

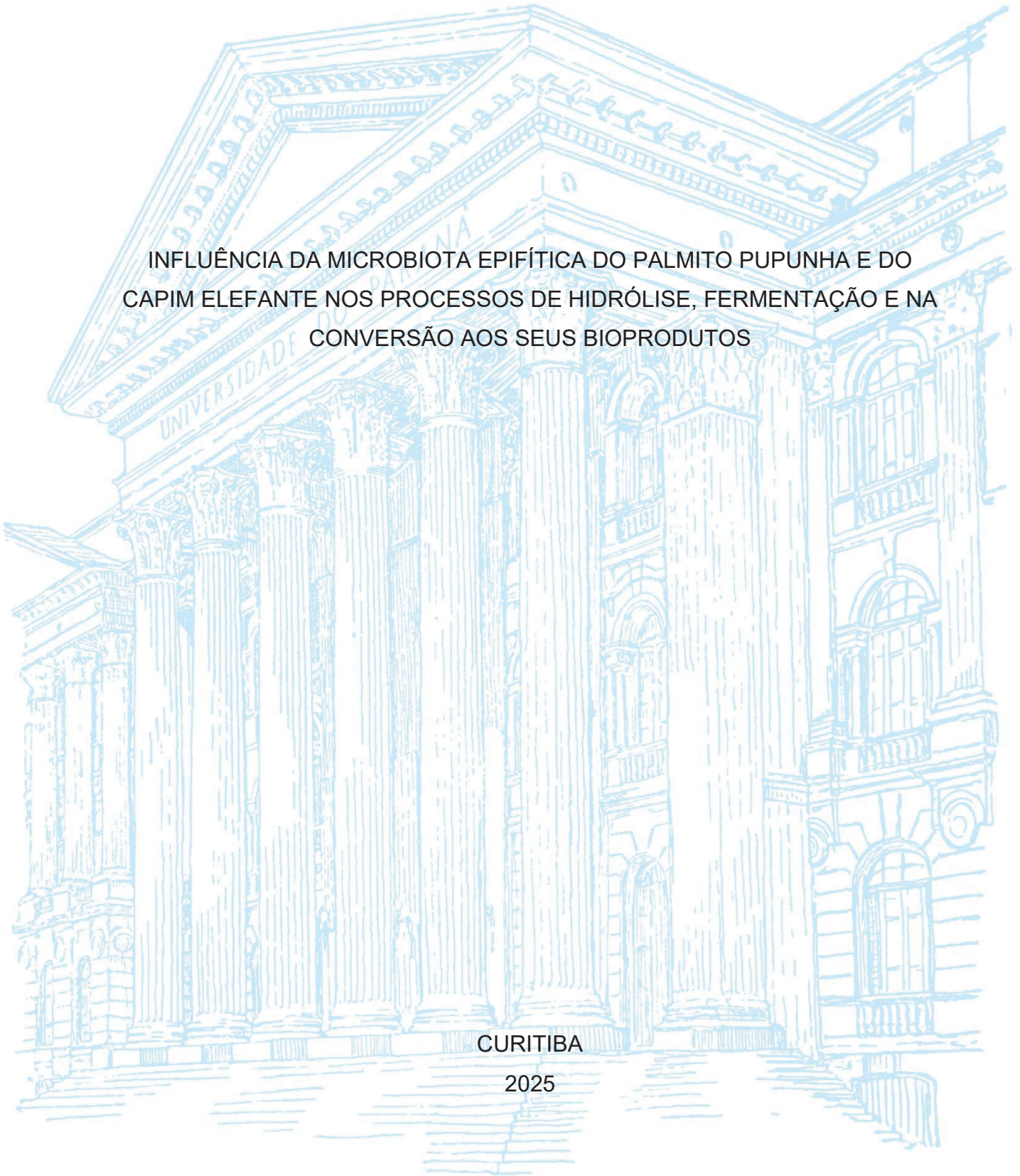
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANUEL CIPRIANO NETO MARTINS

INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA EPIFÍTICA DO PALMITO PUPUNHA E DO
CAPIM ELEFANTE NOS PROCESSOS DE HIDRÓLISE, FERMENTAÇÃO E NA
CONVERSÃO AOS SEUS BIOPRODUTOS

CURITIBA

2025



EMANUEL CIPRIANO NETO MARTINS

INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA EPIFÍTICA DO PALMITO PUPUNHA E DO
CAPIM ELEFANTE NOS PROCESSOS DE HIDRÓLISE, FERMENTAÇÃO E NA
CONVERSÃO AOS SEUS BIOPRODUTOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Arion Zandoná Filho

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Martins, Emanuel Cipriano Neto

Influência da microbiota epifítica do palmito pupunha e do capim elefante nos processos de hidrólise, fermentação e na conversão aos seus bioprodutos. / Emanuel Cipriano Neto Martins. – Curitiba, 2025.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Arion Zandoná Filho

1. Biogás. 2. Biomassa. 3. Digestão anaeróbia. 4. Fermentação. 5. Microbiota epifítica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Zandoná Filho, Arion. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EMANUEL CIPRIANO NETO MARTINS**, intitulada: **INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA EPIFÍTICA DO PALMITO PUPUNHA E DO CAPIM ELEFANTE NOS PROCESSOS DE HIDRÓLISE, FERMENTAÇÃO E NA CONVERSÃO AOS SEUS BIOPRODUTOS**, sob orientação do Prof. Dr. ARION ZANDONÁ FILHO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Outubro de 2025.

Assinatura Eletrônica

04/11/2025 22:34:28.0

ARION ZANDONÁ FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/11/2025 10:31:28.0

REGINA MARIA MATOS JORGE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/11/2025 15:36:59.0

REGINA WEINSCHUTZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho ao meu pai, Cipriano André Martins (*in memoriam*) e à minha filha Kiene Emanuelise Roque Martins.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso estima e agradecimentos a todos aqueles que contribuíram com o sucesso deste estudo. Ao meu orientador, Prof. Dr. Arion Zandoná Filho, pela dedicação, ensinamentos, apoio e todo suporte dado durante a fase do curso. Ao Felipe Gomide, Victor Brisk, à Profa. Dra. Regina Weinschutz, à Profa. Dra. Regina Maria Mattos Jorge por terem aceite o convite e, em especial, contribuir para a melhoria desse trabalho.

Agradeço à minha mãe Ana José Ribeiro Neto, à minha filha Kiene Emanuelise Roque Martins, que têm sido uma razão a mais para seguir firme e forte

Agradeço às minhas irmãs Joana Sandra Neto Martins e Paula Virgínia Neto Martins, aos meus irmãos Inácio e Paulo Cipriano Neto Martins, à minha avó Maria Ribeiro Neto, às minhas tias e tios, às minhas primas e primos, às minhas sobrinhas e sobrinho pela disposição e todo apoio durante a minha jornada no Brasil em geral e, especificamente, durante esse período de mestrado.

À Daniela Jomara Caruço de Oliveira pelo companherismo, atenção e todo apoio.

Agradeço imenso ao Neidelénio Baltazar Soares, Augusto Panzo, Monis Manuel, Hermelindo Silvano Chico, Romualdo, Mairo e Delgina da Costa Agostinho, Bartolomeu Agostinho, Kialunda Sozinho, Paula Lino, Bráulio de Melo, Mateus Mutokola, Mateus Landa, Frederico Neves, Mauro Mendes, Paulo (Diego), Vanilson da Costa, Cláudio (Dário), Eidilson Simão, Abraão Manuel, Eduardo de Almeida, Giuliana Gaino, Evelize Muniz, Maria Erizalda, Luciano da Rocha.

À Eunice Palmira Fonseca Roque, uma das melhores mães do mundo.

À Milma de Brito Dala, Merícia de Andrade Lobo (da Silva Pinto), Maina da Costa pelo tempo, dedicação, carinho, por tudo.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), por ser uma ótima universidade pública e gratuita, cuja infraestrutura, garantia de acesso e permanência, fornecimento de profissionais e apoios necessários têm contribuído cada vez mais para a formação e realização de sonhos de vários estudantes nacionais e estrangeiros.

Aos Laboratórios de Engenharia Química e Energias Renováveis (LEQER), Laboratório de Energia de Biomassa, laboratórios do curso de Engenharia Florestal da UFPR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC).

Por fim, agradeço aos meus amigos, amigas, companheiros e companheiras espalhados/(as) em Angola, no Brasil e no mundo, que direta e/ou indiretamente têm tornado a minha jornada mais feliz.

Meus agradecimentos a todos e todas.

Muito obrigado!

Poucas coisas fazem tanto sentido na vida. Portanto, procuro manter-me “bem como sempre” e viver o melhor que a vida tem, porque ela é bela para ser curta (MARTINS, 2022).

RESUMO

Este estudo avaliou a ação de microrganismos naturais presentes na biomassa lignocelulósica sobre o desempenho de bioprocessos anaeróbios, realizado em três etapas, com biomassa de palmito pupunha e capim-elefante. Foram investigadas a caracterização da biomassa, a diversidade microbiana e a eficiência na produção de açúcares, ácidos orgânicos e etanol para produção de biogás. Os testes em reatores [Reator 1 (A), Reator 2 (B) e Reator 3 (C)], com o capim-elefante mostraram que a suplementação com sacarose e ácido acético, em conjunto com a agitação, favoreceu o crescimento microbiano, principalmente de enterobactérias, *Staphylococcus* e bactérias fermentativas. O Reator 1 (A) destacou-se com pH entre 6,8 e 7,2, relação C/N de 25:1 e alta remoção de sólidos voláteis (>60%), indicando maior eficiência na conversão da biomassa. Na fermentação sólida, o capim-elefante se mostrou promissor, apresentando liberação de glucose (13,1 g/L) com 2% de ácido e 10 a 20 dias de residência. Concentrações superiores (3-4%) reduziram a glucose e aumentaram os subprodutos indesejáveis, como ácido fórmico e etanol. Os resultados sugerem que a microbiota epifítica contribui para a degradação da biomassa e na formação de compostos intermediários, otimizando o processo fermentativo. Conclui-se que o controle de parâmetros físico-químicos e a interação com a microbiota endógena são essenciais para a eficiência da digestão anaeróbia e da produção de biogás, além de contribuir para a inibição de odores.

Palavras-chave: Biogás; Biomassa lignocelulósica; Digestão anaeróbia;
Fermentação; Microbiota epifítica.

ABSTRACT

This study evaluated the action of natural microorganisms present in lignocellulosic biomass on the performance of anaerobic bioprocesses, carried out in three stages, using biomass from peach palm and elephant grass. The characterization of the biomass, microbial diversity, and efficiency in producing sugars, organic acids, ethanol, and biogas was investigated. Tests in reactors [Reactor 1 (A), Reactor 2 (B) and Reactor 3 (C)] with elephant grass showed that supplementation with sucrose and acetic acid, combined with agitation, favored microbial growth, mainly of enterobacteria, Staphylococcus, and fermentative bacteria. Reactor 1 (A) stood out with a pH between 6.8 and 7.2, a C/N ratio of 25:1, and high removal of volatile solids (>60%), indicating greater efficiency in biomass conversion. In solid fermentation, elephant grass proved promising, showing higher glucose release (13.1 g/L) with 2% acid and a residence time of 10 to 20 days. Higher concentrations (3-4%) reduced glucose and increased undesirable byproducts such as formic acid and ethanol. The results suggest that epiphytic microbiota contribute to biomass degradation and the formation of intermediate compounds, optimizing the fermentation process. It is concluded that controlling physicochemical parameters and interacting with endogenous microbiota are essential for the efficiency of anaerobic digestion and biogas production, as well as for odor inhibition.

Keywords: Biogas; Lignocellulosic biomass; Anaerobic digestion; Fermentation.

Epiphytic microbiota.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELOS DE BIODIGESTORES	29
FIGURA 2 - BIODIGESTOR CSTR VERSÃO BÁSICA	30
FIGURA 3 - TEMPERATURA, FATOR QUE INFLUENCIA NO PROCESSO DEDIGESTÃO.....	34
FIGURA 4 - MICRORGANISMOS.....	37
FIGURA 5 - ÁGAR MACCONKEY MOSTRANDO BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE	43
FIGURA 6 - ÁGAR MACCONKEY ADICIONADO DE ESCHERICHIA-SALMONELLA- SHIGELLA.....	44
FIGURA 7 - ESCHERICHIA COLI (OXIDASE NEGATIVA)	44
FIGURA 8 - CONTAMINANTE BURKHOLDERIA CEPACIA	45
FIGURA 9 - STAPHYLOCOCCUS SP. EM MEIO DE CULTURA SM (AGAR SAL MANITOL - MANITOL SALT AGAR (MSA)).....	47
FIGURA 10 - CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS EM ÁGAR VRBG	48
FIGURA 11 - FERMENTAÇÃO ÁCIDA MISTA DE ENTEROBATÉRIAS.....	48
FIGURA 12 - MICROORGANISMOS AERÓBIOS MSESÓFILOS EM MEIO DE CULTURA SM.....	49
FIGURA 13 - ENUMERAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS NO MEIO DE CULTURA SDA.....	50
FIGURA 14 - VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS.....	51
FIGURA 15 - CONVERSÃO DO BIOGÁS POR MEIO DA OXIDAÇÃO TÉRMICA DO METANO.....	52
FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E DO NÚMERO DE PLANTAS NO BRASIL.....	54
FIGURA 17 - INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS	55
FIGURA 18 - GEOLOCALIZAÇÃO DE CURITIBA, REGIÃO DO CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR	60
FIGURA 19 - FOTOS DO CAPIM ELEFANTE	60
FIGURA 20 - BIOREATORES USADOS NOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	68
FIGURA 21 - MISTURA E HOMOGENEIZAÇÃO.....	69
FIGURA 22 - REATORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	70

FIGURA 23 - LIXIVIADO EXTRAÍDO.....	71
FIGURA 24 - ALÍQUOTAS DO LIXIVIADO CENTRIFUGADAS PARA CROMATOGRAFIA	72
FIGURA 25 - BIOREATOR INFORS HT MULTIFORS 2.....	73
FIGURA 26 - BIOMASSA UTILIZADA.....	74
FIGURA 27 - VASOS REACIONAIS E BECKER COM CAPIM-ELEFANTE FRESCO UTILIZADO NO	74
FIGURA 28 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS NOS REATORES 1 E 2.....	75
FIGURA 29 - RESULTADOS DAS PLACAS MCCK (SALMONELLA SP., SHIGELLA E COLIFORMES).....	77
FIGURA 30 - RESULTADO DAS PLACAS PSA (PSEUDOMAS).....	79
FIGURA 31 - CRESCIMENTO MICROBIANO PLACAS PSA NOS DIFERENTES REATORES	83
FIGURA 32 - RESULTADOS DAS PLACAS SM (STAPHYLOCOCCUS SP.).....	84
FIGURA 33 - RESULTADOS DAS PLACAS VRBGA (ENTEROBACTÉRIAS).....	87
FIGURA 34 - DENSIDADE MÉDIA DE COLÔNIAS POR MEIO E REATOR.....	91
FIGURA 35 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-	98
FIGURA 36 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-	100
FIGURA 37 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	102
FIGURA 38 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS NO.....	102
FIGURA 39 - VARIAÇÃO TEMPORAL DOS COMPONENTES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA PARA CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO ÁCIDA.....	103
FIGURA 40 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO COM A BIOMASSA, COM SOLUÇÕES DE SACAROSE A 50% E ÁCIDO ACÉTICO A 4% DURANTE 0, 10 E 20 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 3)	108

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DO CAPIM-ELEFANTE	26
QUADRO 2 - CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO ENTRE OS REATORES	78
QUADRO 3 - DENSIDADE E DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA ENTRE OS	85
QUADRO 4 - PANORAMA GERAL DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA	90
QUADRO 5 - INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS	95
QUADRO 6 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA	106
QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CAPIM-ELEFENATE AO LONGO DO SEU	27
TABELA 2 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM ANALISADOS PARA A ESCOLHA DO.....	32
TABELA 3 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM ANALISADOS PARA A ESCOLHA DO.....	32
TABELA 4 - TEMPERATURA, FATOR QUE INFLUENCIA NO PROCESSO DE DIGESTÃO.....	34
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS.....	51
TABELA 6 - MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO.....	70
TABELA 7 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE.....	71
TABELA 8 - COMPARAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE OS REATORES UTILIZANDO PLACAS.....	81
TABELA 9 - COMPARAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE REATORES UTILIZANDO PLACAS.....	88
TABELA 10 - RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E ATIVIDADE MICROBIANA	93
TABELA 11 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-	98
TABELA 12 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-	100
TABELA 13 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO COM A BIOMASSA, COM SOLUÇÕES DE SACAROSE A 50% E ÁCIDO ACÉTICO A 4% DURANTE 0, 10 E 20 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 3)	108

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA*	- Ácido Acético
ABCP	- Associação Brasileira de Celulose e Papel
ADP	- Difosfato de Adenosina
AGV	- Ácidos Graxos Voláteis
AIL	- Lignina Insolúvel em Ácido
AQ	- Água quente
ASL	- Lignina Solúvel em Ácido
ATP	- Adenosina Trifosfato
BDA	- Ágar batata dextrose
BLC	- Biodigestor de Lagoa Coberta
BRS	- Sigla do inglês de " <i>Brazilian Recommended Name</i> " ou Nome Recomendado Brasileiro
CIBIOGÁS	- Centro Internacional de Energias Renováveis
CEPEA	- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CHP	- Sigla do inglês de " <i>Combined Heat and Power</i> " ou Cogeração de Energia
CNA	- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
COV	- Carga orgânica volumétrica
CSTR	- Sigla do inglês de " <i>Continuous Stirred Tank Reactors</i> " ou Reator de Tanque com Agitação Contínua
SDA	- Agar Dextrose Sabouraud
DIR.	- Direta
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPE	- Empresa de Pesquisa Energética
Eq.	- Equação
ESQ.	- Esquerda
FDN	- Fibra em Detergente Neutro
HPLC	- Sigla do inglês de " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> " ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Resolução (CLAE)
IAC	- Instituto Agrônomo de Campinas
<i>in vivo</i>	- Pela utilização de células vivas ou cobaias
<i>in vitro</i>	- Pela utilização de meios de cultura inanimado

LEQER	- Laboratório de Engenharia Química e Energias Renováveis
LIG	- Lignina
MCCK	- Agar MacConkey
MS	- Matéria seca
NDT	- Nutrientes Digestíveis Totais
NREL	- Sigla do inglês de " <i>National Renewable Energy Laboratory</i> " ou Laboratório Nacional de Energia Renovável
PB	- Proteína Bruta
PCI	- Poder calorífico inferior
PIB	- Produto Interno Bruto
PFR	- Sigla do inglês de " <i>Plug-Flow Reactors</i> " ou Reatores Tubulares
PSA	- Agar Cetrimida
RenovaBio	- Política Nacional de Biocombustíveis
RSU	- Resíduos Sólidos Urbanos
s.d.	- Abreviatura do termo "sem data"
SM	- Agar Sal Manitol
s.p.	- Abreviatura do termo "sem número de página"
sp.	- Abreviatura do nome do gênero de "espécie" não identificada
spp.	- Abreviatura do nome do gênero de "espécies" não identificadas
SS	- Sólidos em Solúveis
ST	- Sólidos Totais
SV	- Sólidos Voláteis
TC	- Teor de cinzas
TSA	- Agar Triptona de Soja
UASB	- Sigla do inglês de " <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> " ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA)
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
USP	- Universidade de São Paulo
VRBGA	- Agar Violeta Vermelho Neutro Glucose

LISTA DE SÍMBOLOS

®	- marca registrada
atm	- pressão atmosférica
C/N	- relação carbono/nitrogênio
ET	- Etanol:Tolueno
Kcal/m ³	- quilocaloria por metro cúbico
KgSV/m ³ .d ⁻¹	- carga orgânica volumétrica
kWh/m ³	- <i>quilowatt</i> -hora por metro cúbico ou consumo de gás (ou demanda de energia acumulada)
mL.min ⁻¹	- mililitros por minutos
mmol.L ⁻¹	- milimoles por litro (ou molaridade e concentração em massa)
ADH	- Dinucleotido de nicotinamida e adenina
NAD ⁺	- Forma oxidada de NADH
PA	- para análise (Ex.: Ácido Acético PA)
pH	- potencial hidrogeniônico
pO ₂	- pressão parcial do oxigênio
ppm	- partes por milhão
SV/ST	- Relação sólidos voláteis/sólidos totais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	23
1.2 JUSTIFICATIVA	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	25
Capim-Elefante.....	25
2.2 BIODIGESTORES E BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	28
Tipos de Biodigestores	28
Biodigestão Anaeróbia	33
2.2.1 Fatores que influenciam a biodigestão	33
2.2.1.1 Etapas da biodigestão anaeróbia	35
Microrganismos na Biodigestão	37
2.2.1.2 Microrganismo epifíticos	38
2.2.1.3 Caracterização microbiana utilizando métodos convencionais.....	38
2.2.1.4 Agars utilizadas para as análises microbiológicas.....	39
2.2.1.5 Identificação de microrganismos	42
2.3 GASES PROVENIENTES DA FERMENTAÇÃO.....	50
Biogás e Biometano	50
2.3.1.1 Biogás.....	50
2.3.1.2 Biometano	52
2.3.1.3 Panorama e Impactos da Produção Industrial de Biogás no Brasil	53
2.4 HIDRÓLISE ÁCIDA ACÉTICA E FERMENTAÇÃO	56
Hidrólise Ácida Acética.....	56
Fermentação Láctica.....	56
Fermentação Alcoólica (Etanoica).....	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 LOCAIS E ETAPAS.....	59
• Etapa 1: Estudo com capim-elefante e seus microrganismos epifíticos.....	59
• Etapa 2: Fermentação no estado sólido (dry digestion), da biomassa, com seus microrganismos epifíticos	59

•	Etapa 3: Fermentação no estado líquido (liquid digestion)	59
3.2	BIOMASSA E MICRORGANISMOS UTILIZADOS	59
	Capim-Elefante	59
	Microrganismos Epifíticos	60
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS DE ENSAIO E ANÁLISE	61
	Amostragem	61
3.3.2	Análises Físico-Químicas e Químicas	61
3.3.1.1	Análise do Teor de Água – Biomassas	61
	A determinação da massa seca seguiu a metodologia TAPPI T 550 (1996).	61
3.3.1.2	Teor de umidade - Água Livre	62
3.3.1.3	Análise do Teor de Cinzas - Biomassas	62
3.3.1.4	Teor de Cinzas – Fermentados	63
3.3.1.5	Análise de Extraíveis - Biomassas	63
3.3.1.6	Extraíveis - Fermentados	63
3.3.1.7	Análise de Klason	64
3.3.1.8	Determinação de carboidratos estruturais e lignina	65
3.3.1.9	Análise do teor de Ácidos Orgânicos	66
3.3.3	Análise Microbiana, Meios de Cultura e Placas para Identificação	66
3.3.4	Bioreatores - Fermentação no estado sólido (dry digestion)	67
3.3.4.1	Relação inóculo/substrato	67
3.3.4.2	Fermentação no Estado Sólido a seco	67
a)	Montagem dos Bioreatores e Conversão Ácida da Biomassa	68
b)	Parâmetros físico-químicos selecionados	71
c)	Obtenção do Extrato lixiviado	71
3.3.6	Reatores e Bioprocessos de Fermentação no estado líquido (liquid digestion)	72
a)	Incubadora refrigeradora com agitação - Reator anaeróbio 3 (C)	72
	4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES DA BIOTA MICROBIANA	76
4.1.1	Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas MCCK	76
4.1.1.1	Primeira Análise Comparativa - Placa MCCK	77
4.1.1.2	Comparação entre as Placas MCCK (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)	77

4.1.1.3 Comparação entre as Placas de MCCK (B) - Reator (B) vs. Reator 3 (C Branco)	78
4.1.2 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas PSA.....	79
4.1.2.1 Primeira análise comparativa - Placa PSA	80
4.1.2.2 (B) Placas PSA (A) - Comparação entre Reator 1 (A) e Reator 3 (C - Branco)	80
4.1.2.3 (C) Placas PSA (B) - Comparação entre Reator 2 (B) e Reator 3 (C Branco)	80
a) Pseudomonas spp.	81
4.1.3 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SM.....	83
4.1.3.1 (A) Placa SM - Primeira Análise Comparativa	84
4.1.3.2 (B) Placas SM (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)	84
4.1.3.3 (C) Placas SM (B) - Reator 2 (B) vs. Reator 3 (C - Branco)	84
Staphylococcus sp.	85
4.1.4 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SM.....	86
4.1.5 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas VRBGA	87
4.1.5.1 (A) Placa VRBGA - Primeira Análise Comparativa.....	87
4.1.5.2 (B) Placas VRBGA (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)	87
4.1.5.3 (C) Placas VRBGA (B) - Reator 2 (B) vs. Reator 3 (C - Branco).....	88
a) Enterobactérias.....	89
4.1.6 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SDA.....	89
4.1.6.1 Panorama Geral dos Resultados da Análise Microbiana	90
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	92
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	97
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO.	107
5 CONCLUSÕES.....	111
5.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	111
5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renováveis e sustentáveis torna-se cada vez mais urgente diante do esgotamento dos recursos fósseis e da crescente preocupação com as mudanças climáticas. No contexto brasileiro, o agronegócio, importante motor da economia nacional, é também um dos principais geradores de resíduos orgânicos. Assim, a valorização e o reaproveitamento desses resíduos despontam como alternativas viáveis para a produção de energia limpa e a mitigação de impactos ambientais.

Esta dissertação avalia o potencial da microbiota epifítica associada a biomassas lignocelulósicas, com foco no capim-elefante, para a produção de biogás, uma vez que o resíduo de palmito pupunha foi considerado amostra branca (nível zero), não apresentando resultados compatíveis com os objetivos do estudo. A biodigestão anaeróbia, conduzida em biorreatores, apresenta-se como uma estratégia promissora para converter biomassa em biogás, um combustível renovável com potencial energético relevante e papel estratégico na mitigação das emissões de gases de efeito estufa.

A biodigestão anaeróbia é um processo biotecnológico no qual microrganismos atuam na conversão da matéria orgânica em biogás, em ambiente isento de oxigênio. A biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, representa uma fonte promissora de energia renovável. No entanto, a presença de lignina e hemicelulose confere maior resistência à degradação microbiana, exigindo o desenvolvimento de estratégias que favoreçam a hidrólise e fermentação dessa biomassa (MANYI-LOH; LUES, 2023; BHARADWAJ, 2024).

Além da conversão da biomassa, destaca-se a purificação do biogás para obtenção de biometano, mediante a remoção de dióxido de carbono (CO_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e outras impurezas, o que amplia sua aplicabilidade como biocombustível ou no setor energético (CASTELLANOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2023; *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL ENGINEERING*, 2024).

A escolha adequada da espécie forrageira é um fator determinante na produtividade e eficiência dos bioprocessos, dependendo diretamente do objetivo e da metodologia empregada. Assim, o presente estudo compreende análises físico-químicas da biomassa lignocelulósica, conforme protocolos normatizados, seguidas

pela caracterização da biota natural epifítica, utilizando métodos microbiológicos específicos e meios de cultura seletivos.

As análises microbiológicas foram conduzidas em diferentes meios de cultura (placas prontas da BIOCEN®): Agar MacConkey (MCCCK) para *Salmonella sp.*, *Shigella* e coliformes; Agar Cetrimide (PSA) para *Pseudomonas*; Agar Sal Manitol (SM) para *Staphylococcus sp.*; Agar Triptona de Soja (TSA) para microrganismos aeróbios mesófilos; Agar Violeta Vermelho Neutro Glucose (VRBGA) para enterobactérias; e Agar Dextrose Sabouraud (SDA) para bolores e leveduras.

Esses procedimentos visam identificar e quantificar a microbiota epifítica naturalmente presente nas biomassas estudadas, bem como avaliar sua adaptação e desempenho em bioprocessos de digestão anaeróbia e fermentação, em estado líquido e sólido. O foco central da pesquisa é acompanhar o desenvolvimento microbiano e sua eficiência metabólica na produção de açúcares, ácidos orgânicos, fenóis, etanol e, posteriormente, biogás.

Dessa forma, torna-se essencial aprofundar o conhecimento sobre os microrganismos epifíticos que compõem essas biomassas, ressaltando a importância da caracterização laboratorial e da utilização de métodos específicos para cada grupo microbiano. Ressalta-se que o estudo tem como foco o perfil bioquímico dos microrganismos, sem abordar diretamente o metabolismo enzimático (como a formação de enzimas ou moléculas energéticas ATP/ADP), limitando-se à análise e discussão dos microrganismos efetivamente desenvolvidos durante os bioprocessos.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo principal foi converter resíduos lignocelulósicos em moléculas de maior valor agregado e energético, contribuindo para compreender a contribuição de microrganismos epifíticos nos processos fermentativos. Avaliar a capacidade de criar um meio de cultura epifítico com base nas mudanças no ambiente decorrentes da presença de ácido etílico e ácido acético.

Objetivo geral

Avaliar a ação de microrganismos epifíticos em bioprocessos anaeróbios, mensurando a produção de açúcares, ácidos orgânicos, etanol e biogás.

Objetivos específicos

- Caracterizar as propriedades físico-químicas da biomassa lignocelulósica de capim-elefante, com foco no seu uso em digestão anaeróbica.
- Identificar os microrganismos epifíticos presentes nesta biomassa por meio de métodos microbiológicos específicos, a fim de avaliar a diversidade microbiana.
- Quantificar a produção de açúcares, ácidos orgânicos, fenóis e etanol durante os processos fermentativos, a fim de monitorar a eficiência metabólica dos microrganismos.
- Estabelecer parâmetros do processo que favoreçam o crescimento microbiano e a produção de ácidos orgânicos, com o intuito de otimizar a fermentação, reduzir odores e melhorar a qualidade do biogás.

1.2 JUSTIFICATIVA

O presente projeto fundamenta-se na constatação de que o aproveitamento da fitobiomassa representa uma alternativa ambientalmente adequada e tecnicamente viável para obtenção de biogases, considerando a ampla disponibilidade e baixo custo da matéria-prima utilizada.

Além disso, justifica-se pela necessidade de promover a conscientização da sociedade sobre os impactos ambientais decorrentes da emissão de gases de efeito estufa, reforçando a importância de práticas sustentáveis que contribuam para a mitigação da poluição e para a transição energética.

Considerando que os combustíveis fósseis ainda representam a principal fonte de energia utilizada globalmente, diversos pesquisadores têm buscado fontes alternativas que reduzam a dependência desses recursos. Nesse contexto, o Brasil se destaca por suas condições climáticas e geográficas favoráveis ao desenvolvimento de energias renováveis, embora ainda demande incentivos e investimentos públicos e privados para o avanço tecnológico e a consolidação do setor.

Daí a importância de trabalhar com estes biogases, principalmente o biogás, que surge, portanto, como uma das alternativas tecnológicas mais promissoras para o combate às mudanças climáticas, conforme reconhecido pela *World Biogas Association* (WBA, 2023). Sua utilização contribui significativamente para a redução

das emissões de gases de efeito estufa, a diminuição dos impactos da agropecuária, a geração de energia elétrica e térmica, além da produção de biofertilizantes e da criação de novas oportunidades econômicas e de emprego.

A biomassa escolhida - o capim-elefante - foi selecionada por representar microrganismos típicos de gramíneas, com alta adaptabilidade e crescimento eficiente em ambientes anaeróbios fermentativos.

O potencial brasileiro é reforçado pelo desempenho do agronegócio: segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), cerca de 21,4% do PIB nacional em 2019 teve origem nesse setor, sendo 68% do segmento agrícola e 32% da pecuária. O crescimento de 9,81% no PIB agropecuário em 2021 demonstra o vigor econômico e a relevância estratégica desse campo produtivo (CEPEA, 2021).

Diante desse cenário, a pesquisa busca não apenas explorar o potencial biotecnológico de resíduos agrícolas, mas também contribuir para o fortalecimento da bioeconomia e para a integração de soluções sustentáveis na matriz energética nacional.

Por fim, a dissertação foi estruturada em cinco (5) capítulos: o primeiro apresenta a introdução, o tema, a justificativa e a estrutura do trabalho; o segundo capítulo, a revisão de literatura, reúne fundamentos teóricos e estudos prévios; o terceiro capítulo descreve os materiais e métodos utilizados; o quarto capítulo aborda os resultados e discussão; e o quinto e último capítulo apresenta as considerações finais, limitações do estudo e recomendações para futuras pesquisas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

A biomassa é toda substância orgânica ou qualquer matéria vegetal que pode ser utilizada como fonte de energia (NETO *et al.*, 2010; SILVA; COELHO, 2023). É, geralmente, formada pelo dióxido de carbono da atmosfera e água na fotossíntese combinados, produzindo assim os hidratos de carbono, onde a energia solar é armazenada nas ligações químicas dos componentes estruturais da biomassa (MARTINS *et al.*, 2023).

A biomassa pode ser obtida de vegetais não lenhosos como sacarídeos, celulósicos, amiláceos, aquáticos; de vegetais lenhosos como madeiras; de resíduos orgânicos como agrícolas, urbanos e industriais; e de biofluidos como óleos vegetais (como a mamona e a soja) (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008; PIMENTA, *et al.*, 2022)

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por lignina, hemiceluloses e celulose, sendo a maior parte de sua composição a celulose. A partir dela, é possível obter glucose, que, quando fermentada, pode produzir etanol (KASCHUK, 2016; SILVÉRIO *et al.*, 2021; SILVA; COELHO, 2023).

