRAVO, A.; ORTEGA-MARTINEZ, E.; RUIZ-FILIPPI, G. Impact of milling, enzyme addition, and steam explosion on the solid waste biomethanation of an olive oil production plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, n. 2, p. 331–340, 2016.

- DUAN, D. et al. Microwave-assisted acid pretreatment of alkali lignin: Effect on characteristics and pyrolysis behavior. **Bioresource Technology**, v. 251, n. December 2017, p. 57–62, 2018.
- ELALAMI, D. et al. Combination of dry milling and separation processes with anaerobic digestion of olive mill solid waste: Methane production and energy efficiency. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3295, 2018.
- EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, B. M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 22–26, 2002.
- EUROPEAN COMMISSION a. **A sustainable bioeconomy for Europe : strengthening the connection between economy, society and the environment. Updated Bioeconomy Strategy**. Luxemburgo, 2018. Disponível em: <https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/ec_bioeconomy_strategy_2018.pdf>
- EUROPEAN COMMISSION b. **Communication from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions. An EU action plan for the Circular Economy**. Bruxelas, 2015. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0007.02/DOC_1&format=PDF>
- FACUNDES, B. C. **Fungos filamentosos produtores de holocelulases prospectados em mata de galeria do cerrado**. 2014. Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2014.
- FAO. **The State of Agricultural Commodity Markets 2018. Agricultural trade, climate change and food security**. Rome, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/CA1364EN/ca1364en.pdf>>
- FARIA, O; PIRES, C. **Economia Circular e Bioeconomia : Como as Abordagens se Relacionam?** International Workshop Advances in Cleaner Production. Barranquilla, 2018.
- FEI, Q. et al. Lipid production by microalgae *Chlorella protothecoides* with volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources in heterotrophic cultivation and its economic assessment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 691–700, 2015.
- FENGEL, D; WEGENER, D. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. [s.l: s.n.]
- FERNANDES, A; COSTA, A.; SILVA, C.; SILVEIRA, T. M. L. et al. **Comparação das propriedades físico-químicas do óleo de abacate comestível com o azeite de oliva extra virgem**. Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, Campinas, 2015.
- FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M. J. et al. Assessment of two-phase olive mill solid waste and microalgae co-digestion to improve methane production and process kinetics. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 263–269, 2014.
- FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 2010.
- FEZZANI, B.; CHEIKH, R. Ben. **Bioresource Technology Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature**. **Molecules**, v. 101, p. 1628–1634, 2010.
- FOUNTOULAKIS, M. S. et al. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4735–4744, 2002.

- GAMEIRO, T. et al. Olive oil mill wastewater to volatile fatty acids: Statistical study of the acidogenic process. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 4, 2015.
- GARCIA-AGUIRRE, J. et al. Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. **Bioresource Technology**, v. 244, n. August, p. 1081–1088, 2017.
- GIRIJA, D. et al. Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 372–378, 2013.
- GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Carboxylic Acid Market Size By Product (Acetic, Valeric, Isovaleric, Formic, Propionic, Butyric, Isobutyric, Citric, Caproic, Stearic), By End-User (Food & Beverages, Animal Feed, Personal Care & Cosmetics, Lubricants, Consumer Goods), Industry Analysis R.** 2018.
- GRESES, S.; TOMÁS-PEJÓ, E.; GÓNZALEZ-FERNÁNDEZ, C. Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**. v. p. 122-486, 2019.
- GULLÓN, P. et al. Selected Process Alternatives for Biomass Refining : A Review. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, p. 135–144, 2010.
- GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol.** 2011. Tese. Universidade de São Paulo. p. 1–315, 2011.
- HARALAMPIDIS, K. et al. Temporal and transient expression of stearyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 327, p. 1661–1669, 1998.
- HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU : Drivers , challenges , and opportunities. **Renew. Sust. Energ. Rev.** v. 101, n. June 2018, p. 590–599, 2019.
- HESSELTINE, C. W. Solid State Fermentation-An Overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 23, p. 79–89, 1987.
- HOFFMANN, H. et al. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 206–212, 2005.
- HOLLADAY, J. E. et al. Top Value-Added Chemicals from Biomass Volume II - Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. **Pacific Northwest National Laboratory**, v. II, n. October, p. 87, 2007.
- IEA BIOENERGY. Biorefineries : adding value to the sustainable utilisation of biomass. **IEA Bioenergy**, p. 1–16, 2009.
- IGLESIAS-IGLESIAS, R. et al. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 291, n. July, p. 121817, 2019.
- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL a. **Olive oil figures.** Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>.

INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL b. **Market Newsletter - April 2018**. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/modules/search>>.

JANKE, L. et al. Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 235–244, 2016.

JEFFRIES, T. W. et al. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, p. 163–176, 1990.

JIANG, J. et al. Volatile fatty acid production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 525–530, 2013.

JÚNIOR, S. **Estratégias para o Uso de Biomassa em Química Renovável**. Embrapa Agroenergia. Brasília, 2012.

