



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PABLO INOCÊNCIO MONTEIRO

ACELERAÇÃO DA BIODIGESTÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUOS
SÓLIDOS URBANOS (RESÍDUO ALIMENTAR)

CURITIBA

2023

PABLO INOCÊNCIO MONTEIRO

ACELERAÇÃO DA BIODIGESTÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUOS
SÓLIDOS URBANOS (RESÍDUO ALIMENTAR)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier
Coorientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

CURITIBA

2023

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

Monteiro, Pablo Inocêncio
Aceleração da biodigestão da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos
(resíduo alimentar) / Pablo Inocêncio Monteiro. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Michele Rigon Spier
Coorientador: André Bellin Mariano

1. Biodigestores. 2. Digestão anaeróbia. 3. Resíduos sólidos. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. III. Spier, Michele Rigon. IV. Mariano, André Bellin.
V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PABLO INOCÊNCIO MONTEIRO** intitulada: **ACELERAÇÃO DA BIODIGESTÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS (RESÍDUO ALIMENTAR)**, sob orientação da Profa. Dra. MICHELE RIGON SPIER, 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 doutor 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, 22 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica
24/05/2023 18:17:02.0
MICHELE RIGON SPIER
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
15/06/2023 11:46:02.0
MARCIA REGINA BEUX
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
31/05/2023 18:36:40.0
FRANCINY CAMPOS SCHMIDT
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
05/06/2023 10:43:54.0
CRISTINE RODRIGUES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/05/2023 10:53:04.0
CHRISTIAN SCAPULATEMPO STROBEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)

Assinatura Eletrônica
02/06/2023 08:52:32.0
SASCHA HABU
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta tese a Deus e aos meus amados pais, que me deram a força e a segurança necessárias para concluir este trabalho. Sem o amor e o apoio de vocês, nada disso seria possível. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar estas palavras de agradecimento a todos que me apoiaram nesta jornada acadêmica.

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder força e sabedoria necessárias para enfrentar os desafios ao longo do caminho.

À minha família, agradeço pelo apoio incondicional, amor e incentivo para que eu pudesse realizar este sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL-UFPR), por ter proporcionado condições para uma formação sólida e completa. Agradeço especialmente à orientadora Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier, pela dedicação, paciência e orientações preciosas que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Ao meu coorientador Prof. Dr. André Bellin Mariano, pela colaboração e contribuições importantes.

Agradeço também à empresa SILCON *Sustech Ecosystem*, pelo aporte financeiro no desenvolvimento do projeto e aos alunos que trabalharam comigo, pela ajuda na coleta e análise de dados.

Agradeço à CAPES pela bolsa de fomento à pesquisa, que possibilitou a realização deste estudo e os laboratórios da UFPR (LENGBIO; CEPPA; NPDEAS; LCPQ e LAPESP).

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos agradeço pelas experiências compartilhadas e pelo apoio mútuo ao longo deste percurso.

Não poderia deixar de agradecer aos professores do PPGEAL-UFPR, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, que foram essenciais para a minha formação acadêmica.

Por fim, agradeço à minha companheira Rúbia, por estar ao meu lado em todos os momentos, aconselhando-me e dando-me forças para superar os desafios.

Este trabalho é fruto do esforço e dedicação de todos que mencionei, e por isso, sou profundamente grato.

Muito obrigado.

RESUMO

O destino inadequado dos resíduos sólidos urbanos (RSU) é um grande problema ambiental global. Para evitar o acúmulo em aterros, uma das alternativas incentivadas é a biodigestão anaeróbica, realizada em biodigestores, na qual os resíduos são convertidos em produtos úteis como o biogás bruto. O Brasil apresenta potencial para a produção de biogás, mais precisamente o biometano, componente do biogás bruto, que necessita ser purificado. Diante dos volumes diários de produção de RSU nos maiores centros urbanos, o objetivo principal desse estudo foi desenvolver uma solução tecnológica para acelerar o processo de biodigestão anaeróbica convencional de fração orgânica oriunda de resíduos alimentares, de modo a reduzir tempo de processo e aumentar o rendimento de biometano no biogás bruto. Desta forma, o trabalho foi dividido em 6 capítulos para desenvolvimento dessa pesquisa: Capítulo 1 - revisão da literatura; Capítulo 2 - construção de um sistema de biodigestão em frascos de 100 mL; Capítulo 3 - avaliação do sistema de neutralização da biodigestão; Capítulo 4 - uso de codigestor com estabilizante; Capítulo 5 - isolamento de grupos de microrganismos e uso de enzimas para a biodigestão; e Capítulo 6 - otimização dos valores ideais de grupos de microrganismos e enzimas como inoculantes, utilizando a ferramenta estatística DCCR. Com isso, o presente estudo possibilitou desenvolver um sistema de biodigestão com frascos de 100 mL e demonstrar o comportamento da biodigestão quando são adicionados de recicláveis, condicionados em diferentes rotas de processo (úmido e extrasseco) e em termos de granulometria e temperatura (mesofílica e termofílica). A partir dos experimentos para ajuste de pH, observou-se que o acetato de sódio (CH_3COONa) como agente tamponante apresentou o melhor desempenho. Por outro lado, o lodo de tratamento de esgoto contribuiu para a manutenção do pH neutro e não inibiu efetivamente a produção de biogás. A substituição do N_2 pelo ambiente *headspace* não afetou o processo de avaliação do biogás, sendo sua adição opcional. O pré-tratamento do resíduo inserido no biodigestor para determinação do tamanho de partícula (1,18 mm) contribuiu na padronização, porém, nenhum tratamento interferiu no processo de reação do biogás acumulado. A quantidade de sólidos voláteis adicionados pode afetar a biodigestão, mas os testes mostraram efeitos semelhantes para as respostas do biogás e do biometano. Em relação aos isolamentos de grupos de microrganismos, a pesquisa possibilitou a identificação de dois grupos provenientes de resíduos alimentares e lodo de estação de tratamento de esgoto (EA e EB), que desempenharam um papel significativo na produção de biogás e biometano durante o processo de biodigestão. Além disso, os delineamentos experimentais possibilitaram reduzir a quantidade e identificar as variáveis significativas e suas concentrações ideais dos grupos microbianos EA = $5,25 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, EB = $6,90 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e enzimas CA, C, L, P nas dosagens de $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. Conclui-se que o processo foi otimizado em 10 dias comparado com o processo convencional que tem duração média de 45 dias, obtendo um aumento de 72% e 88% (v/v) na produção de biogás e biometano, respectivamente, para o resíduo alimentar, utilizando o bioacelerador.

Palavras-chave: Digestão anaeróbica; resíduo sólido urbano; *blend* microbiano e enzimático, biodigestor; fração orgânica.

ABSTRACT

The inadequate disposal of municipal solid waste (MSW) is a significant global environmental problem. To avoid accumulation in landfills, one of the encouraged alternatives is anaerobic biodigestion, carried out in biodigesters, where waste is converted into useful products, such as raw biogas. Brazil has potential for biogas production, specifically biomethane, a component of raw biogas that requires purification. Considering the daily volumes of MSW generated in major urban centers, the main objective of this study was to develop a technological solution to accelerate the conventional anaerobic biodigestion process of the organic fraction derived from food waste, in order to reduce process time and increase biometane yield in raw biogas. Therefore, the work was divided into 6 chapters for the development of this research: Chapter 1 - literature review; Chapter 2 - construction of a 100 mL biodigestion system in flasks; Chapter 3 - evaluation of the biodigestion neutralization system; Chapter 4 - use of co-digestion with stabilizer; Chapter 5 - isolation of microbial groups and use of enzymes for biodigestion; and Chapter 6 - optimization of the ideal values of microbial groups and enzymes as inoculants, using the statistical tool DCCR. This study enabled the development of a 100 mL biodigestion system and demonstrated the behavior of biodigestion when recyclables were added, conditioned through different process routes (wet and dry), in terms of particle size and temperature (mesophilic and thermophilic). Through pH adjustment experiments, improved configurations to prevent acidification of the biodigestion process were observed. The best result was obtained when sodium acetate (CH_3COONa) was used as a buffering agent. However, sewage sludge contributes to maintaining neutral pH and does not effectively inhibit biogas production. The substitution of N_2 with headspace did not affect the biogas evaluation process and its addition was optional. Pre-treatment of the waste inserted in the biodigester for particle size determination (1.18 mm) contributed to standardization, but none of the treatments interfered with the accumulated biogas reaction process. The addition of volatile solids can affect biodigestion, but the tests showed similar effects on biogas and biomethane responses. Regarding the isolation of microbial groups, the research enabled the identification of two groups derived from food waste and sewage treatment plant sludge (EA and EB), which played a significant role in biogas and biometane production during the biodigestion process. Furthermore, the experimental designs made it possible to reduce the quantity and identify the optimal configuration for the process (EA = 5.25×10^9 CFU·mL⁻¹, EB = 6.90×10^9 CFU·mL⁻¹, CA = $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, C = $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, L = $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, and P = $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) that combined the microbial groups and commercial enzymes, leading to increased biogas and biomethane production. In conclusion, the process was optimized within 10 days, resulting in a 72% increase in biogas production and an 88% increase in biomethane production (v/v) for food waste, using the bioaccelerator.

Key-words: anaerobic digestion; urban solid waste; accelerator; biodigester, organic fraction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DA TESE	28
FIGURA 2- PROCESSO BÁSICO DE DIGESTÃO ANAERÓBICA: DA RECEPÇÃO A ENTREGA.....	35
FIGURA 3- ETAPAS DE DIGESTÃO ANAERÓBICA NO BIODIGESTOR (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE)	36
FIGURA 4- FLUXOGRAMA DO ESQUEMA DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO DE ACORDO COM A OPERAÇÃO (ÚMIDA, SECA E EXTRASSECA).....	41
FIGURA 5 - CONSTRUÇÃO DO MINIBIODIGESTOR EM ESCALA REDUZIDAS EM FRASCOS DE 100 mL, ETAPA A, B, C e D.....	52
FIGURA 6 – DEMONSTRAÇÃO DAS ETAPAS DA EXECUÇÃO DO ENSAIO DE BIODIGESTÃO (PROPORÇÃO DE RECICLÁVEIS (A); TIPO DO TRATAMENTO DO RESÍDUO (B); TIPO DE TRATAMENTO TÉRMICO (C)	54
FIGURA 7 – DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOGÁS FORMADOS NOS BIODIGESTORES DE 100 mL EM TEMPERATURA CONTROLADA (35 °C).....	55
FIGURA 8 - PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DE VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS COM BIODIGESTORES EM VIA ÚMIDA COM E SEM TRATAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO EM TEMPERATURAS DE 35 °C E 45 °C (1 % E 5 % DE RESÍDUO RECICLÁVEL).....	57
FIGURA 9- PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DE VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS COM BIODIGESTORES EM VIA EXTRASSECA COM E SEM TRATAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO EM TEMPERATURAS DE 35 °C E 45 °C (1 % E 5 % DE RESÍDUO RECICLÁVEL).....	58
FIGURA 10 - PADRONIZAÇÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUO SÓLIDO DE RESTAURANTES	66
FIGURA 11- DEMONSTRAÇÃO DOS BIODIGESTORES EM FRASCOS DE 100 mL COM RESÍDUO SÓLIDO DA FRAÇÃO ORGÂNICA (RESÍDUO ALIMENTAR) + SUA MONTAGEM	67
FIGURA 12- DIAGRAMA DOS EXPERIMENTOS DE BIODIGESTÃO COM AGENTES NEUTRALIZANTES DE pH.....	68

FIGURA 13- PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) NA BIODIGESTÃO DE RESÍDUO SÓLIDO NA FRAÇÃO ORGÂNICA ($[\text{CH}_3\text{COONa}] = 2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{NaHCO}_3] = 1$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $[\text{NaOH}] = 2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	69
FIGURA 14- DIAGRAMA DOS EXPERIMENTOS DE BIODIGESTÃO NO <i>HEADSPACE</i> (COM E SEM ADIÇÃO DE N_2).....	78
FIGURA 15- ENSAIO DE GRANULOMETRIA NO RESÍDUO ALIMENTAR NÃO TRITURADO E TRITURADO (30 SEGUNDOS) E PASSADO EM PENEIRA A 14 <i>mesh</i>	79
FIGURA 16- KIT DE ANÁLISE DE BIOGÁS ALFAKIT (A) E MODELO DE VERIFICAÇÃO DE BIOGÁS (B)	80
FIGURA 17- PERFIL DE PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOGÁS ($\text{mL}\cdot\text{gSV}^{-1}$) PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO; RESÍDUO + ACETATO DE SÓDIO; RESÍDUO + LODO; E RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO (DURANTE 30 DIAS; 35 °C).....	81
FIGURA 18- COMPORTAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO EM 30 DIAS DE PROCESSO PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO + LODO; RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO, (35 °C)	83
FIGURA 19- PERFIL DIÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO DURANTE 30 DIAS DE PROCESSO (SEM N_2 + <i>HEADSPACE</i> ; SEM N_2 + SEM <i>HEADSPACE</i> ; COM N_2), TEMPERATURA DO PROCESSO DE 35 °C	84
FIGURA 20- PRODUÇÃO DE METANO PÓS-TRATAMENTO MECÂNICO EM TRÊS DIFERENTES GRANULOMETRIAS: NÃO TRITURADO, TRITURADO 30s (PROCESSADOR) E TRITURADO (CLASSIFICADO $\leq 14\text{mesh}$ 1,18 mm) DURANTE 30 DIAS A 35 °C	84
FIGURA 21- PERFIL DIÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO DURANTE 30 DIAS DE PROCESSO (35 °C) PARA AS CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS VOLÁTEIS DE $7,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$, $11 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$ e $14,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$	86
FIGURA 22- DIAGRAMA DAS ETAPAS (1, 2 E 3) DE ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS DO RESÍDUO CONDICIONADO A BIODIGESTÃO ANAERÓBICA (35 °C E 45 °C).....	93

FIGURA 23- DEMONSTRAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM PLACAS DE PETRI NOS MEIOS BHI, MRS E PDA (MICRORGANISMOS + MATRIZES, 35 °C E 45 °C).....	94
FIGURA 24- DEMONSTRAÇÃO DA MONTAGEM DOS ENSAIOS PARA DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB (RESÍDUO; LODO ENRIQUECIDO (ISOLADO); BACTÉRIAS LÁCTICAS E LODO ENRIQUECIDO).....	102
FIGURA 25- SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTARAM EFEITO SIGNIFICATIVO POSITIVO DURANTE O PROCESSO DE BIODIGESTÃO VIA ÚMIDA A 35 °C	112
FIGURA 26- MICRORGANISMOS ISOLADOS COM EFEITO SIGNIFICATIVO POSITIVO DURANTE O PROCESSO DE BIODIGESTÃO DIFERENCIANDO EM FORMA E COLORAÇÃO DE GRAM	112
FIGURA 27- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2	115
FIGURA 28- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2	116
FIGURA 29- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS) ETAPA 3	117
FIGURA 30- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS) ETAPA 3	118
FIGURA 31- GRÁFICO DO PERFIL DE COMPORTAMENTO DOS VALORES DE PRODUÇÃO DO BIOMETANO COM O USO DE ENZIMAS DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ETAPA 3).....	118
FIGURA 32- VOLUME ACUMULATIVO DE BIOMETANO E BIOGÁS DOS EXPERIMENTOS COM ENZIMAS DURANTE 10 DIAS (ETAPA 3)..	119
FIGURA 33- VALORES DO PERCENTUAL DE AUMENTO DE BIOMETANO COM O USO DE ENSIMAS NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO (ETAPA 3)	120

FIGURA 34- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS + MICRORGANISMOS) ETAPA 4	121
FIGURA 35- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS + MICRORGANISMOS) ETAPA 4	122
FIGURA 36- GRÁFICO DO PERFIL DE COMPORTAMENTO DOS VALORES DE PRODUÇÃO DO BIOMETANO COM O USO DE ENZIMAS + MICRORGANISMOS DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ETAPA 4)	123
FIGURA 37- VOLUME ACUMULATIVO DE BIOMETANO E BIOGÁS DOS EXPERIMENTOS COM ENZIMAS + MICRORGANISMOS DURANTE 10 DIAS (ETAPA 4).....	123
FIGURA 38- VALORES DO PERCENTUAL DE AUMENTO DE BIOMETANO COM O USO DE ENSIMAS + MICRORGANISMOS NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO (ETAPA 4)	124
FIGURA 39- MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (EB E EA).....	133
FIGURA 40- DEMONSTRAÇÃO DAS ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR PARA A BIODIGESTÃO EM FRASCOS DE 100 mL.....	134
FIGURA 41- ILUSTRAÇÕES EXPERIMENTAIS DA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM SHAKER a 28 °C E 90 RPM DURANTE 72 h E DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO EM ESTUFA A 35 °C DURANTE 10 DIAS.....	135
FIGURA 42- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (DCCR) PARA A PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOGÁS (mL) EM FUNÇÃO DO CONJUNTO CA x EA (A); C x EB (B); CA x EB (C); P x CA (D); L x CA (E); C x CA (F) DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)	142
FIGURA 43-SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (DCCR) PARA A PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOMETANO (mL) EM FUNÇÃO DO CONJUNTO CA x EA (A); CA x EB (B); L x EB (C); P x L (D); P x CA (E); C x CA (F) DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)	143

FIGURA 44- PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BG E BM EM 10 DIA DE PROCESSO A 35 °C.....	144
--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- COMPOSIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO (POR MATERIAL) DE RSU GERADOS NO BRASIL EM 2020.....	30
GRÁFICO 2- GERAÇÃO TOTAL DE RSU NAS REGIÕES BRASILEIRAS NO ANO DE 2022 (t·ano ⁻¹)	32
GRÁFICO 3- DISPOSIÇÃO FINAL DE RSU COLETADOS NO BRASIL (10 ⁶ t·ano ⁻¹)	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS DIFERENTES TIPOS DE RESÍDUOS ORGÂNICOS	31
TABELA 2- ETAPAS DA DIGESTÃO ANAERÓBICA NO BIODIGESTOR E SUAS DESCRIÇÕES (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE).....	35
TABELA 3- ETAPAS DA BIODIGESTÃO E AS REAÇÕES BIOQUÍMICAS DE CADA ETAPA DO PROCESSO (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE)	37
TABELA 4- REAÇÕES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO SINTRÓFICA DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIODIGESTÃO.....	39
TABELA 5- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS ORDENS METANOGÊNICAS (FONTE DE CARBONO; TEMPERATURA E pH) .	40
TABELA 6- VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS PROCESSOS MESOFÍLICO E TERMOFÍLICO NA BIODIGESTÃO	41
TABELA 7-COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS REATORES DE VIA EXTRASSECA E ÚMIDA.....	42
TABELA 8 - PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ATUANTES EM CADA ETAPA DA BIODIGESTÃO.....	43
TABELA 9- PRINCIPAIS MICRORGANISMOS NO LODO ANAERÓBICO NA VIA ÚMIDA E VIA SECA (BACTÉRIA E ARCHAEA)	44
TABELA 10- COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS EM DIFERENTES PROCESSOS (BIODIGESTORES E ATERROS).....	46
TABELA 11- COMPOSIÇÃO EM PERCENTUAL DO RSU DO BRASIL E DE RESTAURANTE (MATERIAL ORGÂNICO).....	53
TABELA 12- PARAMETRO FÍSICO-QUÍMICO DO RESÍDUO ALIMENTAR (pH; °Bx; ST; SV; E SF).....	53
TABELA 13- CONDIÇÕES DOS ENSAIOS DA BIODIGESTÃO DE RESÍDUO ALIMENTAR (RC, ST, RS).....	55
TABELA 14- ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTE DE DUNCAN ($p < 0,05$) PARA O VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS EM 30 DIAS DE PROCESSO DE BIODIGESTÃO PARA A VIA ÚMIDA E EXTRASSECA	

NOS ENSAIOS DE 1 % E 5 % DE RESÍDUO RECICLÁVEL (TEMPERATURAS 35 °C E 45 °C)	59
TABELA 15- ANÁLISE QUANTITATIVA DO PRINCIPAIS GASES NO BIOGÁS ACUMULADO EM 30 DIAS DE PRODUÇÃO	61
TABELA 16- CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O CONTROLE DE pH NA BIODIGESTÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS (CARGA ORGÂNICA; VOLUME DE TRABALHO; RESÍDUO ALIMENTAR; E REAGENTE QUÍMICO NEUTRALIZADOR)	67
TABELA 17- VALORES MÉDIOS ± DESVIOS DE pH DO PROCESSO (HORAS) DE BIODIGESTÃO DE RESÍDUO SÓLIDO DA FRAÇÃO ORGÂNICA COM REAGENTES ALCALINIZANTES	69
TABELA 18- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO RESÍDUO ALIMENTAR E LODO PARA ST, SV, SF E UMIDADE.....	74
TABELA 19- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO RESÍDUO ALIMENTAR	75
TABELA 20- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NO LODO ESTABILIZADO E ENRIQUECIDO COM CALDOS NUTRIENTES: PCA, BHI E MRS. AMOSTRA DE LODO DISPONIBILIZADO POR CSBIOENERGIA (LODO DE ETE PROVENIENTE DA CODIGESTÃO ANAERÓBICA EM VIA ÚMIDA DE RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS DO CEASA DE CURITIBA-PR E ESGOTO SANITÁRIO ..	75
TABELA 21- CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE BIODIGESTÃO COM LODO E NEUTRALIZANTE QUÍMICO	77
TABELA 22- ENSAIO DE OCUPAÇÃO DO <i>HEADSPACE</i> : SEM ADIÇÃO DE N ₂ , COM VOLUME DO <i>HEADSPACE</i> ; COM ADIÇÃO DE N ₂ ; SEM ADIÇÃO DE N ₂ , SEM VOLUME DO <i>HEADSPACE</i> NAS PRIMEIRAS 24h DO PROCESSODE BIODIGESTÃO	78
TABELA 23- ENSAIO DE GRANULOMETRIA NO RESÍDUO ALIMENTAR NÃO TRITURADO E TRITURADO (30 SEGUNDOS) E PASSADO EM PENEIRA A 14 <i>mesh</i>	79
TABELA 24- ENSAIOS DE SÓLIDOS VOLÁTEIS UTILIZANDO CARGAS ORGÂNICAS DE RESÍDUOS ALIMENTARES NAS CONCENTRAÇÕES DE 7,50; 11,00 E 14,50 gSV·L ⁻¹	80

TABELA 25- VALORES DE pH INICIAL E FINAL DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO VIA ÚMIDA PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO; RESÍDUO + ACETATO DE SÓDIO; RESÍDUO + LODO; E RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO (DURANTE 30 DIAS; 35 °C).....	82
TABELA 26- QUANTIDADE DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA EXECUÇÃO DO DELINEAMENTO DO TIPO PB UTILIZANDO RESÍDUO ALIMENTAR EM VIA ÚMIDA (PDA E BHI)	95
TABELA 27- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NO LODO ESTABILIZADO E ENRIQUECIDO COM CALDOS NUTRIENTES: PCA, BHI E MRS. AMOSTRA DE LODO DISPONIBILIZADO POR CSBIOENERGIA (LODO DE ETE PROVENIENTE DA CODIGESTÃO ANAERÓBICA EM VIA ÚMIDA DE RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS DO CEASA DE CURITIBA-PR E ESGOTO SANITÁRIO	95
TABELA 28- VALORES DAS QUANTIDADES DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA O PB LODO (UFC·mL ⁻¹) EM MEIO PDA, BHI E MRS EM 35 °C	96
TABELA 29- VALORES DAS QUANTIDADES DE CÉLULAS VIÁVEIS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DO BANCO DE CEPAS DO LENGEBIO (<i>Lactobacillus acidophilus</i> (BLA); <i>Lactobacillus casei</i> (BLL); <i>Bifidobacterium animalis</i> (BBA)).....	96
TABELA 30- RELAÇÃO E CODIFICAÇÃO DAS CEPAS MICROBIANAS ISOLADAS E SELECIONADAS PARA O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB (RESÍDUO; LODO ENRIQUECIDO (ISOLADO); BACTÉRIAS LÁCTICAS E LODO ENRIQUECIDO).....	97
TABELA 31- GRUPOS DE ENZIMAS COMERCIAIS (α -AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE, PROTEASE, LIPASE E CELULASE) TESTADOS COM POTENCIAL PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS ALIMENTARES (A)	98
TABELA 32- PARÂMETROS DE GRUPOS DE ENZIMAS COMERCIAIS (α -AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE, PROTEASE, LIPASE E CELULASE) TESTADAS COM POTENCIAL PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS ALIMENTARES (B).....	98

TABELA 33- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>PLACKETT-BURMAN</i> (PB) <i>SCREENING DESIGN</i> DO TIPO 15/16 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CEPAS MICROBIANAS: (10^8 UFC·mL ⁻¹) DO BANCO DE CEPAS DO LENCEBIO NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. 16 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 17 A 20) DO EXPERIMENTO CONTROLE (C).....	101
TABELA 34- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>PLACKETT-BURMAN</i> (PB) <i>SCREENING DESIGN</i> DO TIPO 7/8 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CEPAS MICROBIANAS: (10^8 UFC·mL ⁻¹) DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 13 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 8 A 11), NA ETAPA 2.....	103
TABELA 35- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>PLACKETT-BURMAN</i> (PB) <i>SCREENING DESIGN</i> DO TIPO 7/8 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ENZIMAS: (100 U·g ⁻¹) COMERCIAIS NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 13 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 8 A 11), NA ETAPA 3	104
TABELA 36- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>PLACKETT-BURMAN</i> (PB) <i>SCREENING DESIGN</i> DO TIPO 11/12 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS: (100 U·g ⁻¹ ; 10^8 UFC·mL ⁻¹) NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 17 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 12 A 15), NA ETAPA 4	104
TABELA 37- VALORES DE PERDA DE MASSA, MÉDIA DE METANO, MÉDIA DE VOLUME DE BIOGÁS E BIOMETANO, VOLUME ACUMULATIVO PARA BIOGÁS E BIOMETANO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB 15/16 (ETAPA 1).....	106
TABELA 38- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: PERDA DE MASSA NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA EM PORCENTAGEM NA ETAPA 1	107
TABELA 39- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS	

NÍVEIS: MÉDIA DE BIOMETANO (em %) PRODUZIDO NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1	108
TABELA 40- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE BIOGÁS PRODUZIDO EM mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1	108
TABELA 41- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS EM mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1.....	109
TABELA 42- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: SOMA DE BIOGÁS PRODUZIDO EM 14,5 gSV·L ⁻¹ NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1.....	110
TABELA 43- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE METANO mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1	110
TABELA 44- RESUMO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MICRORGANISMOS QUE INFLUENCIARAM POSITIVAMENTE NAS VARIÁVEIS BIOGÁS E BIOMETANO (EFEITO; ERRO PADRÃO E p-VALOR)	111
TABELA 45- RESPOSTAS EXPERIMENTAIS VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS (mL) VOLUME ACUMULATIVO DE METANO (mL) E PERDA DE MASSA (%) PARA O DELINEAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN 7/8 PARA OS MICRORGANISMOS (ETAPA 2).....	114
TABELA 46- ANÁLISE ESTATÍSTICA DO VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS (mL) VOLUME ACUMULATIVO DE METANO (mL) E PERDA DE MASSA (%) PARA O DELINEAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN 7/8 DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2	114
TABELA 47- VALORES DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO RESÍDUO ALIMENTAR E LODO (ST; SV E SF)	131
TABELA 48- CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS (UFC·mL ⁻¹) DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM PDA E BHI	132