Quanto ao uso no Brasil, as primeiras biomassas utilizadas na produção de biogás foram resíduos vegetais, resíduos sólidos urbanos (RSU), resíduos industriais, resíduos animais e resíduos florestais (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008, EPE, 2024; MARCUCCI *et al.*, 2025).

Neste estudo, foi utilizado o capim-elefante como biomassa para a obtenção de açúcares, ácidos orgânicos e etanol e, posteriormente, para a produção de biogás.

Capim-Elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma gramínea perene de rápido crescimento, amplamente utilizada na alimentação animal e na produção de biomassa (GUIMARÃES, 2022).

A composição química do capim elefante é rica em carboidratos e outros componentes que podem ser convertidos em biogás por meio da biodigestão anaeróbia (ASSIS, 2024; JOHANNES, 2024).

Estudos de Silva Carvalho *et al.* (2018), Rosa *et al.* (2019) e Coelho *et al.* (2024), abordam as características agrônômicas do capim elefante e o seu potencial como fonte de biomassa para a produção de biogás.

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DO CAPIM-ELEFANTE

ELEMENTOS	CARACTERÍSTICAS
Altitude	Desde o nível do mar até 2.200 metros, e até 1.500 metros.
Temperatura	De 18 a 30 °C, sendo 24 °C uma boa temperatura.
Precipitação	De 800 a 4.000 mm. Vegeta em regiões quentes e úmidas com precipitação anual de mais de 1.000 mm, com cerca de 70 a 80% de produção na época das águas.
Radiação	Difícil de saturar, mesmo em ambientes com elevada radiação. Possui alta eficiência fotossintética.
Solo	Adapta-se a diferentes tipos de solo, com exceção dos solos com possíveis inundações.
Topografia	Possibilidade de cultivo em terrenos com declives de até 25% devido ao seu baixo controle da erosão do solo.
Fertilidade	Exigente em relação aos nutrientes; e não tolera baixo pH e Alumínio no solo.
Propagação	Por via vegetativa, utilizando-se colmos; poucas sementes são viáveis, tendo um valor cultural próximo a 30%.
Associação	Difícil associar-se a leguminosas, porém, podendo facilitar quando mantida próximo aos 60 cm.

FONTE: Adaptado Silva Carvalho *et al.* (2018), Rosa *et al.* (2019) e Coelho *et al.* (2024).

Como se pode observar no QUADRO 1, trata-se de informações agronômicas do capim-elefante, que são fundamentais para o planejamento do cultivo e para garantir sua produtividade como fonte de biomassa para biogás. A espécie adapta-se a altitudes de até 1.500 metros, apresenta alta eficiência fotossintética e tolera variações de temperatura, incluindo frio e geadas, dependendo da cultivar. Sua produtividade está diretamente ligada à distribuição da precipitação ao longo do ano, à profundidade das raízes e à qualidade do solo, sendo sensível ao encharcamento e a solos mal drenados. Além disso, seu manejo deve considerar a agressividade em consórcios, permitindo associações com leguminosas como soja, siratro e kudzu quando mantidas a certa distância. Esses fatores são determinantes para a produção consistente de biomassa, necessária para processos de biodigestão anaeróbia.

O capim-elefante é bastante exigente quanto ao solo, onde quanto mais profundos e friáveis, melhor, podendo assim haver possibilidade de realização de práticas de reposição de nutrientes (NYAMBATI; WAMBUI; OUMA, 2023).

As suas propriedades e características físicas como a textura, a estrutura e sua profundidade, desempenham papel limitante na seleção da(s) espécie(s) (*Pennisetum purpureum*) que conjuntamente com as propriedades químicas são decisivas para o seu desenvolvimento, podendo destacar a fertilidade do solo quando se buscam altas produções (CARVALHO *et al.*, 2018).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CAPIM-ELEFANTE AO LONGO DO SEU CRESCIMENTO

Idade de corte (dias)	MS (%)				
		PB	FDN	LIG	NDT
50	9,3	9,7	60,5	3,8	50,1
70	13,8	7,7	66,3	5,8	47,9
90	16,4	6,2	68,2	7,0	46,2
100	19,7	5,6	68,6	7,7	45,6

FONTE: Adaptado de Carvalho *et al.* (2018), ROSA *et al.* (2019).

LEGENDA: MS: Matéria seca; PB: Proteína Bruta; FDN: Fibra em Detergente Neutro; LIG: Lignina; NDT: Nutrientes Digestíveis Totais.

Na TABELA 1, pode se observar que a idade de corte é de extrema importância, uma vez que o capim elefante apresenta maior valor nutritivo quando cortado aos 50 dias, podendo chegar a 10% de proteína bruta. Já o corte com idade entre 90 e 100 dias implica na redução dos teores de proteína para aproximadamente 6%.

O clima é também um fator de extrema importância, uma vez que apesar de o capim elefante tolerar climas adversos, este não pode ser modificado, levando em consideração as adaptações e tolerâncias particulares de cada plantio.

É necessário que se atente à época adequada para o plantio, pois é de vital importância.

Períodos de temperaturas elevadas e chuvosos, concretamente em setembro ou outubro, são os mais adequados para semear ou plantar as espécies de forrageiras tropicais, com exclusividade para as gramíneas, mais especificamente o capim-elefante, isto é, para a região Sudeste do Brasil (EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, 2025; EMBRAPA GADO DE CORTE, 2025).

Quanto à sua produção no Brasil, segundo dados da Embrapa Gado de Leite (MG), entre as principais cultivares de capim-elefante, no ano de 2016, a cultivar de

BRS Capiaçú teve rendimento de 30% superior comparado aos de outras disponíveis no mercado, o que acabou gerando cerca de 50 toneladas de matéria seca por hectare ao ano.

A adubação do capim-elefante está relacionada a quantidades apreciáveis de nutrientes que extrai do solo, entre eles nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P), uma vez que se trata de uma planta com elevado potencial de produção de fitobiomassa. Assim sendo, requer solos com boa fertilidade para expressar o seu elevado potencial de produção (LAIANE, 2022).

A adubação nitrogenada deve vir acompanhada da adubação potássica, pois, a aplicação conjunta de N e K é responsável pela sua alta produção. Já adubação fosfatada apresenta efeitos residuais sobre a produção de matéria seca (MS) do capim elefante. Os níveis críticos de fósforo no solo geralmente mostraram-se estáveis (LAIANE, 2022).

Quanto à biomassa residual de palmito pupunha, foi inicialmente avaliada como material de referência (nível zero), não apresentou resultados compatíveis com os objetivos do estudo. Por essa razão, sua abordagem não foi incorporada ao referencial teórico, à metodologia nem aos resultados, direcionando-se a pesquisa exclusivamente ao capim-elefante.

2.2 BIODIGESTORES E BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Os biodigestores são equipamentos que utilizam microrganismos para converter matéria orgânica em biogás.

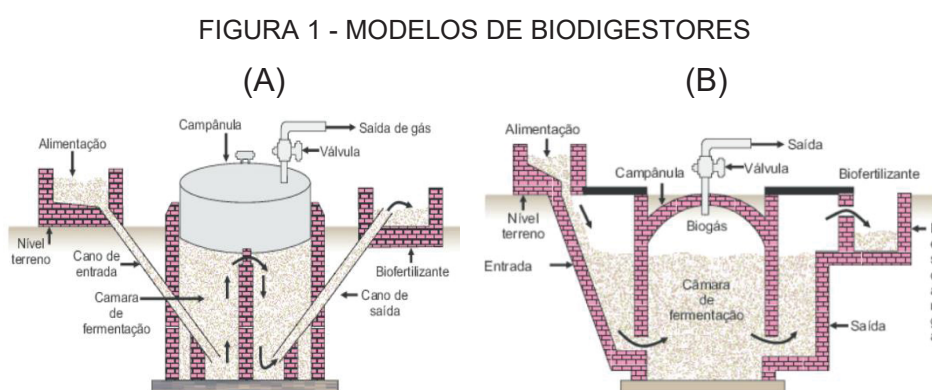
Tipos de Biodigestores

Existem diversos tipos de biodigestores, cada um com suas próprias características e vantagens.

Segundo Granato (2003) e Côrtes (2019), o primeiro biodigestor surgiu em Bombaim na Índia, no ano de 1857, cuja criação foi destinada à produção de gás combustível para um hospital de hansenianos¹.

¹A hanseníase (ou lepra como é popular e pejorativamente conhecida) é uma doença contagiosa causada pela *Mycobacterium leprae*, também conhecida como bacilo de Hansen, em homenagem ao cientista norueguês Gerhardt Henrik Armauer Hansen, pela descoberta desse microrganismo. A doença pode afetar os nervos periféricos e a pele, ocasionar a deformidade física, acarretando um forte traço de estigma social (ROLIM et al., 2006).

Devido ao aumento de interesse pela biodigestão, principalmente no campo e no trato sanitário, assistiu-se assim a grandes avanços da tecnologia, sobretudo, com o surgimento de várias propostas de biodigestores (BALMANT, 2009; MATHIAS, 2023). E ainda, os biodigestores são divididos em dois grandes grupos, os de uso agrícola e os de uso sanitário. Os biodigestores de uso agrícola possuem construção e forma de operação simples, podendo-se destacar dois (2) modelos, que são: o modelo indiano e o modelo chinês. Nas figuras 1 e 2, são apresentadas as concepções de biodigestores, mais especificamente as diferenças entre os dois modelos.



FONTE: Cassini *et al.* (2014).

LEGENDA: (A) MODELO INDIANO DE BIODIGESTOR; (B) MODELO CHINÊS DE BIODIGESTOR

Atualmente, tem se assistido cada vez mais ao aperfeiçoamento de metodologias para a produção de bioinsumos e biocombustíveis a partir de resíduos agrícolas.

Este cenário originou, nas últimas décadas, a necessidade de desenvolver novas tecnologias voltadas para a produção de energia de forma limpa e sustentável. Dessas novas tecnologias obtêm-se biogás como produtos de interesse.

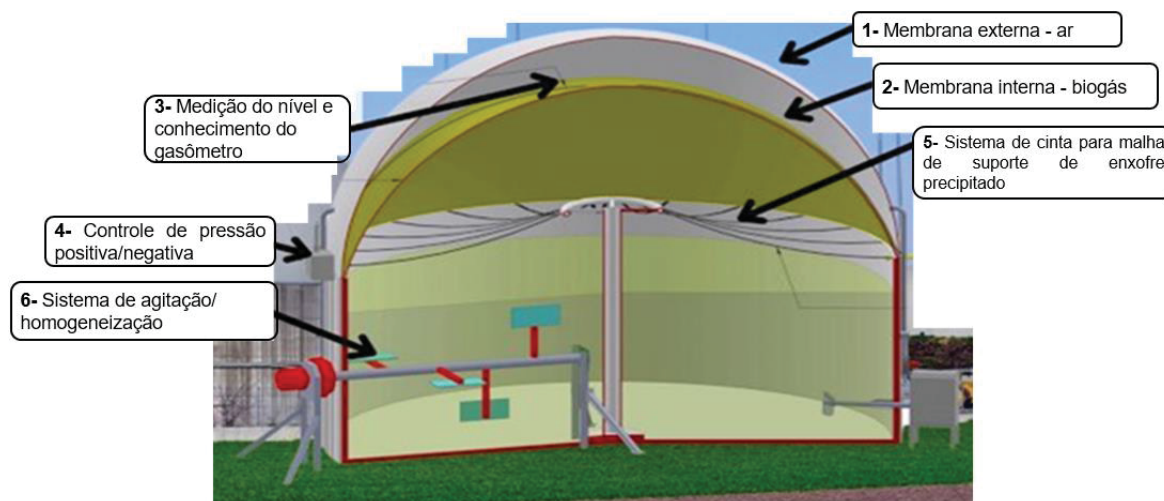
Os sistemas de fluxo ascendente (UASB), os sistemas de tanque agitado contínuo CSTR (sigla do inglês de “*Continuous Stirred Tank Reactors*”) e PFR (sigla do inglês de “*Plug-Flow Reactors*” ou Reatores Tubulares) e os sistemas de lagoa coberta (BLC) são exemplos de tecnologias comumente utilizadas.

Os biodigestores de uso sanitário têm capacidade de operar tanto no campo quanto nas plantas industriais. No caso específico do Brasil, a depender do setor, a escolha do tipo de biodigestor adequado para o desenvolvimento de processos consiste na compatibilidade entre as características da biomassa a ser utilizada e do

incentivo ou das condições financeiras de quem desenvolve (CIBIOGÁS, 2020; BARROS, 2021).

Os biodigestores do tipo CSTR, por serem perfeitamente agitados continuamente, são ideais em bioprocessos (BALMANT, 2009), capazes de proporcionar um maior contato entre o substrato e os microrganismos (BARCHMANN *et al.*, 2016). Possuem duas versões, a básica e a avançada, sendo a versão básica a mais usada (CIBIOGÁS, 2020). Na FIGURA 2 pode ser vista a divisão entre as membranas e o sistema de agitação.

FIGURA 2 - BIODIGESTOR CSTR VERSÃO BÁSICA



FONTE: Adaptado de Energia e Biogás (2022).

A versão básica do CSTR é construída sobre o solo, usada principalmente para dejetos animais. Já a versão avançada possui aspectos bem mais elaborados, usado principalmente em áreas cuja demanda em termos de resíduos é maior, o que resulta em maior investimento também. A versão avançada é mais usada no setor da agroindústria.

A temperatura, o pH, a alcalinidade, a vazão, o nível e outros parâmetros devem ser monitorados durante a produção de biogás no CSTR. Esses parâmetros são controlados por atuadores variados, incluindo o ajuste da temperatura interna do biodigestor, agitação, acionamento de bombas e abertura de válvulas, entre outros. (BARCHMANN *et al.*, 2016; BIOMASSA E ENERGIA, 2022).

Nesses tipos de biodigestores, o substrato é rapidamente homogeneizado/agitado com a massa de substrato mais antiga. Esta ação é constante ao longo do processo. Este procedimento é, também, responsável pela aceleração da

cinética do processo, possibilitando assim a estabilização de vários parâmetros, e resultando no aumento do desempenho da produção de biogás. (BARCHMANN *et al.*, 2016; CÔRTEZ, 2019).

A homogeneização constante e a agitação são essenciais para eliminar zonas mortas dentro da massa de substratos, garantindo uma distribuição uniforme da temperatura no biodigestor (BARCHMANN *et al.*, 2016).

O processo referido, que ocorre nestes biodigestores, conforme mostra a FIGURA 3, é o anaeróbio e, geralmente, ocorre no modo mesofílico (entre 30 °C e 41 °C) (LIMA, 2022).

Portanto, o CSTR versão avançada é mais compacta em comparação com a versão básica; nele há maior facilidade de aquecimento e agitação; tem um sistema de operação mais complexo e possui uma vasta gama de aplicações; e, em função de sua construção, a sua manutenção é mais complexa e é mais cara.

Além do CSTR (principalmente a versão avançada), no setor da agroindústria, são também utilizados os biodigestores UASB (sigla do inglês de “*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*”, proposto por Lettinga e colaboradores (1980), sendo um reator anaeróbio compacto, de fluxo ascendente de alta eficiência no tratamento de remoção de matéria orgânica do efluente por um tempo de retenção muito baixo (ordem de horas), dependendo do tipo de efluente. É normalmente utilizado em processos primários para a estabilização da matéria orgânica inicial, cujo curto tempo de retenção é um diferencial em relação aos biodigestores CSTR.

Além dos supracitados, existem outros tipos de biodigestores, como o do tipo lagoa coberta (BLC), que existe em duas formas de construção (retangular e circular) entre outros, para tratamento de efluentes líquidos, por exemplo.

Em meio à tamanha complexidade dos vários tipos de biodigestores, é preciso atentar para a escolha do biodigestor a ser adotado, em função da motivação e dos objetivos a que se pretende chegar, considerando a importância de seguir determinados critérios (BALMANT, 2009).

Nas tabelas 2 e 3 podem-se observar alguns dos principais critérios (ou parâmetros) a serem analisados para a escolha do biodigestor adequado.

TABELA 2 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM ANALISADOS PARA A ESCOLHA DO BIODIGESTOR ADEQUADO (1)

Crítérios	Parâmetros	Classificação	Observação
Teor de matéria seca dos substratos	ST < 20%	digestão úmida	Substratos bombeáveis
	ST > 20%	digestão seca	Substratos empilháveis

FONTE: Adaptado de Kunz et al. (2019).

Portanto, parâmetros como o teor de sólidos totais (ST), o teor de sólidos voláteis (SV) e a carga orgânica volumétrica (COV) são dos principais a serem considerados na escolha do tipo de biodigestor adequado.

TABELA 3 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM ANALISADOS PARA A ESCOLHA DO BIODIGESTOR ADEQUADO (2)

Biodigestor	Concentração ST	COV
BLC	ST < 20%	0,3 a 8,0 KgSV/m ³ .d
CSTR	ST < 20%	1 a 4 KgSV/m ³ .d
UASB	ST < 300 mg/L	0,5 a 8,0 KgSV/m ³ .d
Digestão seca	ST > 20%	Até 15 KgSV/m ³ .d

FONTE: Adaptado de Kunz et al. (2019).

Apesar do que as tabelas 2 e 3 trazem, sobre os principais critérios ou parâmetros a serem analisados para a escolha do biodigestor adequado, fica claro que é importante salientar que não existe uma tecnologia específica para cada substrato, mas sim tecnologias que são mais empregadas para cada setor, ou seja, a escolha do tipo de biodigestor depende de fatores como o tipo de biomassa utilizada, o volume de resíduos gerados, as condições climáticas e os objetivos da produção.

Portanto, considerando que nos relatos supracitados se tratam dos modelos mais falados quando o assunto são biodigestores (ou bioreatores), no presente estudo, os processos anaeróbios usados estão sendo considerados como CSTR, adequados às necessidades e aos objetivos do mesmo, capazes de usar microrganismos para converter a biomassa, além de outros cujos relatos e/ou acervo é ainda bastante reduzido, e pelo fato de não ser muito viável economicamente o uso de outros como batelada, por exemplo, devido ao processo repetitivo e demorado.

Biodigestão Anaeróbia

A biodigestão anaeróbia surge em resposta às buscas por fontes de energias alternativas economicamente viáveis, face ao aumento do preço do petróleo, e em propriedades rurais, por exemplo.

É um processo natural que envolve a degradação e estabilização da matéria orgânica, como dejetos animais, por bactérias, transformando-os em biogás e bioinsumo, ou seja, levando à formação de metano, produtos inorgânicos (dióxido de carbono) e resíduos líquidos ricos em minerais que podem ser utilizados como bioinsumo (SCHIEVANO *et al.*, 2011; EMBRAPA, 2023).

2.2.1 Fatores que influenciam a biodigestão

A biodigestão anaeróbia é um processo complexo afetado por diversos fatores, como a temperatura, o pH, a alcalinidade, a carga orgânica volumétrica (COV) X tempo de retenção hidráulica (TRH), a concentração de nutrientes e a presença de inibidores (CIBILOGÁS, 2020).

A temperatura ótima para a biodigestão anaeróbia varia de acordo com o tipo de microrganismo envolvido no processo.

Segundo Chen, Zhang e Liu (2021), e Wang, Zhao e Li (2023), o processo de biodigestão anaeróbia pode ocorrer em temperaturas superiores a 10 °C e inferiores a 65 °C, condições em que a produção de CH₄, por exemplo, pode ocorrer em duas situações que podem ser consideradas ótimas, nomeadamente a fase mesofílica (40 °C) e a fase termofílica (50-55 °C), podendo assim considerar a temperatura de 35 °C como ótima para um processo, se considerar uma amplitude de 30 °C a 37 °C. De modo geral, a faixa mesofílica (30°C a 40°C) é a mais comum em sistemas de biodigestão em países tropicais, como o Brasil.

A temperatura influencia a velocidade de crescimento e metabolismo das bactérias, como podemos ver na TABELA 4 e na FIGURA 3.

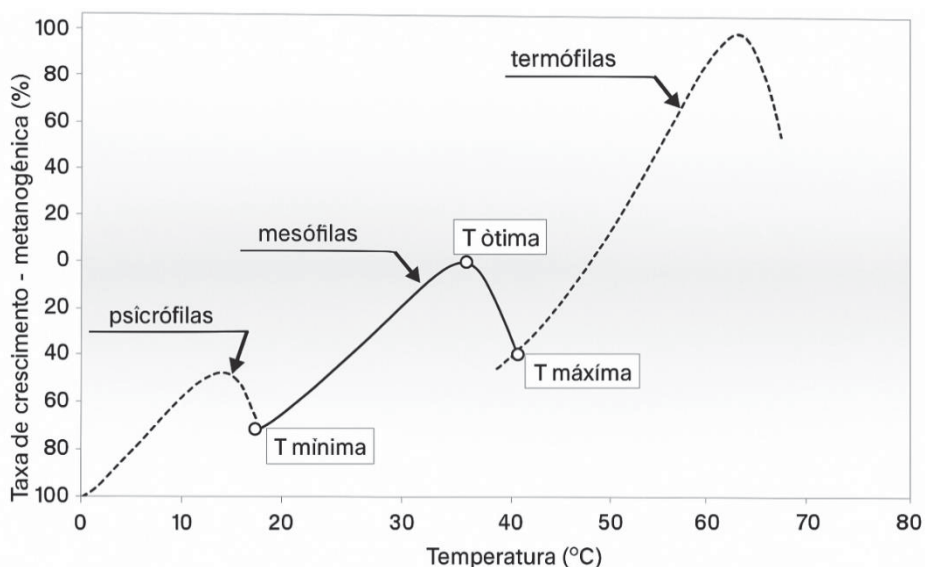
TABELA 4 - TEMPERATURA, FATOR QUE INFLUENCIA NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

Microrganismo de acordo com a classe termal	Mínimo (°C)	Ótimo (°C)	Máximo (°C)	Tempo mínimo de retenção
Psicrófilos	4 - 10	15 - 18	20 - 25	70 - 100 dias
Mesófilos	15 - 20	25 - 35	35 - 45	30 - 60 dias
Termófilos	25 - 45	50 - 60	75 - 80	15 - 20 dias

FONTE: Adaptado de SPEECE (1996), Wang, Zhao e Li (2023).

Na FIGURA 3 pode-se observar que estamos perante três (3) faixas termais, que são: a psicofílica, onde se tem um tempo de retenção hidráulica ótimo na faixa entre 15 °C e 18 °C, dependendo bastante do ambiente em que está ocorrendo o processo de produção do biogás; a mesofílica, que é a mais utilizada, isto é, devido às condições de temperatura no Brasil; e a termofilia.

FIGURA 3 - TEMPERATURA, FATOR QUE INFLUENCIA NO PROCESSO DE DIGESTÃO



FONTE: Adaptado de Kunz *et al.* (2019), Chen, Zhang e Liu (2021), Wang, Zhao e Li (2023).

(Criado com BioRender.com).

É de ressaltar que o mais importante é manter a constância de temperatura, ou seja, que se crie um ambiente propício, referente às condições químicas e físicas necessárias, para que se obtenha a partir de uma rota biológica definida, além da

temperatura, do pH e da relação carbono/nitrogênio (C/N) da biomassa (BALMANT, 2009; ALMEIDA, 2020).

O pH ótimo para a biodigestão anaeróbia fica entre 6,5 e 7,5, e é aceitável entre 6,0 e 8,0. O que implica a dizer que deve ser mantido mais ácido na primeira fase e depois mais básico (ALMEIDA, 2020; GONÇALVES; RAMALHO, 2021).

A alcalinidade se refere à quantidade de carbonatos, capazes de absorver efluentes mais ácidos, com efeito tampão e estabilidade do processo. Na pré-diluição, no pré-tratamento, é preciso fazer uma equalização da quantidade de carbonatos, de modo que absorva a maior quantidade de ácidos para que ocorra o tamponamento da solução e o pH se mantenha na faixa ótima e aceitável. A carga orgânica volumétrica (COV) deve ser dosada conjuntamente com o TRH, de modo que o biodigestor possa realizar a digestão anaeróbia (CIBIOGÁS, 2020).

A concentração de nutrientes, ou seja, relação carbono X nitrogênio é essencial para o crescimento dos microrganismos.

Deve estar na faixa entre 20/1 e 30/1, no máximo, de modo que permita com que as bactérias realizem este processo (CIBIOGÁS, 2020).

A presença de inibidores, ou possíveis contaminantes na matéria orgânica, como metais pesados e compostos tóxicos, pode afetar negativamente o desempenho das bactérias e, conseqüentemente, da biodigestão anaeróbia (CALEFFI, 2024).

Desta feita, é importante atentar-se aos desinfetantes e antibióticos capazes de diminuir a colônia dentro do biodigestor (XIAO *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2025).

O controle cuidadoso dessas condições físicas e químicas é necessário para maximizar a produção de biogás, minimizar a formação de subprodutos indesejados e manter a estabilidade do sistema de digestão anaeróbia.

2.2.1.1 Etapas da biodigestão anaeróbia

A biodigestão anaeróbia é dividida em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Na hidrólise, polímeros complexos da biomassa, como celulose, hemicelulose e proteínas, são quebrados em moléculas menores (BALMANT, 2009; SILVA, 2018).

É a primeira fase, onde os componentes principais da matéria orgânica são convertidos. A faixa de pH deve estar entre 5,2-6,3, de modo que haja um desempenho ótimo e/ou aceitável das bactérias. Nesta etapa, as enzimas produzidas pelas bactérias desempenham um papel fundamental na quebra de polímeros, como

amido e proteínas, em seus monômeros constituintes. Isso envolve a separação das ligações químicas nos polímeros para liberar monômeros, como açúcares a partir do amido, aminoácidos a partir de proteínas e ácidos graxos livres e voláteis a partir de lipídios (BALMANT, 2009; SILVA, 2018).

Esse processo é essencial em muitos contextos biológicos e de fermentação, permitindo que os organismos obtenham os nutrientes necessários a partir de compostos complexos.

Na acidogênese, os produtos da hidrólise são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGVs), como o ácido acético, o ácido propiônico e o ácido butírico, geralmente por fermentação (BALMANT, 2009; SILVA *et al.*, 2023).

Essa é uma parte importante do processo de digestão anaeróbia, que ocorre em ambientes sem oxigênio e envolve a ação de várias bactérias e microrganismos para transformar os substratos orgânicos em produtos, como AGV, que podem ser utilizados em várias aplicações, incluindo a produção de biogás.

Na acetogênese, os AGVs resultantes da acidogênese são convertidos em ácido acético, gás carbônico (CO₂) e hidrogênio gasoso (H₂) (BALMANT, 2009; FOURNIER; MONTEIRO, 2021).

Esta é outra etapa importante no processo, esses produtos podem ser posteriormente utilizados em diversas aplicações, incluindo a produção de biogás, em que o hidrogênio e o dióxido de carbono resultantes podem ser convertidos em metano e outros gases combustíveis.

Na metanogênese, o ácido acético é convertido em metano (CH₄) e CO₂ por bactérias metanogênicas. (SILVA, 2023).

É uma etapa subsequente, não anaeróbia, de formação de CH₄. Nesta etapa, o pH deve estar na faixa entre 6,5-8, de modo a permitir que as bactérias convertam de forma ótima.

É a partir dessa fase que se obtém o biogás. Nesta etapa, o ácido acético (um dos produtos da acetogênese) pode ser transformado em CH₄ e CO₂ por bactérias metanogênicas acetoclásticas, além disso, o CO₂ e o hidrogênio (H₂) também podem ser combinados para formar CH₄ por bactérias metanogênicas hidrogenotróficas (BALMANT, 2009; SILVA, 2023).

É uma etapa essencial na produção de biogás em sistemas de digestão anaeróbia, pois o CH₄ é o principal componente do biogás e pode ser usado como fonte de energia.

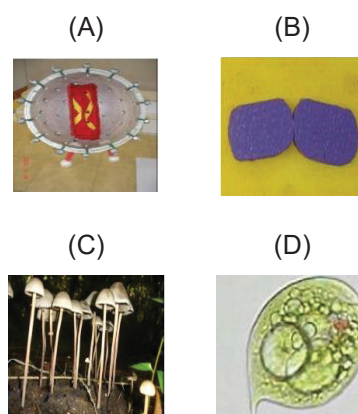
A biodigestão anaeróbia desempenha um papel fundamental na gestão sustentável de resíduos, na produção de energia limpa e na promoção da agricultura sustentável.

Portanto, considerando a singularidade química, ou seja, o conjunto de características químicas próprias da biomassa que determinam seu comportamento no processo de biodigestão anaeróbia e seu potencial energético, inicialmente, é necessário que se realize a caracterização dos microrganismos no processo de biodigestão anaeróbia, no caso do presente estudo, nos processos de hidrólise e fermentação segundo a sua estrutura lignocelulósica, energética e microbiológica, sem esquecer-se da biota natural do reator, esta última, que se refere à comunidade de microrganismos presentes de forma natural em um determinado ambiente ou sistema.

Microrganismos na Biodigestão

Microrganismos são organismos microscópicos, impossíveis de serem observados a olho nu com exceção de alguns que, em determinadas fases de crescimento, podem atingir dimensões macroscópicas (NASCIMENTO, 2010). Entre eles, destacam-se bactérias (1 μm), fungos (100 μm de diâmetro), vírus (1 nm) e algumas algas, todos de grande relevância para os processos de biodigestão.

FIGURA 4 - MICRORGANISMOS



FONTE: Adaptado de Nascimento (2010).

LEGENDA: (A) Vírus; (B) Bactérias; (C) Fungos; (D) Algas.

A interação entre esses microrganismos é complexa, permitindo que habitem diferentes ecossistemas e integrem a microbiota normal de seres humanos, animais e plantas, evidenciando sua diversidade e sua importância funcional na biodigestão.

2.2.1.2 Microrganismo epifíticos

Microrganismos epifíticos são aqueles que vivem na superfície de plantas e podem desempenhar um papel importante na degradação de biomassa lignocelulósica. A composição da microbiota epifítica varia conforme o tipo de planta, o ambiente e as condições climáticas (SILVA; ALMEIDA; COSTA, 2023).

Estudos de Paglia *et al.* (2022), investigam o potencial de microrganismos na conversão de biomassa em biogás, ressaltando a ação de bactérias lácticas e outros grupos na degradação de carboidratos e produção de ácidos orgânicos.

2.2.1.3 Caracterização microbiana utilizando métodos convencionais

A caracterização microbiana é fundamental para compreender a dinâmica da biodigestão anaeróbia e otimizar a produção de biogás. Métodos de cultura em meios específicos e técnicas de sequenciamento de DNA permitem identificar e quantificar os microrganismos presentes em biodigestores.

O crescimento microbiano é realizado em condições controladas, utilizando-se Ágar ou meios equivalentes que simulam o ambiente natural do microrganismo. Esses meios devem fornecer nutrientes essenciais para a síntese e manutenção das funções celulares, promovendo crescimento eficiente (NASCIMENTO, 2010; SPLABOR, 2023).

Os microrganismos são agrupados conforme suas necessidades nutricionais, incluindo fontes de energia, carbono, nitrogênio, sais minerais, vitaminas e água. Fatores físicos, como pH, temperatura, aeração e pressão osmótica, também influenciam seu cultivo. O crescimento pode ocorrer *in vivo*, com células vivas ou cobaios, ou *in vitro*, em meios de cultura inanimados (NASCIMENTO, 2010; SPLABOR, 2023, grifo próprio).

A nutrição microbiana envolve processos metabólicos complexos, com destaque para catabolismo (decomposição) e anabolismo (biossíntese), nos quais as reações enzimáticas desempenham papel central (NASCIMENTO, 2010; SILVA *et al.*, 2023):

1. Catabolismo: degrada moléculas complexas em moléculas simples, liberando energia. Durante a digestão anaeróbica, microrganismos decompõem matéria orgânica complexa, como açúcares e proteínas, em produtos simples como CH₄ e CO₂;

2. Anabolismo: síntese de moléculas complexas a partir de precursores simples, responsável pela formação de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos.

As enzimas atuam como catalisadores, acelerando as reações químicas, seja para quebrar moléculas complexas no catabolismo ou sintetizar moléculas no anabolismo. Assim, a nutrição microbiana representa um equilíbrio entre processos catabólicos e anabólicos, garantindo nutrientes, energia e crescimento celular.

2.2.1.4 Agars utilizadas para as análises microbiológicas

O Agar é o material utilizado para o desenvolvimento microbiano, uma substância solidificante e agente gelatinizador (gelatina de pâncreas) originária de algas vermelhas como a *Gelidium corneum* (japonesa), com capacidade de solidificar a uma temperatura acessível de 80,0 °C, além disso, não é degradado por microrganismos, que o torna muito importante para manter a integridade do meio de cultura durante o processo de crescimento dos microrganismos. (NASCIMENTO, 2010; SPLABOR, 2023).

Trata-se da base, um componente fundamental nos meios de cultura utilizados em microbiologia, sendo o mais utilizado e considerado o melhor devido às suas propriedades de solidificação e estabilidade, podendo ser colocado em um tubo ou em uma placa (de Petri).