KHAN, M. A. A. et al. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 738–748, 2016.

KIST, B; SANTOS, C; OLIVEIRA, C. **Anuário Brasileiro das Oliveiras**. 1. ed. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2018.

KLEMM ET AL. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, n. 22, 2005.

KO, J. K. et al. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 290–296, 2016.

KOCHOLATY, B. Y. W.; HOOGERHEIDE, J. C. Studies of the metabolism of the strict anaerobes (genus : *Clostridium*). v. 2, p. 437–448, 1937.

KURUTI, K. et al. Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT). **Bioresource Technology**, v. 238, p. 188–193, 2017.

LAMMI, S. et al. Dry fractionation of olive pomace as a sustainable process to produce fillers for biocomposites. **Powder Technology**, v. 326, p. 44–53, 2018.

LEE, D. J. et al. Effect of volatile fatty acid concentration on anaerobic degradation rate from field anaerobic digestion facilities treating food waste leachate in South Korea. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

LEE, M. J. et al. Sodium (Na⁺) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 108, p. 22–26, 2012.

LIM, S. J. et al. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7866–7874, 2008.

LIMA, D. R. S. et al. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: A kinetic analysis. **Industrial Crops & Products**, v. 111, n. January, p. 684–693, 2018.

LIN, R. et al. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 250–255, 2015.

- LIU, H. et al. Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 799–807, 2012.
- LYU, H. et al. Exploration and optimization of mixed acid synergistic catalysis pretreatment for maximum C5 sugars. **Bioresource Technology**, v. 260, n. March, p. 53–60, 2018.
- MAAMIR, W. et al. Effect of fenton pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater and olive mill solid waste in mesophilic conditions. **International Journal of Green Energy**, v. 14, n. 6, p. 555–560, 2017.
- MAINTINGUER, S. I. et al. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 1, p. 152–160, 2017.
- MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part II. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1446–1466, 2015.
- MASSOLA, C. P.; MAZIERO, E. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista [IPT] Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, p. 58–73, 2017.
- MEIGHAN, B. N. et al. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 431–441, 2017.
- MESA, L. et al. Desirability function for optimization of Dilute Acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. **Applied Energy**, v. 198, p. 299–311, 2017.
- MILANESE, M. et al. Numerical study of anaerobic digestion system for olive pomace and mill wastewater. **Energy Procedia**, v. 45, p. 141–149, 2014.
- MIRANDA, I. et al. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. **Bioresource Technology**, v. 292, n. June, 2019.
- MONLAU, F. et al. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane : Impact of Structural Features and Pretreatment and Biomethane : Impact of Structural Features. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n.3p. 260–322, 2011.
- MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures ? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 934–951, 2014.
- MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209–232, 2018.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- MOTTE, J. C. et al. Total solids content: A key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013.
- MURALI, N.; FERNANDEZ, S.; AHRING, B. K. Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 197–204, 2017.

- NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Respostas - Parte II : Variáveis de Mistura Optimization of Analytical Methods Methodology – Part II : Mixture Variables Using Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Sup. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 393–420, 2018.
- NTOUGIAS, S.; BOURTZIS, K.; TSIAMIS, G. The microbiology of olive mill wastes. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 16, 2013.
- NWODO, J. U. A. O. U. Recovery of laccase-producing *Gammaproteobacteria* from wastewater. **Biotechnology Reports**, v.21, 2019.
- O’HARA, C. M. et al. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 75. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 2046–2049, 1989.
- OGEDA, T. et al. Hidrólise Enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OLESKOWICZ-POPIEL, P. et al. Co-production of ethanol, biogas, protein fodder and natural fertilizer in organic farming - Evaluation of a concept for a farm-scale biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 440–446, 2012.
- OLIVEIRA, C. A. P. de. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético diluído em sistema pressurizado**. 2016. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. Disponível em:
<<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18161>>.
- PAESI, A. et al.. Comparison of the production of hydrogen and volatile fatty acids from sugarcane vinasse by *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis* strains alone, in co-cultures or in the bioaugmentation of the microbial consortium. **Environmental Technology & Innovation**, p. 122-155, 2020.
- PARANHOS, A. et al. Methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass : Kinetic and energy assessment. **Bioresource Technology** . v. 300, n. December 2019, 2020.
- PELLERA, F.-M. M. et al. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of olive mill solid waste. **Waste Management**, v. 58, p. 160–168, 2016.
- PÉREZ, J. A. et al. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. **Fuel**, v. 87, n. 17–18, p. 3640–3647, 2008.
- PIERALISI. **O mundo PIERALISI: das prensas de implantação ao ciclo contínuo graças a inovação tecnológica**. 2018. Disponível em:
<www.pieralisi.com/media/files/444_olivo_nel_cuore_prt.pdf>.
- RINCÓN, B. et al. Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 2, p. 253–261, 2008.
- RINCÓN, B. et al. Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic-acidogenic step. **Waste Management**, v. 29, n. 9, p. 2566–2573, 2009.