TABELA 49- VALORES CODIFICADOS E DECODIFICADOS DE VARIÁVEIS DE PROCESSAMENTO (NÍVEIS -2,38; -1; 0; +1; E +2,38).....	136
TABELA 50-MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) 2^5 + CONFIGURAÇÃO COM AS RESPOSTAS BIOGÁS (BG) E BIOMENTANO (BM) ACUMULATIVO DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO	138
TABELA 51- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO BG E BM EM 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)	141
TABELA 52- MODELAGEM DA BIODIGESTÃO COM BG E BM: COMPARAÇÃO ENTRE VALORES PREDITOS, EXPERIMENTAIS E VALORES DO ENSAIO CONTROLE DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO A 35 °C	145

LISTA DE SIGLAS

AVG	- Ácidos Graxos Voláteis
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i>
COA	- Carga Orgânica Adicionada Total
DA	- Digestão Anaeróbica
DBO	- Demanda Biológica De Oxigênio
DQO	- Demanda Química De Oxigênio
ETE	- Estação De Tratamento De Esgoto
GEE	- Gases Do Efeito Estufa
MRS	- De Man, Rogosa E Sharpe
PCA	- Ágar Padrão De Contagem
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PNRS	- Política Nacional De Resíduos Sólidos
RA	- Resíduo Alimentar
RC	- Resíduo Recicláveis
RCD	- Resíduo de Construção e Demolição
RS	- Resíduo Sólido
RSS	- Resíduo e Serviço de Saúde
RSU	- Resíduos Sólidos Urbanos
RU	- Restaurante Universitário
SF	- Sólidos Fixos
SST	- Sólidos Solúveis Totais
ST	- Sólidos Totais
SV	- Sólidos Voláteis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
OBJETIVOS	27
• OBJETIVO GERAL	27
• OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ESCOPO DA TESE	28
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	29
1.1 RESÍDUO SÓLIDO E RESÍDUO SÓLIDO URBANO (RSU)	29
1.2 COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS ORGÂNICOS	31
1.3 GERAÇÃO DE RESÍDUO SÓLIDO URBANO NO BRASIL	32
1.4 LEI DE POLÍTICA NACIONAL DE RESÍDUO SÓLIDO E BIODIGESTÃO DE RSU	32
1.5 DIGESTÃO ANAERÓBICA	34
1.5.1 Processo de digestão anaeróbica	34
1.5.1.1 Etapa hidrolítica (Hidrólise)	37
1.5.1.2 Etapa acidogênica (Acidogênese)	38
1.5.1.3 Etapa acetogênica (Acetogênese)	38
1.5.1.4 Etapa metanogênica (Metanogênese)	39
1.6 CLASSIFICAÇÃO DOS BIODIGESTORES ANAERÓBIOS	40
1.7 MICRORGANISMOS NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA	42
1.8 BIOGÁS	46
1.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA BIODIGESTÃO	47
1.10 ENXOFRE NA BIODIGESTÃO	48
1.11 DESENVOLVIMENTO DA TESE	49
CAPÍTULO 2 - BIODIGESTÃO ANAERÓBICA DE RESÍDUO ALIMENTAR VISANDO PRODUÇÃO DE BIOMETANO EM FRASCOS DE VIDRO¹	50
2.1 INTRODUÇÃO	51
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
2.2.1 Construção de biodigestores de bancada de fase única	52
2.2.2 Material orgânico	53
2.2.3 Ensaio de biodigestão (tamanho da partícula e adição de reciclável)	53
2.2.4 Análise estatística	56
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

2.4 CONCLUSÕES	61
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE TAMPÕES QUÍMICOS PARA CONTROLE DA ACIDIFICAÇÃO NA BIODIGESTÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA EM FRASCOS DE 100 mL.....	64
3.1 INTRODUÇÃO	65
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
3.2.1 Materiais.....	66
3.2.1.1 Produtos químicos.....	66
3.2.1.2 Matéria prima	66
3.2.2 Planejamento experimental e preparo da biodigestão	67
3.2.3 Análise estatística	68
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.4 CONCLUSÃO.....	70
CAPÍTULO 4 - USO DE CODIGESTOR COMO ESTABILIZANTE PARA A BIODIGESTÃO	71
4.1 INTRODUÇÃO	72
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1 Materiais.....	73
4.2.1.1 Matéria-prima (resíduo orgânico)	73
4.2.1.2 Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE).....	73
4.2.1.3 Análise de sólidos no resíduo orgânico e lodo de ETE	73
4.2.1.4 Contagem de microrganismos do resíduo com matéria orgânica e no lodo de ETE.....	75
4.2.2 Ensaio de biodigestão com resíduo orgânico + lodo de ETE	75
4.2.2.1 Ensaio com reagente neutralizante + lodo de ETE	77
4.2.2.2 Ensaio da atmosfera inicial no <i>headspace</i> na biodigestão	77
4.2.2.3 Ensaio de granulometria do resíduo orgânico + lodo de ETE	79
4.2.2.4 Ensaio da quantidade de sólidos voláteis na biodigestão	80
4.2.3 Análise do biogás	80
4.2.4 Análise estatística descritiva	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.4 CONCLUSÕES	86

CAPÍTULO 5- PRÉ-SELEÇÃO DE GRUPOS MICROBIANOS E ENZIMAS ISOLADAS USANDO A FERRAMENTA ESTATÍSTICA PLACKETT-BURMAN PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE BIOGÁS E BIOMETANO²	88
5.1 INTRODUÇÃO	89
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	90
5.2.1 Materiais.....	90
5.2.2 Microrganismos e enzimas para a aceleração do processo de biodigestão.....	91
5.2.2.1 Ativações de cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico)	91
5.2.2.2 Ativações de cepas microbianas de isolados (lodo de ETE)	95
5.2.2.3 Ativações de cepas microbianas de isolados (bactérias lácticas)	96
5.2.2.4 Coloração de Gram de cepas microbianas de isolados	96
5.2.2.5 Microrganismos isolados para o delineamento experimental do tipo <i>Plackett-Burman</i> (PB).....	97
5.2.2.6 Atividade enzimática e enzimas selecionadas para a hidrólise da biodigestão.....	97
5.2.2.7 Cálculos das massas e enzimas adicionadas aos tanques de hidrólise.....	100
5.2.3 Delineamento experimental do tipo <i>Plackett-Burman</i> (PB).....	100
5.2.3.1 Ensaio das cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 1)	100
5.2.3.2 Ensaio das cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 2)	102
5.2.3.3 Ensaio de enzimas e cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 3 e 4)	103
5.2.4 Análise do biogás	105
5.2.5 Análise estatística descritiva	105
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
5.3.1 Efeitos dos microrganismos isolados (ETAPA 1)	106
5.3.2 Efeitos dos microrganismos isolados (ETAPA 2)	114
5.3.3 Efeitos enzimáticos na composição do resíduo orgânico (ETAPA 3)	117
5.3.4 Efeitos do delineamento experimental do tipo <i>Plackett-Burman</i> (PB) que utilizou enzimas e microrganismos (ETAPA 4)	121
5.4 CONCLUSÕES	125

CAPÍTULO 6- OTIMIZAÇÃO DE UM BIOACELERADOR PARA A BIODIGESTÃO DE RESÍDUO ORGÂNICO USANDO FERRAMENTA DE DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	128
6.1 INTRODUÇÃO	129
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	130
6.2.1 Matéria-prima para a biodigestão	130
6.2.1.1 Substrato	130
6.2.1.2 Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE)	130
6.2.1.3 Microrganismos e enzimas	130
6.2.2 Análise de sólidos no resíduo orgânico e lodo de ETE	131
6.2.3 Contagem de microrganismos do resíduo alimentar e no lodo de ETE	131
6.2.4 Atividade enzimática e enzimas selecionadas para a hidrólise da biodigestão	133
6.2.5 Biodigestão	133
6.2.5.1 Parâmetros e etapas do processo	133
6.2.5.2 Análise de biogás	135
6.2.6 Planejamento experimental utilizando a ferramenta estatística DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)	135
6.2.6.1 Planejamento experimental	135
6.2.6.2 Análise de superfície de resposta	136
6.2.6.3 Otimização e validação	137
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
6.3.1 Planejamento experimental	137
6.3.2 Desejabilidade e validação experimental da otimização	144
6.4 CONCLUSÃO	145
ASPECTOS RELEVANTES DOS RESULTADOS	146
CONCLUSÕES GERAIS	147
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

INTRODUÇÃO

A geração e gestão de resíduos sólidos urbanos (RSU) são um desafio significativo para o meio ambiente global. O aumento excessivo na produção de RSU é uma preocupação em todas as áreas urbanas (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2018). Esse problema é particularmente crítico em países em desenvolvimento, onde a acumulação excessiva de RSU causa sérios problemas de poluição ambiental, representando um dos desafios mais difíceis de enfrentar (AL-KHATIB *et al.*, 2010; SIDDIQUA *et al.*, 2022).

A gestão integrada dos resíduos torna-se complexa devido ao volume gerado diariamente, resulta na sobrecarga de aterros sanitários, aterros controlados ou lixões em várias regiões. No Brasil, em 2022, foram produzidas 81 milhões de toneladas de RSU, com uma média aproximada de 381 kg de RSU/ano por pessoa. Deste total, 93% (76,1 milhões) foram coletados, sendo que os aterros sanitários receberam 61% dos RSU (46,4 milhões de toneladas). Os 39% restantes foram descartados inadequadamente em lixões ou aterros controlados por 3.001 municípios (ABRELPE, 2022).

Diversas alternativas estão sendo desenvolvidas para gerenciar o tratamento de resíduos sólidos orgânicos, e minimizar seu acúmulo em aterros. Nesse sentido, destaca-se o uso de biodigestores que têm ganhado cada vez mais espaço na gestão de resíduos orgânicos. Esse processo consiste na biodigestão anaeróbia, catalisada por microrganismos e enzimas, que transformam os resíduos sólidos em produtos como biogás (CH_4 , CO_2 , H_2O , H_2S , H_2) ou biometano (CH_4), com alto valor energético (SOUSA GUIMARÃES; SILVA MAIA, 2023). Além disso, é gerada uma fração líquida rica em nutrientes que pode ser utilizada como biofertilizante. Portanto, a biodigestão não só contribui para o saneamento básico, como também pode gerar benefícios econômicos para a população.

A eficiência da técnica de biodigestão pode ser aprimorada em relação à produção de biogás e biometano, uma vez que o Brasil possui potencial para produzir 4 milhões de Nm^3/ano de biogás, conforme indicam estudos realizados pela ABRELPE e ABiogás (2019). Isso é o suficiente para gerar 14,4 TWh/ano de energia elétrica. O volume de RSU gerado em 2017 destinado aos aterros sanitários sem aproveitamento do biogás foi equivalente a produção de 7.230 GWh de eletricidade. Essa quantidade de energia renovável atenderia 24 milhões de residências ou ainda

seria equivalente à substituição de mais de 2 milhões de litros de biodiesel de soja produzidos (PNRS, 2020). Neste contexto, o objetivo desta tese foi desenvolver um processo que acelere a biodigestão anaeróbica da fração orgânica proveniente de resíduos sólidos urbanos, especificamente os resíduos alimentares gerados por restaurantes. A proposta foi aumentar a produção de biogás, convertendo-o em biometano, em um período reduzido em comparação com o processo convencional de biodigestão.

OBJETIVOS

- Objetivo geral

Desenvolver uma solução tecnológica para acelerar o processo de biodigestão anaeróbica de resíduos alimentares da fração orgânica de RSU. A proposta é aumentar a produção de biogás e biometano, buscando a redução do tempo do processo de biodigestão.

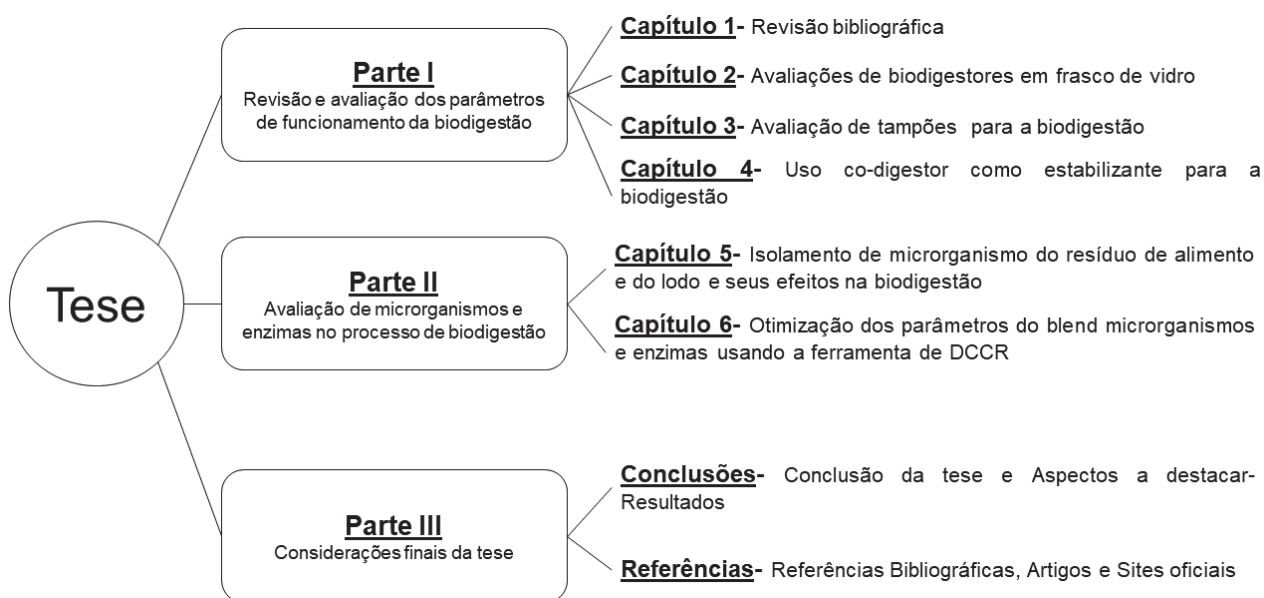
- Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar o resíduo alimentar da fração orgânica de RSU para a utilização em mini biodigestores (frasco de 100 mL);
- ❖ Desenvolver processos de biodigestão de resíduo alimentar utilizando mini biodigestores de fase única (frasco de 100 mL);
- ❖ Realizar pré-testes para avaliar a influência da granulometria do resíduo alimentar, presença de sólidos de origem não alimentar na produção de biogás, quantidade de sólidos voláteis e neutralizantes químicos na influência ao tempo e produção de biogás;
- ❖ Realizar testes com codigestor como meio estabilizado da biodigestão;
- ❖ Quantificar o biogás bruto e seus componentes, especialmente o biometano (CH₄);
- ❖ Isolar grupos microrganismos viáveis do resíduo alimentar e lodo de estação de tratamento de esgoto;
- ❖ Identificar variáveis independentes de grupos microbiológicos e enzimáticos, por meio da ferramenta estatística *Plackett-Burman* (PB) para a biodigestão;
- ❖ Utilizar a ferramenta estatística tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização dos parâmetros do blend de microrganismos e enzimas para a produção de biogás e biometano;

ESCOPO DA TESE

De modo a facilitar o entendimento da organização desta tese, o esquema apresentado na FIGURA 1 mostra suas divisões (Partes I, II e III) e suas subdivisões (Capítulos 1 a 6). Na Parte I, foi apresentada uma breve revisão da literatura sobre os temas chave desta tese: resíduos alimentares da fração orgânica de RSU, digestão anaeróbica, classificação dos biodigestores, microrganismos no processo de biodigestão, biogás e atividade enzimática na biodigestão. Além da construção do sistema funcional para a biodigestão em escala laboratorial. Na sequência, a Parte II apresenta o desenvolvimento do estudo com microrganismos e enzimas, e a Parte III apresenta as considerações finais e as referências da literatura.

FIGURA 1- ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DA TESE



FONTE: Autor, (2023).

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 RESÍDUO SÓLIDO E RESÍDUO SÓLIDO URBANO (RSU)

Os resíduos sólidos, de acordo com a norma NBR.10.004:2004 - ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), são os resíduos nos estados sólido e semissólido, que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Desta forma, os RSU conhecidos usualmente como lixo urbano, são definidos como a consequência das atividades domésticas e comerciais dos centros urbanos (SUBRAMANYAM e GORODETSKY, 2017). A Política Nacional dos Resíduos Sólidos, Lei nº 12.305 de 2010, define resíduos sólidos como sendo: “Material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido”.

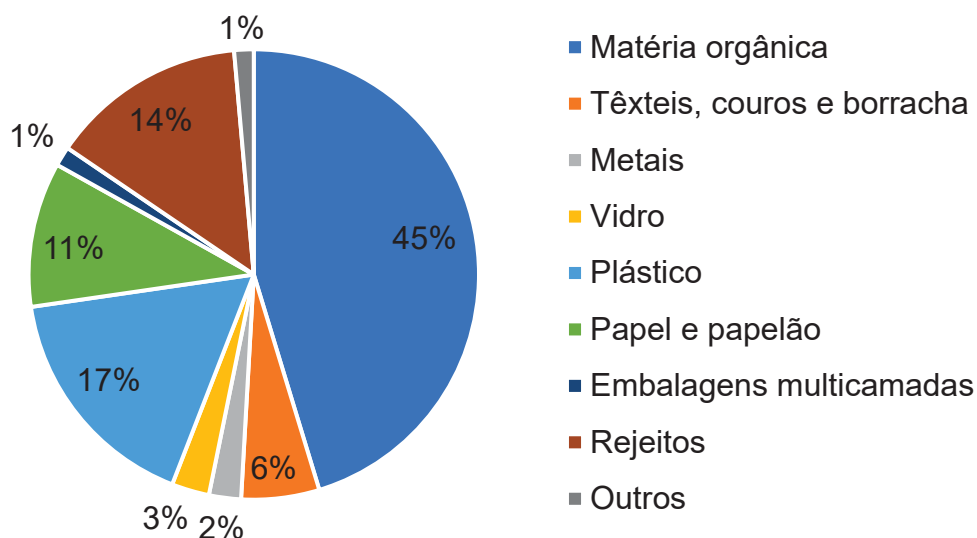
A classificação para os resíduos sólidos (RS) pode ser feita de diversas formas: quanto a natureza física (seco ou úmido), a composição química (resíduo orgânico ou inorgânico) e o riscos potenciais ao meio ambiente (perigosos, não perigosos, não-inertes e inertes) – de acordo com a (ABNT) NBR 10.004:2004.

Em relação aos RSU a forma mais usual de classificar é quanto a sua origem ou fonte de geração como por exemplo, domiciliar, comercial, público, serviços de saúde e hospitalar, portos, aeroportos, terminais rodoviários e ferroviários, industrial, agrícola e resíduos da construção civil (MINISTÉRIO PÚBLICO DO PARANÁ, 2013).

Dessa forma os RSU são classificados em diferentes categorias, tais como "Matéria Orgânica", que engloba sobras e perdas de alimentos, resíduos verdes e madeiras, "Têxteis, Couros e Borrachas", que inclui retalhos em geral, peças de roupas, calçados, mochilas, tênis, pedaços de couro e borracha, e "Embalagens Multicamadas", que consistem em embalagens compostas por mais de um tipo de material. A categoria "Rejeitos" abrange resíduos sanitários, outros materiais não identificados e recicláveis contaminados que não permitiram a separação. Além disso, a categoria "Outros" contempla os resíduos identificados que não deveriam estar no fluxo de RSU, tais como Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), eletroeletrônicos, pilhas e baterias, resíduos perigosos, Resíduos de Construção e Demolição (RCD),

pneus, óleos e graxas, embalagens de agrotóxicos e outros resíduos perigosos (ABRALPE, 2020). No GRÁFICO 1 estão apresentados os percentuais de RSU.

GRÁFICO 1- COMPOSIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO (POR MATERIAL) DE RSU GERADOS NO BRASIL EM 2020



FONTE: ABRALPE (2020).

A composição dos RSU varia significativamente entre municípios e de país para país. Essa variação depende principalmente do estilo de vida, situação econômica, regulamentos de gerenciamento dos resíduos e estrutura industrial (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2018; SYADRUDIN *et al.*, 2023). A geração de RSU é um problema crescente em todo o mundo, especialmente em áreas urbanas densamente povoadas, e representa um desafio significativo para a sustentabilidade ambiental e econômica (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2018; ABUBAKAR *et al.*, 2022). Os RSU são considerados um dos problemas mais desafiadores enfrentados pela maioria dos países em desenvolvimento que sofrem de graves problemas de poluição ambiental causado por suas grandes quantidades (AL-KHATIB *et al.*, 2010; POPE, 2020). O aumento do poder aquisitivo da população em crescimento, sobretudo nos países emergentes, gera uma elevação do consumo de bens materiais e, com isso, um maior descarte de RSU na natureza (ABRELPE, 2020). Devido à disposição inadequada dos RSU, seja por meio de coleta informal, ou seja, pelo sistema público de coleta insuficiente, uma grande quantidade desses resíduos não recebe o tratamento adequado. Como resultado, há um agravamento significativo dos

impactos ambientais causados pela presença desses resíduos no meio ambiente, conforme observado pelo IPEA (2020).

1.2 COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS ORGÂNICOS

A fração orgânica dos RSU corresponde a, aproximadamente, 45 % da geração de resíduos totais (GRÁFICO 1). Com isso, essa faixa de valores pode variar de acordo com a época e região devido às diferentes atividades geradoras (ALVES, 2016; ULLOA-MURILLO, 2022). Os resíduos orgânicos podem ser divididos basicamente em cinco categorias: Lodos de esgoto; esterco animal; resíduos alimentares e industriais, incluindo resíduos de abatedouro; resíduos de colheita e culturas energéticas, incluindo algas e a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (ROMERO-GÜIZA *et al.*, 2015; ABU YAZID *et al.*, 2017; CECCHI *et al.*, 2021).

Os resíduos alimentares, são constituídos de uma mistura de compostos de natureza orgânica tais como polímeros de carboidratos (ex: amido, celulose e hemicelulose), proteínas, lipídeos, lignina, ácidos orgânicos e uma parcela inorgânica que pode variar de acordo com sua origem (ALVES, 2016; FIOROTO *et al.*, 2019; SLOPIECKA *et al.*, 2022). Na TABELA 1 estão apresentados os valores médios da composição diferentes fontes de resíduo orgânico relatadas na literatura.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS DIFERENTES TIPOS DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

Resíduo	Carboidratos (%) *	Proteínas (%) *	Lipídeos (%) *	Referências
Frutas e Vegetais	35,20**	12,90	15,20	QIAO <i>et al.</i> (2012)
Alimentares	20,20**	29,90	17,30	
Domiciliares	35,04	14,60	6,09	CABBAI <i>et al.</i> (2013)
Restaurante	47,50	20,50	18,70	
Frutas e Vegetais	34,00	13,90	5,90	
Alimentares	35,50-69,00	6,40-24,10	4,40-21,80	KIRAN <i>et al.</i> (2014)

* Unidade em % mássica (g/g) sólidos voláteis (SV); ** Inclui teor de fibras.

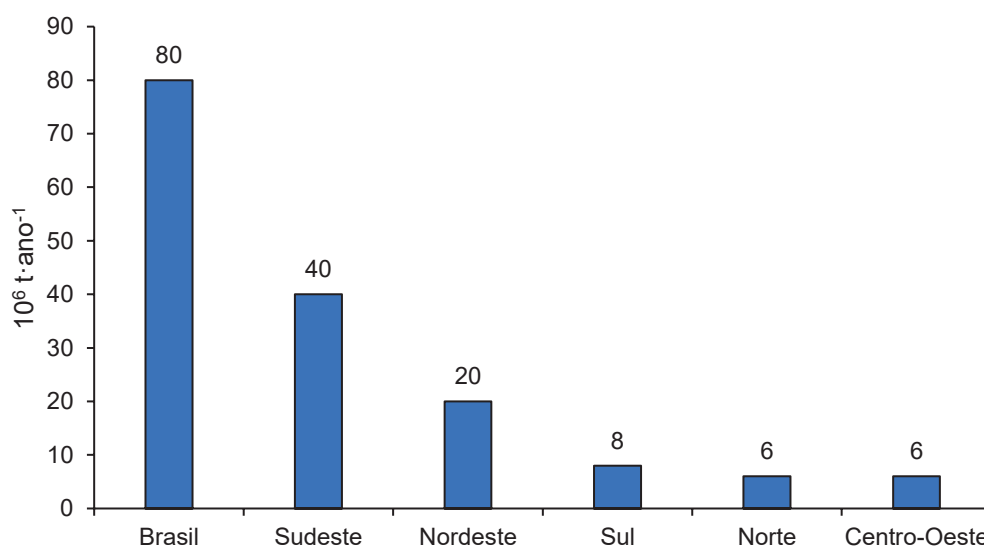
FONTE: Adaptado de (ALVES, 2016).

Os resíduos orgânicos, de acordo com outros autores, apresentam valor médio de composição que pode variar. Geralmente possuem uma composição média de 55 a 62 % de carboidratos, 19 a 24 % de lipídeos e 15 a 18 % de proteínas (LI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; BROWNE *et al.*, 2012; KUCZMAN *et al.*, 2018; SLOPIECKA *et al.*, 2022).

1.3 GERAÇÃO DE RESÍDUO SÓLIDO URBANO NO BRASIL

No ano de 2022 o Brasil gerou 81,8 milhões de toneladas de RSU com uma média de 381 Kg/ano de RSU por pessoa. Desse montante, 93 % (76,1 milhões) foram coletados. Os aterros sanitários receberam 61 % dos resíduos sólidos urbanos coletados (46,4 milhões de toneladas), enquanto o restante (39 %) foi despejado em locais inadequados (lixões ou aterros controlados) por 3.001 municípios (ABRELPE, 2022). No GRÁFICO 2 estão apresentados os valores em tonelada/dia de RSU gerados nas regiões brasileiras no ano de 2022.

GRÁFICO 2- GERAÇÃO TOTAL DE RSU NAS REGIÕES BRASILEIRAS NO ANO DE 2022 (t·ano⁻¹)



FONTE: Adaptado de ABRELPE (2022).

O Sudeste, diferentemente das demais regiões, produz resíduos em proporção maior que sua participação na população brasileira: concentra 42 % dos habitantes, mas gera 50 % dos RSU, com um índice per capita de 1,23 Kg/dia (ABRELPE, 2022).