3. Agar MacConkey (**MCCK**)

O Agar MacConkey é um meio seletivo para bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, *Shigella* e coliformes. A seletividade decorre de sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, enquanto lactose e indicadores de pH permitem diferenciar bactérias capazes de fermentar lactose (NASCIMENTO, 2010; STATPEARLS, 2024; JUNG; HOILAT, 2025).

A sua temperatura pode ser de 25 °C, faixa de pH 7,1 ± 0,2, e tempo de incubação de 24 a 48 horas (STATPEARLS, 2024).

Essa seletividade é útil quando se deseja isolar e cultivar especificamente bactérias Gram-negativas em uma amostra mista.

Além da seletividade, contém lactose e indicadores de pH que permitem a diferenciação de bactérias Gram-negativas com base na capacidade de fermentar a

lactose e produzir ácido, o que resulta em uma diminuição do pH do meio, fazendo com que o meio mude de cor, tornando-se vermelho ou rosa. Portanto, as colônias de bactérias que têm a capacidade de fermentar a lactose adquirem essa coloração, enquanto as bactérias que não fermentam a lactose permanecem incolores ou de outra cor, tornando-o um meio diferencial, além de ser seletivo (NASCIMENTO, 2010).

Em resumo, o Agar MacConkey é um meio seletivo e diferencial amplamente utilizado na microbiologia para isolar e distinguir bactérias Gram-negativas, com base na fermentação da lactose, na produção de ácido e na sensibilidade aos inibidores presentes no meio, além de permitir que os microbiologistas identifiquem certos grupos de bactérias e forneçam informações importantes sobre suas características metabólicas.

4. Agar Cetrimida (**PSA**)

Utilizado para *Pseudomonas aeruginosa*, o Agar Cetrimida é seletivo devido à cetrimida, inibindo outros microrganismos. Gelatina e glicerol fornecem nitrogênio e carbono, enquanto cloreto de magnésio e sulfato de dipotássio estimulam a produção de pigmentos como pioverdina e piocianina, conferindo a coloração verde característica (HEXIS CIENTÍFICA, 2023; SAGE PUBLISHING, 2023).

Geralmente, obtém-se resultado entre 24 e 72 horas incubadas, podendo o pH estar na faixa de $7,2 \pm 0,2$ e a temperatura de 25 °C (HEXIS CIENTÍFICA, 2023).

A característica de inibição de crescimento de alguns microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos está associada à cetrimida, um composto de amônio quaternário. O composto cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio) inibe outras bactérias. Enquanto o cloreto de magnésio e o sulfato de dipotássio são componentes que podem estar presentes em meios de cultura específicos para estimular a produção de pioverdina e piocianina em quantidade suficiente para conferir às colônias uma cor verde característica. Essa coloração verde é uma das características distintivas dessa bactéria, o que pode ser útil para a identificação em laboratórios de microbiologia. (HEXIS CIENTÍFICA, 2023; SAGE PUBLISHING, 2023).

Geralmente, obtém-se resultado entre 24 e 72 horas de incubação, podendo o pH estar na faixa de $7,2 \pm 0,2$ e a temperatura, em 25 °C. (HEXIS CIENTÍFICA, 2023).

5. Agar Sal Manitol (**SM**)

O Agar Sal Manitol é seletivo para *Staphylococcus* sp., mudando de cor de rosado para amarelo na presença de fermentação de manitol, favorecido pelo alto teor de NaCl (RODRIGUES *et al.*, 2023; MORGAN DIAGNOSTICS, 2025).

Geralmente, o pH final está na faixa de $7,4 \pm 0,2$ e a temperatura é de 25 °C. Podem apresentar resultados a partir de mais ou menos 36 horas após a incubação das placas; no entanto, essas formulações podem ser ajustadas e/ou suplementadas conforme necessidades para atender às especificações de desempenho (MBIOLOG DIAGNÓSTICOS, 2023).

6. Ágar violeta vermelho neutro glúciase (**VRBGA**)

Agar Violeta Vermelho Bile Glucose é um meio de cultura utilizado na detecção e quantificação/enumeração de Enterobactérias (*Enterobacteriaceae*), bactérias Gram-negativas resistentes aos sais biliares, podendo as Enterobactérias apresentar colônias roxas, circundadas ou não por um halo violeta (BIOKAR DIAGNOSTICS, 2023).

Colônias podem apresentar cor violeta devido à degradação da glucose em ácido (DIAS *et al.*, 2023).

Neste meio, as bactérias gram-positivas são inibidas pela presença de violeta cristal e sais biliares em simultâneo. Incubados durante 24 ± 2 horas, com o pH vermelho neutro (viragem para vermelho), geralmente na faixa de $7,4 \pm 0,2$, para temperatura de 25 °C (a 37 °C), e a formação de uma zona de precipitação de sais biliares em torno das colônias são detectores que indicam a degradação da glucose em ácido (DIAS *et al.*, 2023).

7. Agar Triptona de Soja (**TSA**)

Um aspecto muito importante deste meio é o fato de ser referido em muitos padrões internacionais como o meio ideal para testes de controle de qualidade.

Neste meio, as digestões enzimáticas de caseína e de soja e/ou a combinação de triptona e peptona de soja atuam como fonte de nitrogênio e de aminoácidos e peptídeos de cadeia de crescimento de microrganismos, já o cloreto de sódio é responsável por manter o equilíbrio osmótico (SINERGIA CIENTÍFICA, 2023).

Geralmente se usa pH final na faixa de $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C, podendo obter resultados entre 21 e 24 horas de incubação, no entanto, a formulação para o cultivo

pode ser ajustada ou complementada conforme necessário para atender às especificações de desempenho, ou seja, segundo as normas pertinentes (SINERGIA CIENTÍFICA, 2023).

8. Agar Dextrose Sabouraud (**SDA**)

O Agar Dextrose Sabouraud ou Sabouraud Dextrose é um meio de cultura utilizado em procedimentos qualitativos para o cultivo e/ou seleção para fungos patogênicos e não patogênicos (particularmente dermatófitos), com pH ácido e concentração de dextrose (açúcares) que inibe bactérias, favorecendo o crescimento de bolores e leveduras (NASCIMENTO, 2010; LABORCLIN, 2019).

Devido a essa seletividade, o Agar Sabouraud é uma escolha comum em laboratórios de microbiologia para o isolamento e cultivo de fungos, tornando-se particularmente útil na pesquisa e no diagnóstico de infecções fúngicas. Sua composição desfavorável para bactérias é uma vantagem quando se deseja isolar especificamente fungos em uma amostra.

O período de incubação do Agar Sabouraud é, no mínimo, de 3 dias, com pH na faixa de $5,6 \pm 0,2$ e temperatura de $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (LABORCLIN, 2019).

2.2.1.5 Identificação de microrganismos

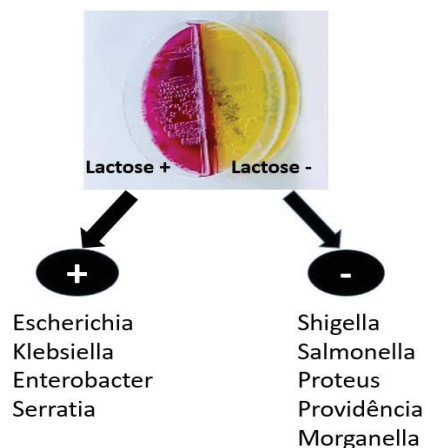
O crescimento microbiano depende de nutrientes essenciais, incluindo matéria orgânica, nitrogênio, carboidratos e oxigênio comoceptor terminal de elétrons (HIRAI, 2020). A seguir, descrevem-se grupos específicos de microrganismos, seus meios de cultura e condições de incubação:

9. **Salmonella sp.** - meio de cultura **MCCK**

Bactéria Gram-negativa, não fermentadora de lactose, com colônias transparentes no Agar MacConkey. Cresce entre 5 e $48 \text{ }^\circ\text{C}$ (ótimo $35\text{--}37 \text{ }^\circ\text{C}$), pH 7,0-7,5 e atividade hídrica $>0,94$ (MICROBIOLOGY IN PICTURES, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; SPLABOR, 2023; USDA, s.d.; CARNEIRO; COSTA, 2020).

No entanto, alguns açúcares, como arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol, podem ser fermentados pela *Salmonella* (CARNEIRO¹; COSTA², 2020). Ao fermentar a glucose, esta bactéria gera gás e ácido acético. E ainda, é também capaz de gerar sulfeto de hidrogênio (H_2S), característica utilizada para testes laboratoriais de identificação (CARNEIRO; COSTA, 2020).

FIGURA 5 - ÁGAR MACCONKEY MOSTRANDO BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE (ESQ.) E NÃO FERMENTADORAS DE LACTOSE (DIR.)



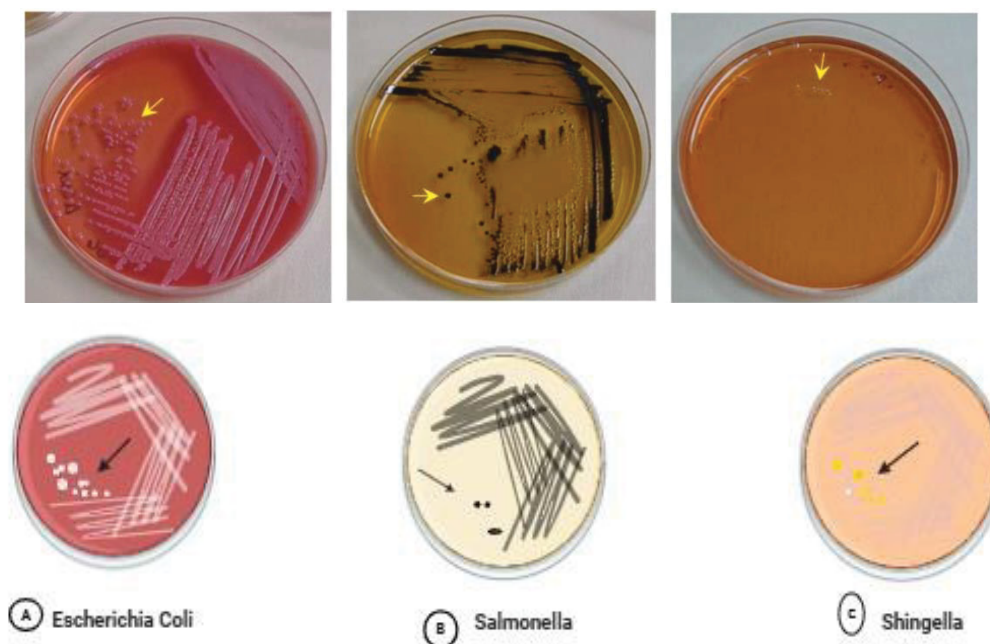
FONTE: Adaptado de Nascimento (2010).

LEGENDA: ESQ.: Esquerda; DIR.: Direta.

10. *Shigella* - meio de cultura **MCCK**

Segundo a *National Library of Medicine* (2013), *Shigella* são Bactéria entérica Gram-negativa, anaeróbica facultativa, em bastonete, capaz de fermentar açúcares sem produzir gás. Apresentam fatores de crescimento como Temperatura ideal: 10-48 °C; pH 6–8; e a depender da espécie, podem crescer em um período de incubação de 1 dia a 1 semana (SILVA, 2017). A FIGURA 6 representa as diferentes formas das culturas e cores do meio após a inoculação de *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*

FIGURA 6 - ÁGAR MACCONKEY ADICIONADO DE ESCHERICHIA-SALMONELLA-SHIGELLA



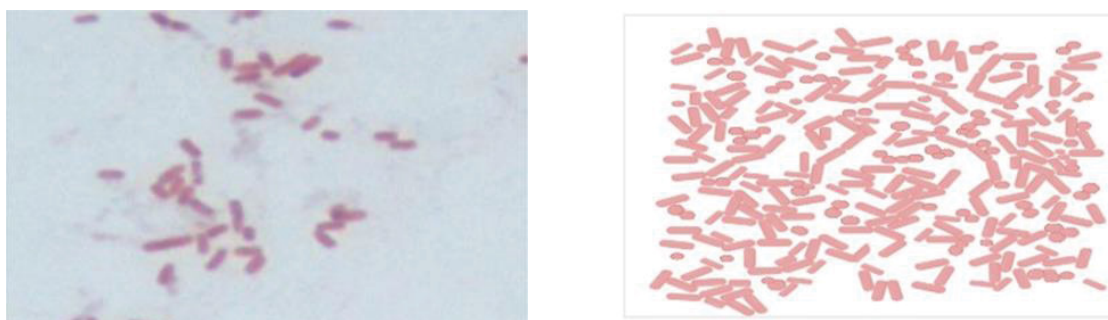
FONTE: Adaptado de Fernandes Junior (2019). (Criado com BioRender.com)

LEGENDA: (A) *Escherichia Coli*; (B) *Salmonella*; (C) *Shingella*.

11. Coliformes - meio de cultura MCKK

Coliformes são grupos de bactérias Gram-negativas que utilizam lactose e produzem gás a 35–37 °C, pH 4,4–9, quando incubados por 48 horas (ou 44-45,5 °C). São divididos três (3) grupos, formando um grupo de 16 espécies usadas para indicar a qualidade da água. Esses 3 grupos são: coliformes totais, coliformes fecais e *E. Coli* (ECOTICIAS, 2023, grifo próprio). em coliformes totais, fecais e *E. Coli*, incluem *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (GARROTE, 2023; ECOTICIAS, 2023).

FIGURA 7 - ESCHERICHIA COLI (OXIDASE NEGATIVA)



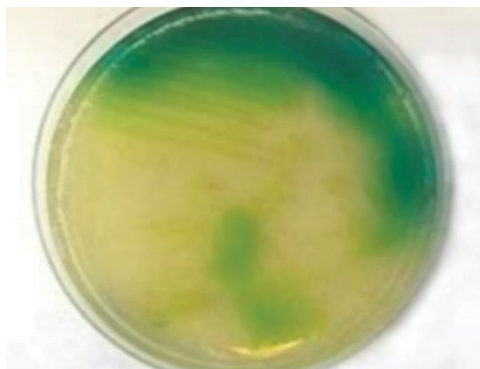
FONTE: Adaptado de Fernandes Junior (2019). (Criado com BioRender.com)

12. *Pseudomonas* - meio de cultura PSA

Pseudomonas são Bacilos Gram-negativos não fermentadores, aeróbios, móveis e geralmente encontram-se aos pares, retos ou ligeiramente curvos, que podem ser separados fenotipicamente em cinco (5) grupos ou dez (10) espécies, sendo as *Pseudomonas aeruginosa* de maior importância (AL-FRIDAWY; ALDARAGHI; ALKHAFAJI, 2021; HIRAI, 2020). Entre eles, os autores enfatizam os grupos fluorescentes (*Pseudomonas aeruginosa*) e aeróbios estritos (não fermentadores), que produzem pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura (pioverdina e piocianina), e algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto.

Na ausência ou indisponibilidade de nitrato, é necessária incubação, e seu crescimento ocorre na superfície da placa, por haver ali a maior concentração de O₂ (HIRAI, 2020), podendo crescer em temperatura ótima de 30 °C e 37 °C, com pH 5,5 e 6, em um período de incubação de apenas 1-3 dias. (HIRAI, 2020; AL-FRIDAWY; ALDARAGHI; ALKHAFAJI, 2021).

FIGURA 8 - CONTAMINANTE BURKHOLDERIA CEPACIA



FONTE: Hirai (2020).

A produção de pigmentos é uma característica importante em microbiologia que pode ajudar na identificação de certas bactérias. No caso da *Pseudomonas aeruginosa*, esses pigmentos são particularmente notáveis, uma vez que são conhecidas por produzir pigmentos como pioverdina e piocianina em quantidade suficiente para dar às colônias uma cor verde característica. Essa coloração verde é uma das características distintivas dessa bactéria, o que pode ser útil na identificação em laboratórios de microbiologia (AL-FRIDAWY; ALDARAGHI; ALKHAFAJI, 2021).

13. Estafilococos (*Staphylococcus* sp.) - meio de cultura **SM**

Os *Staphylococcus* sp., são um grupo de bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, que podem crescer em temperaturas de 7 a 48 °C, sendo a faixa de 30 a 37 °C considerada ótima, tempo de incubação de até cerca de 24 horas, capazes de afetar diversas espécies animais, responsáveis pela colonização natural das mucosas e da pele (AMARAL et al., 2003; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; HEXIS CIENTÍFICA, 2023).

Existem várias espécies de *Staphylococcus*, cuja prevalência varia conforme a espécie animal. Essas espécies se dividem basicamente em dois grupos: coagulase positiva (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*) e coagulase negativa (*S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. sciuri*, *S. felis*) (AMARAL et al., 2003; HEXIS CIENTÍFICA, 2023). Os *Staphylococcus* formam colônias pequenas ou grandes, que podem variar em cor de amarelo, vermelho ou branco. Os não patogênicos geralmente formam colônias pequenas cercadas por uma zona vermelha (FIGURA 9).

As colônias de *S. aureus* fermentadores de manitol são grandes e cercadas por uma zona amarela, enquanto *S. epidermidis* e *Bacillus subtilis* produzem colônias brancas (HEXIS CIENTÍFICA, 2023). São capazes de realizar metabolismo respiratório ou fermentativo, dependendo das condições de crescimento e da disponibilidade de oxigênio, caracterizando-os como aeróbios facultativos, ou seja, podem crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002). Quando em ambientes com oxigênio, eles utilizam o metabolismo respiratório, produzindo energia via cadeia de transporte de elétrons. Em ambientes com pouco oxigênio ou sem oxigênio, eles recorrem ao metabolismo fermentativo, onde os carboidratos são metabolizados gerando ácidos e, ocasionalmente, álcool.

FIGURA 9 - STAPHYLOCOCCUS SP. EM MEIO DE CULTURA SM (AGAR SAL MANITOL - MANITOL SALT AGAR (MSA))



FONTE: Adaptado de Microbiology Note (2023). (Criado com BioRender.com)

LEGENDA: ((A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Staphylococcus apidermidis*, (C) *Staphylococcus sp luteus*).

Essa adaptabilidade metabólica dos *Staphylococcus* é uma característica que lhes permite sobreviver e prosperar em uma variedade de ambientes, o que é importante para sua capacidade de colonizar diferentes locais no corpo humano e em outros ambientes naturais.

14. Enterobactérias (Enterobacteriaceae) - meio de cultura VRBGA

Enterobactérias é um grupo de bactérias ou uma família de bacilos Gram-negativos, que inclui espécies fermentadoras e não fermentadoras de lactose, cepas não fermentadoras de lactose como *Escherichia* (*E. Coli*), *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*, *Erwinia* (MANUAL OF MICROBIOLOGICAL CULTURE MEDIA, 2017; USP, s.d.). Seu desenvolvimento ocorre após incubação de 72 h, à temperatura de 25,0°C e pH entre 4,5 e 6,6 ± 0,2. (FIGURA 10).

Para o seu metabolismo respiratório, pode utilizar ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, podendo as bactérias crescer, sob condições aeróbias, em um meio bacteriológico complexo convencional, pela ação dos constituintes nitrogenados, que fornecem substratos oxidáveis. Enquanto sob condições

anaeróbias, o seu crescimento depende da presença de um carboidrato fermentável (USP, s.d.).

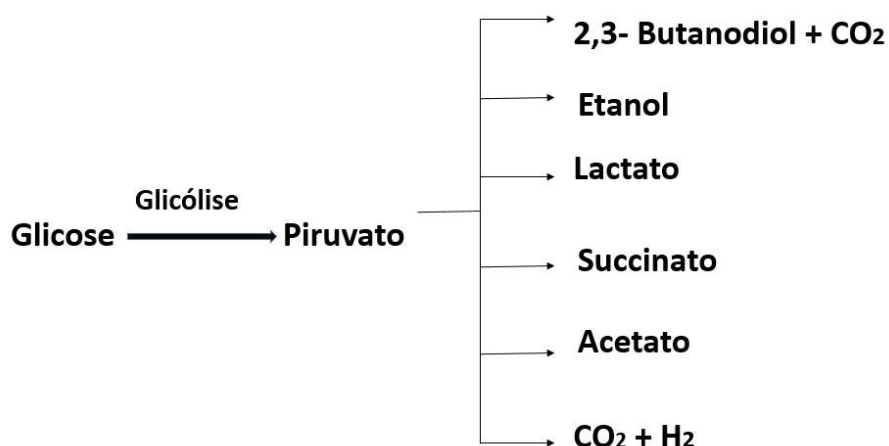
FIGURA 10 - CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS EM ÁGAR VRBG



FONTE: Brunetti (2023). (Criado com BioRender.com)

A fermentação ácido-mista é aquela em que açúcares são fermentados, mais comum no grupo entérico, e responsável pela produção principalmente de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido fórmico (ou CO_2 e H_2), e etanol. (BRUNETTI, 2023; USP, s.d.).

FIGURA 11 - FERMENTAÇÃO ÁCIDA MISTA DE ENTEROBATÉRIAS



FONTE: Adaptado de Fernandes Junior (2019). (Criado com BioRender.com)

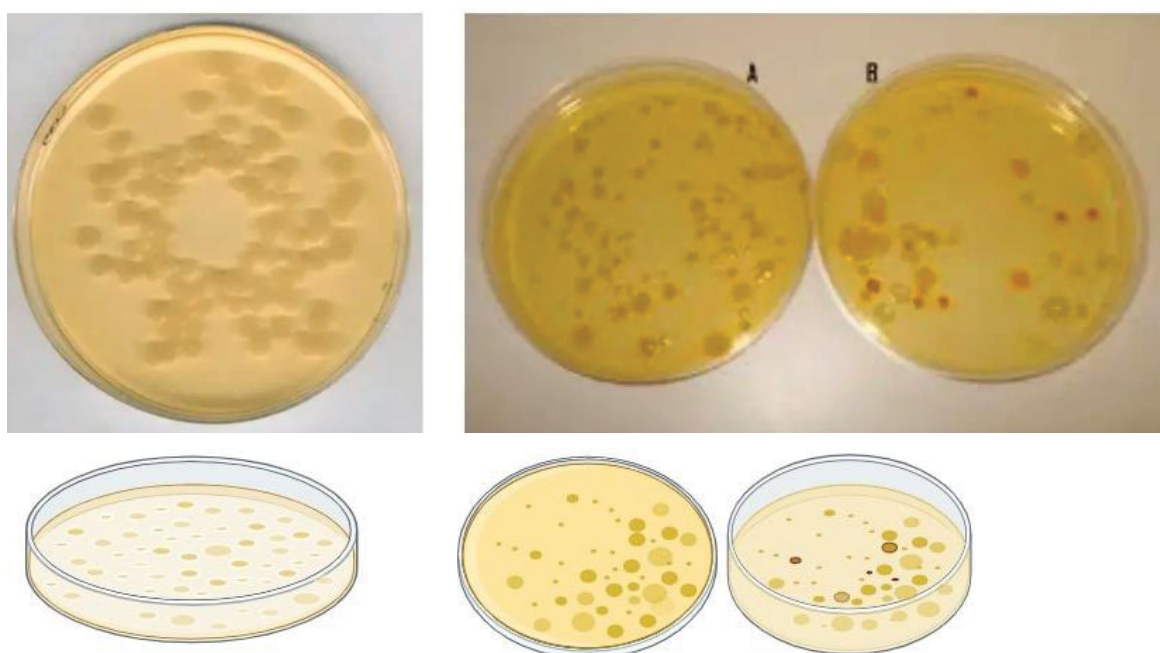
15. Microrganismos aeróbios mesófilos - meio de cultura TSA

Os microrganismos aeróbios mesófilos são aqueles que com necessidade de oxigênio para seu metabolismo e a capacidade de crescer em uma faixa de temperatura moderada, geralmente, entre 5-50 °C, ótimo 37 °C, e pH variável,

podendo incluir gêneros como *Escherichia*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Proteus* e *Pseudomonas* (CIDASC, 2021).

Na FIGURA 12, são apresentados os resultados da inoculação de microrganismos aeróbios mesófilos em meio de cultura SM (agar triptona de soja - tryptical soy agar).

FIGURA 12 - MICROORGANISMOS AERÓBIOS MSESÓFILOS EM MEIO DE CULTURA SM (AGAR TRIPTONA DE SOJA - TRYPTICAL SOY AGAR)



FONTE: O autor (2025). (Criado com BioRender.com)

Eles são encontrados em muitos ambientes naturais e podem incluir várias espécies bacterianas comuns (CIDASC, 2021), ou seja, entre 20 °C a 40 °C, além de poder crescer em pH baixo, em um período de 48 horas.

16. Bolores e Leveduras - meio de cultura **SDA**

Apesar de geralmente se apresentarem com aspectos bem diferentes, Bolores e leveduras são microrganismos que pertencem ao mesmo grupo, fungos:

1. Bolores: fungos multicelulares com formados por filamentos denominados hifas, ramificadas em micélios, com grande capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis como a umidade e a temperatura, podendo estar entre 48-60 horas, 25-30 °C, pH 4,5-5,0 (BORGES, 2020).

2. Leveduras: fungos unicelulares, substratos ricos em carboidratos, principalmente açúcares simples. Isso ocorre porque as leveduras utilizam carboidrato como fonte de carbono e energia em um processo de fermentação realizando fermentação alcoólica, que pode ocorrer entre 2-3 horas, 25-30 °C, pH 4-4,5 (BORGES, 2020).

As leveduras são amplamente utilizadas na indústria para a produção de álcool etílico (fermentação alcoólica) e na panificação, onde o CO₂ produzido pela fermentação faz com que o pão cresça.

FIGURA 13 - ENUMERAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS NO MEIO DE CULTURA SDA



FONTE: Filassi (2019).

Portanto, substratos ricos em carboidratos são ideais para o crescimento e a multiplicação das leveduras devido à sua capacidade de utilizar esses açúcares de forma eficiente como fonte de carbono e energia.

2.3 GASES PROVENIENTES DA FERMENTAÇÃO

Biogás e Biometano

2.3.1.1 Biogás

O biogás é uma mistura de gases resultante da degradação anaeróbia de matéria orgânica. Sua composição varia conforme o tipo de biomassa utilizada e as condições operacionais do processo de biodigestão (CIBIOGÁS, 2020).

O metano (CH₄) é o principal componente, geralmente representado entre 50% e 75% do volume total. Outros gases presentes incluem dióxido de carbono (CO₂), nitrogênio (N₂), vapor d'água (H₂O) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) (CIBIOGÁS, 2020), conforme apresentado na TABELA 5.

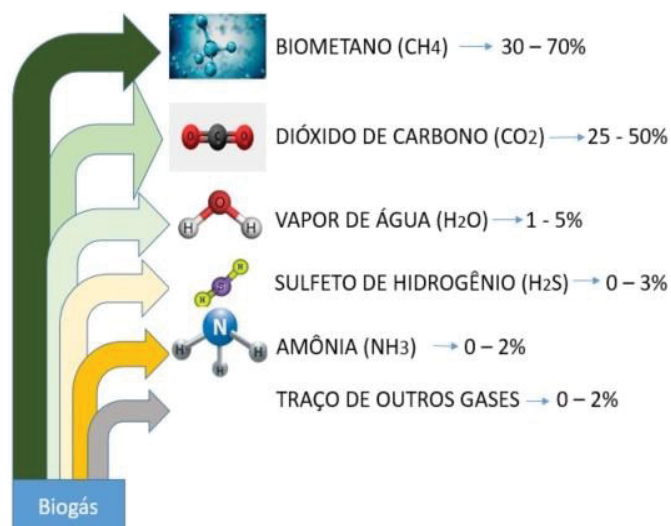
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS

Componente	Concentração
Metano (CH ₄)	50% - 75% em volume
Dióxido de carbono (CO ₂)	25% - 45% em volume
Água (H ₂ O)	2% - 7% em volume (20 - 40 °C)
Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	20 - 20.000 ppm
Nitrogênio (N ₂)	< 2% em volume
Oxigênio (O ₂)	< 2% em volume
Hidrogênio (H ₂)	< 1% em volume

FONTE: Adaptado de CIBiogás (2020).

Como pode ser observado (TABELA 5), o biogás é majoritariamente composto por metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), enquanto os demais componentes apresentam concentrações variáveis, dependendo do substrato e das condições do biodigestor. Seu poder calorífico varia entre 5.000 e 7.000 kcal/m³, podendo ser comparado à relação de 1,0 m³ de biogás a outras fontes de energia (OLIVER et al., 2008; INOVAE, 2018; LIMA, 2020). Na FIGURA 14, pode-se observar a variação da composição do biogás.

FIGURA 14 - VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS



FONTE: Adaptado de Lima (2020). (Criado com BioRender.com)

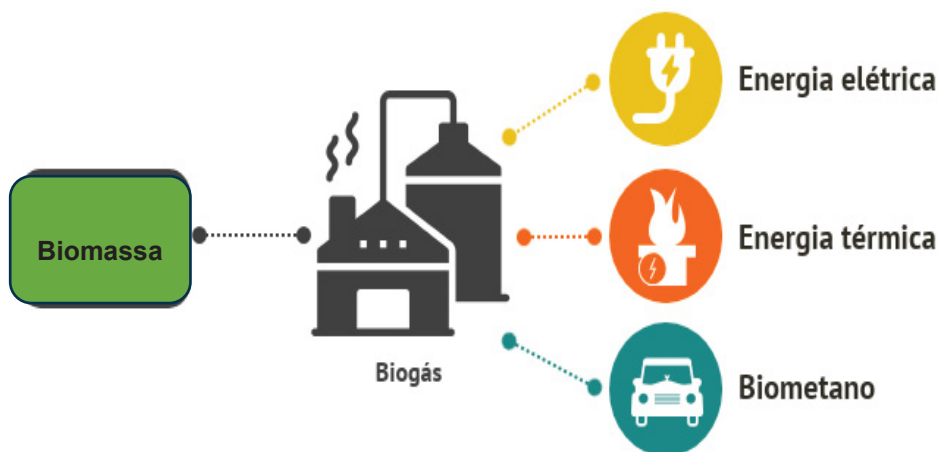
O biogás configura-se como uma tecnologia promissora, tanto para a produção de energia renovável quanto para a gestão de resíduos orgânicos. Seu uso proporciona benefícios ambientais, econômicos e sociais, contribuindo para a

sustentabilidade. Entretanto, é fundamental superar desafios relacionados à otimização da produção e à utilização eficiente do biogás.

O biogás possui diversas aplicações. Pode ser utilizado para geração de energia elétrica e térmica, aquecimento de água, cocção e até mesmo para movimentar máquinas e veículos.

Além disso, o digestato, subproduto da biodigestão anaeróbia, constitui um fertilizante orgânico de alta qualidade, promovendo a fertilidade do solo e favorecendo práticas agrícolas sustentáveis.

FIGURA 15 - CONVERSÃO DO BIOGÁS POR MEIO DA OXIDAÇÃO TÉRMICA DO METANO



FONTE: Adaptada de Blog Energia Cooperativa (2021).

A FIGURA 15 ilustra o processo de conversão do biogás por oxidação térmica do metano, demonstrando a transformação do biogás em energia utilizável.

2.3.1.2 Biometano

O biometano é um biocombustível obtido a partir da purificação do biogás, através da remoção do CO_2 e de outros componentes indesejáveis (LIMA, 2020). Quimicamente idêntico ao gás natural, pode ser utilizado na mesma infraestrutura de transporte e distribuição.

Quando proveniente de resíduos orgânicos, o biometano tem origem principalmente em atividades agrossilvopastoris ou em resíduos comerciais, como alimentos descartados por bares e restaurantes. Por outro lado, não inclui o gás gerado em aterros sanitários ou estações de tratamento de esgoto, devido à presença de resíduos não orgânicos que comprometem sua qualidade (LIMA, 2020).

2.3.1.3 Panorama e Impactos da Produção Industrial de Biogás no Brasil

De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2024), o biogás e o biometano têm assumido papel estratégico na transição energética brasileira, representando uma alternativa sustentável para diversificar a matriz e reduzir a dependência de combustíveis fósseis. Essa fonte renovável tem se expandido nas últimas décadas, principalmente devido à valorização de resíduos agroindustriais e urbanos como insumos energéticos.