- RINCÓN, B. et al. Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 249–255, 2013.
- RINCON, I. M. C. **Bioprospeção bacteriana para produção de bio-hidrogênio a partir de hidrolisado hemicelulósico e avaliação do processo fermentativo**. 2018. Tese. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2018.
- RODRÍGUEZ, G. et al. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5261–5269, 2008.
- ROJAS, O. J. Cellulose Chemistry and Properties : Fibers , Nanocelluloses and Advanced Materials. **Adv Polym Sci**, v.271, p.1-329, 2016.
- ROSSETI, R. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações totais em frutos do café: avaliações em diferentes estágios de maturação**. 2007. Dissertação. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
- RUBIO-SENENT, F., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G., LAMA-MUÑOZ, A., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. New Phenolic Compounds Hydrothermally Extracted from the Olive Oil Byproduct Alperujo and Their Antioxidative Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1175–1186, 2012.
- RUIZ, H. A. et al. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35–51, 2013.
- SANTOS, L. C. dos et al. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, n. 3, p. 601–612, 2018.
- Scopus**. Disponível em: <https://www.scopus.com/sources?zone=TopNavBar&origin=NOORIGIN_DEFINED> 2019.
- SERRANO, A. et al. Olive mill solid waste biorefinery: High-temperature thermal pretreatment for phenol recovery and biomethanization. **Journal of Cleaner Production** v. 148, p. 314–323, 2017.
- SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbico de leito fluidificado**. 2008. Dissertação. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2008.
- SICILIANO, A.; STILLITANO, M. A.; DE ROSA, S. Biogas production from wet olive mill wastes pretreated with hydrogen peroxide in alkaline conditions. **Renewable Energy**, v. 85, p. 903–916, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.029>>.
- SILVA, F. C. et al. Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, n. 4, p. 467–476, 2013.
- SILVA, N. C. S. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico da casca de café na produção de biogás e etanol**. 2019. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.
- SINGH, L.; CARIAPPA, M. P.; KAUR, M. Klebsiella oxytoca: An emerging pathogen? **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, p. S59–S61, 2016.

- SINGHANIA, R. R. et al. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 166–174, 2013.
- SOARES, C. M. T.; FEIDEN, A.; TAVARES, S. G. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás Factors that influence the anaerobic digestion process in biogas production. **Revista Nativa**, v. 5, p. 522–528, 2017.
- STRAZZERA, G. et al. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 226, n. May, p. 278–288, 2018.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- SUVOROVA, I. A.; GELFAND, M. S. Comparative genomic analysis of the regulation of aromatic metabolism in betaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–18, 2019.
- TAHERI, E. et al. Biohydrogen production under hyper salinity stress by an anaerobic sequencing batch reactor with mixed culture. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 16, n. 2, p. 159–170, 2018.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Science**. v. 9, p.1621-1651, 2008.
- TOIVANEN, H.; NOVOTNY, M. The emergence of patent races in lignocellulosic biofuels, 2002–2015. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, n. January, p. 318–326, 2017.
- TOWNSEND, S. M. et al. Characterization of an extended-spectrum betalactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*. **Microbiology**, v. 154, n. 12, p. 3659–3667, 2008.
- UNITED NATIONS. World Population Prospects The 2017 Revision Key Findings and Advance Tables. **World Population Prospects The 2017**, p. 1–46, 2017. Disponível em: <<https://www.compassion.com/multimedia/world-population-prospects.pdf>>.
- VASSILEV, S. V. et al. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 913–933, 2010.
- WAINAINA, S. et al. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437–458, 2019.
- WANG, LAWRENCE K. ; YUNG-TSE, HUNG; HOWARD, H LO ; YAPIJAKIS, C. **Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2004.
- XIA, A. et al. Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids from the seaweed carbohydrate mannitol. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 488–497, 2015.
- YANG, L. et al. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 824–834, 2015.

- YARIMTEPE, C.; OZ, N.; INCE, N. Bioresource Technology Volatile fatty acid production dynamics during the acidification of pretreated olive mill wastewater. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 936–944, 2017.
- YI, J. et al. Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and microbial characteristics analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- YIN, J.; WANG, K.; YANG, Y. Improving production of volatile fatty acids from food waste fermentation by hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 323–329, 2014.
- YUAN, Q.; SPARLING, R.; OLESZKIEWICZ, J. A. VFA generation from waste activated sludge: Effect of temperature and mixing. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 603–607, 2011.
- YUAN, Y. et al. Advances in enhanced volatile fatty acid production from anaerobic fermentation of waste activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 694, 2019.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Complex effluent streams as a potential source of volatile fatty acids. **Waste Biomass Valor**, v. 4, n. 3, p. 557–581, 2013.
- ZHANG, C.; LV, F. X.; XING, X. H. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8344–8349, 2011.
- ZHOU, M. et al. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 68–78, 2018.
- ZHUANG, X. et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68–75, 2016.