1.4 LEI DE POLÍTICA NACIONAL DE RESÍDUO SÓLIDO E BIODIGESTÃO DE RSU

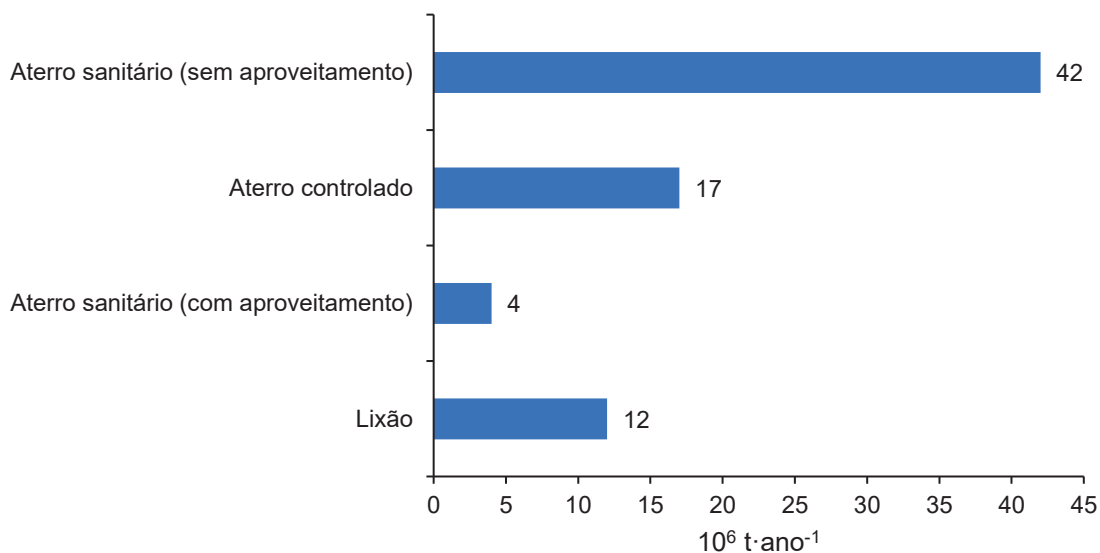
No Brasil, ainda se enterram, queimam ou lançam a céu aberto milhões de toneladas de resíduos urbanos, em decorrência do desconhecimento de seu potencial

de aproveitamento e dos impactos negativos que provocam quando dispostos inadequadamente (ZAGO; BARROS, 2019; VIERA *et al.*, 2022).

Dessa forma, a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) Lei 12.305/2010- prevê que o gerenciamento de resíduos sólidos deve obedecer a seguinte ordem de prioridade: “Não geração, redução, reutilização, reciclagem e tratamento dos resíduos sólidos, bem como a disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos” (BRASIL, 2010a).

Dentre as várias formas de destinar os RSU encontram-se os aterros sanitários, que, conforme a NBR 8419/1992 da ABNT, é uma técnica de disposição de RSU no solo, sem causar danos à saúde pública e ao meio ambiente, o que minimiza os impactos ambientais. Entretanto técnicas como a biodigestão vêm sendo aplicada em RSU como forma de gerar novos produtos (gás combustível). É importante ressaltar que o mercado de limpeza urbana movimentou recursos correspondentes a R\$ 29,9 bilhões no Brasil em 2021, aumento de 3 % na comparação com o ano anterior (ABRELPE, 2022). No GRÁFICO 3 estão apresentadas as quantidades em tonelada/ano de RSU depositadas em lixões, aterro sanitário e aterro controlado em 2022.

GRÁFICO 3- DISPOSIÇÃO FINAL DE RSU COLETADOS NO BRASIL (10^6 t·ano⁻¹)



FONTE: Adaptado de ABRELPE (2022).

A PNRS de Lei n° 12.305 de 2010 junto com o decreto 7.404 de 2010, estimulam a implantação de biodigestores no Brasil e fortalece os motivos de

incentivos para a implementação de projetos de biodigestão de resíduos sólidos orgânicos urbanos (BRASIL, 2010b).

A biodigestão ou digestão anaeróbica (DA) ganhou atenção significativa nos últimos anos. Além de produzir energia renovável e produtos químicos de base biológica a partir de diversas matérias-primas orgânicas, o processo DA também corrige os fluxos de resíduos orgânicos, além de reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (NGUYEN, 2019; KHANAL *et al.*, 2021).

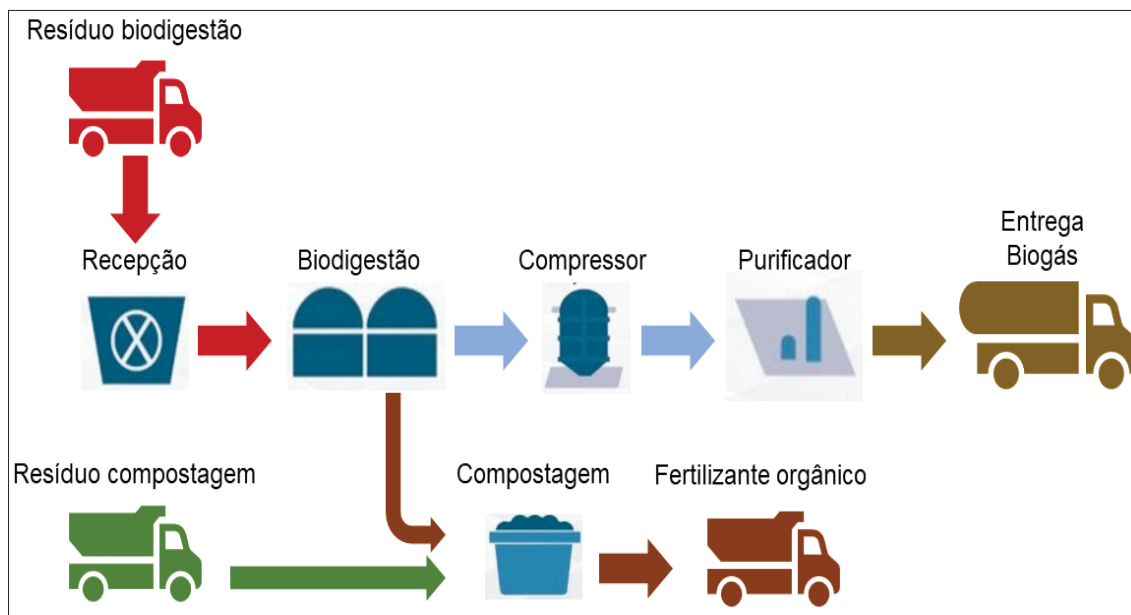
1.5 DIGESTÃO ANAERÓBICA

A DA é o processo que ocorre dentro dos biodigestores para a geração de biogás. O resíduo é microbiologicamente catalisado, no qual a matéria orgânica é, por meio de uma série de conversões sequenciais microbianas, transformada em biogás (ANGELIDAKI, 2019; HOLOHAN *et al.*, 2022; SATAV *et al.*, 2022). A decomposição bacteriana de materiais orgânicos na ausência de oxigênio é conhecida como DA. Durante esse processo biológico, é produzido um gás comumente denominado de biogás, composto principalmente por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), além de pequenas quantidades de outras substâncias como H_2S , O_2 e N_2 (ROGOFF; SCREVE 2019; SHARMA *et al.*, 2022).

1.5.1 Processo de digestão anaeróbica

O processo de DA envolve quatro principais etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Durante a hidrólise, microrganismos produzem enzimas hidrolíticas que degradam macromoléculas em açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e glicerol. Em seguida, essas moléculas são convertidas em ácidos orgânicos voláteis, álcoois e alguns gases, como CO_2 , H_2 e NH_3 (ZHANG *et al.*, 2022; KUNZ *et al.*, 2022). Esses produtos são transformados em ácido acético, CO_2 e H_2 , que por fim são convertidos em metano (CH_4) por bactérias metanogênicas. O biogás resultante contém tipicamente de 55 % a 75 % de metano (CH_4), dependendo da matéria-prima utilizada e do projeto do sistema (ROGOFF, 2014; WAINAINA *et al.*, 2019; HARIRCHI *et al.*, 2022). As FIGURAS 2, 3 e a TABELA 2 a seguir, ilustra o processo básico de digestão anaeróbica.

FIGURA 2- PROCESSO BÁSICO DE DIGESTÃO ANAERÓBICA: DA RECEPÇÃO A ENTREGA



Vermelho: Resíduo (RSU); Verde: Resíduo (Compostagem); Marrom: Fração líquida/sólida (Fertilizante); Amarelo: Biogás e Azul: Processo de Biodigestão e Compostagem

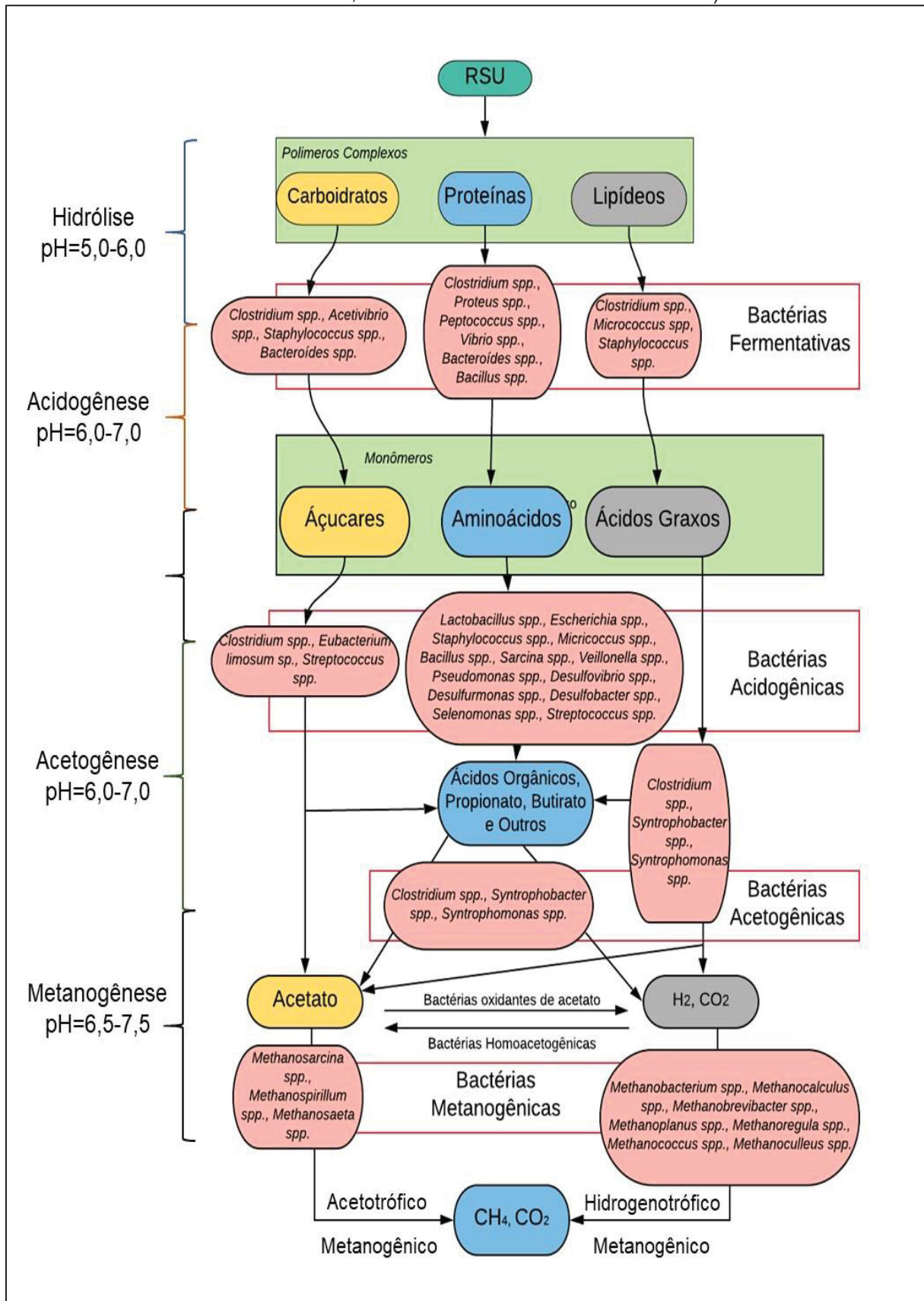
FONTE: Adaptado de SMAI, (2020).

TABELA 2- ETAPAS DA DIGESTÃO ANAERÓBICA NO BIODIGESTOR E SUAS DESCRIÇÕES (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE)

Etapas	Descrição
Hidrólise	Os polímeros complexos (macromoléculas biológicas) são convertidos em compostos de menor complexidade, por meio da ação de enzimas, fazendo com que a disponibilidade de resíduo ao metabolismo dos demais microrganismos, aumente.
Acidogênese	As bactérias fermentativas degradam os compostos gerados na fase de hidrólise, produzindo compostos simples (ácidos graxos, álcoois, ácido lático e compostos inorgânicos).
Acetogênese	Ocorre a oxidação dos compostos gerados na acidogênese, sendo excretado acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, substratos esses fundamentais para o desenvolvimento das bactérias metanogênicas.
Metanogênese	Os compostos orgânicos são convertidos em biogás, por meio de microrganismos denominados arqueas metanogênicas, que são divididos em duas vias metabólicas, as acetoclásticas que produzem CH ₄ e CO ₂ a partir do acetato, e as hidrogenotróficas, que geram gás metano através da metabolização de dióxido de carbono e hidrogênio.

FONTE: Adaptado de Van *et al.* (2019).

FIGURA 3- ETAPAS DE DIGESTÃO ANAERÓBICA NO BIODIGESTOR (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE)



FONTE: Adaptado de Pramanik, Suja, Zain e Pramanik, (2019).

Na TABELA 3 estão apresentadas as reações bioquímicas de cada sub-etapa da biodigestão, bem como os produtos formados no biodigestor.

TABELA 3- ETAPAS DA BIODIGESTÃO E AS REAÇÕES BIOQUÍMICAS DE CADA ETAPA DO PROCESSO (HIDRÓLISE, ACIDOGÊNESE, ACETOGÊNESE E METANOGÊNESE)

Etapa	Reação
Hidrólise	<ul style="list-style-type: none"> • (Sacarose) $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow$ (Glicose) $C_6H_{12}O_6$ + (Frutose) $C_6H_{12}O_6$ • (Trioleína - Gordura) $C_{57}H_{104}O_6 + 3H_2O \rightarrow$ (Glicerina) $C_3H_8O_3$ + (Ácido Oleico) $3C_{18}H_{34}O_2$ • (Di-peptídeo - Proteína) $C_4H_6O_3N_2-R_1-R_2 + H_2O \rightarrow$ (Aminoácido 1) $C_2H_4O_2N-R_1$ + (Aminoácido 2) $C_2H_4O_2N-R_2$
Acidogênese	<ul style="list-style-type: none"> • (Glicose) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow$ (Acetato) $2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$ • (Glicose) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow$ (Propionato) $2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$ • (Glicose) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow$ (Butirato) $CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$
Acetogênese	<ul style="list-style-type: none"> • (Propionato) $CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow$ (Acetato) $CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ • (Propionato) $CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow$ (Acetato) $CH_3COO^- + H^+ + 3HCOO^-$ • (Butirato) $CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow$ (Acetato) $2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Metanogênese	<ul style="list-style-type: none"> • (Acetato) $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow$ (Metano) $CH_4 + HCO_3^-$ • (Formiato) $HCOO^- + \frac{1}{4} H_2O + \frac{1}{4} H^+ \rightarrow \frac{1}{4}$ (Metano) $CH_4 + \frac{3}{4} HCO_3^-$ • (Propionato) $CH_3CH_2COO^- + 1,75H_2O \rightarrow \frac{3}{4}$ (Metano) $CH_4 + \frac{5}{4} HCO_3^- + \frac{1}{4} H^+$

FONTE: O autor (2023).

1.5.1.1 Etapa hidrolítica (Hidrólise)

Na DA, a hidrólise (conforme evidenciado nas TABELAS 2 e 3 e na FIGURA 3) é a primeira etapa. Essa etapa envolve a decomposição de compostos complexos em compostos mais simples por meio da incorporação química de água (TISSERAND e YOUNG, 2014; KUNZ *et al.*, 2022). A hidrólise enzimática é um processo no qual as enzimas aumentam a clivagem das ligações nas moléculas com a adição dos elementos da água (SZEKELY; DIDASKALOU, 2016; NIJU *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2022).

Na etapa de hidrólise da DA no biodigestor, compostos orgânicos polimerizados, especialmente aqueles insolúveis, como carboidratos, proteínas e gorduras, são decompostos em monômeros e dímeros solúveis, ou seja, em monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos (ALI SHAH *et al.*, 2014; KUNZ *et al.*, 2022). Nessa etapa, ocorre a atuação de enzimas extracelulares pertencentes ao grupo das hidrolases (como amilases, proteases e lipases), produzidas por cepas microbianas adequadas com potencial hidrolítico.

As bactérias hidrolíticas na DA podem ser divididas em três categorias: produtoras de lipases (*Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*), de proteases (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*) e de amilases (*Clostridium*,

Staphylococcus, Eubacterium e Acetivibrio) (PRAMANIK; SUJA; ZAIN; PRAMANIK, 2019).

1.5.1.2 Etapa acidogênica (Acidogênese)

A acidogênese é um processo biológico no qual ocorre a decomposição adicional dos componentes restantes por bactérias acidogênicas (fermentativas) (POZNYAK, ORIA, e POZNYAK, 2019). Nessa fase, são produzidos ácidos graxos predominantemente voláteis (acetato, propionato, butirato), álcool e outros (MAURYA *et al.*, 2019). Segundo Fardin, De Barros e Augusto (2018), as bactérias acidogênicas convertem os produtos da hidrólise em substratos metanogênicos. Como os açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos que são degradados em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio e em ácidos graxos voláteis e álcoois.

As bactérias que estão presentes na digestão anaeróbica dependem do tipo do resíduo que está sendo tratado. Desta forma, na fase acidogênica as bactérias presentes na digestão anaeróbica de resíduo alimentar são: *Clostridium, Eubacterium limosum, Streptococcus* (presentes em monômeros de açúcares), *Lactobacillus, Escherichia, Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Sarcina, Veillonella, Pseudomonas, Desulfovibrio, Desulfurmonas, Desulfobacter, Selenomonas, Streptococcus* (presentes em monômeros de aminoácidos) (PRAMANIK, SUJA, ZAIN e PRAMANIK, 2019).

1.5.1.3 Etapa acetogênica (Acetogênese)

A acetogênese refere-se à síntese de acetato, que inclui a formação de acetato pela redução de CO₂ e a formação de acetato a partir de ácidos orgânicos (ANGELIDAKI *et al.*, 2011). Nessa etapa, as bactérias acetogênicas transformam os produtos das bactérias acidogênicas em substrato para as bactérias metanogênicas, como o acetato, o hidrogênio (H₂) e o dióxido de carbono (CO₂).

Segundo Du Shin *et al.* (2017), os produtos como os álcoois formados nas etapas anteriores (etapa de fermentação) são anaerobicamente oxidados em substratos metanogênicos, tais como acetato, H₂ e CO₂. Além de ácidos graxos voláteis, com cadeias de carbono mais longas do que uma unidade, são oxidados em etilo e H₂. Na TABELA 4 estão apresentadas as conversões de propionato e butirato,

intermediários importantes em fermentações anaeróbicas de matéria orgânica complexa, e nos substratos metanogênicos, acetato e hidrogênio. De acordo com Angelidaki *et al.* (2011), as bactérias só podem derivar energia para o crescimento a partir dessas conversões se a concentração dos produtos for mantida baixa. Isso resulta em uma dependência obrigatória de bactérias acetogênicas em arqueas metanogênicas ou outros eliminadores de hidrogênio (por exemplo, redutores de sulfato).

TABELA 4- REAÇÕES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO SINTRÓFICA DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIODIGESTÃO

Reação
<i>Oxidação de ácidos graxos</i>
<ul style="list-style-type: none"> • (Acetato) $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ • (Propionato) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{(Acetato)} \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$ • (Butirato) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{(Acetato)} 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
<i>Utilização de hidrogênio por metanógenos e acetogênios</i>
<ul style="list-style-type: none"> • $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{(Metano)} \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ • $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{(Acetato)} \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$
<i>Oxidação sintrófica de acetato acoplada à metanogênese hidrogenotrófica</i>
<ul style="list-style-type: none"> • (Acetato) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{(Metano)} \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$

FONTE: Angelidaki *et al.* (2011)

1.5.1.4 Etapa metanogênica (Metanogênese)

A metanogênese é o estágio final da digestão anaeróbica, através da qual os produtos dos estágios anteriores são convertidos em CO_2 e CH_4 (DU SHIN *et al.*, 2017). A metanogênese é considerada um tipo especial de fermentação, sendo o processo de geração de metano (CH_4) por metanógenos, que são microrganismos ou arqueas estritamente anaeróbicas (FLORES, 2014; VÍŤEZOVÁ *et al.*, 2020).

Na etapa metanogênica da digestão anaeróbica, ocorre a conversão dos ácidos orgânicos provenientes da fase acidogênica em CH_4 , CO_2 e água. Essas composições compõem a maioria do biogás com cerca de 55 % a 70 % de metano formado a partir de ácidos acéticos usando descarboxilação por acetato e os restantes 30 % a 40 % de metano formado a partir da redução de dióxido de carbono liberada pelo digestor (MUTHUDINESHKUMAR e ANAND, 2019). Esta etapa é sensível ao pH e estritamente restrita a ocorrer na faixa de pH 6,5-8,0.

Os microrganismos metanogênicos pertencem ao domínio Archaea, filo *Euryarchaeota*. Consistem em seis ordens filogenéticas: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* e *Methanocellales* (ANGELIDAKI *et al.*, 2011; VÍTĚZOVÁ *et al.*, 2020). As Archaea metanogênicas são responsáveis pela etapa final no processo de DA para a formação de metano a partir de acetato e/ou de dióxido de carbono e hidrogênio, formiato e álcoois. As principais características fisiológicas (fontes de carbono utilizadas, faixa de crescimento de temperatura e pH) dos metanógenos estão resumidas na TABELA 5.

TABELA 5- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS ORDENS METANOGÊNICAS (FONTE DE CARBONO; TEMPERATURA E pH)

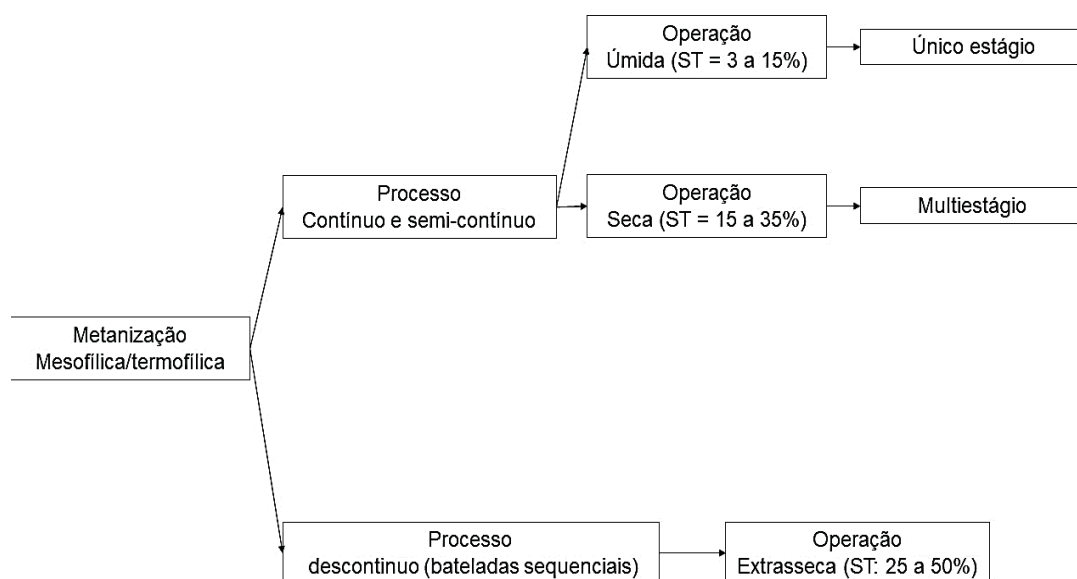
Ordem metanogênica	Fontes de carbono	° C	pH
<i>Methanosarcinales</i>	Acetato, H ₂ +CO ₂ , CO, metanol, metilaminas, metilmercapto, propionato, dimetilsulfeto	1,0-70	4,0-10,0
<i>Methanomicrobiales</i>	H ₂ +CO ₂ , formato, etanol, ^a 2-propanol, ^b 2-butanol, ^b ciclopentanol	15-60	6,1-8,0
<i>Methanobacteriales</i>	H ₂ +CO ₂ , CO, formato, C ₁ -compostos metilada ^c	20-88	5,0-8,8
<i>Methanococcus</i>	H ₂ +CO ₂ , formiato	<20-88	4,5-9,8
<i>Methanopyrales</i>	H ₂ +CO ₂	84-110	5,5-7,0
<i>Methanocellales</i>	H ₂ +CO ₂ , formiato	25-40	6,5-7,8

^a Apenas para *Methanogenium sp.*; ^b Apenas para *Methanoculleus sp.*; ^c Apenas para *Methanosphaera sp.*
 FONTE: Adaptado de Angelidaki *et al.* (2011)

1.6 CLASSIFICAÇÃO DOS BIODIGESTORES ANAERÓBIOS

Os biodigestores anaeróbios podem ser classificados de acordo com a concentração de sólidos totais com que operam (reatores de via úmida, seca e extrasseca). Classificados em estágio único (todas as etapas de digestão em um reator) e em múltiplos estágios (etapas de digestão em vários reatores) (VAN *et al.*, 2019). O fluxograma do processo de fermentação apresenta a classificação dos biodigestores (FIGURA 4).

FIGURA 4- FLUXOGRAMA DO ESQUEMA DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO DE ACORDO COM A OPERAÇÃO (ÚMIDA, SECA E EXTRASSECA)



ST: Sólidos totais no biodigestor.

FONTE: Adaptado de Fricke e Pereira (2013); Kunz *et al.*, 2022.

Conforme as faixas de temperaturas dos processos de biodigestão, há dois grupos distintos, que se caracterizam pelos grupos microbianos que se desenvolvem nessas duas diferentes faixas: processo mesofílico ou termofílico. No processo mesofílico os reatores operam a temperaturas que variam entre 30 °C e 40 °C, enquanto para o processo termofílico a temperatura ideal varia entre 45 °C e 60 °C. Na TABELA 6 estão apresentadas as vantagens e desvantagens dos diferentes processos que empregam temperaturas diferentes.