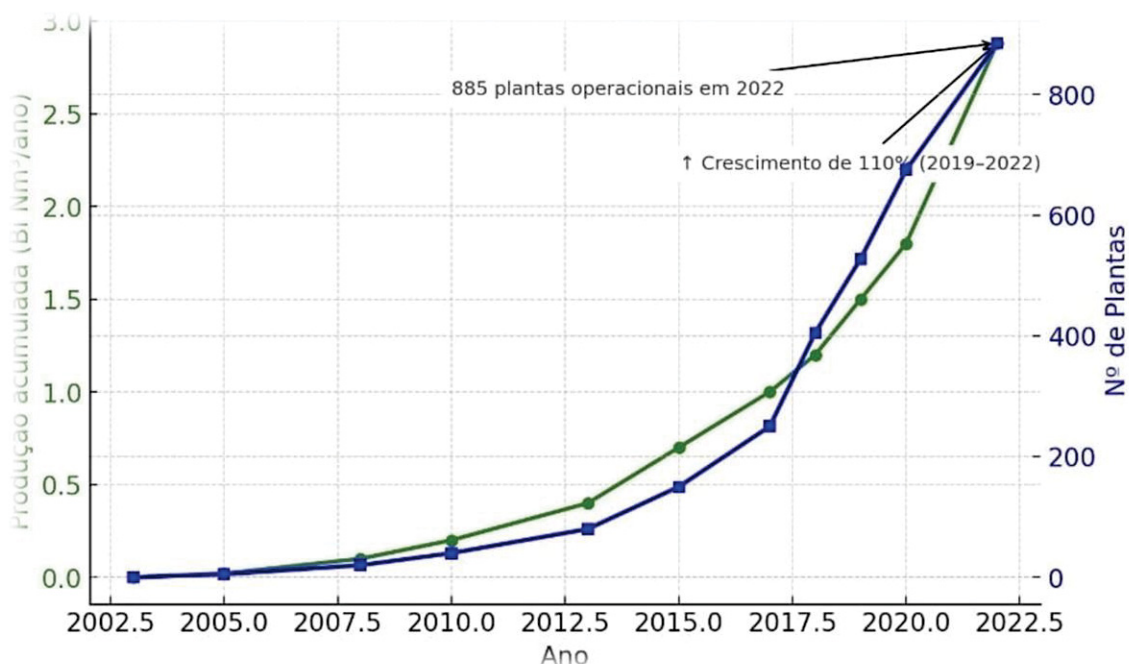
Segundo dados da CIBiogás (2020), até aquele ano o Brasil possuía 675 plantas de biogás em operação, com uma produção média anual de 2,2 bilhões de metros cúbicos (m³). As unidades estavam distribuídas entre 556 plantas de energia elétrica, 92 de energia térmica, 11 de biometano e 6 de energia mecânica.

Nos anos seguintes, o setor apresentou crescimento expressivo. Em 2022, o número de plantas operacionais aumentou para 885, atingindo 2,88 bilhões de m³ por ano, o que corresponde a um crescimento de 110%. Dentre essas plantas, 62% eram de médio porte, 32% de pequeno porte e 6% de grande porte, (CIBiogás, 2023).

Diversas iniciativas industriais consolidaram o avanço do setor. A Jalles Machado e Albioma, por exemplo, inauguraram, em Goiás, a primeira planta de biogás produzida a partir da vinhaça (CIBIOGÁS, 2023). Já a Cocal implementou o uso de biometano em substituição ao diesel em parte de sua frota logística (operações), promovendo a sustentabilidade e redução de custos (BIOMASSA E ENERGIA, 2024).

O processo de evolução ou expansão industrial teve origem em 2003, com crescimento acelerado a partir de 2018, quando o número de unidades aumentou mais de 66% devido ao avanço das tecnologias de biodigestão e à popularização do biogás como fonte energética alternativa.

FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E DO NÚMERO DE PLANTAS NO BRASIL (2003-2022)



FONTE: Adaptado de CIBiogás (2020), CIBiogás (2023).

O Brasil possui um grande potencial para a produção de biogás, estimado em 84,6 bilhões de metros cúbicos por ano, o maior do mundo. No entanto, a exploração atual está abaixo desse potencial, com a produção efetiva sendo significativamente menor, devido a desafios logísticos, econômicos e regulatórios. De acordo com (REVISTAS UFPR, 2024; MARCUCCI *et al.*, 2025).

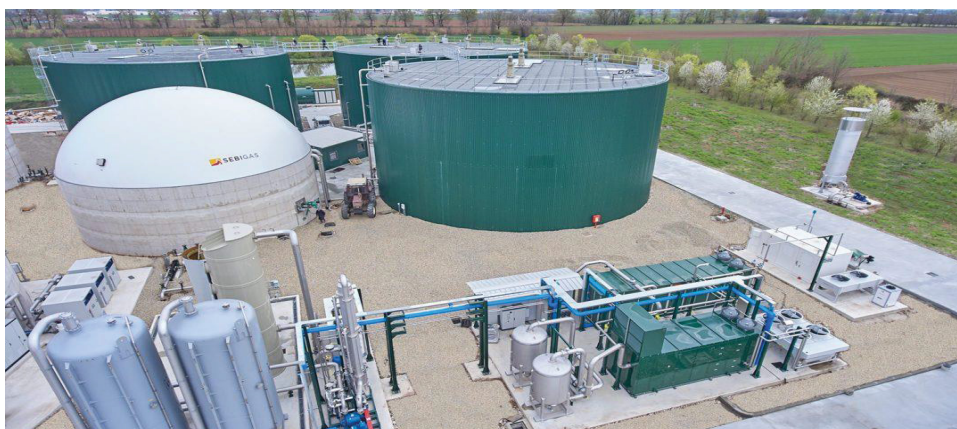
Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro concentram a maior produção nacional, mesmo com menor número de plantas, em razão da escala industrial e do uso de resíduos sólidos urbanos como substrato. Já o Paraná e Minas Gerais lideram em quantidade de unidades instaladas, porém com plantas de menor porte e substratos de origem agropecuária (CIBIOGÁS, 2020).

A produção descentralizada de biogás surge como uma estratégia para que indústrias gerem seu próprio combustível a partir de resíduos orgânicos, transformando passivos ambientais em ativos energéticos. Contudo, o desenvolvimento do setor depende fortemente de políticas de incentivo, investimentos em infraestrutura de distribuição, pesquisa aplicada e tecnologias de purificação e compressão, essenciais para consolidar o biogás e o biometano como fontes estáveis na matriz energética nacional (EPE, 2024).

17. Impacto da produção de biogás industrial

O biogás e o biometano, são essenciais para a descarbonização da economia, contribuindo para a mitigação de crises energéticas e para o cumprimento das metas de redução de emissões (CIBIOGÁS, 2021). Além disso, favorecem a gestão sustentável de resíduos e impulsionam a geração de empregos e renda, especialmente em áreas rurais. Estudos indicam que o setor de biogás pode gerar cerca de 46 mil empregos até 2029, fortalecendo a economia circular e regional (AMPLUM BIOGÁS, 2023).

FIGURA 17 - INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS



FONTE: Machado (2021).

Face a este cenário, é importante a compreensão da bioengenharia como um processo e da engenharia química para a caracterização e otimização deste, cuja integração entre ambos é capaz de tornar possível a produção/obtenção de biogás, de forma sustentável, econômica e ambientalmente correta. E ainda ampliar as possibilidades das fontes por meio do fomento à competição no mercado, com apoio e/ou políticas públicas e investimentos privados, gerando benefícios econômicos e sociais, modernização da matriz energética nacional e atrair mais investimentos no setor.

A implantação de plantas industriais de biogás contribui para a redução de custos operacionais, controle da carga de matéria orgânica lançada no meio ambiente, diminuição da proliferação de insetos e mitigação de odores desagradáveis (OLIVEIRA; MIRANDA; JUNIOR, 2024; SOUZA *et al.*, 2025). Dessa forma, essas iniciativas destacam-se como estratégias ambientalmente sustentáveis e energeticamente eficientes, alinhadas aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

(ODS) e à promoção da bioeconomia nacional (OLIVEIRA; MIRANDA; JUNIOR, 2024; SOUZA *et al.*, 2025).

2.4 HIDRÓLISE ÁCIDA ACÉTICA E FERMENTAÇÃO

Hidrólise Ácida Acética

A hidrólise ácida acética consiste na utilização do ácido acético para romper as ligações presentes na biomassa lignocelulósica, facilitando a degradação subsequente durante a biodigestão anaeróbia (SIQUEIRA, 2015). Este processo não apenas aumenta a disponibilidade de carboidratos solúveis para os microrganismos envolvidos na digestão, como também contribui para mitigar odores desagradáveis, reduzindo a formação de compostos sulfurados durante a biodigestão (ECONOMOU *et al.*, 2023).

Dessa forma, a hidrólise ácida acética integra-se ao ciclo de produção de biogás, fornecendo substratos mais acessíveis às bactérias metanogênicas e acidogênicas, promovendo a eficiência energética e o melhor controle ambiental do processo.

Fermentação Láctica

O termo “fermentação” deriva do latim *fervere*, que significa “ferver” (FAGUNDES NETO, 2014). A fermentação láctica é um processo microbiano no qual açúcares são convertidos em ácido láctico, sendo este seu principal produto (SIQUEIRA, 2015).

Bactérias lácticas são microrganismos comuns em ambientes de biodigestão anaeróbia e podem desempenhar um papel importante na degradação de carboidratos e na produção de ácidos orgânicos (WANG *et al.*, 2021).

A fermentação láctica pode ser utilizada para o controle de odores em sistemas de biodigestão, reduzindo a produção de compostos sulfurados e amônia. (ANDREEV *et al.*, 2017).

Dessa forma, a fermentação láctica atua como etapa complementar ao processo anaeróbio, preparando a biomassa e ajustando as condições químicas para uma biodigestão mais eficiente.

Fermentação Alcoólica (Etanoica)

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico realizado por microrganismos como leveduras e bactérias, no qual açúcares são convertidos em energia celular, etanol e dióxido de carbono (CO₂) (SAPATISTA, 2020). Trata-se de uma via

catabólica, que ocorre em condições anaeróbias (sem oxigênio) e é fundamental para a produção de alimentos, medicamentos e biocombustíveis.

Historicamente, a fermentação alcoólica foi estudada por Louis Pasteur (1822-1895), que demonstrou que diferentes leveduras produzem variações significativas na qualidade do vinho, destacando a importância da escolha do microrganismo correto para o processo (SANTOS, 2016; UNITED STATES NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021).

O processo envolve etapas bioquímicas bem definidas: a glicólise converte glucose em duas moléculas de piruvato, liberando ATP e reduzindo NAD^+ a NADH. O piruvato é posteriormente transformado em acetaldeído, liberando CO_2 , e o NADH doa elétrons ao acetaldeído, formando etanol (FAGUNDES NETO, 2014, s. p.; BRASIL ESCOLA, 2017).

A eficiência da fermentação alcoólica é influenciada por fatores ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e agitação, que impactam tanto a multiplicação da levedura quanto a taxa de conversão dos açúcares em etanol (ALVES, 2013; SANTOS, 2016).

Um desafio crítico neste processo é a contaminação bacteriana, particularmente por microrganismos Gram-positivos do gênero *Lactobacillus*. Altos níveis de contaminação ($\geq 10^6$ - 10^7 células/mL) podem comprometer o rendimento fermentativo, gerar subprodutos indesejados e competir pelo substrato, reduzindo a eficiência de conversão em etanol (SANTOS, 2016; FERMENTEC, 2025). Contaminações moderadas ($\sim 10^5$ células/mL) são toleráveis, permitindo a manutenção do processo (SANTOS, 2016).

Níveis significativos de contaminação bacteriana, superiores a 10^6 ou 10^7 células/mL, podem prejudicar a eficiência da fermentação etanólica, resultando em menor produção de etanol e em subprodutos indesejados. Em contrapartida, níveis de contaminação bacteriana próximos a 10^5 células/mL são considerados mais aceitáveis e podem permitir um processo de fermentação mais eficaz (SANTOS, 2016).

Para minimizar riscos, recomenda-se rigorosas práticas de higiene, qualidade adequada do inóculo de levedura e estratégias de esterilização e tratamento do meio (SEO *et al.*, 2020).

A fermentação alcoólica conecta-se diretamente ao ciclo de produção de biogás, uma vez que os etanóis produzidos podem ser convertidos em substratos adicionais

para a digestão anaeróbia, permitindo integração entre processos fermentativos e metanogênicos. Essa sinergia fortalece a eficiência energética e a sustentabilidade ambiental, consolidando a interdependência entre hidrólise, fermentação láctica e alcoólica e biodigestão para produção de biogás e biometano.

Contudo, abordou-se a produção de biogás e biometano a partir de resíduos orgânicos, destacando biodigestores, microrganismos (epifíticos) e processos de fermentação e hidrólise, explorando a composição, aplicações energéticas e potencial industrial no Brasil, enfatizando sustentabilidade e gestão de resíduos, além da integração da bioengenharia e da engenharia de processos para otimizar a eficiência e fortalecer a matriz energética renovável.

A seguir, apresenta-se a seção ou capítulo dedicado aos materiais, métodos de ensaio e análises estatísticas utilizadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, são descritos os locais, etapas, materiais e os métodos de ensaio e análise estatística utilizados para alcance dos objetivos.

3.1 LOCAIS E ETAPAS

O estudo foi realizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Laboratório de Engenharia Química e Energias Renováveis (LEQER), no Laboratório de Energia de Biomassa e nos laboratórios do curso de Engenharia Florestal.

Os experimentos foram divididos em três (3) etapas:

- **Etapa 1:** *Estudo com capim-elefante e seus microrganismos epifíticos*, coletado nas dependências da UFPR - Centro Politécnico.
- **Etapa 2:** *Fermentação no estado sólido (dry digestion), da biomassa, com seus microrganismos epifíticos*, buscando a propagação dos microrganismos e seleção em um meio acético.
- **Etapa 3:** *Fermentação no estado líquido (liquid digestion)* da biomassa, buscando a propagação de microrganismos e a fermentação láctica e alcóolica (etanoica).

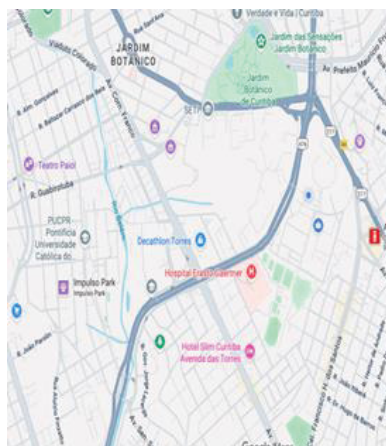
3.2 BIOMASSA E MICRORGANISMOS UTILIZADOS

A biomassa selecionada foi o capim-elefante por representar microrganismos típicos de gramíneas, com alto conteúdo lignocelulósico, alta adaptabilidade e crescimento eficiente em ambientes anaeróbios fermentativos.

Capim-Elefante

Na primeira etapa (1), foi feito o estudo com capim-elefante e seus microrganismos epifíticos, coletado nas dependências da UFPR - Centro Politécnico. Esta etapa foi concluída com as etapas subsequentes, uma vez que a avaliação e crescimento microbiano, quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e etanol foi feito após realização dos processos de hidrólise e fermentação.

FIGURA 18 - GEOLOCALIZAÇÃO DE CURITIBA, REGIÃO DO CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR



FONTE: Google Maps (2022).

O capim-elefante utilizado nos experimentos foi retirado do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em diferentes áreas próximas umas das outras (UTM: Zone: 22J E: 0677802 N: 7184019). A retirada ocorreu entre os meses de março e dezembro de 2022 e julho de 2023. A altura mínima foi: 75,3 cm; altura média: 204 cm; altura máxima: 505 cm, enquanto as folhas atingiram, no máximo, 76 cm.

FIGURA 19 - FOTOS DO CAPIM ELEFANTE



FONTE: O autor (2022).

Microrganismos Epifíticos

Os microrganismos utilizados nos processos de hidrólise e fermentação foram todos de origem natural, pré-existentes no vegetal colhido. A sua caracterização

microbiológica foi feita através do desenvolvimento de culturas em meios específicos conforme preconiza o compêndio farmacopeico brasileiro (5ª. Edição – Capítulo 5.5).

As Cepas foram separadas conforme o meio de cultura e em seguida utilizada sem que outro processo de segregação fosse usado. Portanto, foram utilizados diversos consórcios de microrganismos com semelhante crescimento no meio ágar específico.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS DE ENSAIO E ANÁLISE

Amostragem

Para a homogeneização das amostras, utilizaram-se uma tesoura Maped Stainless e um triturador forrageiro Trapp, modelo F56hO795 (WEG MOTORS LTDA), obtendo-se partículas de tamanho reduzido para facilitar a pesagem, a mistura, a homogeneização e o armazenamento nos birreatores.

Para a pesagem das amostras, utilizou-se uma balança de prato Filizola (precisão de 1,0 g) e uma balança analítica Adventurer AR2140 (Ohaus Corporation). A balança de prato foi calibrada antes de cada pesagem utilizando um peso padrão de 5,0 kg.

3.3.2 *Análises Físico-Químicas e Químicas*

3.3.1.1 *Análise do Teor de Água – Biomassas*

A determinação da massa seca seguiu a metodologia TAPPI T 550 (1996).

Uma massa de 10,0000 g (+/- 0,5 mg) de amostra dos substratos foi adicionada a pesa-filtros previamente tarados, e colocadas em uma estufa aquecida a 100,0 °C (+/- 5,0 °C) por uma hora.

Após esse período, foram esfriados no dessecador e pesados com a mesma precisão.

Repetindo esta operação até a massa constante.

A massa seca é o resultado obtido ao final do ensaio, quando a massa medida permanece constante ao longo do tempo.

A massa seca (MS) da amostra foi obtida através da EQUAÇÃO 1:

$$MS (\%) = \frac{\text{Massas final da amostra após secagem (g)} \cdot 100}{\text{Massa inicial da amostra úmida (g)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.3.1.2 Teor de umidade - Água Livre

A determinação da umidade ou dos sólidos totais seguiu o procedimento do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL).

Uma sequência de pesagens até a obtenção de um valor constante, garantindo o fim da retirada de voláteis a 105,0 °C.

Possuindo a massa de biomassa úmida, cerca de 3,500 g, pode-se fazer a subtração da massa constante obtida dessa, encontrando-se a massa de voláteis evaporados.

O desenvolvimento desse teste deve ser feito em triplicata, garantindo a coerência e a representatividade dos resultados (SLUITER *et al.*, 2008).

O uso deste procedimento deu-se ao fato de que amostras de biomassa podem conter grandes quantidades de umidade, tendo como escopo principal a remoção da umidade, possibilitando a representação futura da amostra em peso seco. (SLUITER *et al.*, 2008).

3.3.1.3 Análise do Teor de Cinzas - Biomassas

O teor de cinzas foi determinado conforme a norma ABCP M11/77 (1977). Este método é amplamente utilizado em análises de biomassa lignocelulósica e oferece uma boa precisão e reprodutibilidade.

Cadinhos de porcelana com tampas resistentes foram colocados em uma mufla e aquecidos a 575,0 °C (+/- 25,0 °C) por uma hora.

Após esse período, foram resfriados em dessecador e pesados com precisão de 0,1 mg.

Então, foram colocadas nos cadinhos e estes tampados, levados à mufla e aquecidos à mesma temperatura de 575,0 °C por 1 hora,

Repetindo esta operação até massa constante, com as amostras “absolutamente secas” (cerca de 5,0 g), permitindo-se assim a incineração inicial.

Na mesma temperatura, foram retiradas a tampa e as amostras calcinadas por 3 horas.

Verificou-se a ausência total de partículas de carvão nas cinzas; os cadinhos, juntamente com as tampas, foram retirados da mufla, esfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados com precisão de 0,1 mg.

O teor de cinzas (TC) foi calculado segundo a EQUAÇÃO 2:

$$\text{TC (\%)} = \frac{\text{Massa das cinzas (g)} \cdot 100}{\text{Massa inicial da amostra seca (g)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

3.3.1.4 Teor de Cinzas – Fermentados

A determinação da massa seca seguiu a metodologia da NREL.

Uma massa de cerca de 2,000 g do material previamente seco a 105,0 °C, foi posicionada em cadinhos tarados, e levados à mufla na temperatura adequada por 24 horas.

A massa final de cinzas é o resultado obtido ao término do ensaio.

A massa final de cinzas é obtida por meio de simples subtração (HAUBER; PAES DE CARLI, 2023).

Este método gravimétrico, possibilita a análise de resíduos agrícolas visando a determinação da quantidade total de matéria inorgânica que a biomassa estudada possui. Assim, essa pode ser dividida em duas facetas: a estrutural e a extraível. Como seus nomes muito bem indicam, uma é fisicamente ligada à estrutura, enquanto a segunda pode ser removida por meio de um método de extração (HAUBER; PAES DE CARLI, 2023).

3.3.1.5 Análise de Extraíveis - Biomassas

A determinação do teor de extraíveis presentes nas biomassas lignocelulósicas *in natura* seguiu a norma da NREL.

Foi feita a extração em aparelho Soxhlet, com uma sequência de solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano (DCM), etanol: tolueno (1:2, v/v) (ET) e etanol 95% (EtOH), e uma extração em balão de fundo redondo com água quente (AQ).

O percentual de cada extrato em relação à massa seca do material empregado originalmente no ensaio foi obtido por diferença de massa.

3.3.1.6 Extraíveis - Fermentados

A determinação do extraíveis seguiu a norma NREL.

Foram pesadas 2,000 g de biomassa (base seca), as quais foram acondicionadas em pequenos sacos confeccionados com papel filtro de celulose. Esses sacos foram inseridos no interior de um sistema de extração Soxhlet, acoplado

a balões de fundo redondo contendo os solventes de interesse e posicionados sobre mantas de aquecimento.

A temperatura das mantas foi ajustada para garantir o número adequado de ciclos de sifonagem por hora, conforme as características de cada solvente. Para a água, foram estabelecidos de 4 a 5 ciclos de sifão por hora, enquanto para o etanol a 95% (m/m), o controle térmico foi ajustado para permitir de 6 a 10 ciclos de sifão por hora.

Inicialmente, realizou-se a extração aquosa, com duração total de 9 horas. Em seguida, procedeu-se à extração com etanol a 95% por 17 horas. Após o término de cada etapa de extração, os extratos líquidos foram submetidos à evaporação dos solventes por meio de um evaporador rotativo (rotaevaporador), operando a 80 °C para a fração aquosa e 60 °C para a etanólica.

A finalidade do processo de evaporação foi a concentração das soluções e a remoção completa dos solventes, possibilitando a quantificação da massa de sólidos remanescente. Essa massa corresponde ao teor de compostos extraíveis presentes em cada uma das (MENG; TAN; FENG, 2019).

A escolha deste método se dá pelo fato de que alguns materiais não ligados à estrutura química da biomassa são, em métodos de caracterização analítica, causadores de interferência, sendo necessário removê-los, o que gerará maior qualidade à análise de carboidratos e de lignina (MENG; TAN; FENG, 2019).

3.3.1.7 Análise de Klason

A determinação de lignina insolúvel seguiu o método de Klason.

Uma massa de cerca de 1,00 g de amostra seca e moída foi tratada com 15 ml de ácido sulfúrico 72% (v/v), por 2 horas a 20 °C, com agitação constante.

Em seguida, a mistura foi diluída até concentração de 3,0% de ácido e submetida à hidrólise em autoclave a 121 °C por 1 hora.

Após a hidrólise, o material foi filtrado.

O resíduo sólido (lignina insolúvel) foi lavado, seco e quantificado gravimetricamente.

A lignina parcialmente solubilizada foi qualificada por espectrofotometria no ultravioleta.

3.3.1.8 Determinação de carboidratos estruturais e lignina

A caracterização dos carboidratos estruturais e da lignina foi realizada conforme protocolo do NREL (SLUITER *et al.*, 2008), utilizando biomassa previamente livre de extrativos.

Uma massa de 300 mg de amostra foi pesada e adicionados 3 ml de H₂SO₄ concentrado (72% m/m), mantendo-se a mistura a 30 °C por 1 hora com agitação periódica.

Em seguida, a amostra foi diluída com 84 ml de água destilada, reduzindo a concentração do ácido para 4%, e submetida à hidrólise em autoclave (121 °C, 1 h).

Após resfriamento, realizou-se a filtração a vácuo.

O resíduo sólido foi lavado, seco e considerado lignina insolúvel.

O filtrado foi coletado, ajustado para 250 ml e dividido para análises por UV-Vis (240 nm) - para quantificação da lignina solúvel - e por HPLC - para determinação dos açúcares monoméricos (SLUITER *et al.*, 2008).

A lignina solúvel foi determinada por UV-vis (240 nm), utilizando água como branco. Amostras diluídas foram analisadas e o cálculo seguiu a EQUAÇÃO 3, na qual ϵ é a absorvidade, *Caminho* é a distância específica do equipamento em cm e $V_{filtrado}$ é o volume total de filtrado (87 ml) (SLUITER *et al.*, 2008).

$$\%LIA_{livre} = \frac{UV_{abs} * V_{filtrado} * Diluição}{m_{amostra,seca} * \epsilon * Caminho} * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Açúcares estruturais foram quantificados por HPLC, com base em curvas de calibração e a Equação 9, onde $V_{balão}$ é o volume do balão utilizado e a *Relação* diz respeito a uma proporção entre os açúcares degradados e os de fato encontrados na matéria. (SLUITER *et al.*, 2008).

$$\%açúcar_{livre} = \frac{Quantificação * V_{balão} * Relação}{10 * m_{amostra,seca}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Os resultados foram corrigidos para a biomassa bruta pela EQUAÇÃO 5:

$$\%Componente_{bruto} = \%Componente_{livre} \cdot \frac{m_{livre}}{m_{bruta}} \quad (\text{Eq.5})$$

Por fim, a equação acima destaca a necessidade de correção dos percentuais na transformação de livres de extraíveis em biomassa bruta, o que é feito por meio de uma simples noção de proporção mássica.

3.3.1.9 Análise do teor de Ácidos Orgânicos

A composição de ácidos orgânicos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir do hidrolisado obtido pelo método de Klason.

A identificação e quantificação dos ácidos eluídos foram realizadas por comparação com padrões, utilizando detetores de índice de refração (RID-10A) e ultravioleta (UV-MP10), ambos da marca Shimadzu.

As análises foram realizadas em sistema CLAE Shimadzu LC20AD, com amostrador automático (SIL10A), desgaseificador (DGU14A), forno de coluna (CTO10A) e detector de índice de refração (RID10A).

Utilizou-se coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) com pré-coluna 87H, a 65 °C, eluída com H₂SO₄ 10 mmol L⁻¹, a 0,6 ml min⁻¹.

A quantificação foi feita por padronização externa, com curvas de calibração para açúcares, ácidos orgânicos e etanol.

3.3.3 Análise Microbiana, Meios de Cultura e Placas para Identificação

As análises microbiológicas foram feitas utilizando placas prontas da BIOCEN®.

Os métodos de espalhamento, seletividade para os grupos de microrganismos seguiram as orientações da Farmacopéia Brasileira 5^a. Edição - Capítulo 5.5, a partir da mistura e homogeneização da biomassa, bem como de materiais para o depósito da biomassa e o armazenamento dos experimentos em determinados tempos de residência.

Abaixo são indicados os meios e os grupos avaliados no crescimento microbiano, como as placas:

- Ágar MacConey (MCCK) - *Salmonella sp.*, *Shigella* e coliformes;
- Ágar Cetrimida (PSA) - *Pseudomas*;
- Ágar Sal Manitol (SM) - *Staphylococcus sp.*;

- Ágar Triptona de Soja (TSA) - microrganismos aeróbios mesófilos;
- Ágar Violeta Vermelho Neutro Glucose (VRBGA) – Enterobactérias;
- Ágar Dextrose Sabouraud (SDA) – Bolores e Leveduras

As culturas foram desenvolvidas em estufas microbiológicas, duas de modelo 410/5ND da fabricante Nova Ética, e outra de modelo TE-394/1 da fabricante Tecnal, todas a 37 °C.

3.3.4 Bioreatores - Fermentação no estado sólido (*dry digestion*)

Após a realização do procedimento da primeira etapa, a digestão a seco da biomassa foi realizada.

Na segunda etapa (2), foi realizada a fermentação no estado sólido (*dry digestion*), da biomassa, com seus microrganismos epifíticos, buscando a propagação dos microrganismos e seleção em um meio acético, além da obtenção de produtos de valor agregado (açúcares, ácidos orgânicos e etanol, biogás, digestato).

3.3.4.1 Relação inóculo/substrato

A proporção inóculo/substrato foi considerada com base na importância dos microrganismos na digestão anaeróbia. O inóculo fornece a microbiota responsável pela degradação da matéria orgânica e produção de biogás.

Cuidados foram tomados para evitar a contaminação por microrganismos epifíticos presentes no capim-elefante, que poderiam comprometer a eficiência do processo. (*PAGLIA et al., 2022*).

A biomassa vegetal, além de atuar como substrato, contribui com nutrientes (N, P, K) que enriquecem o digestato, tornando-o um biofertilizante potencialmente aplicável na agricultura (*PAGLIA et al, 2022*).

3.3.4.2 Fermentação no Estado Sólido a seco

A fermentação no estado sólido foi empregada para a estabilização da matéria orgânica e para o favorecimento da produção de produtos de valor agregado, como açúcares, ácidos orgânicos e etanol, além do biogás.

Utilizou-se capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) como substrato lignocelulósico, além de farinha de trigo integral, água e ácido acético (PA) como agente acidificante.

A digestão foi conduzida em bioreatores de vidro preenchidos com a biomassa seca como se pode visualizar na FIGURA 20.

FIGURA 20 - BIOREADORES USADOS NOS ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA



FONTE: O autor (2022).

Frascos de vidro foram utilizados como bioreatores devido à sua transparência, permitindo o monitoramento visual da biomassa durante a fermentação. As tampas foram perfuradas para a inserção de tubos, facilitando a liberação dos gases gerados, prática comum em processos de biodigestão anaeróbia para evitar o acúmulo de pressão.

a) *Montagem dos Bioreatores e Conversão Ácida da Biomassa*

Foram conduzidos 12 experimentos em bioreatores, variando-se a adição de água e a acidificação inicial. Os tempos de residência adotados foram de 10, 20 e 30 dias.

O capim-elefante foi previamente triturado em um triturador forrageiro, resultando em partículas de tamanho reduzido e não uniforme.

Depois de triturado, o capim elefante foi pesado em uma balança.

A biomassa triturada foi homogeneizada com farinha de trigo integral, água e ácido acético PA em proporções variadas. A mistura foi preparada em recipientes apropriados antes de ser transferida aos bioreatores (FIGURA 21).

FIGURA 21 - MISTURA E HOMOGENEIZAÇÃO



FONTE: O autor (2022).

Cada bioreator recebeu 800 g de biomassa e 100 g de farinha de trigo integral.

A água e o ácido acético (PA) (4%) foram adicionados em volumes variados, conforme quatro níveis de acidificação, calculados com base na equação de diluição de soluções (Eq. 6).

$$c_1v_1 = c_2v_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

A EQUAÇÃO 6 é um método utilizado para diluir soluções estoque quando as concentrações são conhecidas, visando a uma concentração diferente, em que **C** é a concentração, **V** o volume e os índices 1 e 2 indicam, respectivamente, os dados da solução estoque e da solução desejada.

Foram montados quatro bioreatores para cada tempo de residência (10, 20 e 30 dias), totalizando 12 experimentos. Os sistemas foram projetados para manter condições anaeróbias e permitir a conversão da biomassa por microrganismos. A TABELA 6 apresenta o arranjo experimental adotado.

TABELA 6 - MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

	Tempo de residência (dias)	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ÁCIDA INICIAL (mL/100g)			
		Nível			
Relação Substrato/ inóculo	10 20 30	0 (0%)	1 (2%)	2 (3%)	3 (4%)
Relação Ácido Acético: Água		800 g de biomassa lignocelulósica 100 g de farinha de trigo integral			
		10 mL de H ₂ O	50 ml de H ₂ O	28 mL de H ₂ O	0 mL de H ₂ O
		0 mL de AA*	50 mL de AA*	72 mL de AA*	100 mL de AA*

FONTE: O autor (2022).

Os bioreatores foram identificados com os dias de residência e os níveis de acidificação. (FIGURA 22)

FIGURA 22 - REATORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS



FONTE: O autor (2022).

Os bioreatores foram preenchidos com a biomassa lignocelulósica e o inóculo microbiano, conforme as condições de fermentação especificadas na TABELA 6.

b) Parâmetros físico-químicos selecionados

Os parâmetros físico-químicos para a fermentação anaeróbia a seco nos bioreatores foram baseados em estudos anteriores voltados à estabilização da matéria orgânica. A TABELA 7 apresenta o resumo desses parâmetros.

TABELA 7 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

Parâmetros	
Acidificação inicial:	Quatro níveis: 0%; 2%; 3%; 4%
Agitação:	Não
Temperatura:	Ambiente
Tempo de residência:	Três: 10; 20; 30 dias

FONTE: O autor (2022).

c) Obtenção do Extrato lixiviado

Para realizar a análise química dos açúcares, ácidos orgânicos e etanol presentes no lixiviado, alíquotas do lixiviado foram coletadas do digestato de cada bioreator para análise química de açúcares, ácidos orgânicos e etanol.

A amostra sólida foi colocada em funil de Büchner, revestido com filme de polipropileno para otimizar a filtração a vácuo, e conectado a um Kitassato com bomba de vácuo.

Após a extração a vácuo, o lixiviado foi armazenado em refrigerador, em 12 frascos identificados, correspondentes aos bioreatores utilizados (FIGURA 23).

FIGURA 23 - LIXIVIADO EXTRAÍDO

(A) 10 dias de residência (B) 20 dias de residência (C) 30 dias de residência



FONTE: O autor (2022)

Após a filtração da biomassa, o eluído foi centrifugado usando uma centrífuga Eppendorf (modelo 5415B, Brinkmann Instruments Inc.) e, posteriormente, analisado por cromatografia líquida de alta resolução para determinar suas características físico-químicas.

As amostras foram preparadas diluindo-se 0,1 mL do lixiviado centrifugado em 0,9 mL de água destilada, ajustando-se à faixa de detecção da curva padrão cromatográfica (FIGURA 24).