TABELA 6- VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS PROCESSOS MESOFÍLICO E TERMOFÍLICO NA BIODIGESTÃO

Processo	Vantagens	Desvantagens
Mesofílico	Biomassa constituída por microrganismos tolerantes à grandes variações das condições do meio (maior estabilidade); Maior proporção de microrganismos; Sistemas baratos, fáceis de construir e operar relativamente aos termofílicos.	Maior tempo de detenção hidráulica e menor taxa de produção de biogás em relação aos sistemas termofílicos; Baixa capacidade de biodegradação; carga microbiana viável reduzida (pobre); Desequilíbrio nos nutrientes.
Termofílico	Maior velocidade das reações bioquímicas e das taxas de crescimento; Maior potencial metanogênico associado a baixo tempo de detenção hidráulica; Maior capacidade de destruição de agentes patogénicos virais e bacterianos e de desidratação da lama biológica.	Maior demanda de energia, baixa estabilidade e altas taxas de toxicidade; Microrganismos mais sensíveis às variações das condições do meio; Maior propensão à acidificação e, por conseguinte à inibição de atividade microbiana.

FONTE: Adaptada de Sasaki *et al.* (2011); Mao *et al.* (2015); Kunz *et al.* (2022).

Além disso, o sistema de operação dos reatores pode ser contínuo, semicontínuo ou descontínuo (FIGURA 4). Em sistemas contínuos e semicontínuos o substrato é inserido de forma intermitente ou semi-intermitente, o processo descontínuo é quando o reator opera com uma quantidade pré-estabelecida de substrato, em sistema de batelada.

A concentração dos sólidos totais (ST) determina a via que o reator é operado, (úmida, seca ou extrasseca). Os reatores que operam em via úmida o teor de ST é de no máximo 15 %. Para a via seca os teores de ST estão entre 15 % e 35 %, e para a via extrasseca operam com teores entre 25 % e 50 % de ST. A TABELA 7 apresenta a diferença entre o processo de DA por via seca e úmida.

TABELA 7-COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS REATORES DE VIA EXTRASSECA E ÚMIDA

Via Extra Seca	Via Úmida
<p>Teor de sólido totais: Superior a 25 %</p> <p>Instalações de menor porte;</p> <p>Necessita: Homogeneização antes da introdução no biodigestor;</p> <p>Equipamento mais potente e robusto (densidade);</p> <p>Demanda de energia elétrica: 20 % a 30 %.</p>	<p>Teor de sólidos totais: máximo 15 %;</p> <p>Agitador mecânico interno;</p> <p>Formação de flotante (espuma), Sedimentação de matéria inorgânica;</p> <p>Demanda de energia elétrica: 50 %.</p>

FONTE: Adaptado de Zhao *et al.* (2021) e Ellacuriaga *et al.* (2021).

As etapas de digestão podem ser divididas em único estágio ou multiestágio. Os reatores de único estágio são aqueles em que todas as fases ocorrem em um único reator. Por outro lado, os reatores do tipo multiestágio separam as fases em diferentes reatores. Geralmente, são utilizados dois reatores, um para as etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese, e outro para a fase metanogênica.

1.7 MICRORGANISMOS NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

No processo de biodigestão, diferentes microrganismos atuam em simbiose na degradação do substrato, que ocorre em várias etapas por meio de reações paralelas (PRAMANIK *et al.*, 2019; HARIRCHI *et al.*, 2022). Fungos e bactérias são os microrganismos capazes de crescer nesse meio, transformam a fração orgânica do resíduo em nutrientes e biogás (CH₄ e CO₂).

A degradação da matéria orgânica pelas bactérias ocorre principalmente por meio da produção de enzimas, que são moléculas responsáveis por catalisar reações bioquímicas. A ação enzimática pode ocorrer por meio de dois mecanismos: endoenzimas e exoenzimas. As endoenzimas são produzidas pelas células e têm a capacidade de atuar dentro do meio celular, enquanto as exoenzimas são produzidas pelas células e liberadas para o ambiente extracelular, onde exercem sua função. (KHALID *et al.*, 2023). Enzimas extracelulares são responsáveis pela degradação de substratos insolúveis à parede celular. Uma vez solubilizados, os subprodutos dessas substâncias são capazes de entrar na célula e sofrer a ação das endoenzimas (CRISTY *et al.*, 2014; MATHEW *et al.*, 2022).

As enzimas possuem grande especificidade do substrato em que são capazes de atuar, de modo que uma comunidade diversificada de microrganismos é necessária para garantir que toda a matéria orgânica seja degradada (CRISTY *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017).

Gerardi (2003) aponta que a concentração de microrganismos em um digestor anaeróbio é usualmente superior a 10^{16} células/mL, sendo que os sacarolíticos presentes correspondem a cerca de 10^5 células/mL e os metanogênicos a 10^8 células/mL. Na TABELA 8 estão apresentados os principais microrganismos envolvidos nas diferentes fases da biodigestão anaeróbica.

TABELA 8 - PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ATUANTES EM CADA ETAPA DA BIODIGESTÃO
(Continua)

Etapa	Não patogênicos	Patogênicos	Referências
Hidrólise	<i>Bacillus subtilis</i> (1), (2) <i>Bacillus licheniformis</i> (1), (3) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1) <i>Lactobacillus paracasei</i> (4) <i>Streptomyces griseus</i> (1), (5) <i>Aspergillus oryzae</i> (1), (6)	<i>Bacillus cereus</i> (7) <i>Micrococcus</i> (8) <i>Staphylococcus</i> (8) <i>Bacteroides</i> (8) <i>Streptococcus</i> (8) <i>Eubacterium</i> (8) <i>Clostridium</i> (8)	(1) AGUILAR, 2017 (2) SHAH, 2011 (3) SANGEETHA, 2010 (4) WANG, 2008 (5) LAZIN, 2009 (6) MURTHY, 2012 (7) ANNAMALAI, 2011 (8) MACHADO, 2016
Acidogênese	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (9) <i>Ruminococcus albus</i> (10) <i>Caldicellulosiruptor</i> (11) <i>Cellulomonas</i> (12)	<i>Clostridium thermocellum</i> (13) <i>Bacillus cereus</i> (14) <i>Bacteroidaceae</i> (15)	(9) VASIEE, 2016 (10) MORRIS, 1988 (11) AKINOSHO, 2014 (12) BREDHOLT, 1999 (13) SINGH, 1986 (14) MACENA, 1997 (15) CHERNICHARO, 2007

TABELA 8- PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ATUANTES EM CADA ETAPA DA BIODIGESTÃO
(Conclusão)

Etapa	Não patogênicos	Patogênicos	Referências
Acetogênese	<i>Acetanaerobacterium</i> (16) <i>Gelria glutamica</i> (16) <i>Sporanaerobacter acetigenes</i> (17) <i>Thermacetogenium phaeum</i> (18) <i>Ruminococcus</i> (16)	<i>Acidaminococcus</i> (8)	(16) deVOS, 2009 (17) H-EUGENIO, 2002 (18) HATTORI, 2000
Metanogênese	<i>Thermacetogenium phaeum</i> (18) <i>Syntrophaceticus schinkii</i> (19) <i>Methanobacteriales</i> (20), (15) <i>Methanosarcinales</i> (20) <i>Methanopyrales</i> (21)	<i>Thermotoga lettingae</i> (22) <i>Methanococales</i> (20) <i>Methanomicrobiales</i> (20) <i>Methanocellales</i> (21) <i>Methanosaeta</i> (15)	(19) WESTERHOLM, 2010 (20) LIU, 2008 (21) LIU, 2010 (22) BALK, 2002

FONTE: O autor (2023).

Na TABELA 9 estão apresentados os percentuais de principais bactérias funcionais (nível de gênero) e principais metanógenos (nível de gênero) no lodo anaeróbico da fermentação para a produção de biogás por via seca e úmida.

TABELA 9- PRINCIPAIS MICRORGANISMOS NO LODO ANAERÓBICO NA VIA ÚMIDA E VIA SECA (BACTÉRIA E ARCHAEA)

Microrganismo	Função	Gênero	Via úmida (%)	Via seca (%)
Bactéria	Acidogênese	<i>Petrimonas</i>	1,3	9,5
	Acidogênese	<i>Proteiniphilum</i>	1,8	5,7
	Hidrólise	<i>Ruminofilibacter</i>	12,0	0,5
Archaea	Metanogênese hidrogenotrófica	<i>Methanocorpusculum</i>	0,1	48,0
	Metanogênese hidrogenotrófica	<i>Methanobrevibacter</i>	0,5	15,1
	Metanogênese acetotrófica	<i>Methanosaeta</i>	77,0	4,4

FONTE: Adaptado de ZHOU *et al.* (2019).

Em cada fase da digestão anaeróbia, observa-se que diferentes espécies de fungos e bactérias apresentam eficiência variada na degradação da matéria orgânica, conforme evidenciado na TABELA 8. Durante a etapa de hidrólise, as enzimas extracelulares celulases, proteases e lipases, produzidas por microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, são responsáveis pela quebra dos compostos orgânicos em moléculas mais simples (LIM *et al.*, 2020; FERDES *et al.*, 2020). Essa fase corresponde à etapa mais lenta, de modo a limitar todo o processo de

biodigestão. A fase da acidogênese é amplamente reconhecida como a etapa mais rápida da digestão anaeróbia, na qual microrganismos fermentativos convertem os subprodutos da hidrólise, principalmente em ácidos orgânicos voláteis (JANESCH *et al.*, 2021). Esse processo resulta na diminuição do pH do ambiente e favorece o crescimento de microrganismos acidogênicos e acetogênicos, que possuem preferência por um pH na faixa de 4,5 a 5,5 (CARNEIRO *et al.*, 2020).

A terceira fase do processo de digestão anaeróbia, denominada acetogênese, envolve a atividade de microrganismos estritamente anaeróbios, cujo crescimento é sensível às variações do ambiente e ocorre em um ritmo lento. Esses microrganismos são caracterizados pela secreção de enzimas altamente instáveis na presença de oxigênio (VASILIADOU, GIOULOUNTA e STAMATELATOU 2023). Os microrganismos acetogênicos desempenham um papel importante na redução do acúmulo de cargas produzidas durante a acidogênese, como íons lactato, propionato e butirato, além de produzirem hidrogênio. Vale ressaltar que os microrganismos metanogênicos não conseguem degradar essas substâncias, tornando a atividade dos acetogênicos fundamental (XU *et al.*, 2023).

Por meio de uma associação de "*cross-feeding*", os microrganismos acetogênicos interagem com os microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos, que utilizam o hidrogênio produzido para gerar biogás. Esse processo auxilia na redução da pressão parcial de hidrogênio no ambiente, o que favorece a acetogênese (YADAV *et al.*, 2022.)

Os microrganismos metanogênicos utilizam H₂, CO₂, formiato e acetato como fontes de energia e carbono para o crescimento. Esses microrganismos geralmente pertencem ao domínio *Archea* e são classificados em dois grupos principais: os acetoclásticos, que metabolizam acetato para produzir CH₄ e CO₂, e os hidrogenotróficos, que utilizam a reação entre H₂ e CO₂ para gerar CH₄ e água. (COSSU e MORELLO 2018).

Dessa forma, é importante notar que o grupo hidrogenotrófico apresenta maior tolerância às variações ambientais do que os acetoclásticos. No entanto, ambos os grupos são sensíveis a mudanças e preferem ambientes levemente alcalinos (pH > 9,0), não sobrevivendo em pH inferior a 6,0 (WORMALD *et al.*, 2020).

O estudo e entendimento da comunidade microbiana na digestão anaeróbia é essencial para garantir a correta operação e performance do processo. A estrutura dessa comunidade interfere diretamente na estabilidade da biodigestão e a

compreensão da atividade dos microrganismos se mostra crucial para a otimização de resultados.

1.8 BIOGÁS

O biogás, conforme descrito por Nazari *et al.* (2018), é composto principalmente de metano e dióxido de carbono, com pequenas quantidades de outros gases, sendo considerado uma fonte valiosa de energia renovável. Sua produção pode ser obtida a partir de resíduos agrícolas, florestais, alimentares e municipais, tornando-o uma opção eficaz para a produção de energia e tratamento de resíduo (TSHEMESE *et al.*, 2023).

De acordo com Aparicio *et al.* (2020), o biogás é produzido a partir de digestores anaeróbicos ou aterros sanitários por meio da degradação biológica de compostos orgânicos. A composição do biogás pode variar de acordo com o tipo de matéria-prima utilizada e a tecnologia de digestão empregada em cada local. De maneira geral, o biogás é composto por dois componentes principais, o metano (CH₄) e o dióxido de carbono (CO₂), além de impurezas, tais como o sulfeto de hidrogênio (H₂S), o nitrogênio (N₂) e o amônia (NH₃) (XIE *et al.*, 2020). A TABELA 10 mostra a composição do biogás por DA e biogás em aterro.

TABELA 10- COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS EM DIFERENTES PROCESSOS (BIODIGESTORES E ATERROS)

Composição	Unidade	Biogás em Biodigestores	Biogás em Aterros
CH ₄	% vol	53 – 70	30 - 65
CO ₂	% vol	30 – 50	25 - 47
N ₂	% vol	2 – 6	1 - 17
O ₂	% vol	0 – 5	1 - 3
H ₂	% vol	N / D	0 - 3
H ₂ S	ppm	0-2000	30 - 500
NH ₃	ppm	100	0 - 5
Cloro total	mg / Nm ³	0,25	0,3 - 225
Siloxano	µg / g-seco	0,08 - 0,5	0,3 - 36

FONTE: Adaptado de YANG e GE, 2016.

Segundo Ruan *et al.* (2019) o biogás é amplamente utilizado como substituto do gás natural em veículos automotores, cozimento de refeições, aquecimento de casas e geração de eletricidade. Kristoferson e Bokalders, (1986) seguem a mesma direção de pensamento e defendem que o biogás produzido a partir de digestores

pode ser usado para dois propósitos básicos, sendo eles: ser queimado diretamente para cozinhar e iluminar ou indiretamente em motores de combustão para gerar eletricidade ou força motriz.

1.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA BIODIGESTÃO

As enzimas são moléculas proteicas que catalisam reações bioquímicas específicas (SPIER *et al.*, 2016). São nomeadas usando as espécies alvo (substratos) seguidas pela terminação “ase” (por exemplo, celulase e pectinase que quebram celulose e pectina, respectivamente) (SUMMERSCALES *et al.*, 2017). Conforme Spier *et al.*, (2018), as enzimas são catalisadores biológicos (biocatalisadores) que aceleram reações bioquímicas em organismos vivos, podendo ser extraídas de suas células e empregadas em aplicações comerciais e industriais.

A atividade enzimática é responsável pelo aumento da velocidade de conversão de substratos em produtos na presença de enzimas. As enzimas possuem sítios ativos formados por aminoácidos em sua estrutura proteica tridimensional, permitindo o reconhecimento químico e a ligação com o substrato, reduzindo a energia de ativação necessária para a reação bioquímica ocorrer (SIDDIQUI *et al.*, 2022).

A seletividade, eficiência e robustez da atividade enzimática são determinadas tanto pela estrutura proteica quanto pela composição química dos grupos funcionais presentes no interior e exterior dos sítios ativos (SALMON *et al.*, 2015; BELL *et al.*, 2021). A inativação da atividade enzimática ocorre em casos de ruptura da estrutura proteica, processo denominado desnaturação (JONASSON *et al.*, 1999; ACHARYA *et al.*, 2021). De acordo com Salmon *et al.* (2015), a atividade enzimática é definida como a quantidade ou unidades de enzimas necessárias para catalisar uma reação específica e alcançar uma conversão pré-determinada.

Na digestão anaeróbia, Odnell *et al.* (2016) utilizaram seis tipos de enzimas inoculantes para a produção de biogás e analisaram o desempenho de cada uma. Após a adição de proteases e lisozimas no processo, foi verificada a diminuição no tempo de fermentação e o aumento da produtividade do biogás.

Outro estudo utilizou um mosto de fungos para a preparação do substrato empregado na biodigestão, sendo testadas amostras de lodo e de restos alimentares, ambos sem e com pré-tratamento com o mosto de fungos. Verificou-se nesse estudo

que, utilizando o mosto de fungos como inoculante na mistura, a produção de biogás foi ligeiramente maior, bem como a cinética microbiana também apresentou maior eficiência (YIN *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a adição de enzimas tem sido considerada uma estratégia promissora para melhorar a biodigestão anaeróbia. Estudos recentes mostram que a adição de enzimas pode aumentar significativamente a produção de biogás em até 40 % (CHEN *et al.*, 2021). Por exemplo, a adição de lipase e carboidrases em resíduos alimentares melhorou a produção de biogás e redução de sólidos (WANG *et al.*, 2021), enquanto a adição de enzimas em biomassa microalgal aumentou a produção de metano (XU *et al.*, 2021). Além disso, a adição de enzimas em resíduos com elevadas cargas orgânicas, como efluentes de processamento de alimentos, resultou em uma maior recuperação de nutrientes e produção de biogás (ZHANG *et al.*, 2021). O uso de enzimas também melhorou a digestão anaeróbia de biomassa agrícola e resíduos alimentares (LEE *et al.*, 2020; LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2020). Esses estudos demonstraram que a adição de enzimas pode ser uma solução eficaz para melhorar a biodigestão anaeróbia, aumentando a produção de biogás e a recuperação de nutrientes a partir de resíduos orgânicos.

1.10 ENXOFRE NA BIODIGESTÃO

O enxofre é um elemento presente em diversos alimentos e que, em certas quantidades, possui um papel essencial ao organismo humano (MACHADO *et al.*, 2016). Ele está mais presente em alimentos ricos em proteínas, como carne, feijão, grãos, ovos, laticínios, cebola, alho, abacaxi, coco, melancia, banana, por exemplo (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014). Assim, na biodigestão de resíduos sólidos de restaurantes foram encontrados muitos alimentos ricos em proteínas e, conseqüentemente, ricos em enxofre.

O enxofre presente nos alimentos é degradado por bactérias redutoras de sulfato, também chamadas de sulforedutoras, e participam do processo chamado sulfetogênese, o qual ocorre em paralelo com a metanogênese. Exemplos dessas bactérias são *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Syntrophobacterales*, onde todas são Gram-negativas (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Na presença de compostos de enxofre, as bactérias sulforedutoras competem com outros microrganismos e reduzem o rendimento da formação de biogás.

Adicionalmente, o H₂S inibe as arqueias metanogênicas. A sulfetogênese é mais eficiente na remoção de DQO do que a metanogênese (CHERNICHARO *et al.*, 2007), o que resulta na redução do rendimento de metano, o produto com valor energético. É importante observar que os substratos com baixa concentração de compostos de enxofre em relação à concentração de DQO, permitem que o processo de digestão anaeróbia ocorra de acordo com as etapas da biodigestão, sem competição significativa à metanogênese (SILVEIRA *et al.*, 2015).

Os compostos de enxofre, especialmente o gás sulfídrico (H₂S), pode causar impactos negativos na produção de Biogás. Por possuir um valor de pH baixo (<1), apresenta a propriedade de corrosividade, podendo danificar o equipamento que realiza o processo de biodigestão, além de causar maus odores e toxicidade ao ambiente. Além disso, uma maior concentração de H₂S no biogás compromete também a qualidade do mesmo, uma vez que o objetivo é ter o máximo possível de biometano (CH₄) na composição do biogás devido ao seu elevado potencial energético (MACHADO *et al.*, 2016).

Assim, fica evidente que no decorrer do tempo os compostos de enxofre podem causar sérios danos ao processo de biodigestão, o que leva a escolha de um método para contornar este problema, como por exemplo, um tratamento do biogás. Existem várias opções de tratamento, principalmente para o gás sulfídrico e para o dióxido de carbono (CO₂) presentes no gás. No entanto, para os compostos de enxofre o tratamento aplicado é chamado de dessulfurização.

1.11 DESENVOLVIMENTO DA TESE

A partir da revisão literária sobre biodigestão, as etapas da tese foram desenvolvidas nos capítulos 2, 3, 4, 5 e 6, apresentados de forma sequencial. Esses capítulos abordaram a construção e avaliação da biodigestão em biodigestores de 100 mL, a avaliação de neutralizantes químicos para o sistema, o uso de codigestão como estabilizante e o isolamento de grupos microbianos do resíduo alimentar e lodo de tratamento de esgoto. Além da avaliação das condições ideais para a combinação de microrganismos e enzimas no processo de biodigestão. O objetivo principal dessas etapas foram a busca para aumentar a produção de biogás e biometano em um tempo reduzido comparado com o processo convencional.

CAPÍTULO 2 - BIODIGESTÃO ANAERÓBICA DE RESÍDUO ALIMENTAR VISANDO PRODUÇÃO DE BIOMETANO EM FRASCOS DE VIDRO¹

Resumo: A geração e o destino inadequado dos resíduos sólidos urbanos têm sido um grande problema ambiental no planeta. A gestão do resíduo sólido urbano gerado nos grandes centros urbanos é problemática e preocupante mundialmente. Alternativas são desenvolvidas para o tratamento dos resíduos sólidos orgânicos. O Brasil apresenta grande potencial para a produção de biogás, mais precisamente o biometano, componente do biogás bruto, que necessita ser purificado. Diante do grande volume diário de produção de RSU nos grandes centros urbanos, o objetivo principal desse estudo é desenvolver uma técnica de biodigestão para resíduo alimentar orgânico de restaurantes, especificamente do restaurante universitário (RU) da UFPR. Os experimentos foram conduzidos com resíduo homogeneizado e não homogeneizado, com quantidades de recicláveis adicionados, como plástico, papel e papelão, nas proporções de 0%, 1% e 5% em massa do resíduo. A temperatura de 35 e 45 °C foi controlada para a biodigestão do sistema. Os dados foram apresentados como médias \pm desvio-padrão. Para comparar as variáveis de resposta, foram verificadas a normalidade e homoscedasticidade, e os valores médios foram avaliados pela ferramenta de análise de variância (ANOVA) unifatorial. Os ensaios condicionados a uma temperatura de 35 °C apresentaram significância estatística com os maiores valores de biogás acumulados, quando comparados com os de 45 °C. Quanto aos ensaios que variaram o percentual de recicláveis no interior do biodigestor, apenas 12,5% dos ensaios realizados com 1% de recicláveis adicionados apresentaram maiores volumes acumulativos de biogás em 30 dias de produção, seguidos por 37,5% dos ensaios que continham 5% de recicláveis e 50% dos que continham 0% de recicláveis (controle). Comparando os tratamentos de resíduo (com tratamento 2mm \neq sem tratamento 2mm), 21% dos ensaios que não receberam o tratamento do resíduo a 2 mm apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o biogás acumulado em 30 dias, quando comparados com seus respectivos ensaios com tratamento. O presente estudo possibilitou desenvolver um sistema de biodigestão com frascos de 100 mL e demonstrar o comportamento da biodigestão quando são adicionados recicláveis, condicionados a diferentes rotas de processo (úmido e extrasseco), em termos de granulometria e temperatura (mesofílica e termofílica).

Palavra-chave: Tratamento de resíduo alimentar; granulometria; via úmida e extrasseca, escala reduzida.

¹ Este Capítulo foi publicado na revista *Observatório de la Economía Latinoamericana* "Anaerobic Digestion of Food Waste for Biogas Production in Glass Bottles"

2.1 INTRODUÇÃO

Os resíduos sólidos urbanos (RSU) representam um grande desafio ambiental em todo o mundo, devido ao seu grande volume diário e à gestão complexa desses materiais (ABRALPE, 2022). A fração orgânica é a principal componente desses resíduos, variando de 50 % a 60 % da geração total, com origens diversas, como lodos de esgoto, esterco animal, resíduos alimentares e industriais, resíduos de colheita e culturas energéticas (POUR *et al.*, 2021).

O presente capítulo foca na fração orgânica dos resíduos alimentares, devido à sua aplicabilidade no projeto de biodigestão em questão. A composição macromolecular desses resíduos é composta por uma mistura de polímeros de carboidratos, proteínas, lipídeos, lignina, ácidos orgânicos e uma parcela inorgânica (QUIDEAU *et al.*, 2021).

A crescente preocupação com o gerenciamento de resíduos sólidos tem impulsionado o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o tratamento desses materiais. Nesse contexto, a biodigestão se destaca como uma alternativa viável e promissora, baseada na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos por microrganismos. Esse processo envolve quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, nas quais os microrganismos excretam enzimas que desempenham um papel importante na estabilização da matéria orgânica, gerando biogás ou biometano com alto valor energético e uma fração líquida rica em nutrientes, que pode ser empregada como biofertilizante (FERDES *et al.*, 2020). Em alguns casos, a sulfetogênese também ocorre em paralelo com a metanogênese, resultando na produção de gás sulfídrico (H₂S).

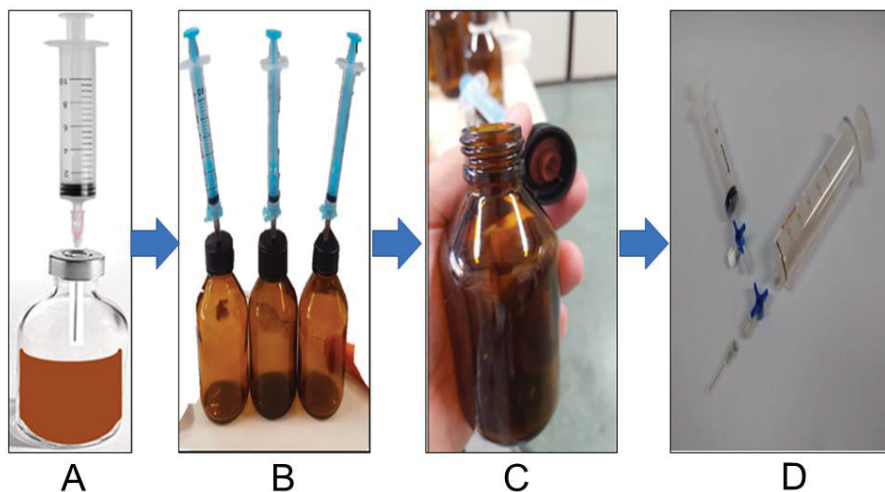
O objetivo deste estudo é desenvolver uma técnica de biodigestão para resíduos orgânicos provenientes de restaurantes, com ênfase nos resíduos alimentares gerados pelo restaurante universitário (RU) da UFPR. Para tal, foram utilizados frascos de vidro de 100 mL, a fim de avaliar a eficácia do processo de biodigestão neste sistema experimental.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Construção de biodigestores de bancada de fase única

Na construção dos biodigestores de bancada em pequena escala foi utilizado um frasco âmbar de 100 mL de capacidade volumétrica. A verificação do gás produzido foi quantificada por seringa de plástico (10 mL) na superfície da tampa, onde o deslocamento do êmbolo das seringas mostrará o quanto de volume em mL é produzido. As seringas foram fixadas às tampas de rosca perfuradas e uma vedação de borracha foi colocada entre o frasco e a tampa, para garantir a vedação adequada e evitar vazamentos ou perdas de biogás produzido, utilizando resina para auxiliar nesse processo. Para captura de biogás para análise, seguiu-se o modelo D com seringa na vertical auxiliada com a válvula de 3 vias de plástico. O biogás bruto foi armazenado em bolsa plástica à temperatura de 28 ± 2 °C e submetido a análises da composição do biogás bruto. A FIGURA 5 apresenta a construção dos biodigestores de fase única.

FIGURA 5 - CONSTRUÇÃO DO MINIBIODIGESTOR EM ESCALA REDUZIDAS EM FRASCOS DE 100 mL, ETAPA A, B, C e D



A: Modelo; B: Biodigestor adaptado; C: Adaptação (frasco “Pluma” + Tampa rosqueável de plástico no lugar do lacre tradicional de alumínio + septo de borracha); D: Adaptação para a retirada do gás sem abrir o biodigestor.

FONTE: Monteiro *et al.* (2023).

2.2.2 Material orgânico

O resíduo sólido utilizado para a realização da pesquisa foi a fração orgânica (arroz, feijão, macarrão, casca de frutas, legumes e proteínas) proveniente de atividades de restaurante próximo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Centro Politécnico (Curitiba, Brasil). Os dados referentes à massa de matéria orgânica processada foram adequados à composição total de RSU, segundo IPEA (2012). A TABELA 11 mostra a composição referente do RSU no Brasil e a composição de RSU de restaurantes universitário a partir do cardápio semanal.

TABELA 11- COMPOSIÇÃO EM PERCENTUAL DO RSU DO BRASIL E DE RESTAURANTE (MATERIAL ORGÂNICO)

RSU Brasil		RSU de Restaurantes (Material orgânico)	
Composição	(%)	Composição	(%)
Material Orgânico	51	Carboidratos	56
Papel e Papelão	13	Lipídeos	11
Plástico	15	Proteínas	25
Vidro	2	Fibras alimentares	7
Metais	3		
Outros	17		

FONTE: Adaptado IPEA, (2012) e Autores (2020).

O resíduo sólido orgânico coletado no restaurante local (resíduos do almoço) foi homogeneizado e armazenado à temperatura de -20 °C, para evitar a decomposição biológica até a realização das análises físico-químicas. Vale ressaltar, que o controle microbiológico foi realizado após o descongelamento de todas as amostras (contagem de células viáveis). Em seguida, separou-se alíquotas do resíduo sólido orgânico para a caracterização quanto aos parâmetros físico-químicos de interesse para os processos: pH, sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (SF) (APHA, AWWA e WEF, 2005) e sólidos solúveis totais (°Brix). A TABELA 12 apresenta os parâmetros analisados.

TABELA 12- PARAMETRO FÍSICO-QUÍMICO DO RESÍDUO ALIMENTAR (pH; °Bx; ST; SV; E SF)

Físico-Químico	pH	° Bx	ST (%) *	SV (%) **	SF (%) **
Resíduo Alimentar	5,63	11,00	25	97	3

* base úmida; ** base seca.

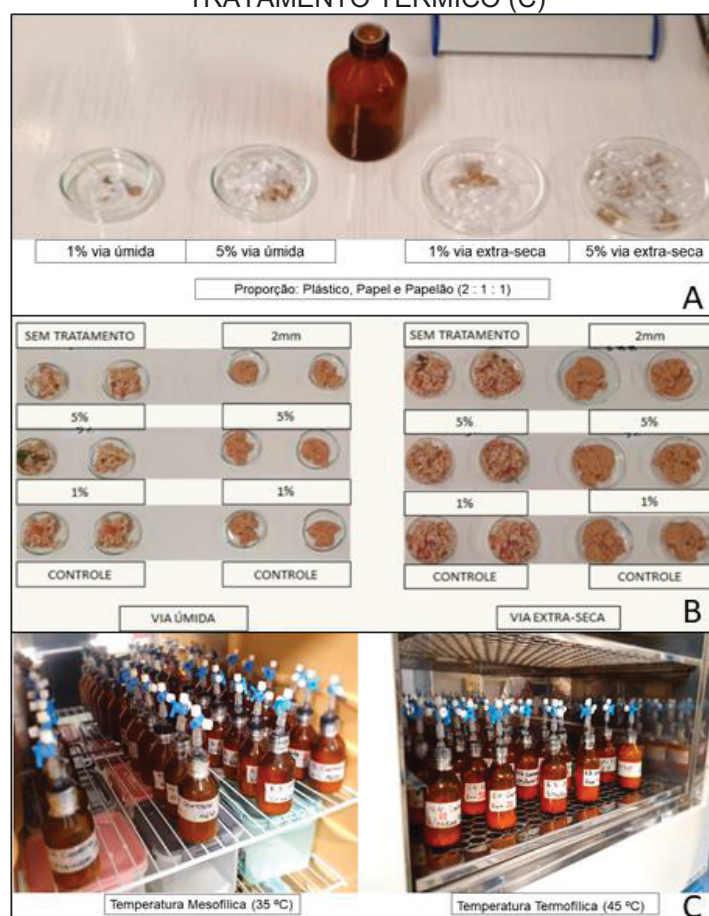
2.2.3 Ensaio de biodigestão (tamanho da partícula e adição de reciclável)

O resíduo foi categorizado em duas condições: (A) sem tratamento e (B) com tratamento. A condição (A) corresponde ao resíduo sem passar por peneiramento ou

trituração, representando o grupo de controle. Por outro lado, a condição (B) envolve o resíduo que passou por peneiramento de abertura 10 *mesh* (2 mm). Foram adicionados materiais recicláveis nas proporções de 0% (controle), 1% e 5% (plástico, papel e papelão na proporção de 2:1:1), em relação aos sólidos totais inseridos nos biodigestores. Essa adição teve como objetivo simular as condições do resíduo sólido, bem como promover a descompactação do meio durante o processo de biodigestão. Cada processo foi colocado para biodigestão em biodigestores de bancada (frascos de vidro de 100 mL), em temperatura 35 e 45 °C em estufa com temperatura controlada. A TABELA 13 apresenta as condições de processo dos experimentos. A formação de biogás durante o tempo de biodigestão foi observada.

A FIGURA 6 apresenta as etapas do teste de granulometria, sendo que A é percentual de reciclável utilizado, B resíduo mais reciclável e C o experimento nas estufas em temperatura de 35 e 45 °C.

FIGURA 6 – DEMONSTRAÇÃO DAS ETAPAS DA EXECUÇÃO DO ENSAIO DE BIODIGESTÃO (PROPORÇÃO DE RECICLÁVEIS (A); TIPO DO TRATAMENTO DO RESÍDUO (B); TIPO DE TRATAMENTO TÉRMICO (C))



FONTE: Autor (2022)

TABELA 13- CONDIÇÕES DOS ENSAIOS DA BIODIGESTÃO DE RESÍDUO ALIMENTAR (RC, ST, RS)

Condições de processo de biodigestão via-úmida e extrasseca							
Ensaio	RC (%)	ST (%)	gSV·L ⁻¹	°C	H ₂ O (mL)	RS (g)	RC (g)
A (úmida)	Controle (0)	13	43,5	35	58	12,000	0,000
	1	13	43,1	35	58	11,895	0,105
	5	13	41,6	35	58	11,480	0,520
	Controle (0)	13	43,5	45	58	12,000	0,000
	1	13	43,1	45	58	11,895	0,105
	5	13	41,6	45	58	11,480	0,520
B (úmida)	Controle (0)	13	43,5	35	58	12,000	0,000
	1	13	43,1	35	58	11,895	0,105
	5	13	41,6	35	58	11,480	0,520
	Controle (0)	13	43,5	45	58	12,000	0,000
	1	13	43,1	45	58	11,895	0,105
	5	13	41,6	45	58	11,480	0,520
A (extrasseca)	Controle (0)	46	153,5	35	58	42,340	0,000
	1	46	152,4	35	58	42,034	0,306
	5	46	147,1	35	58	40,590	1,750
	Controle (0)	46	153,5	45	58	42,340	0,000
	1	46	152,4	45	58	42,034	0,306
	5	46	147,1	45	58	40,590	1,750
B (extrasseca)	Controle (0)	46	153,5	35	58	42,340	0,000
	1	46	152,4	35	58	42,034	0,306
	5	46	147,1	35	58	40,590	1,750
	Controle (0)	46	153,5	45	58	42,340	0,000
	1	46	152,4	45	58	42,034	0,306
	5	46	147,1	45	58	40,590	1,750

RC: Material reciclável; RS: Resíduos sólidos; ST: Sólidos totais;

As análises nos biodigestores foram realizadas após o processo de biodigestão nos biodigestores de bancada (o processo de biodigestão analisado foi de 30 dias). As variáveis analisadas foram tempo, pH, sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos solúveis totais (SST), biomassa e biogás (APHA,1992; APHA, 2017). O percentual de CO₂ no biogás foi quantificado pelo método ALFAKIT (EMBRAPA) e, por diferença, o percentual de CH₄. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. O volume (mL) de biogás foi aferido nos biodigestores diariamente, no período de 30 dias (FIGURA 7).

FIGURA 7 – DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOGÁS FORMADOS NOS BIODIGESTORES DE 100 mL EM TEMPERATURA CONTROLADA (35 °C)



FONTE: Autor (2022).

2.2.4 Análise estatística

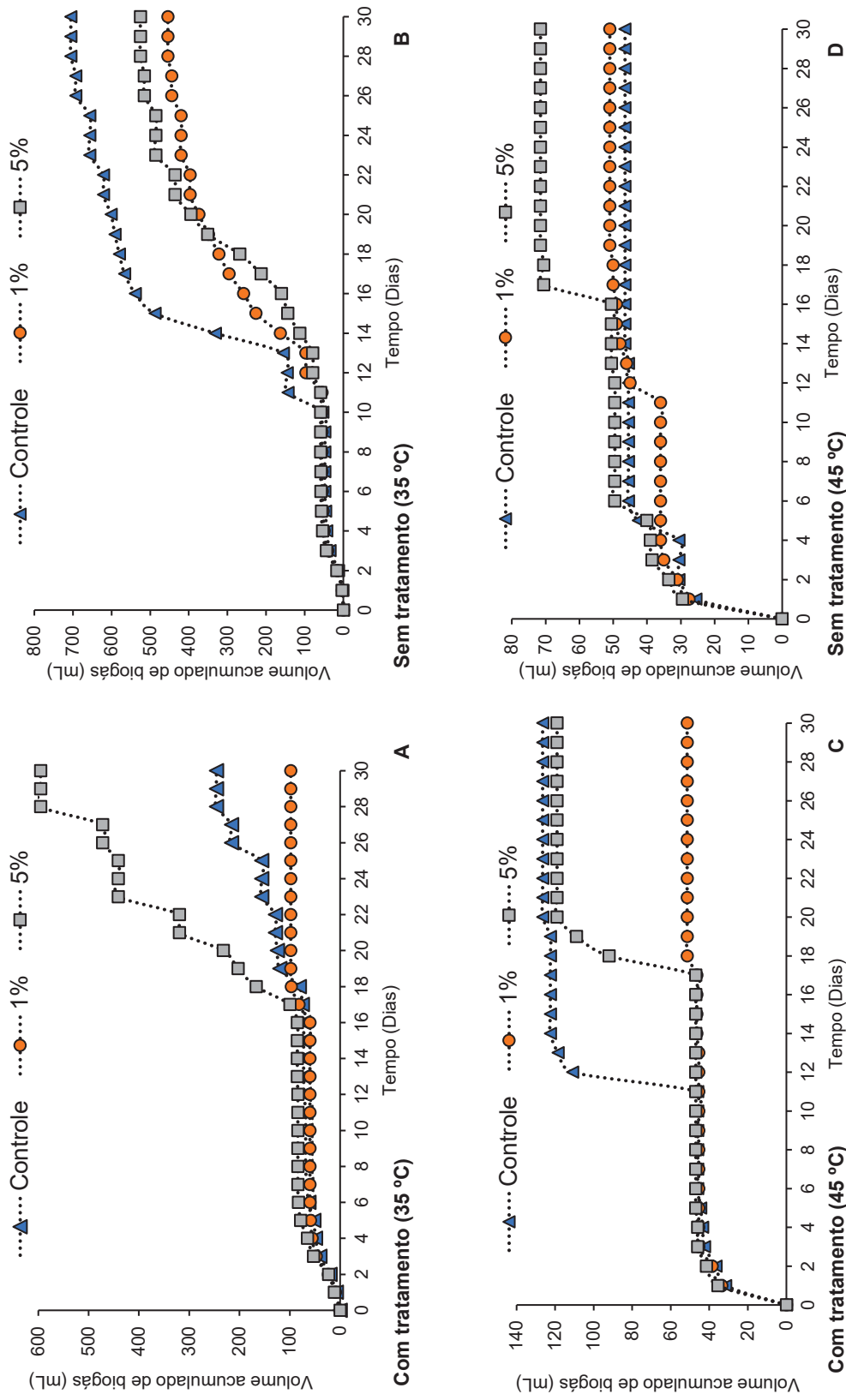
Os dados foram apresentados como médias \pm desvio-padrão. Para comparar as variáveis de resposta, foram checadas a normalidade e a homoscedasticidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Sendo que as diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela ferramenta de análise de variância (ANOVA) unifatorial. O teste Duncan foi aplicado para analisar a diferença nas vias de trabalho do biodigestor (úmida e extrasseca). Para a interpretação dos resultados $\alpha < 0,05$ foi utilizado para rejeitar a hipótese nula. O Software STATISTICA 10 (Statsoft, EUA) foi utilizado para a realização das análises estatísticas de todos os ensaios.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos gráficos na FIGURA 8 e 9, pode ser observado o comportamento do volume de biogás gerado (com tratamento, sem tratamento em 35 °C e 45 °C) na via úmida (13 % ST) e via extrasseca (46 % ST). Portanto, é possível observar que todos os experimentos tiveram um período de produção semelhante em termos de quantidade de resíduo adicionado ao meio anaeróbico para a produção de biogás, tanto na via úmida quanto na via extrasseca. Nos ensaios, houveram diminuições na produção de biogás, tendendo a $<1,0$ mL, sendo que esse período foram os primeiros 10 dias de produção de biogás. A produção de biogás tendeu a $<1,0$ mL a partir do 8º dia, para condições mesofílica (35 °C), e do 6º dia, para condições termofílica (45 °C).

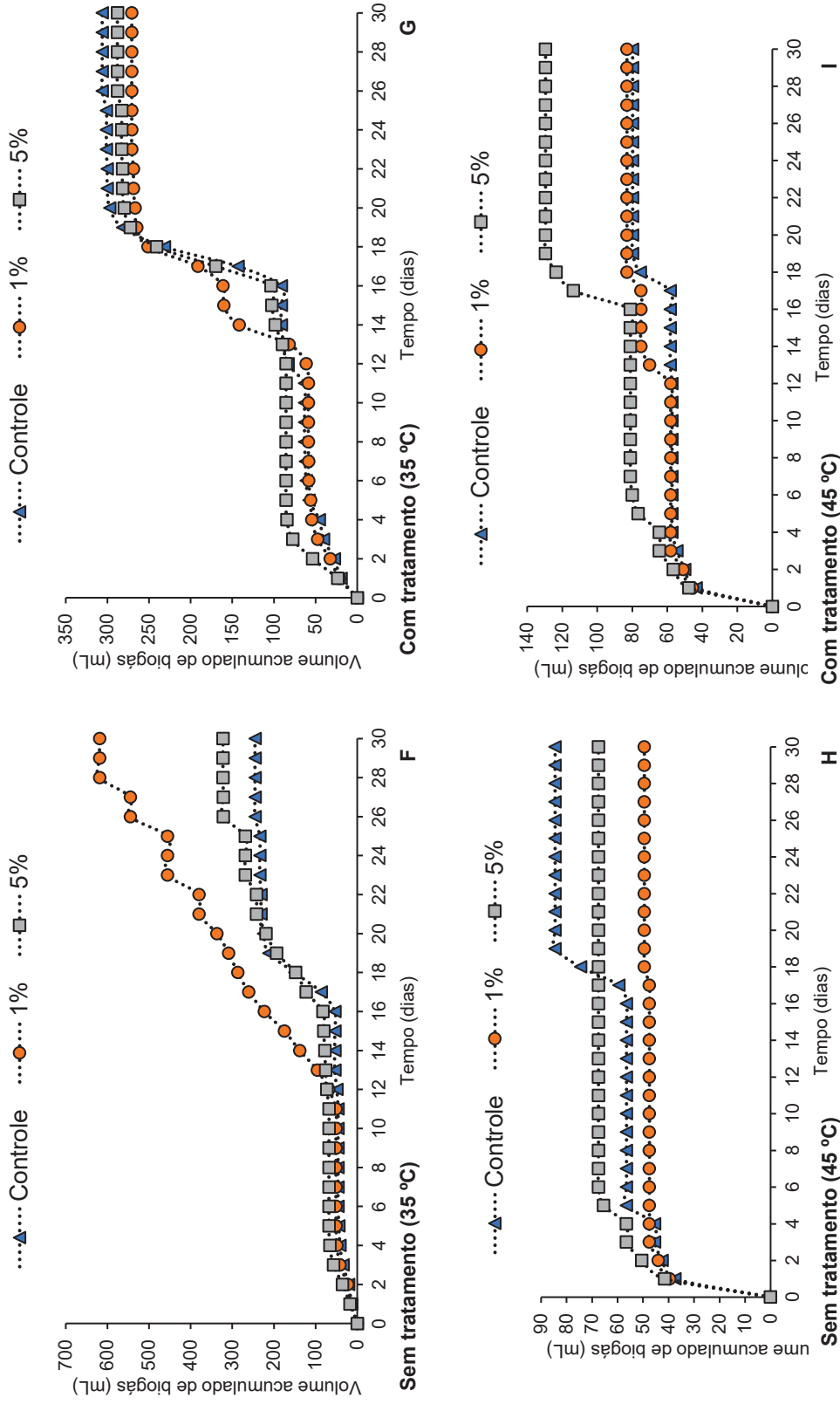
A justificativa para a estagnação da produção de biogás está relacionada à mudança abrupta do pH na fase de hidrólise (pH próximo a 3,0), inviabilizando o crescimento de microrganismos para o processo da digestão anaeróbica. De acordo com o estudo de Souza (1984), que abordou os fatores que influenciam a digestão anaeróbica, foi relatado que o aumento da concentração de ácidos voláteis, no material em processo de digestão, resulta em uma diminuição do pH, o que, por sua vez, favorece as bactérias acidogênicas e prejudica as bactérias produtoras de metano. Para criar um ambiente propício ao desenvolvimento dos microrganismos, o pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,5$ utilizando bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a uma concentração de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir desse período (10 dias), alguns ensaios

FIGURA 8 - PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DE VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS COM BIODIGESTORES EM VIA ÚMIDA COM E SEM TRATAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO EM TEMPERATURAS DE 35 °C E 45 °C, DURANTE 30 DIAS (1 % E 5 % (m/m) DE RESÍDUO RECICLÁVEL)



Obs.: No grupo de controle, não foi adicionado nenhum resíduo reciclável. No grupo 1%, foi adicionado um por cento de resíduo reciclável, enquanto no grupo 5%, foi adicionado cinco por cento de resíduo reciclável.

FIGURA 9- PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DE VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS COM BIODIGESTORES EM VIA EXTRASSECA COM E SEM TRATAMENTO DO RESÍDUO SÓLIDO EM TEMPERATURAS DE 35 °C E 45 °C, DURANTE 30 DIAS (1 % E 5 % DE RESÍDUO RECICLÁVEL)



Obs.: No grupo de controle, não foi adicionado nenhum resíduo reciclável. No grupo 1%, foi adicionado um percento de resíduo reciclável, enquanto no grupo 5%, foi adicionado cinco percento de resíduo reciclável.

retornaram à produção de biogás. A TABELA 14 apresenta a análise estatística descritiva e teste de Duncan $p < 0,05$ para o volume acumulado de biogás produzido durante 30 dias.

TABELA 14- ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTE DE DUNCAN ($p < 0,05$) PARA O VOLUME ACUMULADO DE BIOGÁS EM 30 DIAS DE PROCESSO DE BIODIGESTÃO PARA A VIA ÚMIDA E EXTRASSECA NOS ENSAIOS DE 1 % E 5 % DE RESÍDUO RECICLÁVEL (TEMPERATURAS 35 °C E 45 °C)

Tratamento	Ensaio	Volume Acumulado de Biogás (mL)	σ	Máx. Volume produzido de Biogás em um dia (mL)	Duncan
Sem tratamento (via úmida)	Controle (35 °C)	706	43	176	a
	1 % (35 °C)	454	19	66	abc
	5 % (35 °C)	526	22	83	ab
Com tratamento (via úmida)	Controle (35 °C)	246	14	60	bcdefg
	1 % (35 °C)	98	7	24	defg
	5 % (35 °C)	596	35	123	abc
Sem tratamento (via úmida)	Controle (45 °C)	47	5	26	fg
	1 % (45 °C)	51	5	28	fg
	5 % (45 °C)	72	7	30	efg
Com tratamento (via úmida)	Controle (45 °C)	127	13	65	defg
	1 % (45 °C)	52	6	34	fg
	5 % (45 °C)	119	11	45	defg
Sem tratamento (via extrasseca)	Controle (35 °C)	246	16	64	cdefg
	1 % (35 °C)	619	25	89	a
	5 % (35 °C)	323	15	53	abcd
Com tratamento (via extrasseca)	Controle (35 °C)	306	20	89	bcde
	1 % (35 °C)	271	16	60	bcdef
	5 % (35 °C)	288	19	71	bcdefg
Sem tratamento (via extrasseca)	Controle (45 °C)	85	8	38	efg
	1 % (45 °C)	50	7	40	g
	5 % (45 °C)	68	8	42	efg
Com tratamento (via extrasseca)	Controle (45 °C)	80	8	44	efg
	1 % (45 °C)	83	9	46	efg
	5 % (45 °C)	130	10	48	defg
Análise de Variância					
Teste de Duncan		p < 0,05 $\alpha = 0,05$			

Os ensaios conduzidos a 35 °C apresentaram resultados estatisticamente maiores para volume de biogás acumulativos, quando comparado com os testes a 45 °C. Desta forma, os ensaios “sem tratamento do resíduo” a 35 °C (via úmida) foram os que apresentaram maiores valores de volume acumulado de biogás (mL), durante 30 dias de processo, 706 ± 43 mL (controle, 35 °C); 526 ± 22 mL (5 %, 35 °C) e 454 ± 19 mL (1 %, 35 °C). Seguido pelo ensaio “sem tratamento do resíduo” a 35 °C (via

extrasseca) com 619 ± 25 mL (1%, 35 °C); “com tratamento do resíduo” condicionado a 35 °C (via úmida), obtendo 596 ± 35 mL (5 %, 35 °C). Quanto aos ensaios que variaram o percentual de recicláveis no interior do biodigestor, apenas 12,5 % dos ensaios realizados com 1 % de recicláveis adicionado apresentaram maiores volumes acumulativos de biogás em 30 dias de produção, seguido por 37,5 % os que continham 5 % de recicláveis e 50 % os que continham 0% de recicláveis (controle).

Em estudo realizado por Shrestha *et al.* (2020), o uso de bioplástico pode gerar biogás. No entanto, em período superior a 35 dias de retenção hidráulica, visto que a biodegradação menor que 35 dias é inferior 50 % sua eficiência. Por outro lado, Zhang *et al.* (2020) mostraram que a utilização de recicláveis (micro e nanoplásticos de poliestireno) impacta na produção de metano negativamente. O poliestireno de 80 nm reduziu a produção de CH₄ em 19,3 %, enquanto o poliestireno de 5 µm diminuiu 17,9 % durante a digestão anaeróbica.

Ao avaliar os ensaios de biodigestão apresentados neste estudo e comparar os tratamentos de resíduo (com tratamento de 2 mm versus sem tratamento de 2 mm), verificou-se que 21% dos ensaios com tratamento do resíduo a 2 mm apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para o biogás acumulado em 30 dias, em comparação com seus respectivos ensaios sem tratamento. Da mesma forma, 21% dos ensaios que receberam tratamento do resíduo mostraram valores estatisticamente significativos para o volume acumulado de biogás. No entanto, apenas 6% dos ensaios não apresentaram diferença estatisticamente significativa na produção de biogás quando comparados entre si. Segundo Ariunbaatar *et al.* (2014), o pré-tratamento mecânico desintegra e/ou tritura as partículas sólidas dos substratos, liberando assim compostos celulares e aumentando a área superficial específica. Uma área de superfície aumentada proporciona melhor contato entre substrato e bactérias anaeróbias, potencializando assim o processo de biodigestão.

Izumi *et al.* (2010) estudaram o efeito do tamanho de partícula na biometanação de resíduo alimentar. A redução de tamanho, por meio de um moinho de esferas, resultou em uma solubilização de DQO 40 % maior, o que levou a um rendimento de produção de biogás 28 % maior. No entanto, a redução do tamanho em excesso para partículas menores que 0,7 mm causou um acúmulo de ácidos graxos voláteis.

Os dados obtidos na análise qualitativa do biogás, utilizando o kit de Análise de Biogás da EMBRAPA, são apresentados na TABELA 15. Esses resultados revelam uma proporção considerável de CH₄ (metano) presente nas amostras controle da biodigestão. Através dessa análise, foi possível verificar a presença de H₂S, NH₃, CO₂ e CH₄ no biogás, sendo o metano um dos componentes de destaque. No entanto, é importante destacar que a análise realizada pelo kit determina as proporções de metano e dióxido de carbono por diferença de volume, o que significa que a substância analítica identifica apenas a quantidade de CO₂ presente no biogás. Nesse sentido, a análise permite inferir que a parte do biogás que não reage com a substância analítica é composta por metano. Porém, devido ao fato de o sistema de biodigestão ser iniciado com a injeção de gás atmosférico para facilitar a fase hidrolítica, o gás remanescente da reação não é exclusivamente metano, contendo também outros gases atmosféricos, como O₂ e N₂.

TABELA 15- ANÁLISE QUANTITATIVA DO PRINCIPAIS GASES NO BIOGÁS ACUMULADO EM 30 DIAS DE PRODUÇÃO

Biogás	Quantidade	Valor de Referência
CO ₂	25 %	-
H ₂ S	47,25 mL/m ³	500 mL/m ³
NH ₃	29,74 mL/m ³	100 mL/m ³
O ₂ ; N ₂ ; CH ₄	75 %*	-

Em relação aos dados encontrados de amônia (NH₃) e ácido sulfídrico (H₂S), ambas as substâncias apresentaram menor concentração. Considerando o trabalho de Domingues e Silva (2017), a baixa quantidade apresentada de H₂S, em relação à literatura, é justificada em decorrência da aceleração de produção dos ácidos orgânicos em virtude da atividade microbiana durante a fase hidrolítica. Nesse sentido, a alta produção de ácidos orgânicos da fase ácido da biodigestão anaeróbica também influencia na baixa proporção de amônia no meio.

2.4 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a criação de um sistema de biodigestão utilizando frascos de vidro e demonstrou o comportamento da biodigestão ao adicionar materiais recicláveis, seguindo diferentes rotas de processo (úmido e extrasseco), considerando a granulometria e a temperatura (mesofílica e termofílica). Concluiu-se que a temperatura mesofílica teve um impacto direto e positivo na produção de

biogás, quando comparada à temperatura termofílica. A ausência de materiais recicláveis no processo de biodigestão contribuiu para o bom funcionamento do biodigestor e influenciou na produção acumulativa de biogás. O tratamento do resíduo com granulometria de 2 mm, ao ser inserido no biodigestor, contribuiu para sua padronização. Tanto o processo úmido quanto o processo extrasseco tiveram um impacto significativo nos primeiros dias da biodigestão, tornando necessário o controle químico para a manutenção da microflora anaeróbia.