FIGURA 24 - ALÍQUOTAS DO LIXIVIADO CENTRIFUGADAS PARA CROMATOGRAFIA



FONTE: O autor (2023).

3.3.6 Reatores e Bioprocessos de Fermentação no estado líquido (*liquid digestion*)

Na terceira etapa (3), foi realizada a fermentação no estado líquido (*liquid digestion*), da biomassa buscando a propagação de microrganismos e fermentação láctica e alcóolica (etanoica).

Para as fermentações nesta fase utilizaram-se uma incubadora microprocessada refrigerada com agitação e um bioreator Multifors 2.

a) Incubadora refrigeradora com agitação - Reator anaeróbio 3 (C)

Para representar a etapa de hidrólise e fermentação, foram utilizados 63,0 g de biomassa em um erlenmeyer de 250 mL, completado com água ultrapura até atingir 500 mL.

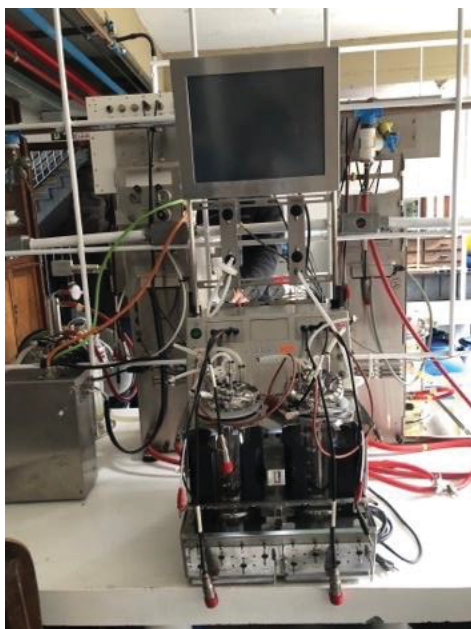
As amostras foram incubadas em equipamento refrigerado com agitação orbital (modelo TE-422, Tecnal), operando entre 34,0 °C e 37,0 °C, 49 rpm, com capacidade de refrigeração de até 480 BTU/h.

O sistema foi utilizado como meio básico para o desenvolvimento de microrganismos epifíticos em condições controladas.

b) Bioreator Infors HT Multifors 2 - Reator anaeróbio 1 (A) e 2 (B)

O bioreator Multifors 2 (INFORS HT) foi utilizado para experimentos de fermentação microbiana em pequenos volumes. Equipado com a plataforma eve® de controle, o sistema permitiu condução paralela de bioprocessos com precisão estatística e monitoramento eficiente de parâmetros, adequado para o cultivo celular e aplicações em digestão anaeróbia (FIGURA 25).

FIGURA 25 - BIOREATOR INFORS HT MULTIFORS 2



FONTE: O autor (2023).

A biomassa foi cortada manualmente com tesoura previamente lavada e esterilizada com álcool 45%, para posterior uso no processo de fermentação e hidrólise no bioreator multiprocessado INFORS HT (FIGURA 26).

FIGURA 26 - BIOMASSA UTILIZADA

(A)



(B)



FONTE: O autor (2023)

LEGENDA: (A) Capim elefante na sua forma *in natura*, (B) Corte para análise microbiana e hidrólise.

Após o processo de corte da biomassa [FIGURA 26 (B)], o material foi pesado em uma balança analítica modelo Adventurer.

Após a pesagem, a biomassa foi destinada ao processo de hidrólise e, posteriormente, à análise microbiológica.

FIGURA 27 - VASOS REACIONAIS E BECKER COM CAPIM-ELEFANTE FRESCO UTILIZADO NO REATOR MULTIFORS 2 E INCUBADORA REFRIGERADORA COM AGITAÇÃO



FONTE: O autor (2023).

A biomassa foi cortada, pesada (63 g) e distribuída em um Becker e em dois vasos reacionais (1 e 2) do bioreator Multifors 2, com consistência aproximada de 13%.

Os vasos 1 e 2 [reatores 1 (A) e 2 (B)] foram preenchidos com água até 500 mL e submetidos à hidrólise e fermentação no Multifors 2, utilizando soluções de sacarose a 50% e ácido acético a 4% para ajuste do pH 3 e fornecimento de carbono.

O Becker [Reator 3 (C)] recebeu biomassa e água, sem adição das soluções, sendo incubado em refrigeradora com agitação, servindo como controle (branco).

Os três reatores operaram em condições anaeróbias por 0, 10 e 20 dias (FIGURA 33).

O Reator 1 (A) trabalhou com agitação, o reator 2 sem agitação. Os parâmetros de hidrólise e fermentação seguiram protocolos anteriores, controlando temperatura, pH, agitação e pO₂, conforme resumido na FIGURA 28, em relação ao bioreator Multifors 2.

FIGURA 28 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS UTILIZADOS NOS REATORES 1 E 2



FONTE: O autor (2023).

Para avaliar o processo de hidrólise e fermentação, foram coletadas alíquotas dos reatores 1 (A), 2 (B) e 3 (C).

As amostras foram acondicionadas em tubos Eppendorf para posterior análise físico-química e microbiana.

O eluido coletado foi submetido à análise microbiana e centrifugado para análise cromatográfica em fase líquida de alta resolução (CLAE).

Para esta última, as amostras foram preparadas diluindo 0,1 mL do centrifugado em 0,9 mL de água ultrapura, ajustando-se à faixa da curva padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo buscou analisar a presença de microrganismos epifíticos e sua capacidade de gerar rotas específicas de produção ou formação de açúcares, ácidos orgânicos, etanol, com destaque para o ácido láctico por meio da hidrólise acética, em função das condições do meio de cultura e a adaptação dos microrganismos existentes inicialmente na biomassa, bem como definir os melhores parâmetros operacionais que permitem as condições ótimas para a produção do biogás.

A produção de ácido láctico é um indicador importante da qualidade e estabilidade da fermentação, especialmente em processos que envolvem microrganismos como bactérias lácticas (*PAGLIA et al.*, 2022).

De forma geral, os resultados abaixo referem-se à fermentação tanto em estado sólido quanto em estado líquido. Abaixo, segue alguns dos melhores resultados, com figuras, tabelas, quadros.

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES DA BIOTA MICROBIANA

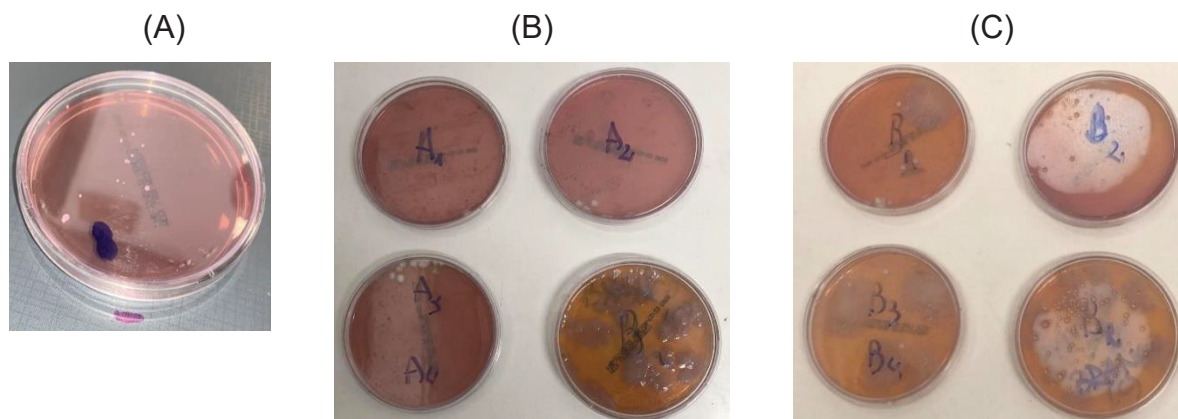
Abaixo, são exibidas várias placas com microrganismos cultivados em meios seletivos, provenientes dos reatores [1 (A), 2 (B) e 3 (C)]. As primeiras análises dessas placas com meio de cultura tiveram como objetivo principal observar o crescimento microbiano em diferentes meios aplicados à biomassa após fermentação e hidrólise. Nessa fase, foram observados aspectos, como a forma e a coloração da colonização microbiana. Essa avaliação forneceu uma visão preliminar da atividade microbiológica nos extratos analisados.

As amostras dos meios reacionais, após fermentação e hidrólise, foram inoculadas em várias placas Biocen® com o objetivo inicial de observar o crescimento microbiano na biomassa bruta e a sua seletividade natural devido às condições reacionais. Nessa fase, foram examinados aspectos da colonização microbiana, como o formato, a coloração e a quantidade de colônias formadas. Essa análise forneceu uma visão da atividade microbiológica presente nos extratos analisados.

4.1.1 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas MCCK

Abaixo seguem os resultados da análise microbiana com as placas MCCK.

FIGURA 29 - RESULTADOS DAS PLACAS MCKK (SALMONELLA SP., SHIGELLA E COLIFORMES)



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: (A) Placa MCKK - Primeira análise comparativa, (B) Placas MCKK (A) - Reator 1 (A) e 3 (C - Branco), (C) Placas MCKK (B) - Reator 2 (B) e 3 (C - Branco).

4.1.1.1 Primeira Análise Comparativa - Placa MCKK

A primeira análise realizada com a placa MCKK teve como objetivo inicial observar o crescimento microbiano em diferentes meios de cultura aplicados à biomassa após os processos de fermentação e hidrólise. Nessa etapa, foram avaliados aspectos da colonização microbiana, como formato, coloração. Essa análise forneceu uma visão preliminar da atividade microbiológica presente nos extratos analisados.

4.1.1.2 Comparação entre as Placas MCKK (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)

Foram analisadas as amostras do Reator 1 (A), que operou com agitação e adição de sacarose e ácido acético, em relação ao Reator 3 (C), considerado o branco (sem aditivos ou suplementação, ou seja, sacarose e ácido acético e agitação). Observou-se maior desenvolvimento microbiano no Reator 1, indicando que as condições operacionais favorecem o crescimento de microrganismos endógenos e/ou adaptados à biomassa fermentada. O controle [Reator 3 (C)] apresentou colônias mais esparsas e menos diversificadas, sugerindo que os suplementos ou aditivos e a agitação desempenharam um papel crucial no estímulo ao crescimento microbiano.

4.1.1.3 Comparação entre as Placas de MCCK (B) - Reator (B) vs. Reator 3 (C Branco)

A análise entre o Reator 2 (B), sem agitação, porém com aditivos, e o Reator 3 (C - Branco), permitiu observar o impacto isolado dos aditivos sobre o desenvolvimento microbiano. Os resultados indicaram um crescimento moderado no Reator 2, maior que no branco, mas inferior ao Reator 1, o que demonstra que, embora os aditivos promovam o crescimento microbiano, a ausência de agitação limita a homogeneização e oxigenação, fatores importantes para um cultivo mais eficiente.

QUADRO 2 - CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO ENTRE OS REATORES
UTILIZANDO PLACAS MCCK

Reator / Placa	Condições Operacionais	Suplementos (Sacarose/Ác. Acético)	Agitação	Crescimento Microbiano Observado	Observações Principais
Reator 1 (A)	Multifors 2 - Com agitação	Sim	Sim	Elevado	Colonização intensa e diversificada
Reator 2 (B)	Multifors 2 - Sem agitação	Sim	Não	Moderado	Crescimento significativo, porém, limitado
Reator 3 (C - Branco)	Incubadora refrigerada - Controle (sem suplementos)	Não	Sim	Baixo	Poucas colônias, crescimento discreto

FONTE: O autor (ano).

A análise microbiológica das amostras cultivadas em vários meios seletivos permitiu identificar a presença e o comportamento de grupos bacterianos importantes em ambientes ambientais, alimentares e clínicos. A seguir, aborda-se a presença e as implicações dos principais gêneros detectados ou estudados nas amostragens.

O Agar MacConkey (MCCK) é descrito como meio seletivo e diferencial para bacilos Gram-negativos, diferenciando fermentadores e não fermentadores de lactose (NASCIMENTO, 2010; JUNG; HOILAT, 2025).

a) *Salmonella*, *Shigella* e Coliformes sp.

A presença de colônias em meios como o Agar MacConkey (MCCK) e o meio *Salmonella-Shigella* (SS) indica enterobactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose (RIBEIRO et al., 2020; STATPEARLS, 2024).

Quanto à sua aplicação à produção de biogás, a presença de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, e coliformes em meios seletivos, como MacConkey agar (MCCK) e

VRBGA, está relacionada à atividade fermentativa inicial e à degradação parcial da biomassa. Embora não participem diretamente da metanogênese, esses microrganismos atuam nas fases hidrolítica e acidogênica da digestão anaeróbia, promovendo a conversão de polissacarídeos, proteínas e lipídios em ácidos orgânicos e em intermediários metabólicos (RIBEIRO et al., 2020; STATPEARLS, 2024).

Os coliformes totais e termotolerantes, como *Escherichia coli*, estão associados a ambientes fermentativos ou industriais. Níveis elevados de sua detecção podem indicar falhas no controle higiênico ou recontaminação cruzada (CAP-LAB, 2023). Para a produção de biogás, a presença elevada de coliformes termotolerantes pode indicar risco de competição microbiana e de consumo excessivo de substrato fermentável, sem conversão metanogênica eficiente (CAP-LAB, 2023). Em termos operacionais, densidades elevadas desses microrganismos devem ser interpretadas como indicativo de fermentação ativa, porém desequilibrada do ponto de vista energético.

Em meios que diferenciam fermentadores (coliformes) de patógenos, é possível correlacionar densidades mais altas com contaminação ou falhas de sanitização. Comparar a presença de *Salmonella* ou *Shigella* (identificada por meio de SS ou XLD) ajuda a avaliar o risco toxigênico em relação à contagem geral de coliformes.

4.1.2 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas PSA

Na FIGURA 30, segue o resultado da primeira análise microbiana com as placas PSA.

FIGURA 30 - RESULTADO DAS PLACAS PSA (PSEUDOMAS)



FONTE: O autor (2023).

4.1.2.1 Primeira análise comparativa - Placa PSA

A primeira análise com Placas PSA teve como objetivo avaliar de forma preliminar a presença e diversidade microbiana nas amostras oriundas da digestão anaeróbia.

Observou-se um crescimento microbiano inicial expressivo, o que indicou a presença de microrganismos endógenos na biomassa. A coloração, densidade e distribuição das colônias sugeriram atividade microbiana significativa já nas primeiras 24 a 48 horas de incubação.

Ainda nas placas PSA, análises recentes feitas [reator 1 (A), Reator 2 (B), Reator 3 (C - Branco)] demonstraram que não foi seletiva, sendo genérica, ou seja, houve crescimento de várias culturas, que caracterizou seu uso neste estudo mais propriamente para confirmação da presença de microrganismos do que a seleção específica.

4.1.2.2 (B) Placas PSA (A) - Comparação entre Reator 1 (A) e Reator 3 (C - Branco)

As amostras dos reatores 1 (com agitação e suplementação) e 3 (controle sem suplementação), com as Placas PSA revelaram que o Reator 1 (A) apresentou alta densidade de crescimento microbiano, com colônias bem definidas e distribuídas, indicando um ambiente propício à proliferação de microrganismos fermentativos. A agitação e os suplementos contribuíram para a biodisponibilidade de nutrientes. Enquanto o Reator 3 (C - Branco) mostrou crescimento microbiano limitado, com colônias esparsas. A ausência de suplemento energético e o papel de controle deste reator justificam os resultados reduzidos.

4.1.2.3 (C) Placas PSA (B) - Comparação entre Reator 2 (B) e Reator 3 (C Branco)

Os resultados das amostras dos reatores 2 (sem agitação) e 3 (branco) demonstraram que o Reator 2 (B) apresentou crescimento microbiano moderado, maior que o controle, mas inferior ao reator 1. A ausência de agitação pode ter limitado a dispersão de nutrientes, afetando a eficiência da fermentação. Enquanto o Reator 3 (C - Branco) novamente serviu como referência, com baixo nível de crescimento microbiano, confirmando a influência positiva da suplementação e das condições operacionais nos reatores 1 e 2.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE OS REATORES UTILIZANDO PLACAS PSA

Reator	Condições Operacionais	Crescimento Microbiano (%)	Observações
Reator 1 (A)	Com agitação + sacarose (50%) + ácido acético (4%)	~90%	Maior crescimento; ambiente mais favorável à fermentação.
Reator 2 (B)	Sem agitação + sacarose (50%) + ácido acético (4%)	~60%	Crescimento moderado; ausência de agitação influenciou.
Reator 3 (C - Branco)	Sem adição de nutrientes; apenas biomassa e água	~25%	Menor crescimento; controle da atividade microbiana basal.

FONTE: O autor (2025).

As Placas PSA permitiram verificar a influência de parâmetros como agitação, suplementação e controle de temperatura na atividade microbiana. O Reator 1 (A) demonstrou ser o mais eficiente na promoção da fermentação microbiana.

A análise reforça a importância do ambiente controlado e da adição de fontes de carbono para intensificar a biodegradação e produção de metabólitos desejados.

O Agar Cetrimida (PSA) é utilizado especificamente para o isolamento e a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, graças à sua elevada seletividade, com inibição de outras bactérias (CEBRIAN *et al.*, 2023; HEXIS CIENTÍFICA, 2023).

Todas as placas apresentaram o mesmo indicativo de presença de microrganismos, não sendo possível diferenciar as condições ou os meios por meio do plaqueamento. Ensaio de contagem em ágar (em frascos) poderiam ajudar na quantificação, mas não foram realizados, pois o foco deste estudo não era quantificar microrganismos, apenas verificar sua presença ou ausência.

a) *Pseudomonas spp.*

O gênero *Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, é um gênero ubíquo, aeróbio, oxidase-positivo e resistente a variações ambientais. Possui diversos fatores de virulência, como exotoxinas, alginato, pigmentos (piocianina) e biofilmes altamente adaptáveis.

As colônias desenvolvidas em meio PSA apontaram a possível presença de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, aeróbia estrita e que cresce

preferencialmente em ambientes oxigenados, sendo favorecida por agitação e fluxo de nutrientes (SOUZA *et al.*, 2021).

Estudos recentes mostram como biofilmes de *Pseudomonas* se adaptam ao estresse hidrodinâmico — aumentando densidade, produção de matriz e estabilidade mecânica sob fluxo (JOSUE *et al.*, 2021; CHAN, 2021).

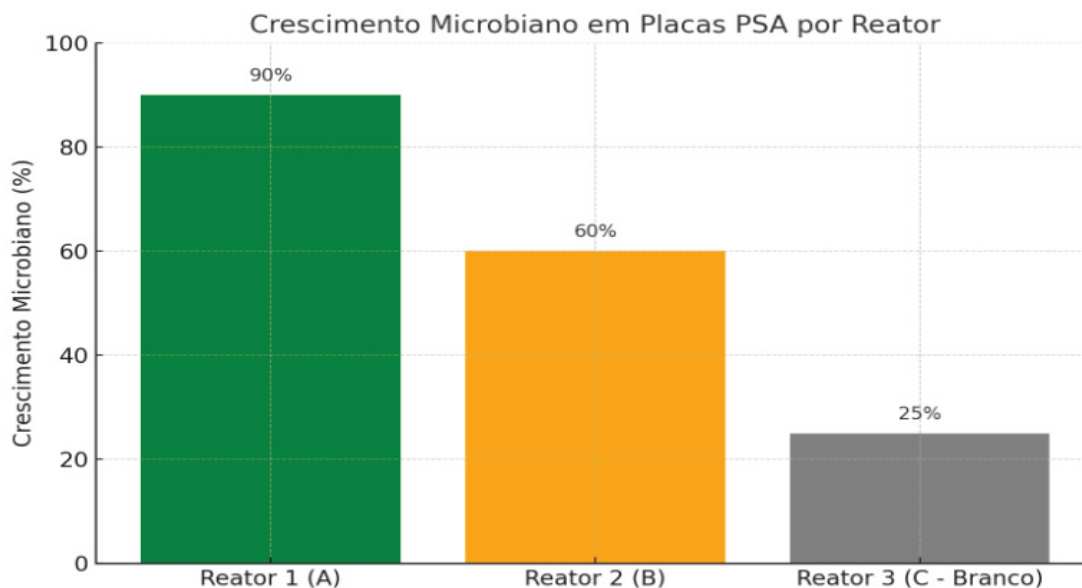
Em relação à sua aplicação na produção de biogás, embora tradicionalmente não associada à produção de biogás em ambientes anaeróbios, a ocorrência de *Pseudomonas* em sistemas parcialmente oxigenados ou com fluxo de recirculação de substratos pode impactar a composição da microbiota fermentadora (SOUZA *et al.*, 2021). Além disso, a formação de biofilmes por *Pseudomonas* pode alterar o equilíbrio físico-químico dos reatores, afetando a transferência de massa e a distribuição de nutrientes entre as comunidades microbianas, o que pode comprometer a eficiência de conversão em metano (CHAN, 2021).

Na FIGURA 31, o gráfico resume os resultados da análise comparativa das Placas PSA nos diferentes reatores utilizados no experimento.

O Reator 1 (A) apresentou o maior crescimento microbiano (~90%), indicando que as condições com agitação e adição de sacarose e ácido acético foram mais favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos. O Reator 2 (B), sem agitação, teve um crescimento intermediário (~60%), sugerindo que a ausência de movimentação afetou negativamente o ambiente microbiano. O Reator 3 (C - Branco), que não recebeu adição de nutrientes, mostrou o menor crescimento (~25%), servindo como controle da atividade natural da biomassa sem suplementação.

Como observou-se na TABELA 8, a FIGURA 31 resume os resultados da análise comparativa.

FIGURA 31 - CRESCIMENTO MICROBIANO PLACAS PSA NOS DIFERENTES REATORES UTILIZADOS



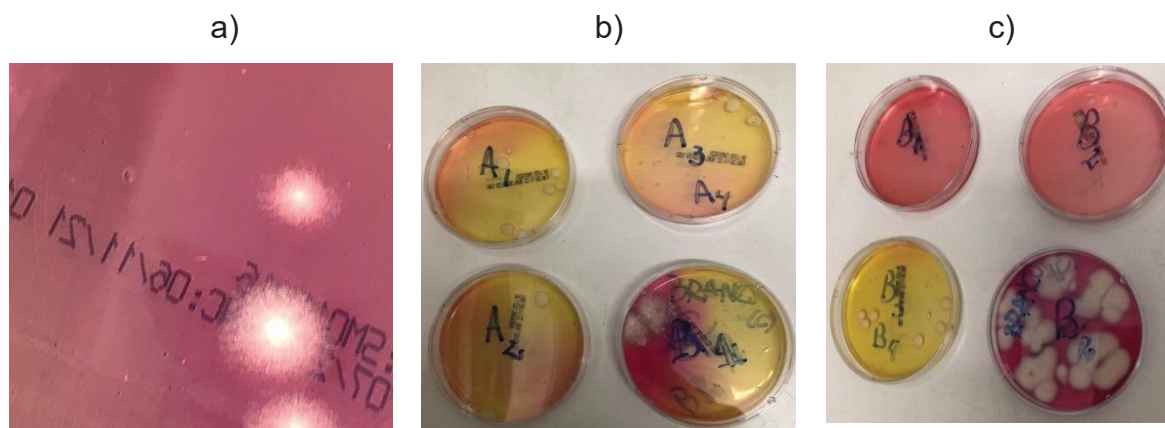
FONTE: O autor (2025).

Esses resultados demonstram que tanto os fatores nutricionais quanto as condições físicas, como a agitação, influenciam diretamente a eficiência da fermentação microbiana e, portanto, um crescimento de colônias em placa PSA sugere presença de *P. aeruginosa*. Em reatores com agitação e maior oxigenação, o crescimento pode ser favorecido. A adaptação a biofilmes pode indicar sua persistência em sistemas reatoriais com fluxo. Resistências potenciais devem ser consideradas (CHAN, 2021; SOUZA *et al.*, 2021).

4.1.3 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SM

Segue abaixo, na FIGURA 32, apresentação dos resultados da análise microbiana com as placas SM, com legendas claras e concisas, explicando o conteúdo da figura.

FIGURA 32 - RESULTADOS DAS PLACAS SM (STAPHYLOCOCCUS SP.)



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: (A) Placa SM - Primeira análise comparativa, (B) Placas SM (A) - Reator 1 (A) e 3 (C - Branco), (C) Placas SM (B) - Reator 2 (B) e 3 (C - Branco).

4.1.3.1 (A) Placa SM - Primeira Análise Comparativa

A análise inicial nas Placas SM mostrou a presença de colônias microbianas com intensidade visivelmente maior nos reatores que receberam suplementação (reatores 1 e 2), em comparação ao Reator 3 (C - Branco). Isso indica que a adição de sacarose e ácido acético favoreceu o crescimento microbiano, principalmente de microrganismos fermentativos, como lactobacilos e outros anaeróbios facultativos.

4.1.3.2 (B) Placas SM (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)

A comparação entre o Reator 1 (com agitação e suplementação) e o Reator 3 (C) (sem suplementação) revelou que o Reator 1 (A) (com agitação e suplementação) apresentou maior densidade de colônias e diversidade microbiana nas Placas SM, confirmando que a agitação associada à presença de nutrientes promoveu condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos acidogênicos. Enquanto o Reator 3 (C) (sem suplementação) mostrou crescimento discreto, indicando apenas a atividade basal da microbiota endógena presente na biomassa.

4.1.3.3 (C) Placas SM (B) - Reator 2 (B) vs. Reator 3 (C - Branco)

A comparação entre o Reator 2 (sem agitação, mas com suplementação) e o Reator 3 (C - controle) evidenciou que o Reator 2 (B) teve crescimento microbiano moderado, menor que o do Reator 1, mas ainda expressivo. A ausência de agitação pode ter limitado a oxigenação localizada e a dispersão de nutrientes, afetando o

desenvolvimento de algumas colônias. Enquanto o Reator 3 (C) novamente apresentou crescimento limitado, servindo como referência de base microbiana natural, sem aditivos ou interferência externa.

QUADRO 3 - DENSIDADE E DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA ENTRE OS REATORES (PLACAS SM)

Reator	Condição Experimental	Densidade de Colônias	Diversidade Microbiana
Reator 1 (A)	Com agitação + sacarose + ácido acético	Alta	Alta
Reator 2 (B)	Sem agitação + sacarose + ácido acético	Moderada	Moderada
Reator 3 (C - Branco)	Controle (sem suplementos)	Baixa	Baixa

FONTE: O autor (ano).

O Agar Sal Manitol, é um meio seletivo e diferencial para estafilococos (*Staphylococcus aureus*), entre outras espécies tolerantes ao sal, baseado na fermentação de manitol e em alta concentração de cloreto de sódio (NaCl, 7,5%). Informações atuais destacam crescimento amarelo em colônias fermentadoras e vermelho em colônias não fermentadoras (MANNHEIM *et al.*, 1952; MORGAN DIAGNOSTICS, 2025).

Staphylococcus sp.

O crescimento observado em placas SM (Agar Sal Mannitol) revelou a presença de estafilococos (*Staphylococcus spp.*), com destaque para *S. aureus*, identificado pela fermentação positiva do manitol (coloração amarela). Este microrganismo é comum em ambientes humanos e animais (MBOLOG, 2023; RODRIGUES *et al.*, 2023).

No que se refere à sua aplicabilidade na produção de biogás, embora os estafilococos (*Staphylococcus aureus*) e outras espécies não estejam diretamente envolvidos na produção de biogás, sua presença pode refletir competição por substrato ou interferência nos processos hidrolíticos iniciais. Além disso, a capacidade de algumas cepas de estafilococos de produzir substâncias antimicrobianas pode inibir populações benéficas, como bactérias acidogênicas e metanogênicas, prejudicando o rendimento energético do sistema (RODRIGUES *et al.*, 2023).

Em meios seletivos, como o SM, a fermentação do manitol (cor amarela) indica *S. aureus*. A presença em reatores com condições favoráveis implica risco tóxico e a necessidade de controle da contaminação por estafilococos, especialmente diante de possíveis mecanismos de resistência.

4.1.4 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SM

Os resultados das placas TSA não seguem sendo apresentados em figuras pela falta de qualidade, mas à semelhança das placas PSA, as TSA também foram genéricas. A sua análise não foi seletiva, portanto, o crescimento foi como previsto para o(s) microrganismo(s), ou seja, todas elas apresentaram o crescimento, algo que é natural nesse tipo de meio.

O Agar Triptona de Soja (TSA) é um meio geral nutritivo, amplamente utilizado na cultura de organismos não fastidiosos (microorganismos aeróbios mesófilos). Serve como base primária para subcultivos antes dos passos seletivos/diferenciais - citado como o melhor meio de base antes da aplicação de meios específicos, como o MacConkey.

Os resultados obtidos nas placas mostraram crescimento microbiano genérico, o que se espera, já que se trata de um meio não seletivo e de uso geral. Esse tipo de meio favorece o crescimento de diversas bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, e serve principalmente para verificar a viabilidade e a densidade total de microrganismos na amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2025).

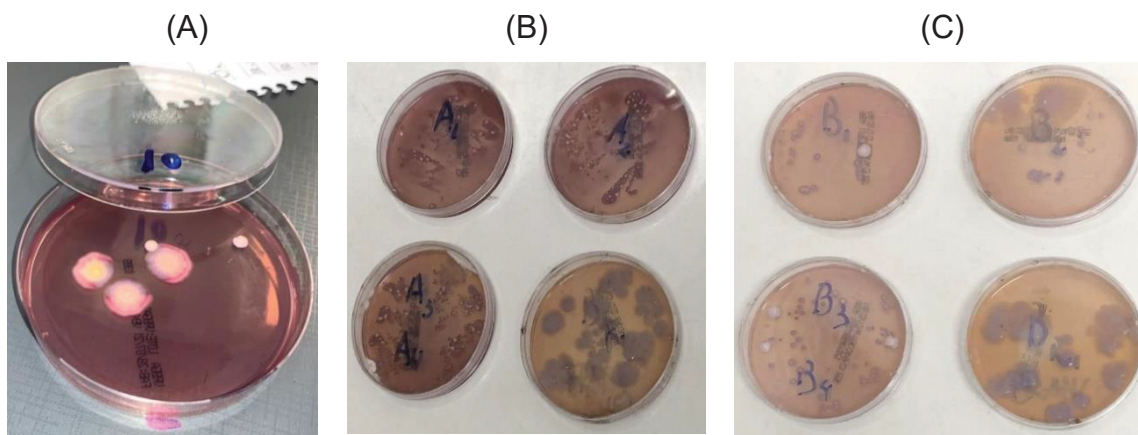
Em comparação, os meios seletivos restringem o crescimento de microrganismos não-alvo, permitindo uma identificação mais direcionada. O crescimento indistinto em TSA, portanto, confirma apenas a presença de uma comunidade microbiana ativa, sem possibilitar diferenciação entre espécies (SILVA *et al.*, 2023).

Assim, o TSA deve ser interpretado como um meio de triagem geral, útil para indicar atividade microbiana, mas insuficiente para caracterização específica. Recomenda-se associar sua utilização a meios seletivos ou a métodos moleculares, garantindo maior precisão na análise e identificação microbiana (MENDES *et al.*, 2023).

4.1.5 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas VRBGA

Segue apresentação dos resultados da análise microbiana com as placas VRBGA, na FIGURA 33, com legendas claras e concisas, explicando o conteúdo da figura.

FIGURA 33 - RESULTADOS DAS PLACAS VRBGA (ENTEROBACTÉRIAS)



Fonte: O autor (2022-2024)

LEGENDA: (A) Placa VRBGA - Primeira análise comparativa, (B) Placas VRBGA (A) - Reator 1 (A) e 3 (C - Branco), (C) Placas VRBGA (B) - Reator 2 (B) e 3 (C - Branco).

4.1.5.1 (A) Placa VRBGA - Primeira Análise Comparativa

Na análise inicial, as placas VRBGA apresentaram colônias características de enterobactérias, com coloração avermelhada e bordas bem definidas. A presença de colônias nas amostras indicou atividade fermentativa e possível degradação da biomassa. A densidade variou conforme a condição experimental de cada reator, sendo um indicativo preliminar da eficácia microbiana nos processos de hidrólise e fermentação.

4.1.5.2 (B) Placas VRBGA (A) - Reator 1 (A) vs. Reator 3 (C - Branco)

O Reator 1 (A) - Com agitação, sacarose e ácido acético apresentou maior quantidade de colônias de enterobactérias. A agitação e a fonte de carbono (sacarose) estimularam a proliferação microbiana. Indicativo de um processo ativo de fermentação com elevada atividade microbiana. Enquanto o Reator 3 (C - Branco) - Controle, sem suplementos, apresentou poucas colônias, com crescimento discreto. A ausência de nutrientes suplementares e agitação limitou o desenvolvimento microbiano.

O Reator 1 (A) demonstrou desempenho superior na ativação microbiana, favorecendo o crescimento de enterobactérias em comparação ao branco.

4.1.5.3 (C) Placas VRBGA (B) - Reator 2 (B) vs. Reator 3 (C - Branco)

No Reator 2 (B) - Sem agitação, mas com sacarose e ácido acético, houve crescimento moderado de colônias, inferior ao Reator 1. A ausência de agitação pode ter reduzido a oxigenação localizada e a distribuição uniforme dos nutrientes, limitando o crescimento. No Reator 3 (C - Branco) - Controle, novamente, demonstrou crescimento reduzido, como observado anteriormente.