Portanto, com a necessidade de utilizar um neutralizante na biodigestão, o capítulo 3 tem como objetivo testar neutralizantes químicos comumente utilizados no processo de biodigestão, monitorando o pH ao longo de um período de 30 dias.

ANAEROBIC DIGESTION OF FOOD WASTE FOR BIOGAS PRODUCTION IN GLASS BOTTLES

Pablo Inocência Monteiro ^{a*}, André Bellin Mariano ^b; Bianca do Santos Padilha ^c; Yann Domingues de Moraes ^c; Leticia Zaguine ^c; Leonardo de Castro Melo ^d; Leonardo Rey Oliveira Lopes ^e; Marcelo Lacerda de Moraes ^f; Michele Rigon Spier ^{g*}.

^a Federal University of Paraná; Graduation Program in Food Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^b Federal University of Paraná; Department of Electrical Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^c Federal University of Paraná; Department of Chemical Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^d Federal University of Paraná; Department of Environmental Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^e Federal University of Paraná; Department of Chemistry, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^f State University of Campinas, Department of Bioenergy, Street. Monteiro Labato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo State, Brazil; zip code: 13083-862.

^g State University of Campinas, Department of Environmental Engineering, Street. Monteiro Labato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo State, Brazil; zip code: 13083-862.

*Corresponding author: spier@ufpr.br; pabloinocencia@ufpr.br.



ISSN 1696-8352
revista@observatoriolatinoamericano.com

Register Login

ABOUT ▾ EDITORIAL POLICIES ▾ ARCHIVES CURRENT CITATIONS - GOOGLE SCHOLAR Q SEARCH
CITATIONS - ALTMETRICS H5 INDEX INDEXING & ABSTRACTING QUALIS CAPES CONTACT

HOME / Qualis CAPES

Qualis CAPES

The journal *Observatório de la Economía Latinoamericana* was evaluated by [Qualis CAPES 2017-2020](#) in Brazil, with the following strata (more information access the [Sucupira Platform](#)):

Qualis CAPES (Brazil) 2017-2020:

PUBLIC AND BUSINESS ADMINISTRATION, ACCOUNTING AND TOURISM - A4
BIODIVERSITY - A4
BIOTECHNOLOGY - A4
FOOD SCIENCE - A4
POLITICAL SCIENCE AND INTERNATIONAL RELATIONS - A4
AGRICULTURAL SCIENCES I - A4
ENVIRONMENTAL SCIENCES - A4

MAKE A SUBMISSION

LANGUAGE

English
Português (Brasil)

CURRENT ISSUE

ATOH 1.0

ISS 2.0

ISS 1.0

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE TAMPÕES QUÍMICOS PARA CONTROLE DA ACIDIFICAÇÃO NA BIODIGESTÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA EM FRASCOS DE 100 mL

Resumo: A biodigestão anaeróbica é caracterizada como um processo de degradação biológica do resíduo sólido urbano na ausência de oxigênio. Este processo pode ser dividido em duas vias, sendo elas: úmida e seca. A importância desse tipo de tratamento está associada ao fato de que plantas de biogás podem tratar a matéria orgânica presente nos RSU, enquanto, simultaneamente, reduzem a poluição ambiental com a geração de metano como energia. Um dos principais parâmetros físico-químicos responsáveis pela alteração na produção de biogás é o pH. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar diferentes agentes químicos tamponantes e seus respectivos efeitos sobre a biodigestão em via úmida. A condição experimental consistiu no uso de frascos de vidro de 100 mL com adição de resíduos orgânicos (alimentos triturados). Diferentes tipos de tampões foram avaliados: CH_3COONa ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), NaHCO_3 ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e NaOH ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A adição dos tampões condicionou os sistemas em $\text{pH}_{\text{inicial}} = 6,00 \pm 0,5$, o qual foi ajustado diariamente durante a fase hidrolítica do processo (7 dias). Os experimentos foram realizados em triplicata, consistindo em 4 testes com adição de tampão e um teste controle, com duração de 30 dias de processo. Os dados são apresentados como médias \pm desvio-padrão ($n = 3$). Para verificação da normalidade, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado, sendo que a homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de Levene (≥ 3 amostras). Análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada em conjunto com o teste de Fisher para verificar as diferenças estatísticas $n < 0,05$, para os tampões em análise. Observou-se que o CH_3COONa foi o tampão que mostrou melhor resposta significativa entre os experimentos e valores de pH na faixa estipulada entre 5 e 6, seguido do NaHCO_3 , KH_2PO_4 e NaOH . O teste controle, como previsto, apresentou o menor pH final ($\text{pH}_{\text{inicial}} = 4,55 \pm 0,5$ a $\text{pH}_{\text{final}} = 3,85 \pm 0,5$ após 30 dias de processo), uma vez que não foi adicionado nenhum tampão nesse sistema. Conclui-se que, com os experimentos para ajuste de pH, foi possível observar que o melhor resultado ($\text{pH} = 5,51 \pm 0,01$) foi obtido para o sistema utilizando acetato de sódio (CH_3COONa) como agente tamponante.

Palavras-chave: Acidificação; tampão; biodigestão; resíduo alimentar; acetato de sódio.

3.1 INTRODUÇÃO

A biodigestão anaeróbica é caracterizada como um processo de degradação biológica do resíduo sólido urbano na ausência de oxigênio. Este processo pode ser dividido em duas vias, sendo elas: úmida e seca. A importância desse tipo de tratamento está associada ao fato de que, plantas de biogás podem tratar a matéria orgânica presente nos RSU, enquanto, simultaneamente, reduzem a poluição ambiental com a geração de metano como energia. Um dos principais parâmetros físico-químicos responsáveis pela alteração na produção de biogás é o potencial hidrogeniônico (pH). O pH é definido como o logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio na solução, natureza ácida da solução aumenta à medida que o pH da solução diminui e vice-versa (SATYAM, 2021).

A atividade das bactérias metanogênicas, produtoras de biogás, tem um ótimo desempenho na faixa de pH entre 6,0 a 7,5 (LEUNG e WANG, 2016). Valores abaixo de 6,0 ou acima de 8,0 reduzem consideravelmente a produção de biogás, podendo inibir completamente a produção de biogás (PRAMANIK *et al.*, 2019).

Em estudo da biodigestão a produção de CH₄ foi 75 % mais eficiente com pH > 5,0 (SREEKRISHNAN *et al.*, 2004; PRAMANIK *et al.*, 2019). Os principais fatores que contribuem para a flutuação do pH são alcalinidade, ácidos graxos voláteis (AGV), a quantidade de produção de CO₂ e a concentração de bicarbonato (HCO₃) durante o processo de digestão anaeróbica (KONDUSAMY e KALAMDHAD, 2014). Eles relataram que a relação entre as concentrações de AGV e HCO₃ deve ser controlada, pois ajuda no ajuste do pH ideal durante o processo de digestão anaeróbica. Os ácidos graxos voláteis são ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido valérico), os principais produtos intermediários produzidos a partir da digestão anaeróbica de resíduos alimentares (SHI *et al.*, 2018).

Os resíduos alimentares (fração orgânica) adquiridos nos restaurantes apresentam caráter ácido, iniciando o processo com o pH em torno de 5,0. A fase inicial dos testes foi desenvolvida com a ausência de compostos químicos para tamponamento do sistema, com objetivo de verificar a capacidade de tamponamento natural do resíduo (CAPÍTULO 2). Com o avanço do experimento, observou-se a necessidade de neutralização do sistema, a partir do decaimento do pH e consequente queda na produção de biogás. Sabendo disso, foram estudadas

alternativas para o reajuste do pH, através de soluções neutralizantes. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar diferentes agentes químicos neutralizantes e seus respectivos efeitos sobre a biodigestão em via úmida.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

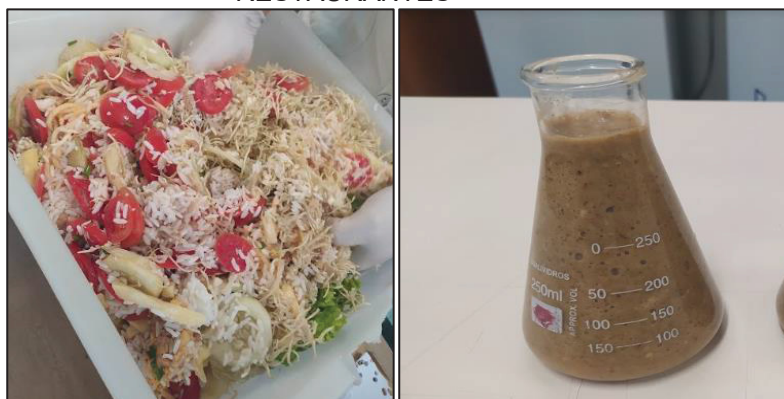
3.2.1.1 Produtos químicos

Hidróxido de sódio P.A. (NaOH), acetato de Sódio P.A. (CH₃COONa) foram adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil). Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) e fosfato de potássio (KH₂PO₄) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2.1.2 Matéria prima

O resíduo sólido utilizado para a realização da pesquisa foi a fração orgânica (arroz, feijão, macarrão, casca de frutas, legumes e proteínas) proveniente de atividades de restaurante próximo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Centro Politécnico (Curitiba, Brasil). Após o recebimento, o resíduo alimentar foi moído em um moinho de facas por 30 segundos, para obter uma amostra homogênea no padrão de 10 *mesh* (2 mm). A FIGURA 10 apresenta o resíduo sólido de restaurante (resíduo de alimentos) e padronizado para os experimentos.

FIGURA 10 - PADRONIZAÇÃO DA FRAÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUO SÓLIDO DE RESTAURANTES



FONTE: Autor (2022)

3.2.2 Planejamento experimental e preparo da biodigestão

Os experimentos contaram com 4 tipos de reagentes químicos mais usados para o controle de pH na biodigestão de resíduo de alimentos (GONÇALVES, 2014; DE OLIVEIRA, 2016; PRAMANIK *et al.*, 2019). Sendo hidróxido de sódio P.A. (NaOH), acetato de Sódio P.A. (CH₃COONa), bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) e fosfato de potássio (KH₂PO₄) na concentração de 2 mol·L⁻¹ (CH₃COONa), 1 mol·L⁻¹ (NaHCO₃), 1 mol·L⁻¹ (KH₂PO₄) e 2 mol·L⁻¹ (NaOH) no biodigestor. Assim, o planejamento para o controle de pH envolveu a realização de 15 experimentos com triplicatas (conforme TABELA 16), utilizando frascos de 100 mL, conforme ilustrado na FIGURA 11.

TABELA 16- CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O CONTROLE DE pH NA BIODIGESTÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS (CARGA ORGÂNICA; VOLUME DE TRABALHO; RESÍDUO ALIMENTAR; E REAGENTE QUÍMICO NEUTRALIZADOR)

Ensaio	Carga orgânica (g SV·L ⁻¹)	Volume de trabalho (mL)	Resíduo Alimentar (g)	Reagente químico neutralizador (mol·L ⁻¹)
Controle	35,00	60,00	11,00	0,00
CH ₃ COONa	35,00	60,00	11,00	2,00
NaHCO ₃	35,00	60,00	11,00	1,00
KH ₂ PO ₄	35,00	60,00	11,00	1,00
NaOH	35,00	60,00	11,00	2,00

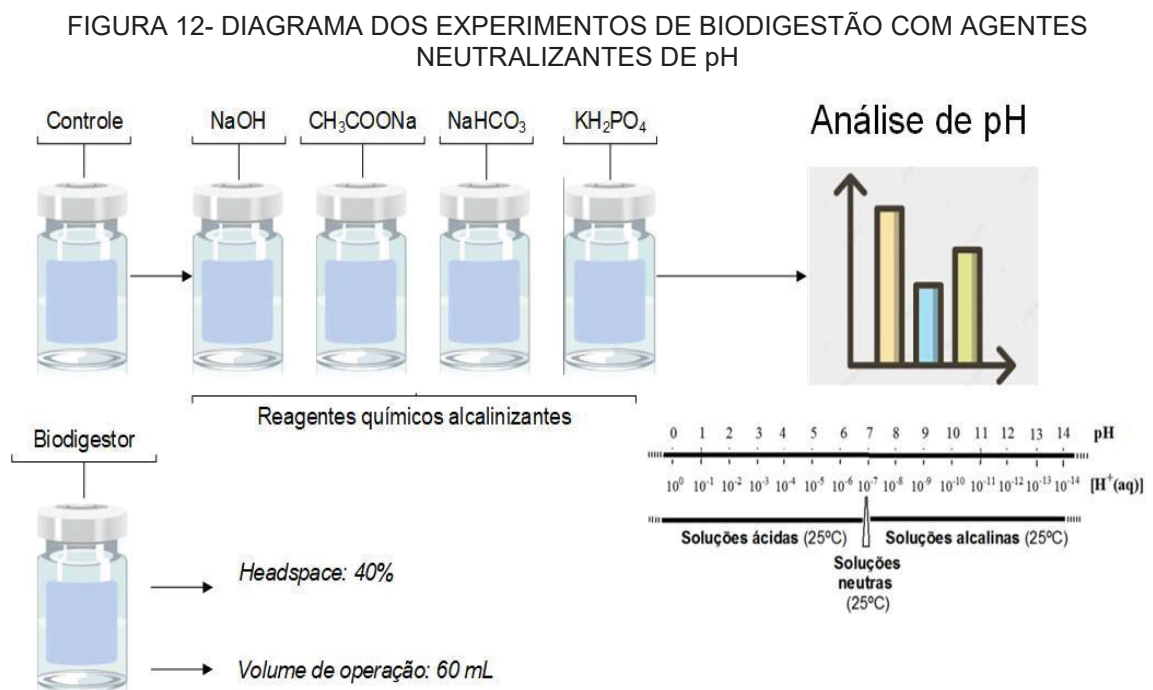
FIGURA 11- DEMONSTRAÇÃO DOS BIODIGESTORES EM FRASCOS DE 100 mL COM RESÍDUO SÓLIDO DA FRAÇÃO ORGÂNICA (RESÍDUO ALIMENTAR) + SUA MONTAGEM



FONTE: Autor (2022)

A condição experimental consistiu no uso de frascos de vidro de 100 mL com adição de resíduos orgânicos (alimentos triturados) com volume operacional de 60 mL. Os reagentes químicos controlador de pH foram adicionados individualmente e condicionando os sistemas em pH_{inicial} = 6,00 ± 0,5, o qual foi ajustado diariamente durante a fase hidrolítica do processo (7 dias). Os experimentos foram realizados em

triplicata, consistindo em 4 testes com adição de reagentes químicos e um teste controle sem adição, com duração de 30 dias de processo com temperatura controlada $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FIGURA 12). Os dados monitorados foram o pH do sistema de biodigestão de cada ensaio por um pHmetro (modelo:LUCA-210), durante os 30 dias de produção, apresentados como médias \pm desvio-padrão ($n = 3$) pelo método de acordo com IAL, Normas Analíticas (2008).



FONTE: Autor (2022)

3.2.3 Análise estatística

Para verificação da normalidade, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado, sendo que a homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de Levene (≥ 3 amostras). A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada em conjunto com o teste de Fisher para verificar as diferenças estatísticas $n < 0,05$, para os tampões em análise. Utilizou-se o Software STATISTICA 10 (Statsoft, EUA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios \pm desvio-padrão dos pH's, para o processo de biodigestão estão disponíveis na TABELA 17. É possível observar que foi constatada diferença

altamente significativa ($p < 0,001$) para o potencial hidrogeniônico (pH) em todas as horas de processo. Sendo que os valores de pH variaram de $3,85 \pm 0,14$ no período de 750h para a amostra “controle” até o valor médio máximo analisado de $6,17 \pm 0,09$ no período de 72 h para amostra que continha NaOH.

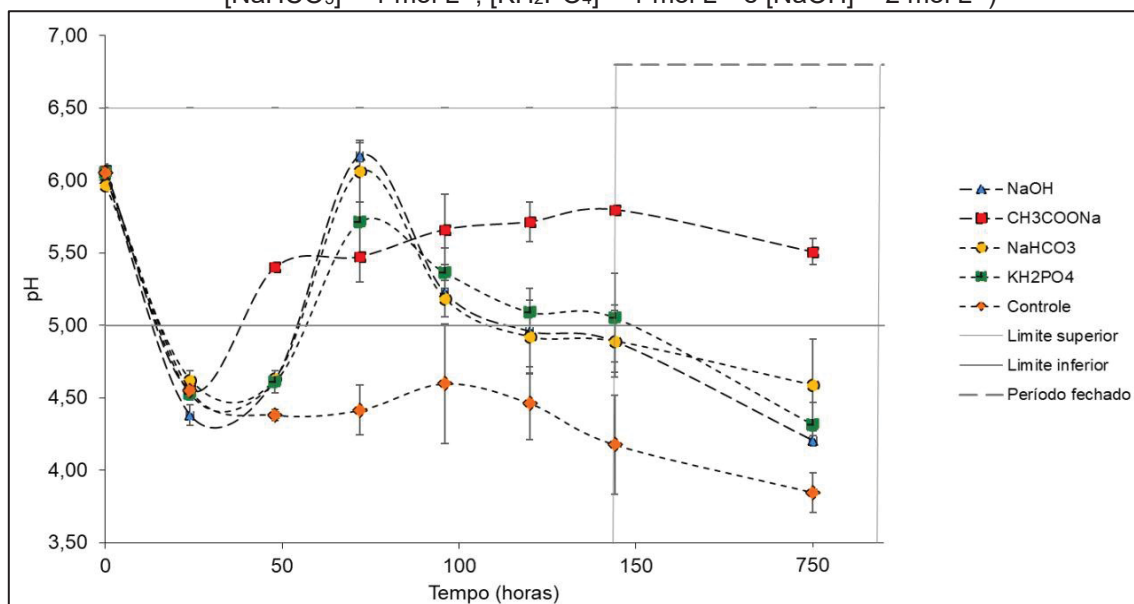
TABELA 17- VALORES MÉDIOS \pm DESVIOS DE pH DO PROCESSO (HORAS) DE BIODIGESTÃO DE RESÍDUO SÓLIDO DA FRAÇÃO ORGÂNICA COM REAGENTES ALCALINIZANTES

Ensaio	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	750 h
NaOH	$4,38 \pm 0,07^c$	$4,63 \pm 0,02^b$	$6,17 \pm 0,09^a$	$5,23 \pm 0,03^b$	$4,96 \pm 0,30^b$	$4,89 \pm 0,21^b$	$4,21 \pm 0,03^c$
CH ₃ COONa	$4,55 \pm 0,02^{ab}$	$5,40 \pm 0,02^a$	$5,47 \pm 0,01^c$	$5,66 \pm 0,24^a$	$5,71 \pm 0,14^a$	$5,80 \pm 0,02^a$	$5,51 \pm 0,09^a$
NaHCO ₃	$4,62 \pm 0,07^a$	$4,63 \pm 0,02^b$	$6,06 \pm 0,22^{ab}$	$5,18 \pm 0,13^b$	$4,92 \pm 0,25^b$	$4,89 \pm 0,25^b$	$4,59 \pm 0,32^b$
KH ₂ PO ₄	$4,53 \pm 0,04^b$	$4,61 \pm 0,08^b$	$5,71 \pm 0,42^{bc}$	$5,36 \pm 0,17^{ab}$	$5,09 \pm 0,17^b$	$5,05 \pm 0,31^b$	$4,32 \pm 0,15^{bc}$
Controle	$4,55 \pm 0,05^{ab}$	$4,38 \pm 0,04^c$	$4,41 \pm 0,17^d$	$4,60 \pm 0,41^c$	$4,46 \pm 0,25^c$	$4,18 \pm 0,34^c$	$3,85 \pm 0,14^d$
p-valor (ANOVA)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ao nível de 5 % pelo teste de Fisher LSD.

No gráfico apresentado na FIGURA 13, foi observado que o CH₃COONa foi o reagente alcalinizante que demonstrou comportamento consistente dentro dos limites de resposta significativa na faixa estipulada entre 5,0 e 6,5. Em seguida, na ordem de efetividade, foram identificados o NaHCO₃, KH₂PO₄ e NaOH. O teste controle, como previsto, apresentou o menor pH final (pH inicial = $4,55 \pm 0,5$ a pH final = $3,85 \pm 0,14$ após 30 dias de processo), uma vez que não foi adicionado nenhum reagente alcalinizante nesse sistema.

FIGURA 13- PERFIL DOS VALORES DOS ENSAIOS DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) NA BIODIGESTÃO DE RESÍDUO SÓLIDO NA FRAÇÃO ORGÂNICA ([CH₃COONa] = 2 mol·L⁻¹; [NaHCO₃] = 1 mol·L⁻¹, [KH₂PO₄] = 1 mol·L⁻¹ e [NaOH] = 2 mol·L⁻¹)



Desta forma, o teste “controle” mostrou potencial para liberação de prótons de certas substâncias no sistema de biodigestão. Segundo Lopes *et al.*, (2021), essa liberação aumenta a acidez (diminuindo o pH) do meio. A acidificação é um problema importante na biodigestão de resíduos alimentares, que é frequentemente causada pelo acúmulo de ácidos graxos voláteis (CAI *et al.*, 2021). A formação de ácido voláteis e o aumento dele no sistema de biodigestão por diversos fatores (concentração de sólidos voláteis, adição de substância tóxicas, temperatura e tipos de resíduos), o pH vai reduzir o valor e a concentração de íons de hidrogênio será aumentada.

No estudo realizado por McCarty e Mckinney (1961) sobre a toxicidade dos ácidos voláteis na digestão anaeróbica, foi constatado que íons de hidrogênio apresentam efeitos tóxicos para a microbiologia do sistema. Além disso, o uso de neutralizantes à base de sais de sódio, mesmo em pH elevado e concentrações baixas, mostrou-se relativamente tóxico para a microbiota metanogênica dos biodigestores. Desta forma, sais de sódio a determinadas concentrações podem inibir o crescimento microbiano na biodigestão e afetar o metabolismo da microbiota; e conseqüentemente afetar a conversão da acetogênese e metanogênese. Segundo Pang *et al.* (2022), a atividade da enzima α -glicosidase e algumas bactérias degradadoras de carboidratos foram inibidas nos testes com NaCl, devido à sua vulnerabilidade a altas concentrações de NaCl. Além disso, a riqueza e diversidade da comunidade microbiana foram reduzidas em comparação com o teste controle.

3.4 CONCLUSÃO

Conclui-se que, com os experimentos para ajuste de pH, foi possível observar que o melhor resultado ($\text{pH} = 5,51 \pm 0,01$) foi obtido para o sistema utilizando acetato de sódio CH_3COONa na concentração de $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ como agente neutralizante, dentro da faixa de pH estabelecida neste estudo ($\text{pH} = 5$ a 6). No entanto, é importante considerar outras opções que possam manter o controle biológico do biodigestor, uma vez que sais de sódio podem ter efeitos inibidores sobre as bactérias metanogênicas. Portanto, o próximo capítulo, Capítulo 4, aborda a implementação de um controle biológico no sistema de biodigestão por meio da codigestão. Neste capítulo, foram analisados os parâmetros de desempenho do biodigestor em escala de laboratório, utilizando frascos de 100 mL.

CAPÍTULO 4 - USO DE CODIGESTOR COMO ESTABILIZANTE PARA A BIODIGESTÃO

Resumo: A biodigestão úmida de resíduos orgânicos de restaurantes, com a adição de acetato de sódio como agente neutralizante (Capítulo 3), destacou-se como uma abordagem eficaz. No entanto, é importante observar que sais de sódio podem apresentar toxicidade para as bactérias produtoras de metano (CH_4), o que pode impactar diretamente a produção de biogás. Uma alternativa para controlar o pH em um biodigestor e reduzir a formação de ácidos voláteis é a codigestão, que envolve a adição de lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) aos resíduos alimentares. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da codigestão na produção de biogás durante a biodigestão úmida, levando em consideração a neutralização química, a atmosfera inicial no espaço livre do biodigestor, a quantidade de sólidos voláteis presentes nos substratos orgânicos e o tamanho das partículas. Foram realizados quatro tipos de experimentos para avaliar o efeito do lodo, juntamente com a análise de diferentes variáveis em relação à produção de biogás e biometano ao longo de 30 dias. Os experimentos incluíram: (1) efeito neutralizante com cinco configurações experimentais (controle com apenas resíduo alimentar e água, lodo + resíduo alimentar, neutralizante químico com resíduo alimentar, acetato de sódio e água, e neutralizante químico + lodo com resíduo alimentar, acetato de sódio, lodo e água); (2) atmosfera inicial no espaço livre do biodigestor com três configurações experimentais (sem adição de gás nitrogênio - ar atmosférico, retirada de ar atmosférico do sistema e adição de nitrogênio no espaço livre do sistema); (3) granulometria com três configurações experimentais (resíduo alimentar não triturado - partículas > 2,00 mm, triturado por 30 segundos e triturado e peneirado em malha de abertura de 14 *mesh* - abertura de 1,18 mm); e (4) quantidade de sólidos voláteis com três configurações experimentais (sólidos voláteis de $7,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$, $11 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$ e $14,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados indicaram que a adição de lodo de tratamento de esgoto contribuiu para manter o pH neutro e não inibiu efetivamente a produção de biogás. A substituição do nitrogênio pelo ar atmosférico no espaço livre do biodigestor não afetou o processo de avaliação do biogás, sendo uma adição opcional. O pré-tratamento do resíduo inserido no biodigestor para determinação do tamanho de partícula (1,18 mm) contribuiu na padronização, porém, nenhum tratamento interferiu no processo de reação do biogás acumulado. A quantidade de sólidos voláteis adicionados pode afetar a biodigestão, mas os testes mostraram efeitos semelhantes para as respostas do biogás e do biometano.

Palavra-chave: Lodo ETE; *headspace*; sólidos voláteis; digestão; fração orgânica.

4.1 INTRODUÇÃO

No capítulo 3, durante a biodigestão dos resíduos orgânicos de restaurantes através da via úmida, foi observado que o pH teve um destaque significativo com a adição de acetato de sódio como agente neutralizante. No entanto segundo McCarty e Mckinney (1961) afirma que sais de sódio apresenta toxicidade para bactérias produtora de metano (CH₄) influenciando diretamente na produção de biogás.

Outra forma de realizar o controle do pH em um biodigestor e amenizar a formação de ácidos voláteis, alternativamente ao uso de meio tamponante, consiste na codigestão, por exemplo, pela adição combinada de Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) aos resíduos alimentares. Em estudo publicado por Zhang *et al.* (2021) foram analisados os efeitos de diferentes parâmetros relativos à adição de Lodo de ETE, juntamente aos resíduos alimentares, em reator de biodigestão via úmida. Nesses experimentos, os autores avaliaram: O desempenho da adição do agente inoculante; O efeito da adição de diferentes quantidades de carga orgânica; E o controle do pH reacional na produção de biometano mensurado.

A combinação de diferentes substratos orgânicos na alimentação do reator anaeróbico promove um equilíbrio entre a concentração de ácidos voláteis e o pH, permitindo o crescimento ótimo dos microrganismos (FERDES *et al.*, 2023). Essa abordagem aumenta a eficiência da digestão anaeróbica, melhorando a estabilidade do processo e a produção de biogás (ZHAN *et al.*, 2022). Portanto, a codigestão é uma tecnologia promissora para transformar resíduos orgânicos em energia renovável de forma mais eficiente e sustentável.

Considera-se importante destacar que o controle de pH foi o procedimento de maior significância para garantir a estabilidade do processo e viabilizar maior produção de biometano em condições de alta carga orgânica (PEZZOLLA *et al.*, 2017). Além disso, a estabilização do pH provocou uma seleção adaptativa de microrganismos metanogênicos e declínio da comunidade do domínio de procariontes Archaeal.

Além do controle de pH, outros parâmetros podem ser alterados para aumentar a produção de biometano em reações da biodigestão úmida. Em Motte *et al.* (2013), um estudo identificou condições ideais para a realização do processo de biodigestão, dependendo da alteração dos seguintes parâmetros: sólidos totais (ST),

granulométrico e relação substrato/inóculo (S/I). No presente trabalho, o objetivo foi avaliar seu impacto na produção de biogás durante a biodigestão úmida frente ao efeito de neutralizante químico; atmosfera inicial no *headspace* na biodigestão; quantidade de sólidos voláteis e granulometria das partículas na matéria orgânica utilizada como substrato para a produção de biogás.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

4.2.1.1 Matéria-prima (resíduo orgânico)

Os resíduos alimentares utilizados no trabalho foram gentilmente disponibilizados pelo restaurante próximo ao centro politécnico da Universidade Federal do Paraná – UFPR (Curitiba, Paraná, Brasil). Após o recebimento, o resíduo alimentar foi armazenado a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

4.2.1.2 Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE)

O lodo de ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) usado como inoculante foi disponibilizado pela CS Bioenergia (joint venture entre a SANEPAR e o Grupo Cattalini) de São José dos Pinhais - Paraná. O lodo fornecido é o produto resultante da codigestão via úmida de resíduos de frutas e verduras provenientes do CEASA (Central de Abastecimento do Paraná, Curitiba) processados juntamente com esgoto sanitário. Enquanto o lodo foi armazenado em temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) na ausência de iluminação.

4.2.1.3 Análise de sólidos no resíduo orgânico e lodo de ETE

Os resíduos alimentares (matéria orgânica) quanto ao lodo de ETE (inoculante) foram caracterizados. A TABELA 18 apresenta as características físico-químicas dos resíduos alimentares e do inoculante, respectivamente. As análises consistiram na determinação da concentração de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e umidade, tanto para base seca quanto para base úmida, determinados pelo método gravimétrico, fazendo-se uma adaptação da metodologia descrita em (APHA, AWWA e WEF, 2005; APHA, 1992; APHA, 2017).

Para sólidos totais, foi transferido de 1 a 5 g da amostra para a cápsula de porcelana, em que é colocado em um forno de 103 a 105 °C por 1 h. Após resfriado em dessecador, o processo é repetido até massa constante. O teor ST foi calculado pela equação 1.

Na determinação de sólidos fixos e voláteis, 1 a 5 g de amostra foi transferida para um forno de mufla frio, aquecido a 550 ± 50 °C e deixada por 1 h. Em sequência, resfriada em dessecador e foi repetido o procedimento até massa constante. Os teores de sólido voláteis e fixos foram calculados pelas equações 2 e 3 consecutivamente. Como as amostras constituem de material orgânico para evitar perda por redução do material, foi realizado o acendimento sobre um queimador de gás sob um exaustor.

Equações:

$$\text{sólidos totais(\%)} = \frac{(A - B). 100}{C - B} \quad (1)$$

$$\text{sólidos voláteis(\%)} = \frac{(A - D). 100}{A - B} \quad (2)$$

$$\text{sólidos fixos (\%)} = \frac{(D - B). 100}{A - B} \quad (3)$$

em que:

A = Massa final do resíduo seco + Cápsula de porcelana.

B = Massa da cápsula de porcelana.

C = Massa da amostra com umidade + Cápsula de porcelana.

D = Massa final de resíduo + Cápsula de porcelana após resfriado.

TABELA 18- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO RESÍDUO ALIMENTAR E LODO PARA ST, SV, SF E UMIDADE

Análises	Resíduo orgânico (RSU)		Lodo (ETE)	
	Base úmida	Base seca	Base úmida	Base seca
ST (%)	21,50	100,00	4,30	100,00
SV (%)	19,00	92,39	2,57	59,81
SF (%)	2,00	7,61	1,73	40,19
Umidade (%)	79,00	0,00	95,70	0,00

ST= Sólidos totais, SV= Sólidos voláteis, SF= Sólidos Fixos.

4.2.1.4 Contagem de microrganismos do resíduo com matéria orgânica e no lodo de ETE

A contagem de microrganismos foi realizada no resíduo alimentar com ágar *Brain Heart infusion* (BHI) e ágar padrão de contagem (PCA) com o método de aplicação em profundidade (*Pour-Plate*). A TABELA 19 mostra os valores estimados referentes das células viáveis no resíduo alimentar.

TABELA 19- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO RESÍDUO ALIMENTAR

Resíduo	Meio de crescimento de microrganismo	
	BHI	PCA
Resíduo alimentar	<1,00 x10 ⁵ (est.) UFC·mL ⁻¹	<1,00 x10 ⁵ (est.) UFC·mL ⁻¹

A contagem de microrganismos foi realizada no lodo de ETE proveniente da codigestão anaeróbica em via úmida de resíduo alimentar de frutas e verduras com ágar (BHI, PDA e MRS) utilizando o método de aplicação em profundidade. A TABELA 20 apresenta a contagem de células viáveis totais no lodo estabilizado e enriquecido, com 3 meios de cultura. Para o isolamento dos microrganismos realizou-se o enriquecimento do lodo em meios de cultura na forma de caldos e contagem em ágar específicos: a) *Brain Heart Infusion* (BHI); b) *Potato Dextrose Broth, Potato Dextrose Agar* (PDA) e c) ágar *De Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) apresentados na TABELA 20 na proporção de 2,5g de lodo para 25 g de meios de cultura (previamente esterilizado) incubados a 35 °C por 24 h.

TABELA 20- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NO LODO ESTABILIZADO E ENRIQUECIDO COM CALDOS NUTRIENTES: PCA, BHI E MRS. AMOSTRA DE LODO DISPONIBILIZADO POR CSBIOENERGIA (LODO DE ETE PROVENIENTE DA CODIGESTÃO ANAERÓBICA EM VIA ÚMIDA DE RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS DO CEASA DE CURITIBA-PR E ESGOTO SANITÁRIO)

Valores estimados	PCA (UFC·mL ⁻¹)	BHI (UFC·mL ⁻¹)	MRS (UFC·mL ⁻¹)	média total (UFC·mL ⁻¹)
Lodo enriquecido*	1,21 x10 ⁸ (est.)	7,39 x10 ⁸ (est.)	1,87 x10 ⁸ (est.)	3,49 x10 ⁸ (est.)
Lodo estabilizado**	1,14 x10 ⁶ (est.)	1,19 x10 ⁶ (est.)	6,50 x10 ⁴ (est.)	7,98 x10 ⁵ (est.)

*Lodo enriquecido, material enriquecimento em caldo nutriente.

**Lodo estabilizado, material conservado em condições ambientes (25 °C ± 4 °C).

4.2.2 Ensaios de biodigestão com resíduo orgânico + lodo de ETE

De modo a verificar os efeitos do lodo de ETE como codigestor na via úmida, foram realizados 4 tipos de experimentos, visando avaliar o efeito do lodo em conjunto com a análise de diferentes variáveis frente as respostas de biogás e biometano

produzido em 30 dias. Nesse sentido, foram realizados os seguintes ensaios: efeito neutralizante; atmosfera inicial no *headspace* na biodigestão; granulometria e quantidade de sólidos voláteis.

A carga orgânica relacionada a proporção de resíduo alimentar adicionada em cada ensaio, foi calculada com base nas Equações 4 e 5, em que contabiliza a quantidade adequada de gramas de sólidos voláteis e massa de resíduo adicionada em cada teste. A massa de sólidos voláteis a ser adicionada no sistema é calculada pela Equação 4.

Equações:

$$m_{SV} = C_{SV} \cdot V_{\text{útil}} \quad (4)$$

em que:

m_{SV} : Massa de sólidos voláteis adicionadas ao sistema (g SV).

C_{SV} : Concentração de sólidos voláteis do sistema (g SV·L⁻¹).

$V_{\text{útil}}$: Volume útil do sistema (L).

A partir da massa de sólidos voláteis, calcula-se a massa de resíduo alimentar a ser adicionada ao sistema por meio da Equação 5.

$$m_{RA} = \frac{m_{SV}}{X_{SV}} \quad (5)$$

em que:

m_{RA} : Massa de resíduo alimentar adicionada ao sistema (g).

X_{SV} : Fração de sólidos voláteis presentes no resíduo alimentar.

Os experimentos foram realizados em triplicata em frascos de 100 mL, com volume de operação de 60 mL. Após finalizado a montagem de cada sistema, os frascos foram incubados em estufa a 35 °C (± 2 °C).

4.2.2.1 Ensaio com reagente neutralizante + lodo de ETE

Conforme observado no CAPÍTULO 3, o efeito neutralizante desempenha um papel crucial no controle do pH durante a biodigestão, destacando sua importância no sistema. Dessa forma, esse experimento propõe avaliar o desempenho do lodo de ETE em comparação ao uso do reagente químico acetato de sódio. Na TABELA 21, encontram-se as configurações utilizadas nos experimentos, nos quais foram utilizados: o Controle (apenas resíduo alimentar e água), lodo + resíduo alimentar, neutralizante químico (resíduo alimentar, acetato de sódio e água) e neutralizante químico + lodo (resíduo alimentar, acetato de sódio, lodo e água). Para cada teste, foram definidos inicialmente a carga orgânica ($\text{gSV}\cdot\text{L}^{-1}$), volume de trabalho de 60 mL, volume de inóculo utilizado (mL), massa de resíduo alimentar (g) e volume utilizado de reagente químico acetato de sódio (mL). O acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) utilizado foi na concentração de $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com pH de 8,30.

TABELA 21- CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE BIODIGESTÃO COM LODO E NEUTRALIZANTE QUÍMICO

Ensaio	COA ($\text{g SV}\cdot\text{L}^{-1}$)	Lodo (mL)	RA (g)	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (mL)
Resíduo (Controle)	35,00	0,00	10,57	0,00
Resíduo + acetato de sódio	35,00	0,00	10,57	22,00
Resíduo + lodo	35,00	48,00	10,57	0,00
Resíduo + lodo + acetato de sódio	35,00	48,00	10,57	7,50

COA = Carga orgânica total adicionada.

SV: Sólidos Voláteis.

RA = Resíduo alimentar.

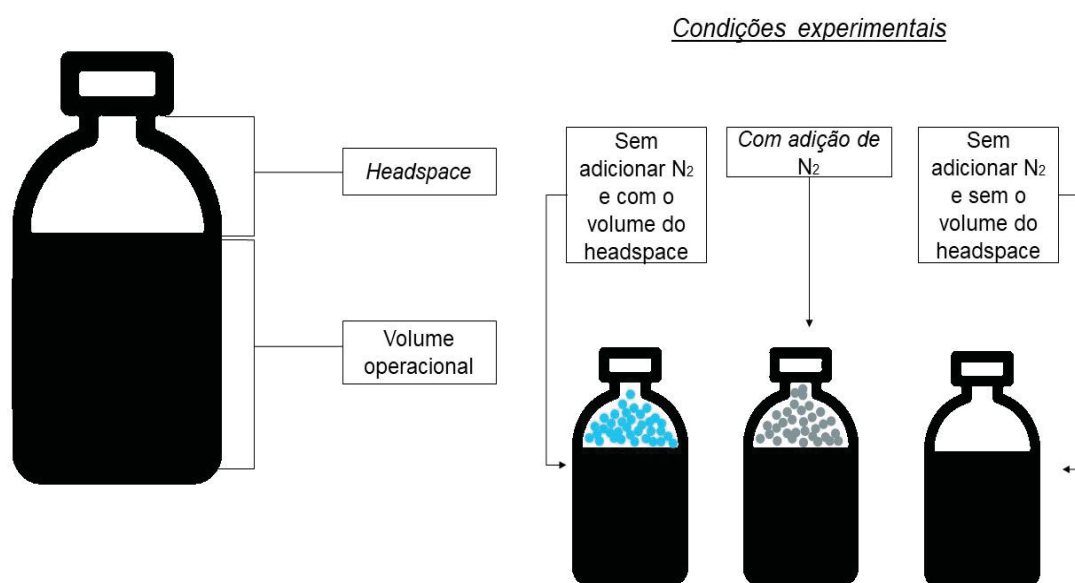
A quantidade de biogás produzida nas diferentes composições foi analisada, a fim de avaliar quantitativamente e qualitativamente o biogás formado, bem como o percentual de biometano pelo método de percentual de CO_2 no biogás pelo ALFAKIT (EMBRAPA) e por diferença o percentual de CH_4 . Os valores de pH dos sistemas foram monitorados nos tempos de 0, 15 e 30 dias com pHmetro eletrônico.

4.2.2.2 Ensaio da atmosfera inicial no *headspace* na biodigestão

Na maioria dos estudos sobre biodigestão na via úmida, a atmosfera inicial do sistema é dada por atmosfera inerte normalmente utilizando gás nitrogênio (N_2). Com o objetivo de analisar a influência da atmosfera inicial na produção de biogás, foi conduzido um estudo no qual foram adotadas três condições: 1) atmosfera inicial composta apenas por ar atmosférico (sem adição de gás nitrogênio); 2) ausência

completa de ar atmosférico (volume removido do sistema por meio de uma seringa), e; 3) adição de nitrogênio no espaço livre do sistema (conforme ilustrado na FIGURA 14).

FIGURA 14- DIAGRAMA DOS EXPERIMENTOS DE BIODIGESTÃO NO *HEADSPACE* (COM E SEM ADIÇÃO DE N₂)



FONTE: Autor (2022).

A porção de sólidos voláteis (SV), em relação ao resíduo (7,5 gSV·L⁻¹), foi padronizado para a realização desse experimento, bem como a quantidade de lodo de ETE nos ensaios. Nesse caso, a variação entre os experimentos ocorreu no preenchimento do *headspace*, no qual foi ocupado por: ar atmosférico ou ausência de ar ou N₂.

Em cada experimento, foram definidos, inicialmente, a carga orgânica (gSV·L⁻¹), o volume de inóculo utilizado (mL), a massa de resíduo alimentar (g) e o gás ocupado no *headspace*, identificados na TABELA 22.

TABELA 22- ENSAIO DE OCUPAÇÃO DO *HEADSPACE*: SEM ADIÇÃO DE N₂, COM VOLUME DO *HEADSPACE*; COM ADIÇÃO DE N₂; SEM ADIÇÃO DE N₂, SEM VOLUME DO *HEADSPACE* NAS PRIMEIRAS 24h DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO

Ensaio	COA (g SV·L ⁻¹)	Lodo (mL)	RA (g)	<i>Headspace</i>
Resíduo + Lodo	7,50	48,00	2,06	Sem adição de N ₂ , com volume do <i>headspace</i>
Resíduo + Lodo	7,50	48,00	2,06	Com adição de N ₂
Resíduo + Lodo	7,50	48,00	2,06	Sem adição de N ₂ , sem volume do <i>headspace</i>

COA = Carga orgânica total adicionada.

SV: Sólidos Voláteis. RA = resíduo alimentar.

Obs.: O *Headspace* corresponde a 40 % do volume do biodigestor.

A quantidade de biogás produzida nas diferentes composições foi analisada, quanto ao volume de biometano pelo método de percentual de CO₂ (ALFAKIT, EMBRAPA) e por diferença de CH₄.

4.2.2.3 Ensaio de granulometria do resíduo orgânico + lodo de ETE

Os experimentos de biodigestão foram conduzidos em três distintas granulometrias do resíduo alimentar mais adição de lodo (ETE). Na FIGURA 15 e na TABELA 23 estão apresentados o resíduo alimentar não triturado (partículas > 2,00 mm), o triturado durante 30 segundos, o triturado (partículas > 2,00 mm), e o peneirado em malha de abertura de 14 *mesh* (abertura 1,18 mm).

FIGURA 15- ENSAIO DE GRANULOMETRIA NO RESÍDUO ALIMENTAR NÃO TRITURADO E TRITURADO (30 SEGUNDOS) E PASSADO EM PENEIRA A 14 *mesh*



FONTE: Autor (2022).

TABELA 23- ENSAIO DE GRANULOMETRIA NO RESÍDUO ALIMENTAR NÃO TRITURADO E TRITURADO (30 SEGUNDOS) E PASSADO EM PENEIRA A 14 *mesh*.

Ensaio	Granulometria	Controle de pH	Volume de lodo (mL)	RA (g)	Head space
A	Não triturado	Não	48,00	2,06	Ar atmosférico
B	Triturado 30s	Não	48,00	2,06	Ar atmosférico
C	14 <i>mesh</i>	Não	48,00	2,06	Ar atmosférico

RA = Resíduo alimentar

4.2.2.4 Ensaio da quantidade de sólidos voláteis na biodigestão

Segundo Zhang *et al.* (2021), a quantidade de sólidos voláteis presentes no sistema influencia na produção de biogás, uma vez que estão relacionados à massa de substrato que se converte em gás durante o processo de biodigestão. Tendo isso em vista, o experimento segue a proporções de sólidos voláteis de: 7,5 gSV·L⁻¹, 11 gSV·L⁻¹ e 14,5 gSV·L⁻¹, (TABELA 24). O volume de trabalho foi de 60 mL com um *headspace* de ar atmosférico.

TABELA 24- ENSAIOS DE SÓLIDOS VOLÁTEIS UTILIZANDO CARGAS ORGÂNICAS DE RESÍDUOS ALIMENTARES NAS CONCENTRAÇÕES DE 7,50; 11,00 E 14,50 gSV·L⁻¹

Ensaio	COA (g SV·L ⁻¹)	Lodo (mL)	RA (g)	Headspace
Resíduo + Lodo	7,50	48,00	2,06	Sem adição de N ₂ , com volume do <i>headspace</i>
Resíduo + Lodo	11,00	48,00	3,04	Sem adição de N ₂ , com volume do <i>headspace</i>
Resíduo + Lodo	14,50	48,00	4,00	Sem adição de N ₂ , com volume do <i>headspace</i>

COA = Carga orgânica total adicionada.

SV: Sólidos Voláteis.

RA = Resíduo alimentar.

4.2.3 Análise do biogás

A quantidade de biogás foi determinada por meio da retirada dos volumes produzidos nos biodigestores com o auxílio de uma seringa de vidro (20 mL), com erro $\pm 4 \%$ (ARTICLASS, Itália), e de válvulas (3) acopladas no sistema.. Quanto ao percentual de biometano no biogás, foi realizado pelo método de captura de CO₂ em solução alcalina de hidróxido de sódio a 2 mol·L⁻¹ (EMBRAPA, 2021). Os ensaios foram realizados em temperatura controlada de 35 °C (± 2 °C). Os elementos presentes no kit de análise de biogás estão apresentados na FIGURA 16.

FIGURA 16- KIT DE ANÁLISE DE BIOGÁS ALFAKIT (A) E MODELO DE VERIFICAÇÃO DE BIOGÁS (B)



FONTE: ALFAKIT (2022).

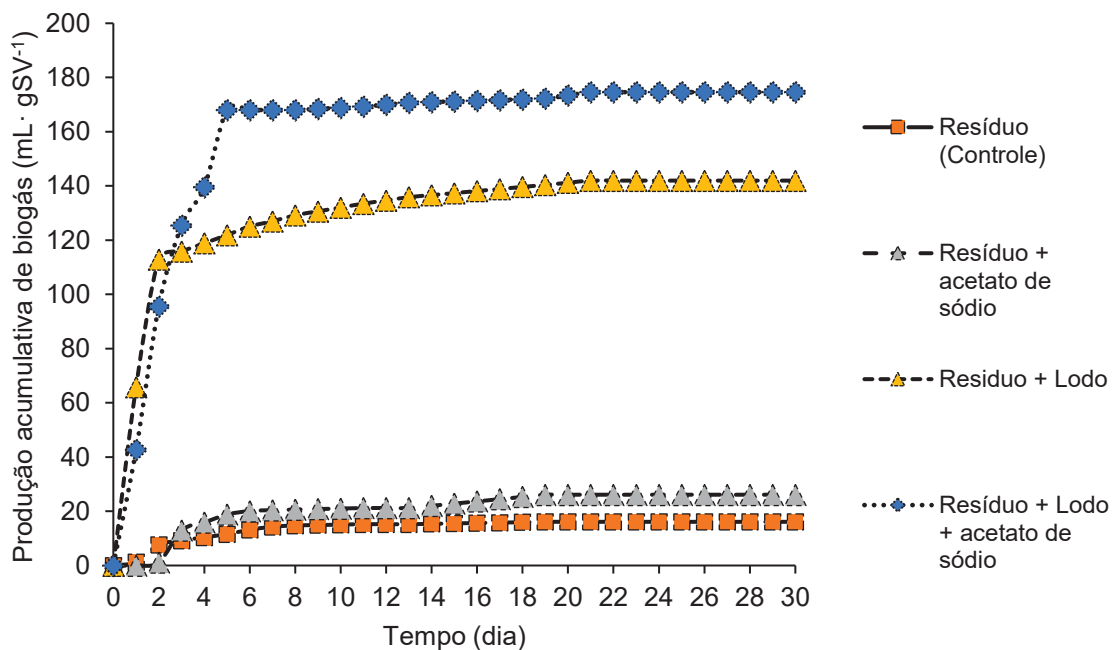
4.2.4 Análise estatística descritiva

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio-padrão. Para comparar as variáveis respostas, foram checadas a normalidade e homoscedasticidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene (≥ 3 amostras) respectivamente. Análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada em conjunto com o pós teste de Fisher para verificar as diferenças estatísticas $n < 0,05$. Utilizou-se o Software STATISTICA 10 (Statsoft, EUA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seguir são apresentados resultados dos testes do processo de codigestão em via úmida (batelada) sem alimentação durante 30 dias de processo. O perfil de produção acumulada biogás ($\text{mL}\cdot\text{gSV}^{-1}$) do resíduo alimentar (controle), resíduo alimentar + acetato de sódio, resíduo alimentar + lodo (codigestão), resíduo + lodo (codigestão tamponada) + acetato de sódio estão apresentados na FIGURA 17.

FIGURA 17- PERFIL DE PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOGÁS ($\text{mL}\cdot\text{gSV}^{-1}$) PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO; RESÍDUO + ACETATO DE SÓDIO; RESÍDUO + LODO; E RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO (DURANTE 30 DIAS; 35°C)



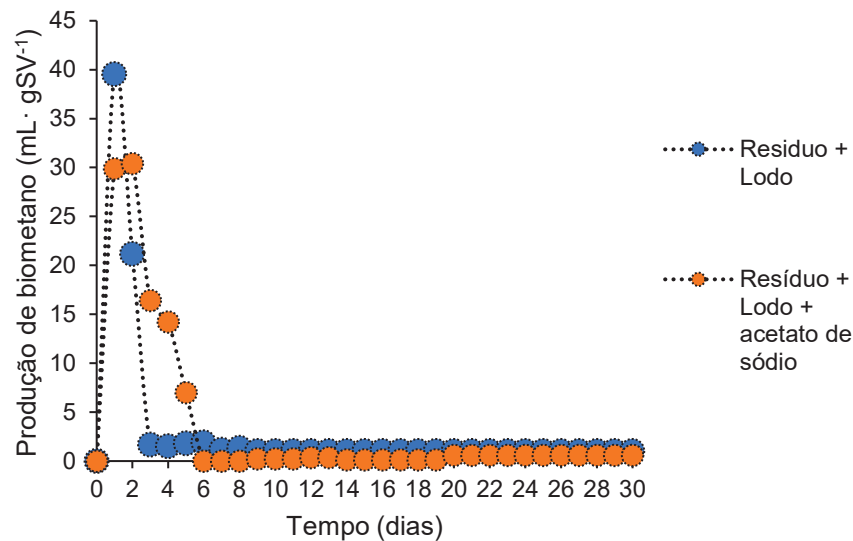
Com a análise dos resultados apresentados na FIGURA 17, pode-se verificar uma rápida estagnação na produção de biogás para todos os ensaios propostos. A partir do dia 5, todos os experimentos demonstraram redução significativa na produção de biogás. Entretanto, pode-se observar a importância da presença do lodo com relação a maior produção acumulativa de biogás de $175 \pm 10 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$, em que o ensaio que continha lodo e acetato de sódio foi superior aos que não continha. A relação do pH inicial e final do processo, que indica a necessidade da utilização de lodo para o processo de biodigestão de resíduo alimentar, está demonstrada na TABELA 25. O lodo pode ambientalizar o sistema e manter sua comunidade microbiana metanogênica entre pH neutro 7. Pode-se analisar que, mesmo com a adição de acetato de sódio na ausência de lodo, a medição do sistema atinge pH de neutralidade em 30 dias de processo ($7,46 \pm 0,08$) apresenta baixa produtividade de biogás.

TABELA 25- VALORES DE pH INICIAL E FINAL DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO VIA ÚMIDA PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO; RESÍDUO + ACETATO DE SÓDIO; RESÍDUO + LODO; E RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO (DURANTE 30 DIAS; 35 °C)

Ensaio	pH inicial	pH final
Resíduo (Controle)	$6,70 \pm 0,09$	$3,26 \pm 0,04$
Resíduo + acetato de sódio	$7,40 \pm 0,07$	$7,46 \pm 0,08$
Resíduo + Lodo	$7,67 \pm 0,16$	$7,42 \pm 0,07$
Resíduo + Lodo + acetato de sódio	$7,57 \pm 0,06$	$7,59 \pm 0,09$

A fim de analisar os dados da produção diária de biometano ao longo de um período de 30 dias, foram considerados apenas os ensaios que incluíam a adição de lodo de ETE, uma vez que não houve formação de volume suficiente para análises nos demais ensaios. Assim, o comportamento da produção de biometano nos ensaios "Resíduo + lodo" e "Resíduo + lodo + acetato" está apresentado na FIGURA 18.