O Reator 2 (B) apresentou crescimento superior ao branco, mas inferior ao Reator 1, evidenciando que a agitação é um fator importante para maximizar a atividade microbiana.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE REATORES UTILIZANDO PLACAS VRBGA

Reator	Condições Experimentais	Densidade de Colônias	Observações Microbiológicas
Reator 1 (A)	Com agitação, sacarose (50%), ácido acético (4%)	Alta	Crescimento expressivo de enterobactérias, colônias bem definidas. Indica forte atividade fermentativa.
Reator 2 (B)	Sem agitação, sacarose (50%), ácido acético (4%)	Moderada	Crescimento visível, porém, inferior ao reator 1. Agitação limitada influenciou o desenvolvimento.
Reator 3(C)	Sem agitação, sem suplementos (controle/branco)	Baixa	Crescimento restrito. Indica baixa atividade microbiana sem estímulo energético adicional.

FONTE: O autor (ano).

A presença de nutrientes (sacarose e ácido acético) combinada com a agitação (Reator 1) favoreceu significativamente o crescimento de enterobactérias. Já o controle (Reator 3 (C)) evidenciou condições limitantes para a atividade microbiana, servindo como referência para a avaliação dos efeitos dos estímulos aplicados.

O Agar Violeta Vermelho Neutro Glicose (VRBGA), indicado pela farmacopeia americana e brasileira, são recomendações como meio sólido para detecção e contagem de enterobactérias em alimentos e laticínios. Utilização no isolamento de bactérias gram-negativas bile-tolerantes a partir de produtos farmacêuticos não estéreis (BIOKAR DIAGNOSTICS, 2023).

a) *Enterobactérias*

O crescimento de enterobactérias em meios seletivos, como VRBGA e MCK, confirma a presença de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, que inclui patógenos importantes, como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Enterobacter*. Esses microrganismos possuem ampla capacidade fermentativa (TORTORA et al., 2017; BOKAR DIAGNOSTICS, 2023; REIS et al., 2023).

Na produção de biogás, as **enterobactérias**, detectadas por VRBGA e MCK, atuam principalmente nas fases de hidrólise e fermentação. Espécies como *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* estão envolvidas na conversão de compostos orgânicos complexos em ácidos graxos voláteis, CO₂, H₂ e etanol - substratos utilizados posteriormente por bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas (TORTORA et al., 2017).

Entretanto, a presença excessiva de enterobactérias pode levar à acidificação excessiva do meio, reduzindo o pH do sistema e inibindo a metanogênese. Além disso, muitas cepas exibem resistência antimicrobiana e taxa de crescimento elevada (e/ou rápida), competindo com organismos mais lentos e especializados do consórcio metanogênico (REIS et al., 2023).

Resultados positivos em placas VRBGA e MacConkey (“fermentação de lactose”) indicam a presença de enterobactérias, mas a avaliação do perfil de resistência torna-se relevante para inferir risco ambiental ou clínico.

4.1.6 Resultados e Discussão da Análise Microbiana - Placas SDA

Os resultados das placas SDA também não seguem sendo apresentados em figuras pela falta de qualidade. Seus resultados demonstram que foram genéricas.

A análise microbiológica é feita considerando uma cultura, neste estudo buscou-se caracterizar os principais grupos de microrganismos que tiveram capacidade de se desenvolver nas três (3) condições diferenciadas para o teor de ácidos.

Os resultados obtidos nas placas SDA ou DAS indicaram crescimento genérico, o que é condizente com as características desse meio. O SDA é um meio não seletivo, tradicionalmente utilizado para o cultivo amplo de fungos filamentosos e leveduras, e também pode permitir o crescimento de algumas bactérias quando não suplementado com agentes inibitórios (PEREIRA et al., 2022).

Esse comportamento demonstra que o meio sustentou o desenvolvimento microbiano de forma geral, sem discriminação entre espécies ou gêneros. Assim como ocorre com o TSA, o crescimento homogêneo em SDA apenas confirma a viabilidade dos microrganismos, mas não fornece informações específicas de identificação (LOPES *et al.*, 2023).

Dessa forma, o SDA deve ser interpretado como um meio de triagem fúngica geral, sendo recomendável o uso de meios seletivos ou de testes complementares - como observação microscópica, coloração diferencial ou técnicas moleculares - para a identificação precisa dos microrganismos presentes (RODRIGUES *et al.*, 2023).

A seguir, discute-se o papel e a implicação de grupos bacterianos isolados ou monitorados nos reatores utilizados, com ênfase nos impactos sobre a produtividade de biogás.

4.1.6.1 Panorama Geral dos Resultados da Análise Microbiana

O desenvolvimento microbiano em sistemas anaeróbios desempenha um papel crucial na conversão da matéria orgânica em biogás, especialmente metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂). A microbiota envolvida nesses processos é diversificada e inclui desde bactérias fermentadoras facultativas até microrganismos hidrolíticos, acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos.

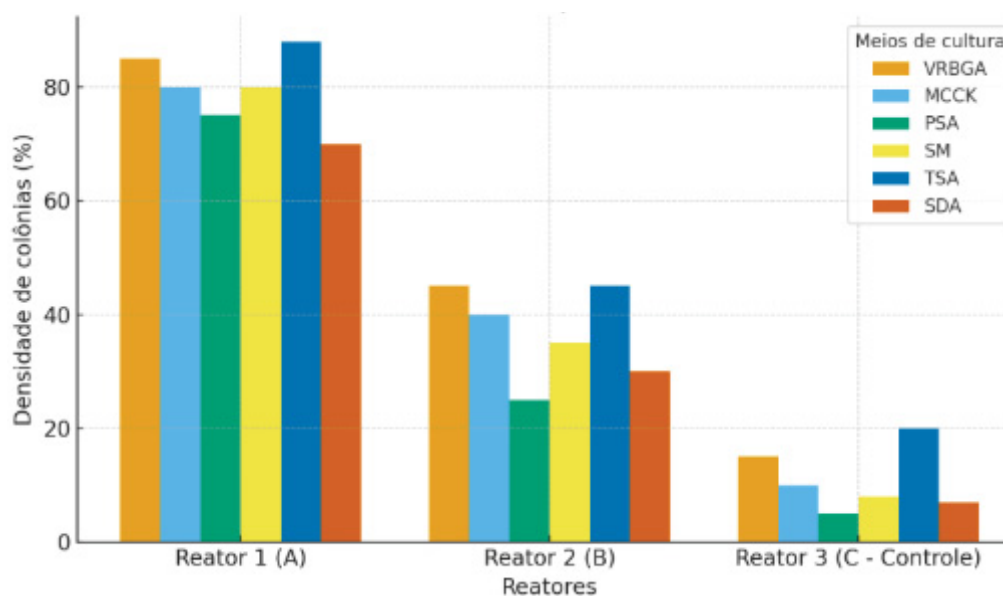
QUADRO 4 - PANORAMA GERAL DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

Meio	Reator 1 (A)	Reator 2 (B) (B)	Reator 3 (C - Controle)
VRBGA	Alta (colônias características de enterobactérias)	Moderada (crescimento reduzido sem agitação)	Baixa (crescimento discreto)
MCCK	Alta (fermentação de lactose evidente)	Moderada (crescimento menor que R1)	Baixa (crescimento restrito)
PSA	Moderada (isolamento de <i>Pseudomonas</i>)	Baixa (crescimento limitado)	Baixa (crescimento muito baixo)
SM	Alta (fermentação manitol positiva)	Moderada (crescimento visível)	Baixa (crescimento restrito)

FONTE: O autor (ano).

Os meios TSA e SDA serviram apenas para confirmar a viabilidade microbiana, sem permitir identificação específica. Assim, o QUADRO 4 apresenta apenas os demais meios, enquanto o gráfico abaixo (barras agrupadas) mostra a densidade média de colônias por meio e reator, reunindo todos os resultados para melhor visualização

FIGURA 34 - DENSIDADE MÉDIA DE COLÔNIAS POR MEIO E REATOR



FONTE: O autor (2025).

A FIGURA 34 mostra o gráfico de barras agrupadas, com o eixo X representando os reatores [1 (A), 2 (B), 3 (C)] e as cores representando os meios (VRBGA, MCCK, PSA, SM, TSA, SDA). O eixo Y mostra a densidade de colônias (numérica, na escala 0 a 100, por exemplo), podendo evidenciar claramente que o Reator 1 (A, com agitação e suplementos) favoreceu maior densidade em todos os meios, enquanto o Reator 3 (C, controle) apresenta sempre a menor densidade. O Reator 2 (B) é intermediário.

Os dados microbiológicos obtidos reforçam a importância da agitação, da suplementação nutricional e do controle sanitário para a manutenção da estabilidade dos sistemas fermentativos. A presença de microrganismos patogênicos ou resistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, estafilococos (*Staphylococcus aureus*) e enterobactérias multirresistentes, deve ser monitorada constantemente para garantir a segurança biológica dos processos.

A análise microbiológica evidenciou que o desempenho dos reatores está fortemente associado ao equilíbrio entre os grupos fermentadores e metanogênicos. A agitação e a suplementação com fontes de carbono (como sacarose) favoreceram o crescimento de enterobactérias e coliformes, refletindo intensa atividade fermentativa, mas exigem monitoramento para evitar a supressão de arqueias metanogênicas por acidificação do meio.

A presença de grupos oportunistas, como *Pseudomonas* e estafilococos, sugere a necessidade de ajustes operacionais e de maior controle sanitário para garantir a eficiência do processo anaeróbio e a estabilidade da produção de biogás.

É importante destacar que o objetivo deste trabalho não é caracterizar molecularmente, enzimaticamente ou geneticamente as espécies microbianas detectadas, tampouco analisar seus mecanismos bioquímicos específicos de atuação.

O foco da pesquisa está centrado na identificação funcional e fenotípica de grupos microbianos relevantes para o processo de digestão anaeróbia, com ênfase em sua presença, atividade metabólica e impacto na eficiência na produção de biogás.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A eficiência do processo de digestão anaeróbia está intimamente associada à manutenção de parâmetros físico-químicos adequados à atividade microbiana.

A avaliação integrada dos dados microbiológicos às variáveis físico-químicas da biomassa permite uma melhor compreensão da dinâmica de fermentação nos diferentes reatores.

Os resultados abaixo referem-se à fermentação tanto em estado sólido quanto em estado líquido, com destaque para este último.

Destacam-se, inicialmente, parâmetros como a concentração da solução ácida e o tempo de residência, como se pode observar.

A concentração de 2% de solução ácida inicial associada a um tempo de residência de 10 a 20 dias apresentou o melhor equilíbrio entre a liberação de glucose, enquanto a formação controlada de ácidos orgânicos úteis (ácido láctico e acético), foi verificada entre 20 e 30 dias, otimizando o potencial fermentativo do lixiviado.

Tempos maiores (30 dias) e concentrações mais altas (3-4%) favoreceram a formação de subprodutos como ácido fórmico e etanol, que podem ser indesejáveis em processos subsequentes.

A ausência ou baixa glucose em 0% e tempos longos indicam pouca ou nenhuma hidrólise da biomassa sem ácido, limitando o potencial fermentativo.

A seguir, a TABELA 10, mostra os resultados da atividade microbiana nos reatores anaeróbios e os parâmetros físico-químicos que afetam o desempenho microbiológico dos reatores, especialmente na produção de biogás.

TABELA 10 - RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E ATIVIDADE MICROBIANA NOS REATORES ANAERÓBIOS

Parâmetro	Reator 1 (A) - Otimizado	Reator 2 (B) - Sem agitação	Reator 3 (C) - Controle sem adição
Temperatura (°C)	35 ± 1 (mesofílica estável)	35 ± 1	35 ± 1
pH	6,8 - 7,2 (ótimo)	6,5 - 6,8	6,1 - 6,4 (ácido)
Relação C/N	~25:1 (ideal para biogás)	~22:1	~17:1 (nitrogênio em excesso)
AGVs (mg/L)	< 2.000 (estável)	~3.000 (acúmulo moderado)	> 4.000 (acúmulo excessivo)
Tempo (dias)	~20	~20	~20
Sólidos Voláteis removidos (%)	> 60% (alta remoção orgânica)	~40%	< 25%
Enterobactérias (VRBGA)	Alta (colônias evidentes)	Moderada	Baixa
Lactose-fermentadoras (MCCK)	Alta (fermentação evidente)	Moderada	Baixa
Pseudomonas (PSA)	Moderada	Baixa	Baixa
Staphylococcus sp. (SM)	Alta (fermentação de manitol)	Moderada	Baixa

FONTE: O autor (ano).

A TABELA 10, permite visualizar que nos três sistemas analisados, a temperatura foi mantida constante em torno de 35 ± 1 °C, condição que caracteriza a faixa mesofílica, a mais comum e estável para digestão anaeróbia. Essa condição favorece a atuação de bactérias fermentativas e metanogênicas, especialmente em sistemas com bom equilíbrio nutricional, como observado no Reator 1 (A).

O pH da biomassa também apresentou variações consistentes com a atividade microbiana observada. No Reator 1 (A), os valores oscilaram entre 6,8 e 7,2, faixa ideal para a atividade metanogênica, indicando estabilidade do sistema e eficiente conversão dos ácidos graxos voláteis (AGV) em metano (CH₄). No Reator 2 (B), o pH foi levemente mais ácido (6,5 a 6,8), o que pode indicar acúmulo moderado de AGVs devido à menor taxa de conversão, reflexo da ausência de agitação. Já no Reator 3 (C), observou-se tendência à acidificação (pH entre 6,1 e 6,4), compatível com baixo consumo de ácidos orgânicos e baixa atividade metanogênica.

A relação carbono/nitrogênio (C/N) é outro fator crítico. No Reator 1 (A), a adição de sacarose favoreceu uma relação C/N próxima de 25:1, ideal para o metabolismo microbiano e produção de biogás. No Reator 2 (B), sem agitação, a C/N

foi ligeiramente menor (cerca de 22:1), o que ainda se mantém em faixa aceitável. Já no Reator 3 (C), sem suplementação orgânica, a C/N caiu para valores próximos de 17:1, indicando desequilíbrio nutricional e possível acúmulo de nitrogênio amoniacal, prejudicial aos microrganismos metanogênicos.

A concentração de AGVs, medida juntamente com o Tempo (dias), apresentou forte correlação com a atividade microbiana. No Reator 1 (A), os AGVs ficaram abaixo de 2.000 mg/L, com Tempo de aproximadamente 20 dias, refletindo equilíbrio entre produção e consumo de intermediários da fermentação. No Reator 2 (B), os AGVs alcançaram cerca de 3.000 mg/L, indicando fermentação ativa, porém menos eficiente. Já no Reator 3 (C), a concentração foi superior a 4.000 mg/L, associada a uma conversão ineficiente e provável inibição parcial do processo.

Os sólidos voláteis (SV) também refletiram essa dinâmica. O Reator 1 apresentou os maiores valores de SV removidos, com eficiência acima de 60%, enquanto o Reator 2 (B) ficou em torno de 40% e o Reator 3 (C) abaixo de 25%, demonstrando que a remoção de matéria orgânica está diretamente ligada à intensidade da atividade microbiana e à disponibilidade de substrato fermentescível.

Esses parâmetros físico-químicos reforçam os dados microbiológicos, confirmando que a eficiência do sistema anaeróbio depende de múltiplos fatores sinérgicos, como temperatura estável, pH neutro, relação C/N adequada e presença de substrato fermentável. A manutenção desses parâmetros próximos às condições ideais favorece a estabilidade do processo e maximiza a produção de biogás, especialmente no Reator 1 (A).

A concentração da solução ácida inicial utilizada no pré-tratamento influencia diretamente a liberação e composição dos compostos presentes no lixiviado. Soluções de maior concentração tendem a promover maior despolimerização da biomassa, liberando açúcares solúveis, como a glucose, e ácidos orgânicos, porém, em excesso, podem gerar subprodutos indesejados que inibem processos biológicos posteriores (JOHANNES; XUAN, 2024).

O tempo de residência do material na solução ácida determina o tempo disponível para reação entre a biomassa e o ácido, impactando a quantidade e o perfil dos componentes liberados (SUCINDA *et al.*, 2020).

QUADRO 5 - INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS

Parâmetro	Influência nos componentes do lixiviado
Concentração solução ácida	Maior concentração (0%, 2%, 3%, 4%) → maior liberação de glucose e ácidos, mas risco de formação de subprodutos tóxicos
Tempo de residência	Tempo ideal (10, 20, 25, 30 dias) → máximo rendimento de açúcares e ácidos úteis; tempo excessivo → degradação e formação de ácidos menores e etanol

FONTE: O autor (ano).

O QUADRO 5 mostra, de forma resumida, a influência da concentração da solução ácida e do tempo de residência, com o intuito de permitir que se tenha, desde já, uma ideia de como os parâmetros físico-químicos afeta o desempenho microbiológico dos reatores, especialmente na produção de biogás.

Quanto maior a concentração da solução ácida, maior a liberação de componentes, como glucose e ácidos, mas também há maior risco de formação de subprodutos tóxicos.

O tempo de residência é outro parâmetro que influencia diretamente o rendimento, uma vez que, quando for ideal, permite o máximo rendimento de açúcares e ácidos úteis, já o excesso causa a degradação e formação de ácidos menores e etanol.

Tanto a concentração da solução ácida, quanto o tempo de residência são abordados de forma complexa na subseção a seguir, onde são apresentados e explicados os resultados referentes à fermentação em estado sólido e os componentes encontrados no lixiviado.

A manutenção da temperatura em torno de 35 ± 1 °C em todos os reatores confirma que o processo ocorreu sob condições mesofílicas. Essa faixa de operação é amplamente considerada ideal para a digestão anaeróbia, pois garante equilíbrio entre a diversidade microbiana e a estabilidade do sistema, sem demandar elevados custos energéticos, como no caso da operação termofílica. Além disso, os microrganismos metanogênicos mesofílicos são mais robustos diante de variações ambientais, o que assegura maior tolerância às flutuações operacionais (ANGELIDAKI *et al.*, 2018).

O pH apresentou forte correlação com a eficiência dos reatores. No sistema otimizado [Reator 1 (A)], o intervalo de 6,8-7,2 manteve-se adequado para a metanogênese, garantindo a conversão eficiente dos intermediários gerados nas fases acidogênica e acetogênica. Já no Reator 2 (B), sem agitação, observou-se

tendência de queda do pH (6,5-6,8), sugerindo acúmulo parcial de ácidos graxos voláteis (AGVs). O Reator 3 (C), sem adição de insumos, apresentou pH mais ácido (6,1-6,4), condição que compromete a atividade de arqueias metanogênicas e reduz a geração de metano. Esses resultados corroboram a ideia de que a manutenção do pH próximo à neutralidade é essencial para evitar desequilíbrios na comunidade microbiana (CHERNICHARO, 2016).

A relação C/N apresentou diferenças marcantes entre os reatores. O valor de ~25:1 no Reator 1 (A) se aproximou do ideal, proporcionando adequado balanço nutricional entre carbono, fonte de energia, e nitrogênio, necessário para síntese proteica microbiana. No Reator 2 (B) (~22:1), a menor disponibilidade de carbono pode ter limitado parcialmente o crescimento microbiano. Já no Reator 3 (C) (~17:1), o excesso de nitrogênio provavelmente levou à formação de amônia livre, o que resultou em inibição microbiana. Esse comportamento confirma que o ajuste da relação C/N é um dos principais fatores para o sucesso de biodigestores (LI et al., 2019).

A concentração de AGVs foi outro indicador crítico. O Reator 1 (A), apresentou valores inferiores a 2.000 mg/L, indicando condições estáveis e sem risco de acidificação. O Reator 2 (B), apresentou acúmulo moderado (~3.000 mg/L), sugerindo sobrecarga parcial do sistema devido à ausência de agitação, que compromete a homogeneidade do substrato. O Reator 3 (C), apresentou valores superiores a 4.000 mg/L, caracterizando acidificação e forte inibição da atividade metanogênica. A literatura aponta que valores acima de 3.000 mg/L de AGVs frequentemente associam-se a colapsos no processo anaeróbio (APHA, 2017).

A remoção de sólidos voláteis refletiu diretamente o desempenho dos sistemas. O Reator 1 apresentou remoção superior a 60%, evidenciando alta eficiência de degradação da matéria orgânica e boa conversão em biogás. O Reator 2 (B) apresentou desempenho intermediário (~40%), coerente com a menor estabilidade físico-química observada. Já o Reator 3 (C) apresentou remoção inferior a 25%, confirmando que a combinação de baixa relação C/N, acúmulo de AGVs e pH ácido reduziu significativamente a biodegradabilidade do substrato. Esse resultado reforça a importância da otimização operacional para maximizar a eficiência energética (CHERNICHARO, 2016).

As análises microbiológicas complementam os dados físico-químicos, confirmando a correlação entre o equilíbrio ambiental e a diversidade microbiana.

O Reator 1 (A), apresentou elevada densidade microbiana em TSA (crescimento generalizado), com colônias robustas de enterobactérias, bactérias lactose-fermentadoras e *Staphylococcus* sp., além de presença moderada de *Pseudomonas* sp., microrganismos importantes na degradação de compostos complexos. Já o Reator 2 (B) apresentou densidade microbiana moderada, indicando condições menos favoráveis para a estabilidade. O Reator 3 (C) apresentou baixa densidade e diversidade microbiana, resultado direto da acidificação e do excesso de AGVs. Esses achados confirmam que a diversidade microbiana é essencial para a resiliência e eficiência de sistemas anaeróbios (ANGELIDAKI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

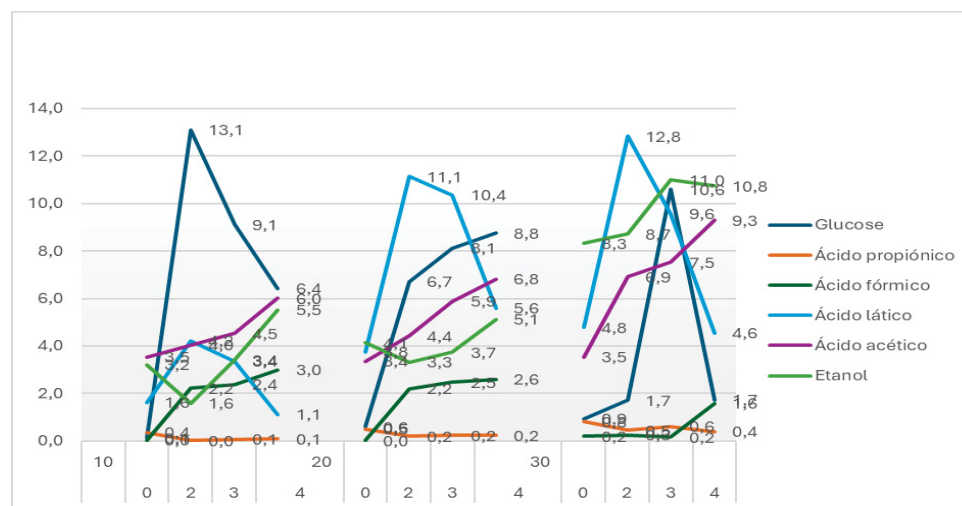
Os resultados da fermentação em estado sólido com a biomassa (capim-elefante) (cromatografia) podem ser visualizados nas Tabelas 11 e 12, e Figuras 35 e 36, nas quais são apresentados os principais açúcares, ácidos orgânicos e etanol encontrados nos lixiviados analisados.

TABELA 11 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-ELEFANTE, COM CONCENTRAÇÃO ÁCIDA DE 0 A 4 % E DURANTE 10, 20 E 30 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 1)

Fermentação / Reator	Concentração da solução ácida inicial (ml/100g) (%)	Tempo de residência (dias)	Componentes encontrados no lixiviado (g/L)						
			Glucose	Ácido propiônico	Ácido fórmico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol	
		10							
1	0		0,1	0,4	0,0	1,6	3,5	3,2	
2	2		13,1	0,0	2,2	4,2	4,0	1,6	
3	3		9,1	0,1	2,4	3,4	4,5	3,4	
4	4		6,4	0,1	3,0	1,1	6,0	5,5	
		20							
5	0		0,6	0,5	0,0	3,8	3,4	4,1	
6	2		6,7	0,2	2,2	11,1	4,4	3,3	
7	3		8,1	0,2	2,5	10,4	5,9	3,7	
8	4		8,8	0,2	2,6	5,6	6,8	5,1	
		30							
9	0		0,9	0,8	0,2	4,8	3,5	8,3	
10	2		1,7	0,5	0,3	12,8	6,9	8,7	
11	3		10,6	0,6	0,2	9,6	7,5	11,0	
12	4		1,7	0,4	1,6	4,6	9,3	10,8	

FONTE: O autor (2022).

FIGURA 35 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-ELEFANTE, COM CONCENTRAÇÃO ÁCIDA DE 0 A 4 % E DURANTE 10, 20 E 30 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 1)



FONTE: O autor (2022).

Na TABELA 11 e FIGURA 35, observa-se que a concentração de 2,0% de ácido, aliada a um tempo de residência entre 10 e 20 dias, promoveu a maior liberação de glucose, com o valor máximo de até 13,10 g/L, indicando maior quebra das estruturas celulósicas da biomassa. Por outro lado, concentrações mais elevadas (3,0 e 4,0%) e tempos prolongados (30 dias) mostraram uma redução significativa na concentração de glucose, sugerindo degradação e consumo do açúcar liberado. Além disso, os ácidos orgânicos acético e láctico, intermediários-chave para a digestão anaeróbia, apresentaram tendência de aumento com o aumento do tempo de residência e da concentração ácida, atingindo valores de até 12,83 g/L para ácido láctico.

O ácido fórmico, considerado um indicador de degradação excessiva e de potencial toxicidade, também aumentou em concentrações mais elevadas.

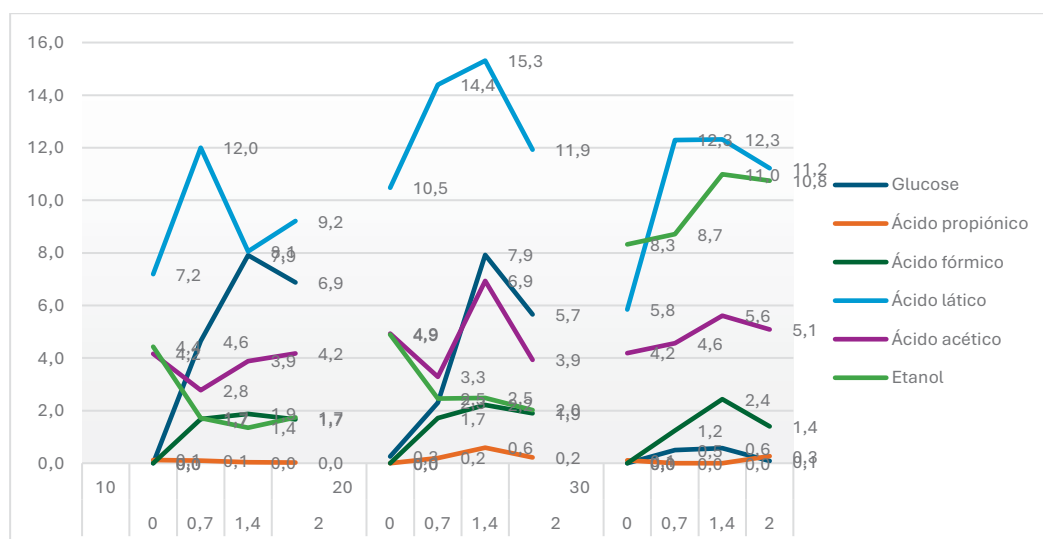
Indica-se a presença de etanol (10,99 g/L e 10,75 g/L) em maiores concentrações nos tempos mais longos (30 dias) e em concentrações ácidas mais elevadas (3,0% e 4,0%), o que sugere fermentação alcoólica ativa ou acentuada. Esses resultados evidenciam a necessidade de otimizar os parâmetros de pré-tratamento para maximizar a produção de açúcares fermentáveis e minimizar a formação de subprodutos tóxicos, garantindo, assim, a qualidade do lixiviado para processos biotecnológicos, como a produção de biogás.

TABELA 12 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-ELEFANTE, COM CONCENTRAÇÃO ÁCIDA DE 0 A 2 % E DURANTE 10, 20 E 30 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 2)

Fermentação / Reator	Concentração da solução ácida inicial (ml/100g) (%)	Tempo de residência (dias)	Componentes encontrados no lixiviado (g/L)						
			Glucose	Ácido propiônico	Ácido fórmico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol	
		10							
1	0,1		0,0	0,1	0,0	7,2	4,2	4,4	
2	0,7		4,6	0,1	1,7	12,0	2,8	1,7	
3	1,4		7,9	0,0	1,9	8,1	3,9	1,4	
4	2		6,9	0,0	1,7	9,2	4,2	1,7	
		20							
5	0,1		0,3	0,0	0,0	10,5	4,9	4,9	
6	0,7		2,3	0,2	1,7	14,4	3,3	2,5	
7	1,4		7,9	0,6	2,2	15,3	6,9	2,5	
8	2		5,7	0,2	1,9	11,9	3,9	2,0	
		30							
9	0,1		0,0	0,1	0,0	5,8	4,2	8,3	
10	0,7		0,5	0,0	1,2	12,3	4,6	8,7	
11	1,4		0,6	0,0	2,4	12,3	5,6	11,0	
12	2		0,1	0,3	1,4	11,2	5,1	10,8	

FONTE: O autor (2022).

FIGURA 36 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM O CAPIM-ELEFANTE, COM CONCENTRAÇÃO ÁCIDA DE 0 A 2 % E DURANTE 10, 20 E 30 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 2)



FONTE: O autor (2022).

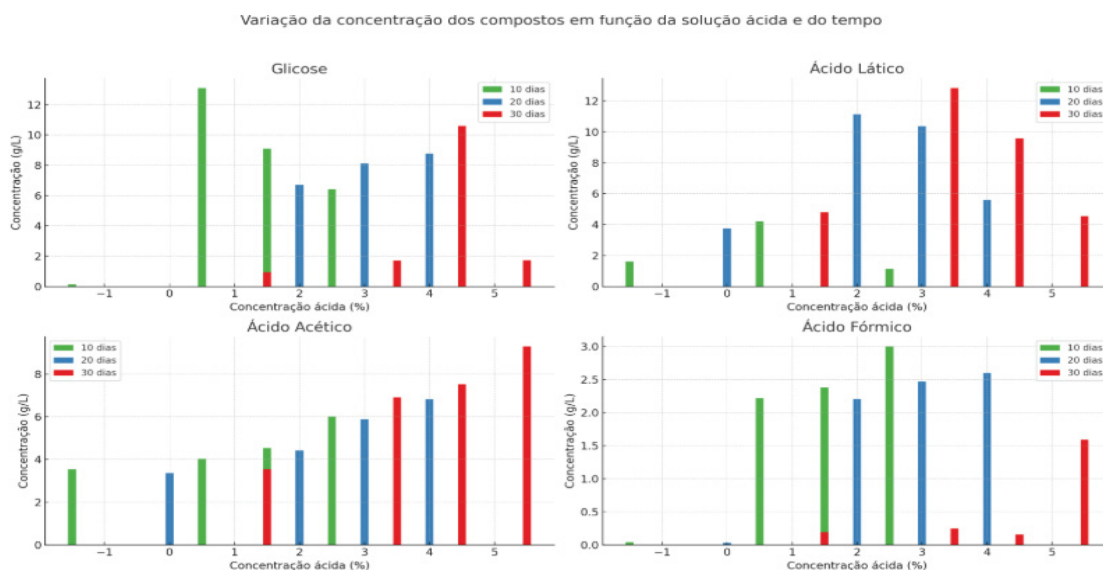
Na TABELA 12 e FIGURA 36, observam-se os resultados que demonstram a variação na concentração da solução ácida inicial (de 0 a 2%) e o tempo de residência (10, 20 e 30 dias). A liberação de glucose foi mais significativa aos 10 e 20 dias, especialmente em concentrações de ácido entre 1,4% e 2,0%, atingindo picos de até 7,9 g/L., contudo, aos 25 dias, houve uma forte redução nos níveis de glucose. A concentração de ácido láctico permaneceu alta na maioria das condições, destacando-se 15,3 g/L aos 20 dias com 1,4% de ácido láctico, refletindo uma atividade fermentativa intensa. Por outro lado, a formação de ácido fórmico aumentou em concentrações elevadas e tempos mais longos, indicando uma degradação acentuada dos açúcares (acima de 2,4 g/L em 1,4% e 30 dias), o que pode prejudicar a digestão anaeróbica. O ácido acético apresentou variação moderada, entre 2,7 e 6,9 g/L, sendo um intermediário importante na formação de metano.

A produção de etanol foi mais significativa em períodos mais longos (até 9,8 g/L, com 0% e 30 dias), indicando uma fermentação alcoólica mais eficiente na ausência de ácido. Os dados mostram que concentrações entre 1,4% e 2% de solução ácida, combinadas com períodos de 10 a 20 dias, proporcionam o melhor equilíbrio entre a liberação de açúcares e a formação de ácidos orgânicos benéficos, evitando o acúmulo excessivo de subprodutos inibidores, como o ácido fórmico.

Ao se debruçar sobre a concentração da solução ácida inicial e o tempo de residência, observou-se que são parâmetros críticos no pré-tratamento da biomassa, afetando diretamente a eficiência da hidrólise e a composição do lixiviado gerado.

Abaixo, segue a FIGURA 37 cujo gráfico (de barras), facilita a compreensão das informações contidas na TABELA 11 (RODADA 1).

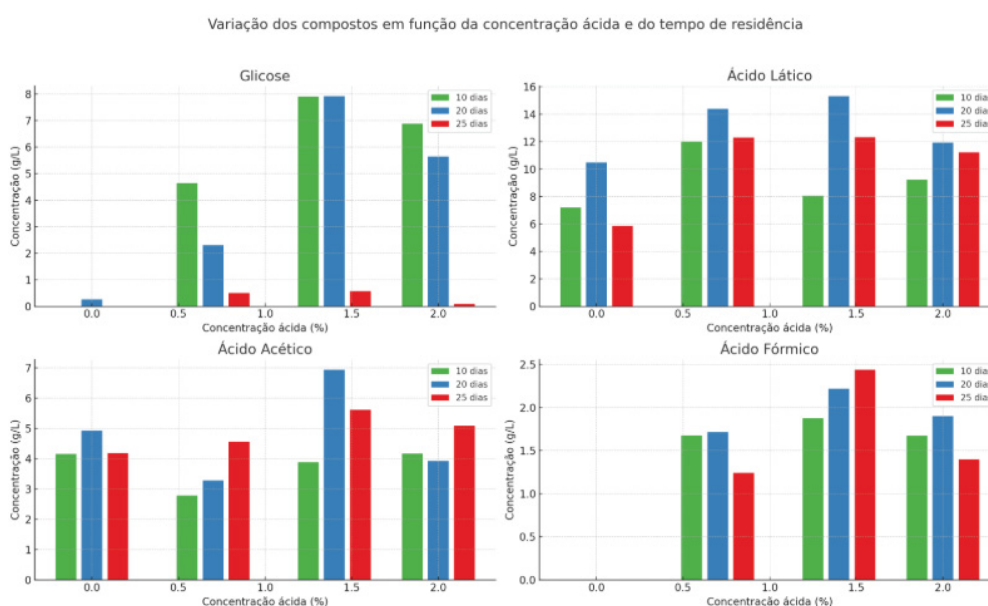
FIGURA 37 - CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO



FONTE: O autor (2025).

Na FIGURA 37, o gráfico de barras agrupadas mostra a variação da concentração de glicose, ácido láctico, ácido acético e ácido fórmico em função da concentração da solução ácida (%) e do tempo de residência (10, 20 e 30 dias). E ainda, da TABELA 12 (RODADA 2), segue o gráfico de barras agrupadas, já com um certo detalhamento dado anteriormente, que ilustra muito bem a variação dos compostos em função da concentração ácida e do tempo de residência (FIGURA 38).

FIGURA 38 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS NO



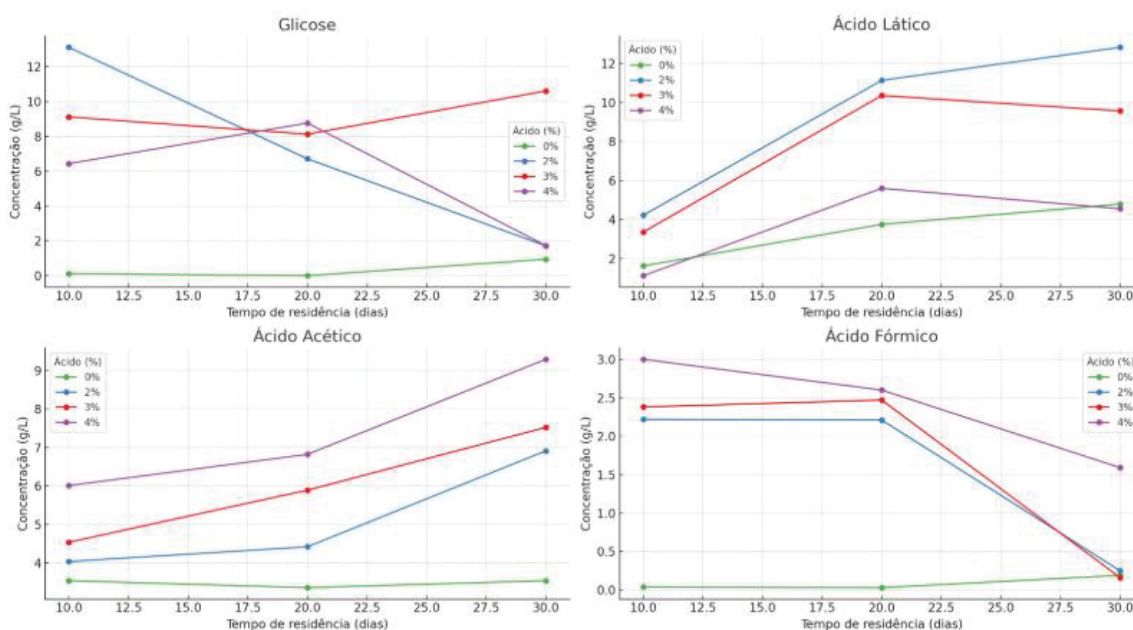
FONTE: O autor (2025).

Na FIGURA 38, o gráfico mostra a tendência dos compostos ao longo do tempo em diferentes concentrações da solução ácida, destacando os melhores pontos de rendimento.

A FIGURA 39, cujo gráfico (de linha), facilita a compreensão das informações contidas na TABELA 11 (RODADA 1), mostra a variação da concentração de glucose e dos principais ácidos (acético, láctico, fórmico) em função da concentração ácida e do tempo, facilitando a visualização do ponto ótimo (exemplo: 2%, 10-20 dias). E ainda, facilita visualizar:

- O ponto ótimo para a liberação de glucose (2% de ácido em 10 dias);
- O aumento progressivo de ácido láctico e acético com o tempo e a concentração;
- A elevação do ácido fórmico em concentrações mais altas e tempos mais longos pode indicar degradação excessiva.

FIGURA 39 - VARIAÇÃO TEMPORAL DOS COMPONENTES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA PARA CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO ÁCIDA



FONTE: O autor (2025).

Na FIGURA 39 observa-se o gráfico de linhas mostrando a variação temporal dos compostos (glucose, ácido láctico, acético e fórmico) em função do tempo de residência, para cada nível de concentração ácida (0%, 2%, 3%, 4%). Esse gráfico evidencia:

- A glucose atinge o pico em 2% com 10 dias, mas decai depois;

- Ácido láctico e acético aumentam com o tempo, especialmente em concentrações mais altas;
- O ácido fórmico cresce com o tempo e a concentração, sendo mais expressivo em 4% após 20 dias, o que pode indicar degradação da biomassa.

A concentração de 2% de ácido com tempo de residência entre 10 e 20 dias proporcionou a maior liberação de glucose (até 13,1 g/L), evidenciando maior eficiência na hidrólise da biomassa.

A redução da glucose, resultante de concentrações maiores (3-4%) ou tempos prolongados (30 dias), sugere degradação do açúcar liberado, além de maior formação de ácidos orgânicos menores, como o ácido fórmico, e de produtos de fermentação como o etanol, que podem ser indesejáveis para processos subsequentes (KIRKPATRICK *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Os ácidos acético e láctico são compostos intermediários importantes para a digestão anaeróbia e a produção de biogás (ZHANG *et al.*, 2018). O aumento do ácido fórmico em concentrações mais elevadas pode indicar degradação excessiva e potencial toxicidade para os microrganismos metanogênicos (GARCÍA *et al.*, 2019).

Assim, condições moderadas de concentração ácida e de tempo de residência são recomendadas para maximizar a liberação de açúcares fermentáveis, minimizar a formação de subprodutos tóxicos e otimizar a qualidade do lixiviado para processos biotecnológicos subsequentes.

A adição controlada de ácido promove a despolimerização parcial da biomassa, aumentando a disponibilidade de açúcares fermentescíveis, mas concentrações muito baixas ou muito elevadas podem comprometer a liberação eficiente (ZHANG; LI; LI, 2022; LI; ZHANG; ZHANG, 2023).

A concentração dos ácidos acético e láctico aumentou com o tempo e a concentração da solução ácida, sendo esses compostos importantes intermediários para a digestão anaeróbia e produção de biogás (ZHANG *et al.*, 2018).

Observou-se que o ácido láctico foi o composto predominante em praticamente todas as condições, alcançando maiores concentrações em 20 dias e em reatores tratados com 0,7% e 1,4% de ácido (Rodada 2). Esse perfil é consistente com a literatura, que indica a rota fermentativa láctica como predominante em condições mesofílicas e com disponibilidade de glucose liberada, podendo representar uma

etapa intermediária na produção de outros ácidos voláteis (CHEN; ZHANG; LIU, 2021; WANG; ZHAO; LI., 2023).

O ácido acético apresentou valores estáveis em diferentes tempos, porém com incremento mais significativo em 20 e 30 dias, especialmente nos reatores a 4%, sugerindo que a acidogênese foi favorecida em concentrações intermediárias de ácido, condição relatada como propícia para a estabilidade do processo (GUO; WANG; LI, 2022).

O aumento do ácido fórmico em concentrações mais elevadas de ácido, sendo mais expressivo em 4% após 20 dias, pode indicar degradação excessiva e potencial toxicidade para os microrganismos metanogênicos (GARCÍA *et al.*, 2019). O ácido fórmico apresentou comportamento complementar, com teores relativamente baixos ao longo de todos os períodos apesar do fato de que o tratamento ácido direcionou as vias metabólicas preferencialmente para a produção de ácidos orgânicos (ZHOU; SUN, W; JIANG, 2021; ZHAO; CHEN; WANG, 2023).

Já o etanol também apresentou comportamento complementar, mas concentrações crescentes em tempos mais longos, notadamente após 30 dias (11,00 mg/L). Estudos recentes apontam o etanol como produto competitivo da glicólise em condições de pH mais baixo e em sistemas não otimizados (MENEGOL *et al.*, 2016; ZHOU; SUN; JIANG, 2021; ZHAO; CHEN; WANG, 2023).

Os resultados evidenciam que a condição ótima para liberação de glucose e formação de ácidos orgânicos ocorreu em concentrações intermediárias de ácido (1,4%) e tempo de residência de 20 dias, destacando-se a produção de ácido láctico e acético. Essas condições favoreceram maior atividade microbiana acidogênica, com menor desvio para a rota alcoólica, o que representa um potencial estratégico para processos de digestão anaeróbia voltados à produção de biogás e bioprodutos (GAO; WU; LI., 2022).

A análise demonstra que a concentração inicial de ácido na solução influenciou diretamente a liberação de glucose no lixiviado. Observa-se que, em condições sem pré-tratamento ácido (0%), a glucose foi praticamente inexistente nos primeiros 10 dias, enquanto concentrações intermediárias (0,7-1,4%) favoreceram a hidrólise de polissacarídeos, resultando em valores mais expressivos de glucose, sobretudo em 10 e 20 dias.

É notável que se trata do processo de avaliação do teor de ácido acético (ácido etanoico) em relação ao processo fermentativo caracterizado pela biorremediação,

gerando teor de açúcares, ácidos orgânicos e álcool, mais especificamente o etanol - devido à sua importância comercial como commodity industrial -, todos os componentes indicados pela literatura.

E ainda, de ressaltar que o ácido láctico é um importante indicador da qualidade e estabilidade da fermentação, tendo em vista a sua ação inibidora sobre outros grupos de microrganismos fermentadores, responsáveis por fermentações indesejáveis, como no caso de odores desagradáveis e da síntese de substâncias químicas com potencial de poluição e de perdas de elementos nutricionais, utilizáveis pelas culturas de interesse econômico (*PAGLIA et al., 2022*).

Com isso, pode-se verificar a importância do ácido láctico para interferir na formação de odores devido à fermentação láctica. Já o etanol é o principal insumo na indústria de bioenergia, a partir de materiais lignocelulósicos.

Os nossos objetivos também estão associados à redução de odores no processo de fermentação, sem prejuízo da conversão de açúcares em álcool, considerando que, uma vez obtidos os açúcares, sua metabolização gera o álcool, cujo processo de fermentação vai refletir na redução de odores.

No entanto, estes, por sua vez, são compostos intermediários da fermentação que ainda estão em fase líquida (no liciviado) e ainda não foram convertidos em gases. Eles fazem parte da fase acidogênica e acetogênica, anteriores à metanogênese, que é quando o biogás verdadeiro é gerado.

Para melhor compreensão deste favorecimento da biomassa escolhida (capim-elefante), buscou-se analisar a composição lignocelulósica desta biomassa e as suas limitações.

QUADRO 6 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA

Característica	Capim-Elefante
Lignina	Moderada
Celulose	Alta
Hemicelulose	Alta

FONTE: O autor (2025).

Do QUADRO 6, cabe elucidar que o capim-elefante possui proporções equilibradas de carboidratos (COELHO, 2020).

QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DA BIOMASSA

Atributo	Capim Elefante
Digestibilidade	Boa, especialmente em genótipos jovens; digestão lenta bem convertida em metano
Composição lignocelulósica	Alta em celulose/hemicelulose, moderada lignina, ideal para biogás
Produção de metano (PBB)	Elevado rendimento: até milhares mL CH ₄ /g SV em ensaios específicos
Estabilidade do pH e AGVs	Saída de digestão estável com pH ~7,3 e AGVs residual muito baixo
Rendimento energético	Elevados valores calóricos e biomassa residual aproveitável mesmo para combustão ou biogás

FONTE: O autor (2025).

O capim-elefante apresenta alta biodegradabilidade, baixo acúmulo de AGVs, pH estável e produção eficiente de metano. Biomassa menos lignificada (lignina elevada), boa digestibilidade e com melhor relação C/N (não tão alta nem baixa), teor de umidade moderado apresentam melhor desempenho ou rendimento de biogás (COELHO *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2024). Este fato é uma das motivações para seu uso nesta pesquisa.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO

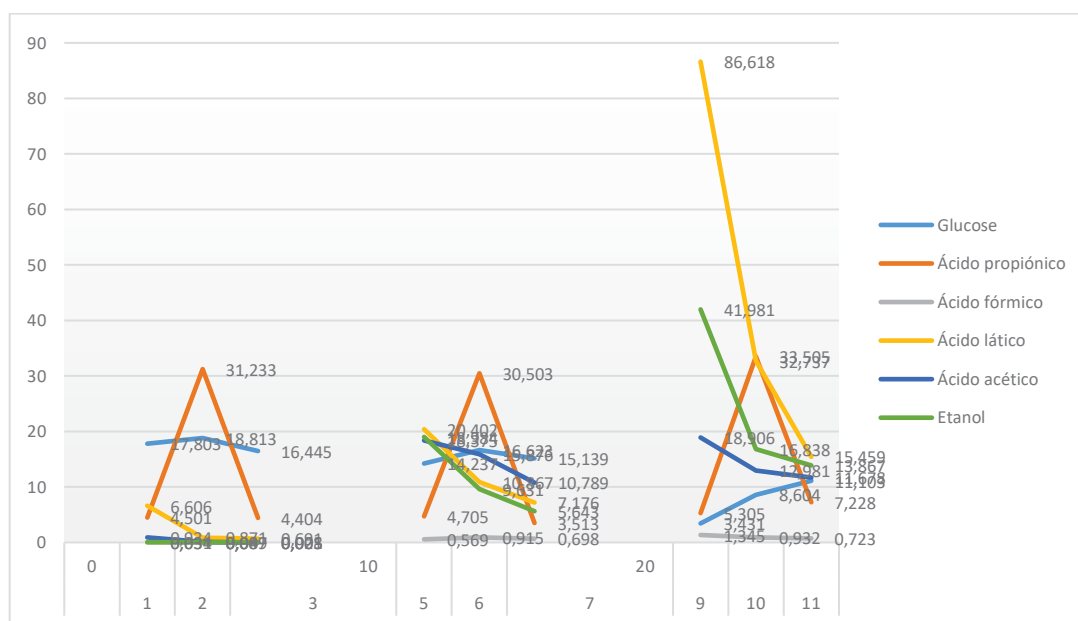
Os resultados da fermentação em estado líquido com o capim-elefante (cromatografia) podem ser visualizados na TABELA 13 e na FIGURA 40, abaixo, nas quais estão apresentados os principais açúcares, ácidos orgânicos e etanol encontrados nos lixiviados analisados.

TABELA 13 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO COM A BIOMASSA, COM SOLUÇÕES DE SACAROSE A 50% E ÁCIDO ACÉTICO A 4% DURANTE 0, 10 E 20 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 3)

Fermentação			Tempo de residência (dias)	Componentes encontrados no lixiviado (g/L)					
Reator	Agitação	Aditivos /Nutrientes		Glucose	Ácido propiônico	Ácido fórmico	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol
			0						
1 (A)	Sim	Sim		17,803	4,501	0,034	6,606	0,934	0,031
2 (B)	Não	Sim		18,813	31,233	0,009	0,871	0,087	0,04
3 (C)	Sim	Não		16,445	4,404	0,008	0,691	0,005	0,021
			10						
1 (A)	Sim	Sim		14,237	4,705	0,569	20,402	18,375	18,984
2 (B)	Não	Sim		16,623	30,503	0,915	10,867	15,876	9,631
3 (C)	Sim	Não		15,139	3,513	0,698	7,176	10,789	5,643
			20						
1 (A)	Sim	Sim		3,431	5,305	1,345	86,618	18,906	41,981
2 (B)	Não	Sim		8,604	33,505	0,932	32,737	12,981	16,838
3 (C)	Sim	Não		11,103	7,228	0,723	15,459	11,678	13,867

FONTE: O autor (2023).

FIGURA 40 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO COM A BIOMASSA, COM SOLUÇÕES DE SACAROSE A 50% E ÁCIDO ACÉTICO A 4% DURANTE 0, 10 E 20 DIAS DE RESIDÊNCIA (RODADA 3)



FONTE: O autor (2025).

Na TABELA 13 e FIGURA 40, observa-se que a adição de aditivos, ou seja, nutrientes (solução de 50% de sacarose e 4% de ácido acético), aliada a agitação e tempo de residência promoveram a maior liberação de glucose, com valores máximos de até 18,813 g/L. Por outro lado, a falta de agitação e aditivos mostraram uma redução significativa na concentração de glucose. Além disso, os ácidos orgânicos acético e lático, intermediários-chave para a digestão anaeróbia, apresentaram tendência de aumento, atingindo valores de até 20,402 g/L para ácido lático e 18,375 para o ácido acético.

O ácido fórmico, considerado um indicador de degradação excessiva e potencial toxicidade, também aumentou.

É indicada a presença de etanol (18,984 g/L) sem agitação, sem presença de aditivos (41,981) e nos tempos mais longos (20 dias).

Observa-se que os reatores com agitação e aditivos (A) apresentaram maior produção de ácidos orgânicos e etanol, indicando que a agitação favoreceu a distribuição homogênea dos nutrientes e o contato entre microrganismos e substrato, otimizando a fermentação. A presença de sacarose e ácido acético estimulou a atividade microbiana e a hidrólise de compostos lignocelulósicos, ou seja, indicou maior quebra das estruturas celulósicas da biomassa (SIQUEIRA, 2015).

Nos reatores sem agitação, mas com nutrientes (2 [B]), sugere-se uma menor transferência de massa e acúmulo localizado de metabólitos, o que limitou a eficiência fermentativa, ou seja, sugerindo degradação e consumo do açúcar liberado. Já nos reatores sem agitação e sem aditivos (3 [C]), os valores menores, refletem uma fermentação incompleta e restrita à microbiota nativa do capim-elefante, sem estímulo enzimático ou energético adequado (WANG *et al.*, 2021).

O aumento do tempo de residência (10 → 30 dias) não promoveu grandes variações no ácido lático, mas favoreceu ligeiro acréscimo na produção de etanol, indicando que parte dos açúcares e ácidos intermediários foram convertidos ao longo do tempo, possivelmente por microrganismos alcoólicos em estágios mais tardios da fermentação (ANDREEV *et al.*, 2017).

Corroborando com os estudos de Siqueira (2015), Wang *et al.* (2021), Andreev *et al.* (2017), os resultados demonstram que a agitação e o uso de aditivos, como sacarose e ácido acético, potencializam a fermentação líquida do capim-elefante, promovendo maior degradação da biomassa e formação de metabólitos, especialmente ácido lático e etanol. A ausência desses fatores reduziu a eficiência

microbiana e a conversão de açúcares, evidenciando a importância do controle operacional e do fornecimento de nutrientes no processo fermentativo.

Portanto, apesar da importância do tempo de residência, aqui, a sacarose e ácido acético são o grande diferencial. A adição de sacarose e ácido acético ao capim-elefante favorece a fermentação e a digestão anaeróbia, fornecendo fonte rápida de carbono e estimulando o metabolismo microbiano. A sacarose acelera o crescimento de bactérias e leveduras fermentativas, aumentando a produção de ácidos orgânicos e etanol. Já o ácido acético, em baixa concentração, auxilia na quebra parcial da lignocelulose, libera açúcares fermentáveis e regula o pH, inibindo microrganismos indesejáveis. Juntos, ambos intensificam a conversão da biomassa, otimizando a eficiência bioquímica e o potencial energético do sistema (HUANG *et al.*, 2019; SIQUEIRA, 2015; WANG *et al.*, 2021).

É notável que se trata do processo de avaliação do teor de ácido acético (ácido etanoico) em relação ao processo fermentativo caracterizado pela biorremediação, gerando teor de açúcares, ácidos orgânicos e álcool, mais especificamente o etanol - devido a sua importância comercial como comóditos industrial -, todos os componentes indicados pela literatura.

E ainda, de ressaltar que o ácido láctico é um importante indicador da qualidade e estabilidade da fermentação, tendo em vista a sua ação inibidora sobre outros grupos de microrganismos fermentadores, responsáveis por fermentações indesejáveis, como no caso de odores desagradáveis e da síntese de substâncias químicas com potencial de poluição e de perdas de elementos nutricionais, utilizáveis pelas culturas de interesse econômico (BRISK, *et al.*, 2022).

Com isso, se pode verificar a importância do ácido láctico para interferir na formação de odores devido a fermentação láctica. Já o etanol, é o principal insumo na indústria de bioenergia, a partir de material lignocelulósicos.

Os nossos objetivos também estão associados à redução de odores no processo de fermentação, sem prejuízo na conversão de açúcares em álcool, considerando que uma vez obtidos açúcares, sua metabolização gera o álcool, cujo processo de fermentação vai refletir na redução de odores.

No entanto, estes, por sua vez, são compostos intermediários da fermentação que ainda estão em fase líquida (no liciviado) e ainda não foram convertidos em gases. Eles fazem parte da fase acidogênica e acetogênica, anteriores à metanogênese, que é quando o biogás verdadeiro é gerado.

5 CONCLUSÕES

A microbiota epifítica presente em biomassa lignocelulósica, como resíduos de palmito de pupunha e capim-elefante, demonstrou potencial considerável para a produção de biogás, especialmente na geração de ácido láctico, que pode contribuir para a inibição de odores em sistemas de biodigestão. A pesquisa revelou a presença de uma diversidade microbiana significativa nas amostras de biomassa, incluindo bactérias, fungos e leveduras. As identificações realizadas por meio de meios seletivos permitiram inferências sobre o equilíbrio microbiano do sistema e sua relação com a produtividade do processo, sem, neste contexto, necessidade de aprofundamento em análises moleculares ou genômicas que excedam os objetivos desta investigação.

Os resultados da pesquisa evidenciaram o papel da hidrólise ácida acética na conversão da biomassa lignocelulósica em biogás, sugerindo que a otimização deste processo pode contribuir para a melhoria da eficiência da produção de biogás e para a redução de odores desagradáveis em sistemas de biodigestão.

5.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A análise microbiana realizada neste estudo foi conduzida em condições controladas de laboratório. Estudos futuros em sistemas de biodigestão em escala piloto ou industrial seriam necessários para confirmar a aplicabilidade dos resultados obtidos em condições reais de operação. Além da produção de biogás (biometano), como se esperava no início da pesquisa, que não se concretizou devido a dificuldades com os aparelhos/biorreatores.

Apesar do aprofundamento do conhecimento sobre os microrganismos epifíticos que compõem essas biomassas, o estudo não teve como foco abordar diretamente o metabolismo enzimático (como a formação de enzimas ou de moléculas energéticas ATP/ADP), limitando-se à análise e discussão dos microrganismos efetivamente desenvolvidos durante os bioprocessos, ou seja, seu perfil bioquímico.

Outra limitação foi o não estudo generalizado da modelagem cinética, e o balanço de massa quantifica a conversão de substratos em produtos (biogás e digestato), sendo fundamental para prever o rendimento, otimizar o processo e garantir sustentabilidade em escala laboratorial e industrial.

5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos futuros devem se concentrar na avaliação do impacto da microbiota epifítica em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, investigando a influência de fatores como a composição da biomassa, as condições de hidrólise e fermentação e o tipo de biodigestor utilizado na produção de biogás. A análise da composição microbiana em sistemas de biodigestão, em escala piloto ou industrial, também é recomendada para compreender a dinâmica da microbiota em condições reais de operação.

A análise proteômica poderia auxiliar na identificação das enzimas envolvidas na produção de etanol pelos microrganismos estudados.

O isolamento dos microrganismos identificados para estudos de produção de biogás em bioreatores é recomendado para avaliar o potencial de cada espécie na conversão da biomassa em biogás. E ainda, poder medir o quanto de biogás foi gerado através de sensor.

REFERÊNCIAS

AL-FRIDAWY, R.; ALDARAGHI, W.; ALKHAFAJI, M. Isolamento e identificação de multirresistência entre isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa.*, 2021.

ALMEIDA, F. S. Estudo do controle de pH na digestão anaeróbia e sua influência na produção de biogás. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/55544>. Acesso em: 30 set. 2025.

ALVES, S. T. Fatores que influenciam na fermentação etanólica do mosto para produção de etanol. 2013. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1004069/1/Dissertau00E7u00E3odemestradoSumaraTeixeiraAlves.pdf>. Acesso em: 4 out. 2025.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE SAÚDE PÚBLICA. *Métodos padrão para o exame de água e efluentes.* 23. ed. Washington: APHA, 2017.

AMPLUM BIOGÁS. Setor de biogás pode contribuir para a geração de 46 mil empregos até 2029. 2023. Disponível em: <https://amplumbiogas.com.br/setor-de-biogas-pode-contribuir-para-a-geracao-de-46-mil-empregos-ate-2029/>. Acesso em: 30 set. 2025.

ANDRADE, J. L. de; SILVA, F. L.; COSTA, R. M. Manejo e adubação do capim-elefante para produção de biomassa e silagem. Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural do Estado de Mato Grosso do Sul - AGRAER, 2000. Disponível em: <https://www.agraer.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/12/Silagem-de-Capim-Elefante.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

ANDREEV, E. *et al.* Bactérias lácticas em sistemas anaeróbios: controle de odores e vias metabólicas. **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, v. 101, p. 4563–4574, 2017.

ANDREEV, V. *et al.* Fermentação de ácido láctico da urina humana para melhorar seu valor fertilizante e reduzir as emissões de odores. **Jornal de Produção Mais Limpa**, v. 142, p. 2180–2188, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/316455312_Lactic_acid_fermentation_of_human_urine_to_improve_its_fertilizing_value_and_reduce_odour_emissions. Acesso em: 30 set. 2025.

ANGELIDAKI, I.; TREU, L.; OLIVEIRA, P.; LUO, G.; CAMPANELLI, I.; ALVARADO-MORALES, M. Upgrade e utilização do biogás: situação atual e perspectivas. **Avanços da Biotecnologia**, v. 36, n. 2, p. 452–466, 2018.

ASSIS, D. B. Avaliação do potencial de produção de biogás a partir do capim-elefante BRS Capiapu (*Pennisetum purpureum*). 2024. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/1884/95847/R%20-%20D%20->

%20DAGMARA%20BELTRAME%20DE%20ASSIS.pdf?isAllowed=y&sequence=1.
Acesso em: 30 set. 2025.

BALMANT, W. Concepção, construção e operação de um biodigestor e modelagem matemática da biodigestão anaeróbica. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2009. 60 f.

BARCHMANN, T. *et al.* Expandindo a flexibilidade das usinas de biogás – gerenciamento de substrato, síntese de cronograma e avaliação econômica. **Landtechnik**, v. 71, n. 6, p. 233-251, 2016. DOI: 10.15150/lt.2016.3146. Acesso em: 16 ago. 2022.

BARROS, D. T. Agroenergia. Embrapa, 2021. Disponível em: <www.embrapa.br/agencia-de-formacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/residuos/biogas/biofertilizante>. Acesso em: 17 jul. 2023.

BHARADWAJ, A. *et al.* Melhorando a digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica por cotratamento mecânico. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, p. 76, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02521-5>. Acesso em: 18 set. 2025.

BHARADWAJ, A. *et al.* Melhorar a digestão anaeróbica da biomassa lignocelulósica por cotratamento mecânico. **Biotecnologia para Biocombustíveis e Bioprodutos**, v. 17, p. 76, 2024. DOI: 10.1186/s13068-024-02521-5.

BIOMASSA E ENERGIA. Biodigestor modelo CSTR. 2022. Disponível em: <https://biogaseenergia.com.br/biodigestor-modelo-cstr>. Acesso em: 4 out. 2025.

BIOMASSA E ENERGIA. Cocal substitui motores a diesel por biometano em suas operações. 2024. Disponível em: <https://biogaseenergia.com.br/junho-de-2024-marca-avancos-significativos-no-mercado-de-biogas>. Acesso em: 30 set. 2025.

BIORENDER. Versão: Biorender premium 2025 (Versão paga). Disponível em: <https://app.biorender.com/?iss=https%3A%2F%2Fauth.biorender.com%2F>. Acesso em: 19 out. 2025.

BORGES, L. Principais contaminantes em ‘feeds’: bolores e leveduras. **Blog Food Safety Brazil**, 2020. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/principais-contaminantes-em-feeds-bolores-e-leveduras/>. Acesso em: 24 set. 2023.

BRASIL ESCOLA. Fermentação: o que é, como ocorre. 8 ago. 2017. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/fermentacao.htm>. Acesso em: 4 out. 2025.

BRUNETTI, B. Controle Microbiológico de Qualidade em Alimentos e contagem de Enterobactérias em Ágar VRBG. BioCen do Brasil, 2023. Disponível em: https://www.linkedin.com/posts/brunobrunetti_publici-microbiologia-biomedicina-activity-6889216753461669888-ybyC/?trk=public_profile_like_view&originalSubdomain=br. Acesso em: 2 out. 2023.

CALEFFI, L. Influência de compostos tóxicos e metais pesados na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. 2024. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2024. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/36333/1/biodigestorsertanejocanicampo.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

CAP-LAB. Microrganismos indicadores em alimentos. 2023. Disponível em: <https://cap-lab.com.br/microbiologia/microrganismos-alimentos/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

CARNEIRO, D. O.; COSTA, M. S. F. Características e patogenicidade da Salmonella enterica: uma revisão de literatura. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 21, n. 1, jan.-mar. 2020. ISSN 1518-836.

CARVALHO, A. P. *et al.* Características agrônômicas do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) cv. Roxo sob irrigação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 1, p. 275-286, jan./fev. 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n1p275. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/27565/23061/150071>. Acesso em: 4 out. 2025.

CASSINI, S. T.; COELHO, S. T.; PECORA, V. Biogás - Biocombustíveis ANP. In: PERLINGEIRO, Carlos Augusto G. (Org.). *Biocombustíveis no Brasil - Fundamentos, Aplicações e Perspectivas*. Rio de Janeiro: **Synergia Editora**, v. 1, p. 136-167, 2014.

CASTELLANOS-SÁNCHEZ, J. E. *et al.* Biogas purification processes: review and prospects. **Biofuels**, v. 15, n. 2, p. 215–227, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2223801>. Acesso em: 18 set. 2025.

CASTELLANOS-SÁNCHEZ, J. E.; AGUILAR-AGUILAR, F. A.; VENEGAS, J. A.; OLIVEIRA, D. R.; *et al.* Processos de purificação de biogás: revisão e perspectivas. **Biocombustíveis**, v. 15, n. 2, p. 215-227, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2223801>. Acesso em: 18 set. 2025.

CEPEA. PIB do agronegócio brasileiro. 2021. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 14 set. 2022.

CHAN, C. Biofilm formation and stress adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*. *arXiv preprint*, 2021. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2101.02542>. Acesso em: 26 jul. 2025.

CHEN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y. Vias de fermentação do ácido láctico e regulação na digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica. **Tecnologia de Biorecursos**, v. 337, p. 125460, 2021.

CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores Anaeróbios*. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2016.

CIBIOGÁS. Biogás nas indústrias brasileiras: como a fonte pode impulsionar o setor? 2021. Disponível em: <https://cibiogas.org/blog-post/biogas-nas-industrias-brasileiras-como-a-fonte-pode-impulsionar-o-setor/#:~:text=Dados%20divulgados%20pela%20Empresa%20de,%C3%B4nibus%2C%20j%C3%A1%20existem%20no%20Brasil>. Acesso em: 22 ago. 2022.

CIBIOGÁS. Biogasmapp, 2020. Disponível em: <http://mapbiogas.cibiogas.org/>. Acesso em: 24 ago. 2022.

CIBIOGÁS. Panorama do Biogás no Brasil 2023. 2023. Disponível em: https://cibiogas.org/wp-content/uploads/2023/12/Panorama_do_Biogs_no_Brasil_2022.pdf. Acesso em: 30 set. 2025.

COELHO, F. F. et al. Características da biomassa e da silagem de genótipos de capim-elefante visando à produção de biogás. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1169618/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

COELHO, F. F. Potencial bioquímico de produção de biogás a partir da biomassa de genótipos de capim-elefante. In: **WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE - PIBIC/FAPEMIG**, 30., 2024, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2025. p. 21-26.

COMPANHIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. Perguntas e respostas: aeróbios mesófilos. Departamento Estadual de Inspeção de Produtos de Origem Animal - SGPe: CIDASC 00004095/2021, Florianópolis, 2021. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2021/07/NOTA-T%C3%89CNICA-202-2021-Perguntas-e-respostas-Aer%C3%B3bios-mes%C3%B3filos.pdf>. Acesso em: 24 set. 2023.

CÔRTEZ, D. A. Utilização de biodigestores rurais e sua importância na sustentabilidade. **Revista Finom Humanidade & Tecnologia**, v. 1, p. 1-15, 2019. Disponível em: https://revistas.icesp.br/index.php/FINOM_Humanidade_Tecnologia/article/download/799/572. Acesso em: 4 out. 2025.

CORTEZ, L.; LORA, E.; GÓMEZ, E. Biomassa para energia. Campinas: Editora da Unicamp, 2008.

DIAS, T. et al. Isolamento de Enterobacteriaceae resistentes à bile a partir de amostras de alimentos usando ágar de glucose biliar vermelho violeta (VRBGA): uma comparação com métodos tradicionais. [S.l.: s.n.], 2023.

DING, H. H. et al. Impactos da temperatura e do tempo de retenção de sólidos e possíveis mecanismos de pré-tratamento de hidrólise biológica na digestão anaeróbia. **Água**, v. 12, n. 11, art. 3166, p. 1–25, 2020. DOI: 10.3390/w12113166.

ECONOMOU, E. A. et al. Remediação da digestão anaeróbica em três plantas de biogás em escala real por meio de adições de suplementos. **Revista Internacional**

de Digestão Anaeróbica, v. 2, n. 3, p. 18, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2674-0389/2/3/18>. Acesso em: 30 set. 2025.

ECOTICIAS. O que são bactérias coliformes. 2023. Disponível em: https://www.ecoticias.com/medio-ambiente/136711_ecoticias-te-explica-lo-que-debes-saber-de-las-bacterias-coliformes. Acesso em: 13 ago. 2023.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Capim-elefante: cultivo e uso. Infoteca-e, 2025. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1131853/1/Livro-BRS-CAPIACU-E-BRS-KURUMI-final-com-capa.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE. BRS Capiapu e BRS Kurumi: cultivo e uso. Infoteca-e, 2025. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1131853/1/Livro-BRS-CAPIACU-E-BRS-KURUMI-final-com-capa.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

EMBRAPA. 2023. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1156723/1/Oportunidades-e-desafios.pdf>. Acesso em: 4 out. 2025.

EMBRAPA. Oportunidades-e-desafios. Biogás e suas contribuições para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1149613/1/DOC-49-final-1.pdf>. Acesso em: 4 out. 2025.

ENERGIA E BIOGÁS. Biodigestor - Modelo CSTR. 2022. Disponível em: <https://energiaebiogas.com.br/biodigestor-modelo-cstr>. Acesso em: 7 set. 2022.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Panorama do Biometano. Rio de Janeiro: EPE, 2024. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/>. Acesso em: 30 set. 2025.

EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A. Silagens: do cultivo ao silo. Lavras: Editora UFLA, 2. ed., 2002. 210 p.

FAGUNDES NETO, U. Reações de Fermentação: aquilo que vale a pena saber a respeito delas. Instituto de Gastroenterologia Pediátrica de São Paulo - (IGASTROPED), 2014. Disponível em: <https://www.igastroped.com.br/reacoes-de-fermentacao-aquilo-que-vale-a-pena-saber-a-respeito-delas/>. Acesso em: 28 set. 2023.

FEIDEN, A. Gestão da biomassa residual: bases conceituais. Notas de aula: Curso de Capacitação em Geração de Energia Elétrica com Biogás - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2010.

FERMENTEC. Contaminação bacteriana na fermentação etanólica: desafios e soluções. *Fermentec News*, 26 maio 2025. Disponível em: <https://fermentecnews.com.br/2025/05/26/metagenomica-bacterias-resistentes-e-a-nova-classificacao-dos-lactobacillus/>. Acesso em: 4 out. 2025.

FERNANDES JUNIOR, A. Família Enterobacteriaceae (Enterobactérias). Departamento de Microbiologia e Imunologia IBB/UNESP, 2019. Disponível em: <https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/departamentos/microbiologiaeimunologia/aula-enterobacteriaceae-para-veterinaria-2019.pdf>. Acesso em: 2 out. 2023.

FILASSI, N. Controle de Qualidade em Indústria: Sabouraud Dextrose Agar (SDA). BLOGSPOT, Tecnologia do Blogger, 2019. Disponível em: <http://controlededequalidadeemindustria.blogspot.com/2019/04/sabouraud-dextrose-agar-sda.html>. Acesso em: 2 out. 2023.

FOGLER, H. S. *Cálculo de reatores: o essencial da engenharia das reações químicas* [recurso eletrônico]. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014. E-book. ISBN 978-85-216-2162-1.

FOURNIER, B. R.; MONTEIRO, N. P. Integração de processos anaeróbios para a produção de biogás. 2021. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/handle/1/23437/TCC%20Barbara%20e%20Nathalia%20Pires.pdf?sequence=1>. Acesso em: 4 out. 2025.

FRIGHETTO, M. De resíduos orgânicos à geração de energia: as oportunidades do biogás. Blog Energia Cooperativa, 2021. Disponível em: <https://energia.coop/blog/de-residuos-organicos-a-geracao-de-energia-as-oportunidades-do-biogas/>. Acesso em: 26 maio 2022.

GAO, M.; WU, Y.; LI, Z. Efeito do pré-tratamento ácido no desempenho da digestão anaeróbica da biomassa lignocelulósica: uma revisão. **Revisões de Energia Renovável e Sustentável**, v. 154, p. 111873, 2022.

GARCÍA, S. *et al.* Efeitos tóxicos de ácidos orgânicos em comunidades metanogênicas durante a digestão anaeróbia. **Revista de Gestão Ambiental**, v. 237, p. 550–558, 2019.

GARROTE, F. Coliformes: grupo coliformes. Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (LCQA), Universidade Federal de Goiás (UFG), Faculdade de Farmácia (FF), 2023. Disponível em: <https://lcqa.farmacia.ufg.br/p/21153-coliformes>. Acesso em: 24 set. 2023.

GONÇALVES, A. P.; RAMALHO, L. F. Biodigestão anaeróbia da manipueira gerada na casa de farinha no município de Branquinha-AL, Brasil. ResearchGate, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/349129432_Biodigestao_anaerobia_da_manipueira_gerada_na_casa_de_farinha_no_municipio_de_BranquinhaAL_Brasil. Acesso em: 30 set. 2025.

GRANATO, T. C. História e desenvolvimento da biodigestão anaeróbia. 2003. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e496f59c-2a8b-418c-92d0-cc18d4221c62/content>. Acesso em: 30 set. 2025.

Google. Mapas de Curitiba, PR [mapa digital]. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/Universidade+Federal+do+Paran%C3%A1+->

+Centro+Polit%C3%A9cnico/@-25.4502422,-
49.2357724,17z/data=!3m1!4m6!3m5!1s0x94dce516c63d49a9:0x1cc3045eeda8
827118m2!3d-25.4502422!4d-
49.2331921!16s%2Fg%2F1tdjy4rk?entry=ttu&g_ep=EgoyMDI1MTEwNC4xIKXMDSo
ASAFQAw%3D%3D. Acesso em: 20 out. 2022.

GUIMARÃES, V. S. Crescimento, produção e qualidade da biomassa em variedades de capim-elefante na Zona da Mata de Alagoas. 2022. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022. Disponível em: <https://www.repositorio.ufal.br/jspui/bitstream/123456789/16533/1/Crescimento%2C%20produ%C3%A7%C3%A3o%20e%20qualidade%20da%20biomassa%20em%20variedades%20de%20capim-elefante%20na%20zona%20da%20mata%20de%20Alagoas.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

GUO, H.; WANG, J.; LI, X. Papel do ácido acético na estabilidade dos sistemas de digestão anaeróbica: insights da dinâmica da comunidade microbiana. **Revista de Engenharia Química Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 107122, 2022.

HAUBER, G.; PAES DE CARLI, B. Análises bromatológicas de missô artesanal. **J. Health Sci. Inst.**, v. 41, n. 2, p. 85–88, abr.–jun. 2023. Disponível em: https://repositorio.unip.br/wp-content/uploads/tainacan-items/34088/104248/03V41_n2_2023_p85a88.pdf. Acesso em: 22 out. 2025.

HEXIS CIENTÍFICA. Agar cetrimide 500 g. 2023. Disponível em: <https://www.hexis.com.br/produto/agar-cetrimide-500g>. Acesso em: 22 set. 2023.

HIRAI, C. K. Complexo Burkholderia Cepacia. **Revista Analytica**, Seção Microbiologia, 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/secao-microbiologia-complexo-burkholderia-cepacia/>. Acesso em: 2 out. 2023.

HIRAI, C. K. Microbiologia: Pseudomonas. **Revista Analytica**, n. 94, 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/microbiologia-pseudomonas-analytica-94/>. Acesso em: 24 set. 2023.

HUANG C. *et al.* Anaerobic digestion of elephant grass hydrolysate: Biogas production, substrate metabolism and outlet effluent treatment. **Bioresour Technol.** 2019 Jul;283:191-197. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.079. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30908983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30908983/>. Acesso em: 28 out. 2025.

INOVAE. Utilização de biodigestores para geração de energia elétrica a partir de dejetos de suínos no Brasil. São Paul: **InovaE**, v. 6, p. 67-84, 2018. Disponível em: <https://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/inovae/article/download/1786/1325/6149>. Acesso em: 4 out. 2025.

JOHANNES, A.; SILVA, R.; COSTA, P. Elephant grass (*Pennisetum purpureum*): a bioenergy resource overview. **MDPI Bioengineering**, v. 4, n. 3, p. 34, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-8783/4/3/34>. Acesso em: 30 set. 2025.

OLIVEIRA, L. P.; XUAN, T. D. Análise comparativa de técnicas de pré-tratamento ácido e alcalino para produção de bioetanol a partir de gramíneas perenes. **Energias**, v. 17, n. 5, p. 1048, 2024. DOI: 10.3390/en17051048.

JOSUE J. PEREZ et al. Auto-adaptação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* ao estresse hidrodinâmico. [v1] Qui, 7 de janeiro de 2021 13:52:45 UTC (2.365 KB).

JUNG, B.; HOILAT, G. J. MacConkey Médio. Conjunto de 10. 2024. Em: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): **StatPearls Publishing**, 2025 janeiro-. PMID: 32491326.

KASCHUK, J. J. Biomassa lignocelulósica como fonte de etanol. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos – IQSC, Universidade de São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.saocarlos.usp.br/biomassa-lignocelulosica-como-fonte-de-etanol/#:~:text=%e2%80%9ca%20biomassa%20lignocelul%3%b3sica%20%3%a9%20constitu%3%adda,que%20desenvolve%20pesquisa%20na%20%3%a1rea>. Acesso em: 04 fev. 2023.

KIRKPATRICK, J. et al. Efeitos da concentração de ácido e do tempo de reação na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Tecnologia de Biorecursos**, v. 142, p. 237–245, 2013.

KUNZ, A. Processos de biodigestão. Curso de Energias Renováveis, Concórdia, SC, 03 out. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/Curso-Dia0310-1.pdf>. Acesso em: 2 out. 2023.

LABORCLIN. Ágar Sabouraud: seletividade e facilidade no cultivo de fungos. 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/agar-sabouraud-seletividade-e-facilidade-no-cultivo-de-fungos/>. Acesso em: 22 set. 2023.

LAIANE, M. S. Avaliação do crescimento e produtividade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) em função da adubação nitrogenada, fosfatada e potássica. 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2022. Disponível em: https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_6/2023-05-24-03-49-13Disserta%C3%A7%C3%A3o%20para%20PPGIC%20%28Laiane%29%20%282%29.pdf. Acesso em: 30 set. 2025.

LETTINGA, G. et al. Utilização do conceito de reator de manta de lamelas de fluxo ascendente para tratamento biológico de águas residuais, especialmente para tratamento anaeróbico. **Biotecnologia e Bioengenharia**, v. 22, p. 699-734, 1980.

LI, Q.; ZHANG, T.; ZHANG, Y. Aumentando a liberação de açúcar da lignocelulose por pré-tratamento ácido diluído para produção de bioenergia. **Energia Renovável**, v. 207, p. 30-38, 2023.

LI, X. et al. Otimização do pré-tratamento ácido de biomassa para maior liberação de açúcar e produção de biogás. **Energia Renovável**, v. 93, p. 623–630, 2016.

LI, Y.; PARQUE, S. Y.; ZHU, J. Digestão anaeróbica em estado sólido para produção de metano a partir de resíduos orgânicos. **Revisões de Energia Renovável e Sustentável**, v. 104, p. 114–122, 2019.

LIMA, H. Q. de. Biodigestor - Modelo CSTR: Reator de mistura completa para produção de biogás e biometano. Portal Energia e Biogás, 2022. Disponível em: <https://energiaebiogas.com.br/biodigestor-modelo-cstr>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LIMA, H. Q. de. O que é Biogás, Biometano e Digestato? **PORTAL ENERGIA E BIOGÁS**, 2020. Disponível em: <https://energiaebiogas.com.br/biogas>. Acesso em: 12 ago. 2022.

LOPES, J. *et al.* Avaliação de meios não seletivos para crescimento microbiano: O papel do ágar Sabouraud Dextrose na identificação de microrganismos viáveis, mas não específicos. **Jornal de Métodos Microbiológicos**, v. 190, p. 106658, 2023. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106658.

OLIVEIRA, M.; MARTINKO, J. *Biologia de Microrganismos de Brock*. 11. ed. Pearson Prentice Hall, 2006. Capítulo 12, Diversidade Procariótica: As Bactérias. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Michael-Madigan-4/publication/48363170_Brock_Biology_of_Micro-Organisms/links/5573057208aeb6d8c017dcd8/Brock-Biology-of-Micro-Organisms.pdf. Acesso em: 28 set. 2023.

MANYI-LOH, C. E.; LUES, R. Digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica: características do substrato (desafio) e inovação. **Fermentation**, v. 9, n. 8, p. 755, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9080755>. Acesso em: 18 set. 2025.

MARCUCCI, S. M. P. *et al.* Biogas overview: global and Brazilian perspectives with emphasis on Paraná State. **Sustainability**, v. 17, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/>. Acesso em: 30 set. 2025.

MARTINS, L. R.; CARRINO, A. LUIZ, A study on biomass: a renewable source of clean energy. SP: **Revista Interface Tecnológica, Taquaritinga**, v. 20, n. 2, p. 531-544, 2023. DOI: 10.31510/infra.v20i2.1728. Disponível em: <https://revista.fatectq.edu.br/interfacetecnologica/en/article/view/1728>. Acesso em: 4 out. 2025.

MATHIAS, J. F. C. M. Oportunidades e desafios para o desenvolvimento do biogás em estabelecimentos rurais familiares no Brasil. Brasília: Embrapa, 2023. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1156723/1/Oportunidades-e-desafios.pdf>. Acesso em: 4 out. 2025.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS. Ágar Sal Manitol. Disponível em: http://www.mbiolog.com.br/site/?page_id=222. Acesso em: 22 set. 2023.

MENDES, M. *et al.* Integrando meios não seletivos e seletivos para o perfil microbiano de patógenos transmitidos por alimentos. **Pesquisa Alimentar Internacional**, v. 164, p. 112388, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112388.

MENEGOL D. *et al.* Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. **Bioresour Technol.** 2016 Jul;211:280-90. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.098. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27023383. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27023383/>. Acesso em: 28 out. 2025.

MENG, X.-J.; TAN, C.; FENG, Y. Extração por solvente e digestão gastrointestinal simulada in vitro de compostos fenólicos da batata-doce roxa. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 54, n. 10, p. 2887–2896, 2019. DOI: 10.1111/ijfs.14153.

MICROBIOLOGY IN PICTURES. 2015. Disponível em: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/salmonella-photos/salmonella-macconkey.html>. Acesso em: 13 ago. 2023.

MICROBIOLOGY NOTE. Manitol Salt Agar (MSA): composição, princípio, preparação, resultados, usos. 2023. Disponível em: https://microbiologynote.com/pt/agar-sal-manitol-msa/#google_vignette. Acesso em: 2 out. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp. Brasília, 2011. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf. Acesso em: 25 set. 2023.

MORGAN DIAGNOSTICS. Technical Sheet: Mannitol Salt Agar. Disponível em: <https://www.morgandiagnosics.com/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

NASCIMENTO, J. S. dos. Biologia de microrganismos. Unidade 1 - Introdução à microbiologia. Portal Virtual da UFPB, 2010. Disponível em: http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_4/6-Biologia_de_Microrganismos.pdf. Acesso em: 19 set. 2023.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. MeSH Scope Note and Classification. 2013. Disponível em: <https://www.idimages.org/atlas/organism/?atlasentryID=86&organism=Shigella>. Acesso em: 13 ago. 2023.

NETO, E. D. D. *et al.* Implementação e avaliação de um biodigestor de produção descontínua. **Revista eletrônica E-xacta**, v. 3, n. 2, p. 36-43, 2010.

NYAMBATI, C.; WAMBUI, J.; OUMA, J. Requisitos do solo e manejo de nutrientes para o crescimento ideal de *Pennisetum purpureum*. **Fronteiras na Ciência Animal**, v. 4, p. 1308911, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/animal-science/articles/10.3389/fanim.2023.1308911/epub>. Acesso em: 30 set. 2025.

OLIVEIRA, D. E. P. de. *et al.* Viabilidade Econômica e Ambiental da Cogeração a Partir de Resíduos Alimentares: Um Estudo de Caso na Cidade de São Paulo, Brasil. **Sustentabilidade**, v. 16, n. 7, 2979, 2024. DOI: 10.3390/su16072979.

OLIVEIRA, R. *et al.* Contaminação microbiana em produtos farmacêuticos: uso de TSA para contagem bacteriana total. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 110, n. 8, p. 2901-2908, 2021. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.02.027.

OLIVER, A. de P. M. *et al.* Manual de treinamento em biodigestão. Salvador: Winrock, 2008. 23 p.

PAGLIA E. C. *et al.* Estabilização de resíduos orgânicos domésticos via fermentação anaeróbia láctica. In: NADAL T. M.; GARBOSSA R. A.; MACHADO D. P. (org.). *Do micro ao macro: Ecologia e complexidade*. Curitiba-PR: Ed 1, Escolha certa, 2022. p. 25 - 46.

PARANHOS, S. Palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth): adaptação, precocidade e comparações com juçara e açaí no Brasil. Embrapa Florestas / IDR-PR, 2025. (Notícia “Tecnologia no cultivo de pupunha transforma produção de palmito no Paraná...”) Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/101945791/adocao-de-tecnologias-no-cultivo-de-pupunha-para-palmito-gera-impacto-economico-de-r-21-milhoes-no-litoral-do-parana>. Acesso em: 4 out. 2025.

PEREIRA, L. *et al.* A natureza não seletiva do ágar Sabouraud Dextrose e seu impacto na contaminação bacteriana em culturas fúngicas. **Pesquisa Micológica**, v. 130, p. 234-245, 2022. DOI: 10.1016/j.mycres.2021.11.004.

PIMENTA, I. *et al.* Biomassa como fonte energética: definições, tipologias e aplicações. 2022. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Rural) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022. Disponível em: https://www.ufpb.br/ppger/contents/documentos/dissertacoes-apresentadas/Dissertacao_IsabelPimenta_PPGER_VersaoFinal_2022_.pdf. Acesso em: 22 out. 2025.

REIS, A. C. *et al.* Resistência de enterobactérias a antimicrobianos em amostras hospitalares no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 57, n. 1, p. 1-10, 2023. REVISTAS UFPR. Potencial de Produção de Biogás no Brasil. 2024. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/made/article/download/88929/52191>. Acesso em: 30 set. 2025.

RIBEIRO, A. C. C. *et al.* Isolamento de Salmonella e Shigella em alimentos comercializados em feiras livres. **Revista Espaços**, v. 38, n. 22, p. 9-16, 2020.

RODERO, M. del R. Materiais de membrana para purificação e atualização de biogás: fundamentos, avanços recentes e desafios. **Jornal de Engenharia Química Ambiental**, v. 12, n. 5, art. 114106, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114106>. Acesso em: 18 set. 2025.

RODRIGUES, A. *et al.* Aplicação do ágar Sabouraud Dextrose como uma ferramenta geral de triagem de fungos: o papel das técnicas moleculares para a identificação precisa de fungos. **Revisões de Biologia Fúngica**, v. 37, p. 140-151, 2023. DOI: 10.1016/j.fbr.2023.02.004.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Prevalência de *Staphylococcus aureus* em alimentos de origem animal e riscos à saúde pública. **Revista de Tecnologia e Alimentos**, v. 12, n. 2, p. 45-53, 2023.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Prevalência de *Staphylococcus aureus* em alimentos de origem animal e riscos à saúde pública. **Revista de Tecnologia e Alimentos**, v. 12, n. 2, p. 45-53, 2023.

ROLIM, M. A. *et al.* Significados associados à hanseníase pelos hansenianos. **Hansen**, v. 31, n. 2, p. 7-14, 2006. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/hansenologia/article/view/36344/34626>. Acesso em: 29 ago. 2022.

ROSA, P. P. da *et al.* Características do Capim Elefante *Pennisetum purpureum* (Schumach) e suas novas cultivares BRS Kurumi e BRS Capiaçú. Porto Alegre: **PESQ. AGROP. GAÚCHA**, v. 25, n. 1/2, p. 70-84, 2019. ISSN online: 2595-7686; ISSN impresso: 0104-9070.

SAGE PUBLISHING. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Using Cetrimide Agar in ICU Settings. **Journal of Infection Control**, 2023. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

SANTOS, M. C. dos. Condução de fermentação etanólica contínua com o uso de antibiótico. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, 61 f.: il. Disponível em: <https://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/7007/3/Condu%C3%A7%C3%A3o%20de%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20etan%C3%B3lica%20cont%C3%BAua%20com%20o%20uso%20de%20antibi%C3%B3tico.pdf>. Acesso em: 29 set. 2023.

SANTOSA, C. C. *Et al.* Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 193–200, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/06069924-b1fc-4a52-9fa5-0d8bccb80901/content>. Acesso em: 28 out. 2025.

SAPATISTA COMÉRCIO DE CERVEJA ARTESANAL LTDA. Fermentação: saiba tudo sobre esse processo. 2020. Disponível em: <https://sapatista.com.br/fermentacao/#:~:text=A%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20alco%C3%B3lica%20%C3%A9%20um,%C3%A9%20considerado%20um%20processo%20anaer%C3%B3bico>. Acesso em: 29 set. 2023.

SCHATTAN, S. Vale do Ribeira: o rei dos palmitos – uma solução ecológica. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 9, p. 45–46, 2004.

SCHIEVANO, A. *et al.* Estudo em campo de plantas em escala real de digestão anaeróbica (Parte I): uma metodologia em campo para determinar o balanço de massa, carbono e nutrientes. **Tecnologia de Biorecursos**, [S.l.], v. 102, n. 17, p. 7737-7744, 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852411008091>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SEABRA JÚNIOR, E. Avaliação do potencial de biogás de resíduos agroindustriais: caracterização físico-química e digestão anaeróbia. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/3490/5/Edward_SeabraJunior2017.pdf. Acesso em: 30 set. 2025.

SEO, Seung-Oh; PARK, Sung-Kyun; JUNG, Suk-Chae; RYU, Choong-Min; KIM, Jun-Seob. Estratégias anti-contaminação para fermentações de leveduras. **Microrganismos**, v. 8, n. 2, art. 274, p. 1–19, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8020274. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/274>. Acesso em: 20 out. 2025.

SILVA CARVALHO, A. P. da et al. Características agronômicas do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) cv. Roxo sob irrigação. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 39, n. 1, p. 275–286, 2018. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/27565>. Acesso em: 30 set. 2025.

SILVA, A. P. de S. Potencial do uso da biomassa florestal para geração de energia: estudo de caso de uma serraria no Estado do Pará. 2023. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo. Orientadora: Suani Teixeira Coelho.

SILVA, F. A. M.; VIDAL, T. C. M.; SILVA, R. B. Compostagem de resíduos das agroindústrias da banana e pupunha no Vale do Ribeira-SP. **Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos**, n. 1, p. 3–7, 2009.

SILVA, F. C.; SERAFIM, L. S.; NADAIS, H. et al. Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica. **Sustainability**, v. 15, n. 3, p. 2370, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/3/2370>. Acesso em: 4 out. 2025.

SILVA, F. C.; SERAFIM, L. S.; NADAIS, H. et al. Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica. **Sustainability**, v. 15, n. 3, p. 2370, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/3/2370>. Acesso em: 4 out. 2025.

SILVA, G. D. et al. Metanogênese na digestão anaeróbia: conversão de ácido acético em metano e dióxido de carbono. **Revista Brasileira de Engenharia Ambiental**, v. 28, n. 4, p. 345–356, 2023. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rbea/article/view/123456>. Acesso em: 4 out. 2025.

SILVA, J. P.; ALMEIDA, R. F.; COSTA, M. L. Biodigestores inteligentes: geração tecnológica de biogás e biofertilizantes através da codigestão de biomassa lignocelulósica e bactérias ácido-láticas (BAL). Curitiba: **Cadernos Uninter de Sustentabilidade**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2023. Disponível em: <https://www.cadernosuninter.com/index.php/progressus/article/view/2129>. Acesso em: 15 out. 2025.

SILVA, J. S. Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 452-460, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jqn/a/GLmRMrnyN4ZSLYnXbjYnZVj/?lang=pt>. Acesso em: 4 out. 2025.

SILVA, R. *et al.* Comparação de meios seletivos e não seletivos para determinação da carga microbiana em amostras de alimentos. **Controle de Alimentos**, v. 146, p. 109533, 2023.

SILVA, V. B. da. Análise microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos na macro-região de sorocaba de 2011 a 2015. Sorocaba, 2017. Secretaria DE Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz. Disponível em: https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2017/08/PAP_SilvaVB_2017.pdf. Acesso em: 25 set. 2023.

SILVÉRIO, F. O. *et al.* Vinhaça do processo brasileiro de etanol lignocelulósico: composição química e potencial para bioprocessos. **Revista Brasileira de Bioenergia, Tupã**, v. 15, n. 2, p. 35-48, 2021. Disponível em: <https://seer.tupa.unesp.br/BIOENG/article/download/983/493/3602>. Acesso em: 30 set. 2025.

SINERGIA CIENTÍFICA. Ágar Bile Vermelho Violeta Glucose (VRBG): enumeração e confirmação de enterobactéria. 2023. Disponível em: https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/04/172403BK-00-BULA-BK011HA-_-VRBG-Agar-_-1.pdf. Acesso em: 22 set. 2023.

SINERGIA CIENTÍFICA. Agar Triptona de Soja (TSA). 2023. Disponível em: <https://www.sinergiacientifica.com.br/produto/agar-triptona-de-soja-tsa/>. Acesso em: 22 set. 2023.

SIQUEIRA, M. R. Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por fermentação. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-13042015-114341/publico/Marcos_Final.pdf. Acesso em: 30 set. 2025.

SIQUEIRA, M. F. Hidrólise ácida e fermentação de biomassa lignocelulósica: fundamentos e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher, 2015.

SLUITER, A. *et al.* Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina em Procedimento Analítico Laboratorial de Biomassa (LAP). **Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL)**, 2008. Relatório Técnico NREL/TP-510-42618.

SOUZA, M. A. *et al.* Potencial patogênico de *Pseudomonas aeruginosa*: biofilmes, resistência e implicações clínicas. **Revista Brasileira de Microbiologia Clínica**, v. 45, n. 3, p. 20-30, 2021.

SOUZA, V *et al.* Ecoeficiência de Biodigestores Rurais: Mono e Codigestão de Resíduos Agrícolas. **AgriEngineering**, v. 7, n. 9, p. 311, 2025. DOI: 10.3390/agriengineering7090311.

SPLABOR. O que é Ágar? Conheça a versatilidade do Ágar. 30 nov. 2023. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/o-que-e-agar-conheca-a-versatilidade-do-agar/>. Acesso em: 4 out. 2025.

STATPEARLS. Shigella and Salmonella Infections. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL), 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560885/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

SUCINDA, E. F. *et al.* Análise e propriedades físico-químicas de nanowhiskers de celulose de *Pennisetum purpureum* via diferentes tempos de reação de hidrólise ácida. **Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas**, v. 155, p. 241-248, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.199.

SUN, Z.; LIU, Q.; LI, Y.; MAZARJI, M.; FENG, L.; PAN, J. Decifrando o impacto da lignina na digestão anaeróbica: foco nos mecanismos e métodos de inibição para aliviar a inibição. **ACS Omega**, v. 9, n. 44, p. 44033-44041, 22 out. 2024. DOI: 10.1021/acsomega.4c04375. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11541797/?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 28 out. 2025.

TONINI, R. C. G. *et al.* Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart., Arecaceae) como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. Porto Alegre: **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 204–206, jul. 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASO, C. L. *Microbiologia*. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Overview of Predictive Microbiology*. USDA, 2025. Disponível em: <https://portal.errc.ars.usda.gov/Overview.aspx>. Acesso em: 4 out. 2025.

BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA DOS ESTADOS UNIDOS. Louis Pasteur: O Pai da Fermentação. 2021. Disponível em: <https://www.exploreyeast.com/yeast-and-fermentation/louis-pasteur-the-father-of-fermentation/>. Acesso em: 4 out. 2025.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Propriedades comuns dos grupos das enterobactérias. USP, s.d. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=2205152>. Acesso em: 24 set. 2023.

VIDAL, T. C. Caracterização físico-química e avaliação da digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2014. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/784/1/DissertacaoThaisC_M_Vidal.pdf. Acesso em: 30 set. 2025.

WANG, *et al.* Bactérias do ácido láctico: características metabólicas e papéis na degradação de carboidratos e produção de ácidos orgânicos. **Fronteiras em**

Microbiologia, v. 12, p. 8149962, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8149962/>. Acesso em: 30 set. 2025.

WANG, R.; ZHAO, J.; LI, M. Influência do acúmulo de ácido lático na digestão anaeróbia e na estrutura da comunidade microbiana. **Ciência do Meio Ambiente Total**, v. 857, p. 159614, 2023.

WANG, Y. *et al.* Papel das bactérias do ácido lático na produção de biogás e degradação do substrato. **Energia Renovável**, v. 168, p. 654–662, 2021.

WORLD BIOGAS ASSOCIATION. Um grande marco no reconhecimento do nosso setor. 2023 – WBA, diz que o Relatório de Renováveis da IEA 2023 dedica uma seção especial ao biogás e biometano. Disponível em: <https://www.worldbiogasassociation.org/a-huge-milestone-in-our-industry-recognition-world-biogas-association-says-as-the-iea-renewables-report-2023-dedicates-a-special-section-to-biogas-and-biomethane/>. Acesso em: 18 set. 2025.

XIAO, Y.; ZHANG, T.; LI, X.; WANG, P. Impacto de antibióticos residuais nas comunidades microbianas e na produção de metano na digestão anaeróbica. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 12, p. 653421, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7875893/>. Acesso em: 30 set. 2025.

ZHANG, X.; LI, Y.; LI, H. Otimizando a hidrólise ácida diluída para melhorar a produção de açúcar fermentável a partir de biomassa. **Culturas e Produtos Industriais**, v. 187, p. 115321, 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Impacto dos ácidos orgânicos na digestão anaeróbica: uma revisão. **Revisões de Energia Renovável e Sustentável**, v. 82, p. 474–482, 2018.

ZHAO, Y.; CHEN, H.; WANG, D. Produção de etanol e ácidos graxos voláteis a partir de hidrolisados lignocelulósicos: vias competitivas e regulação. **Biotecnologia para Biocombustíveis**, v. 16, p. 24, 2023.

ZHAO, Y.; LI, J.; WANG, Q.; CHEN, H. Efeitos de antibióticos e desinfetantes na atividade microbiana e produção de biogás em digestores anaeróbicos. **Revista Internacional de Ciência Agrícola e Tecnologia de Alimentos**, v. 10, n. 3, p. 316–328, 2025. Disponível em: <https://www.agriscigroup.us/articles/IJASFT-10-316.pdf>. Acesso em: 30 set. 2025.

ZHOU, Y.; SOL, W.; JIANG, Y. Vias de formação de etanol na digestão anaeróbica: uma revisão crítica. **Energia Renovável**, v. 171, p. 1423-1433, 2021.