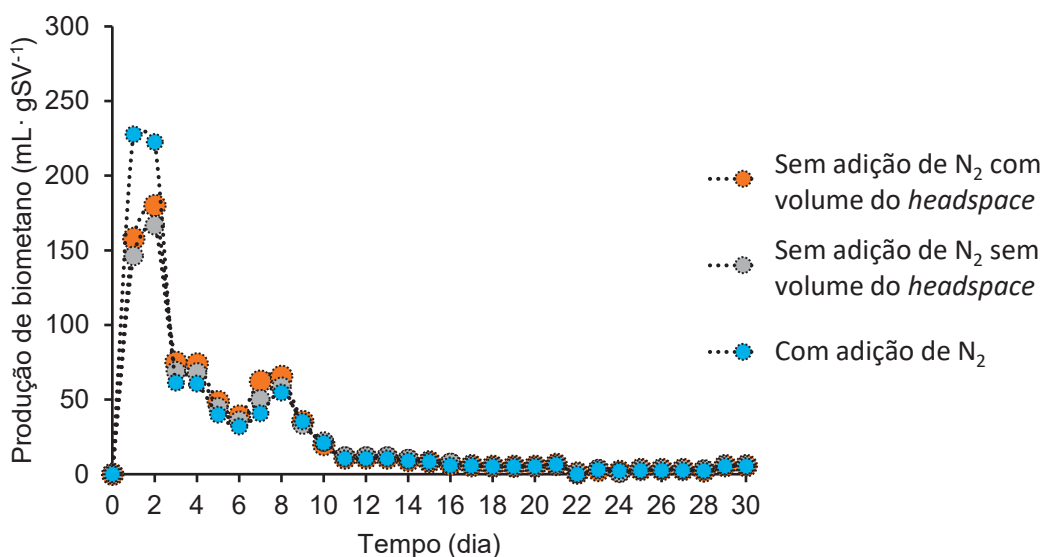
FIGURA 18- COMPORTAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO EM 30 DIAS DE PROCESSO PARA OS ENSAIOS DE RESÍDUO + LODO; RESÍDUO + LODO + ACETATO DE SÓDIO, (35 °C)



Os ensaios demonstraram redução total da sua produção de biometano a partir do 6º dia estagnando para o valor de 0 mL·gSV⁻¹. O volume total de biometano produzido para os ensaios “Resíduo + lodo” e “Resíduo +lodo + acetato” foram 92 e 107 mL·gSV⁻¹, respectivamente.

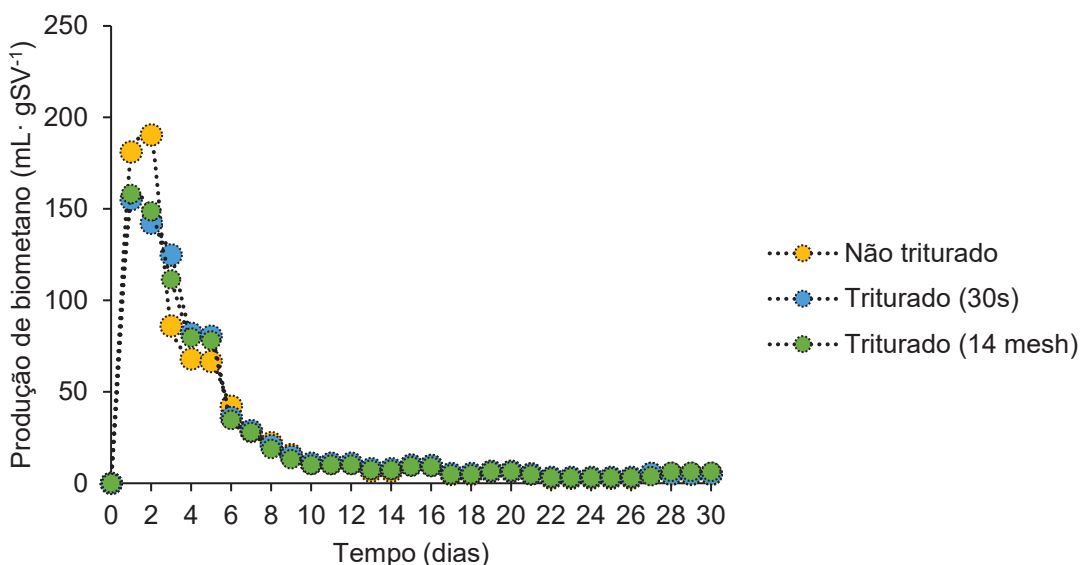
Os valores referentes ao ensaio da influência da atmosfera inicial, durante o processo de biodigestão, estão demonstrados em gráfico na FIGURA 19. A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se verificar o comportamento semelhante para as três condições atmosféricas iniciais preestabelecidas. O perfil demonstra que a diferença entre os ensaios se dá apenas nas primeiras 48 h de processo, sendo valores superiores de 20 a 30 % do volume produzido para as amostras que controlava o *haedspace* com adição N₂. Todos os ensaios apresentaram estagnação da produção de biometano, a partir do 10 dia de processo. No entanto, os valores acumulados de biometano foram 906 ± 42 mL·gSV⁻¹ (com adição de N₂); 874± 30 mL·gSV⁻¹ (sem adição de N₂, com volume do *haedspace*) e 818 ± 24 mL·gSV⁻¹ (sem adição de N₂, sem volume do *haedspace*) não diferenciando estatisticamente p<0,05.

FIGURA 19- PERFIL DIÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO DURANTE 30 DIAS DE PROCESSO (SEM N₂ + HEADSPACE; SEM N₂ + SEM HEADSPACE; COM N₂), TEMPERATURA DO PROCESSO DE 35 °C



Os valores de desempenho do pré-tratamento mecânico em amostras conservadas em condições iguais de temperatura e carga orgânica de 7,5 gSV · L⁻¹ estão apresentados na FIGURA 20. Nesta figura, é possível observar a variação de granulometria nos três ensaios realizados: não triturado (resíduo alimentar íntegro), triturado (30 segundos em processador) e triturado (classificado em ≤ 14 *mesh* 1,18 mm).

FIGURA 20- PRODUÇÃO DE METANO PÓS-TRATAMENTO MECÂNICO EM TRÊS DIFERENTES GRANULOMETRIAS: NÃO TRITURADO, TRITURADO 30s (PROCESSADOR) E TRITURADO (CLASSIFICADO ≤ 14 *mesh* 1,18 mm) DURANTE 30 DIAS A 35 °C



Os valores de biometano não diferenciaram estatisticamente $p < 0,05$. Porém, para o estudo de Motte *et al.* (2013), em relação à granulometria, as frações mais finas testadas aumentam o potencial de acúmulo de ácido graxo voláteis (AGV) e induzem a uma falha do sistema. Isso porque, em frações finas (menores granulometrias), há presença de maior fração solúvel comparada a frações médias e maiores, que devido a maior acessibilidade são facilmente degradadas.

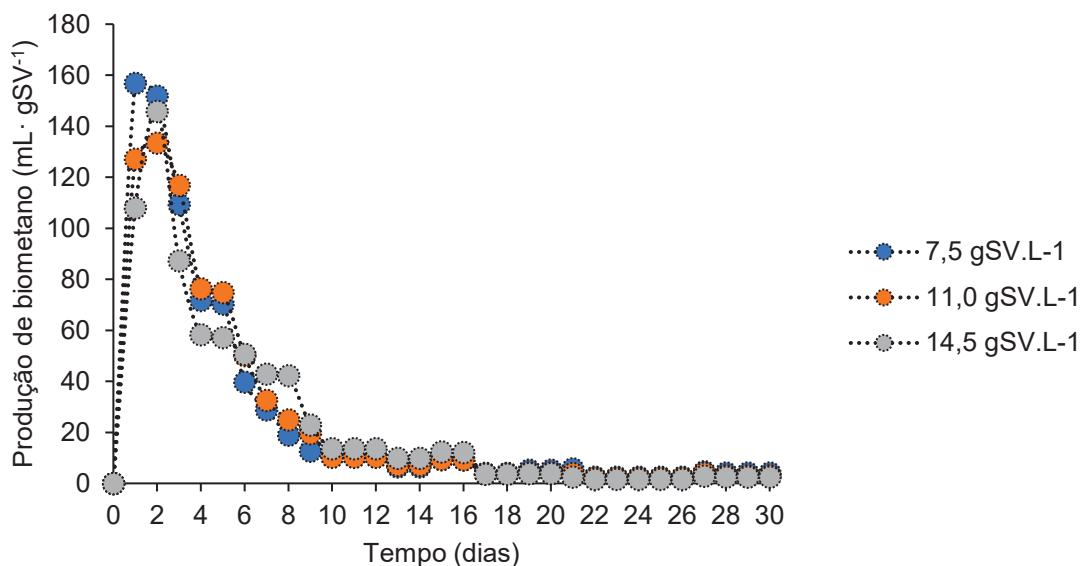
Até o 6º dia, os processos conduzidos com menores granulometrias por metabolizarem mais rapidamente produtos fermentativos produziram elevadas concentrações de compostos inibidores, no qual afetam microrganismos metanogênicos diminuindo a produção de biogás em comparação a maior granulometria (não triturado).

Devido à baixa razão s/x (substrato/inóculo), a estabilidade ao longo dos dias ocorreu pela quantidade de microrganismos presente no lodo e a adaptação da microbiota as condições experimentais. A microbiota, após o 6º dia de experimento, foi capaz de degradar os AGV e os demais produtos fermentativos relacionados à fração solúvel, mantendo semelhante a produção de metano nas diferentes granulometrias.

O consumo de oxigênio leva à criação de condições anaeróbias, resultando no rápido crescimento de microrganismos fermentativos e anóxicos que substituem os organismos aeróbios. Esses microrganismos produzem gases com odores desagradáveis, como resultado da redução de sulfatos em H_2S e a conversão de nitratos em nitrito e amônia. Além disso, ocorre a produção de metano e mercaptanas (LE BORGNE e BAQUERIZ, 2019).

A quantidade de SV no sistema de biodigestão influencia diretamente na produção de biogás, uma vez que relaciona a massa de substrato que se converte em gás durante o processo na faixa de 30 a 45 $gSV \cdot L^{-1}$ (ZHANG *et al.*, 2021). Assim, na FIGURA 21, encontram-se os resultados de produção de biometano (CH_4) para as quantidades de sólidos voláteis abaixo de 30 $gSV \cdot L^{-1}$; Sendo: 7,5 $gSV \cdot L^{-1}$, 11 $gSV \cdot L^{-1}$ e 14,5 $gSV \cdot L^{-1}$.

FIGURA 21- PERFIL DIÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIOMETANO DURANTE 30 DIAS DE PROCESSO (35 °C) PARA AS CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS VOLÁTEIS DE 7,5 gSV·L⁻¹, 11 gSV·L⁻¹ e 14,5 gSV·L⁻¹



Observa-se, na FIGURA 21, que houve um pico de produção de metano no primeiro dia para os sistemas em batelada por via úmida com 7,5 gSV·L⁻¹, produzindo em média 157 mL de biometano. Já os sistemas com 11,0 gSV·L⁻¹ e 14,5 gSV·L⁻¹ atingiram a produção máxima no segundo dia, com produção de 133 mL·gSV·L⁻¹ e 146 mL·gSV·L⁻¹ de biometano, respectivamente. Os ensaios utilizando 7,5 gSV·L⁻¹ resultaram em um maior valor de produção acumulada média de biometano em 1091 ± 20 mL·gSV⁻¹; porém, não apresentaram diferença significativa p>0,05, mostrando que os ensaios apresentaram a mesma taxa conversão. Quando é avaliado apenas o mL acumulativo de biogás, os resultados destacam o ensaio que adicionou maior quantidade de resíduo na faixa trabalhada (2g a 4g). Conseqüentemente, correspondendo ao ensaio de 14,5 gSV·L⁻¹ com 900 mL produzido em 30 dias de processo, permitindo trabalhar com maior quantidade de sólidos.

4.4 CONCLUSÕES

Em termos gerais, este estudo permitiu selecionar os parâmetros do sistema de biodigestão para a codigestão utilizando frascos de vidro de 100 mL. Além disso, demonstrou o perfil da produção de biogás e biometano considerando a adição de neutralizantes, alterações na atmosfera inicial, tamanho de partícula e quantidade de sólidos voláteis. Conclui-se que o lodo de tratamento de esgoto ajuda a manter o valor

do pH neutro e não inibe efetivamente a produção de biogás. A substituição do N₂ pelo ambiente *headspace* não afetou o processo de avaliação do biogás ao longo de 30 dias, sendo sua adição opcional. O pré-tratamento do resíduo antes de ser inserido no biodigestor, com a determinação do tamanho de partícula de 1,18 mm, contribuiu para sua padronização. No entanto, nenhum pré-tratamento teve interferência significativa no processo de produção de biogás ao longo de 30 dias. Embora a quantidade de sólidos voláteis adicionados possa afetar a biodigestão, os testes realizados mostraram efeitos semelhantes nas respostas de produção de biogás e biometano.

Após estabelecer os parâmetros da biodigestão neste capítulo, o capítulo seguinte (Capítulo 5) concentrou-se no isolamento de grupos microbianos e na investigação de sua interação com enzimas, com o objetivo de aprimorar a produção de biogás e biometano ao longo de um período de 10 dias de processo.

CAPÍTULO 5- PRÉ-SELEÇÃO DE GRUPOS MICROBIANOS E ENZIMAS ISOLADAS USANDO A FERRAMENTA ESTATÍSTICA PLACKETT-BURMAN PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE BIOGÁS E BIOMETANO²

Resumo: Os microrganismos, como fungos e bactérias, são capazes de crescer no meio da biodigestão, transformando a fração orgânica do resíduo em nutrientes e biogás (CH₄ e CO₂). O mecanismo de degradação da matéria orgânica pelas bactérias baseia-se, sobretudo, na produção de enzimas, moléculas que catalisam reações bioquímicas. A hidrólise, etapa limitante do processo de biodigestão, pode ser definida como a fase em que macromoléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas, lipídeos e outros compostos orgânicos, são convertidas em moléculas solúveis menores. A atividade das comunidades microbianas possui um papel importante no desempenho e na estabilidade da digestão anaeróbica de resíduos alimentares. Sabendo disso, o presente trabalho tem como objetivo apresentar ensaios de diferentes inoculantes microbianos em conjunto com a codigestão. Para isso, foi proposto um delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (PB) para o estudo, no qual foi avaliada a influência desses inoculantes (linhagens previamente isoladas do resíduo e do lodo) na efetiva degradação dos resíduos orgânicos e na produção de biometano. Para o isolamento dos microrganismos, foi utilizada como amostra o resíduo do processo de biodigestão dos testes iniciais de biogás em frasco de 100 mL (teste controle) e o lodo de estação de tratamento de esgoto. Foram utilizadas 5 enzimas relacionadas à composição do resíduo orgânico. O estudo permitiu isolar microrganismos do resíduo alimentar e do lodo de estação de tratamento de esgoto que contribuíram para a produção de biogás e biometano. Além disso, os delineamentos experimentais possibilitaram reduzir a quantidade de variáveis independentes quanto aos microrganismos isolados, enriquecidos e enzimas comerciais. Sendo estas: α -amilase, amiloglicosidase, protease, lipase e celulase, obtidas comercialmente. A seleção dos melhores microrganismos ocorreu por meio do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*, sendo estes codificados como EA e EB.

Palavra-chave: Microrganismos, enzimas, Gram+ e Gram-; resíduo orgânico; lodo.

² Este Capítulo foi publicado na revista *Observatório de la Economía Latinoamericana* "Optimizing Food Waste Biodigestion: Pre-Selection of Microbial Groups and Isolated Enzymes using The Plackett-Burman Experimental Design"

5.1 INTRODUÇÃO

A biodigestão anaeróbica é uma técnica apropriada e ambientalmente correta para o tratamento da fração orgânica do resíduo sólido urbano (RSU). O processo de biodigestão envolve diferentes microrganismos em simbiose que degradam o substrato em várias etapas por meio de reações paralelas (PRAMANIK *et al.*, 2019; KUNZ e STEINMETZ; 2022). Fungos e bactérias são os microrganismos capazes de crescer nesse meio, transformando a fração orgânica do resíduo em nutrientes e biogás. A degradação da matéria orgânica pelas bactérias se baseia, sobretudo, na produção de enzimas altamente específicas para o substrato em que atuam (HARIRCHI *et al.*, 2022).

A concentração de microrganismos em um biodigestor anaeróbio é geralmente superior a 10^{16} células/mL, sendo que os sacarolíticos presentes correspondem a cerca de 10^5 células/mL e os metanogênicos a 10^8 células/mL (ARTHUR *et al.*, 2022). A etapa limitante do processo de biodigestão é a hidrólise, que pode ser definida como a fase na qual macromoléculas orgânicas são convertidas em moléculas solúveis menores por meio de um complexo enzimático. Os pré-tratamentos, como a hidrólise enzimática, podem aumentar a solubilização e acessibilidade dos microrganismos ao substrato no meio reacional e estão diretamente associados ao aumento da produção de biogás do sistema (LI; CHEN; WU, 2019; ÇAKMAK e UGURLU, 2020; GNAOUI *et al.*, 2020).

A utilização do tanque de hidrólise com adição de enzimas é um importante pré-tratamento da matéria orgânica. A operação deste primeiro reator hidrolítico de forma aeróbica é recomendada pois limita o acúmulo de ácidos graxos voláteis no sistema, contribuindo assim para um maior rendimento de biogás (Han *et al.*, 2015; SAHU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021). No entanto, o uso de enzimas comerciais no processo de biodigestão apresenta barreiras econômicas, como a necessidade do uso de elevadas dosagens de enzimas e seu respectivo custo elevado.

Sabendo disso, o presente trabalho tem como objetivo apresentar ensaios de diferentes inoculantes microbianos em conjunto com a codigestão. Com o objetivo de investigar a influência de diferentes inoculantes (linhagens previamente isoladas do resíduo e do lodo) na eficiente degradação dos resíduos orgânicos e na produção de biometano, foi proposto um delineamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB)

para o estudo. Nesse delineamento, foram realizadas avaliações para analisar os efeitos dos inoculantes, permitindo uma análise abrangente das variáveis envolvidas no processo. Os resultados foram apresentados para a aplicação de algumas enzimas comerciais em tanques de hidrólise contendo resíduo alimentar, seguido pela adição do substrato hidrolisado em reatores anaeróbicos. O estudo visou analisar a eficiência do processo em termos de aceleração e aumento da produção de metano. Foram conduzidas análises para investigar o comportamento dos microrganismos e a influência das enzimas, a fim de observar a taxa de degradação do resíduo alimentar diante da presença desses fatores. O objetivo foi identificar estratégias que proporcionassem uma degradação mais rápida e eficiente, resultando em um aumento significativo na produção de metano.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

O resíduo sólido utilizado para a realização da pesquisa foi a fração orgânica (arroz, feijão, macarrão, casca de frutas, legumes e proteínas) proveniente de atividades de restaurante próximo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Centro Politécnico (Curitiba, Brasil). O lodo de ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) usado como inoculante foi disponibilizado pela CSBioenergia (joint venture entre a SANEPAR e o Grupo Cattalini) de São José dos Pinhais (Paraná). O lodo fornecido é o produto resultante da codigestão via úmida de resíduos de frutas e verduras provenientes do CEASA (Central de Abastecimento do Paraná, Curitiba) processados juntamente com esgoto sanitário. Após o recebimento, o resíduo alimentar foi moído em um moinho de facas por 30 segundos, para obter uma amostra homogênea no padrão de 14 *mesh* (até 1,18 mm), e armazenada sobre refrigeração a -21 °C (± 2 °C) até o momento das análises, enquanto o lodo foi armazenado em temperatura de 25 °C (± 4 °C) sob abrigo da luz.

5.2.2 Microrganismos e enzimas para a aceleração do processo de biodigestão

Os microrganismos e enzimas fornecidos para o presente estudo pertencem ao Laboratório de Engenharia Bioquímica e de Biotecnologia LENGEBIO-UFPR, Curitiba-Paraná. No estudo, foram avaliadas três cepas bacterianas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium animalis subsp.*) e 12 grupos de microrganismos pré-selecionados, os quais foram codificados em meios de cultura, como *Brain Heart Infusion* (BHI), *Potato Dextrose Agar* e *De Man, Rogosa e Sharpe*. Além disso, foram utilizados grupos enzimáticos comerciais com alta atividade enzimática, como amilase, protease, lipase, celulase e amilglucosidase.

5.2.2.1 Ativações de cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico)

Os estudos que envolvem microrganismos dependem de sua capacidade de desenvolvimento *in vitro*, o que é possível apenas se estabelecido um ambiente adequado para seu crescimento (ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, 2017). Para o isolamento de microrganismos, utilizou como amostra o resíduo do processo da biodigestão dos testes iniciais de biogás em frasco de 100 mL (teste controle). Foram coletadas amostras em 7, 14, 21 e 28 dias de biodigestão nas condições mesofílicas (35 °C) e termofílicas (45 °C). O isolamento ocorreu com a repicagem das linhagens em 3 tipos de meios de cultura: meio nutriente *Brain Heart Infusion* (BHI), *Potato Dextrose Agar* (PDA) e *De Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) para bactérias, fungos e leveduras, respectivamente, em que as amostras (biodigestores frasco âmbar) foram inoculadas em placas de Petri, adicionando-se os meios.

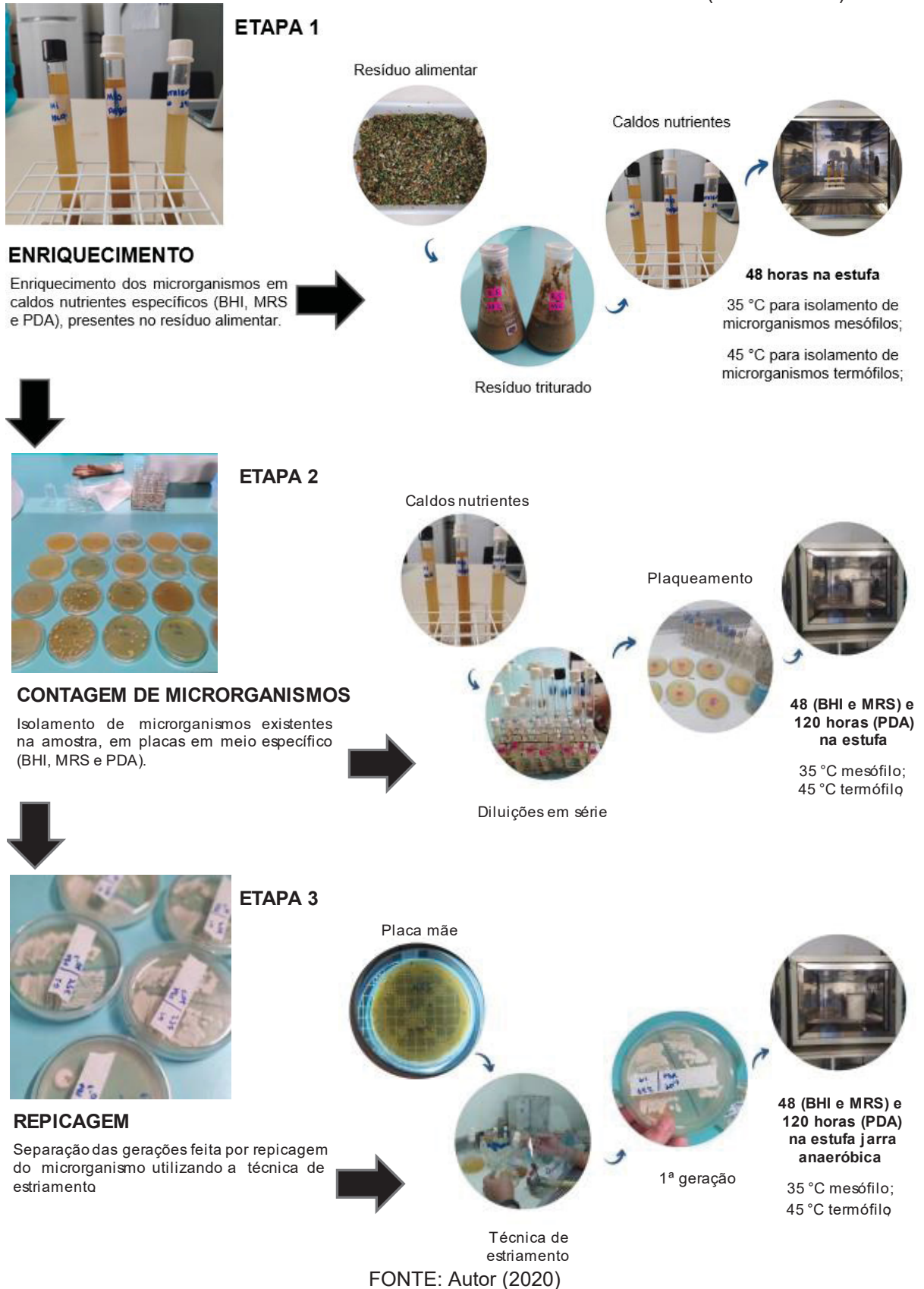
Visando o isolamento de diferentes classes microbianas e grupos mesofílicos e termofílicos, foram realizadas duas inoculações de cada amostra até decima primeira diluição sucessiva para os meios BHI, PDA e MRS (ajustando-se o pH inicial para o pH ideal dos grupos microbianos: fungos 5,0; bactérias 6,0-7,0). As amostras foram incubadas em uma estufa bacteriológica, após a solidificação dos meios e mantidas durante 48 horas a 35 °C e 45 °C para bactérias e para fungos 35 °C por 5 dias, a mesma temperatura do processo de biodigestão mesofílica e termofílica (FIGURA 22). No caso dos fungos, foram observados em placas o crescimento da biomassa e a pureza das culturas. As amostras foram feitas em triplicata.

As amostras concentradas foram diluídas primeiramente no caldo nutriente respectivo a cada meio (BHI, PDA e MRS) 1 g da amostra para 20 mL do caldo (incubada a 35 °C e 45 °C por 48 horas). As amostras foram diluídas em água peptonada contendo 0,1% de NaCl a 0,85% e prepararam-se diluições de 10^{-1} até 10^{-9} . Em seguida, utilizou-se o método de *Pour-plate* para o isolamento de microrganismos anaeróbios. Para as bactérias anaeróbias, utilizou-se meio BHI, enquanto para as bactérias lácticas, utilizou-se meio MRS. Em cada diluição, uma alíquota de 1 mL foi transferida para o fundo de cada placa de Petri, seguindo o procedimento do método de *Pour-plate*. Em seguida, aproximadamente 20 mL de cada um dos respectivos meios (citados anteriormente), foi vertido sobre a placa contendo a alíquota recém-adicionada. Todo o material usado na contagem de microrganismo foi previamente esterilizado e todos os procedimentos foram realizados assepticamente (em câmara de fluxo laminar). Após a inoculação, foi realizada a contagem de colônias que se desenvolveram nas placas.

As placas escolhidas para a contagem foram as que apresentaram um número entre 25-250 unidades formadoras de colônias (UFC), como está apresentada a FIGURA 22.


Os grupos de microrganismos foram divididos em meios específicos: BHI, que podem conter uma variedade de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica*; PDA, que é seletivo para fungos, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida* e *Rhizopus*, e; MRS, que é específico para lactobacilos, incluindo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* e *Leuconostoc mesenteroides*.

FIGURA 22- DIAGRAMA DAS ETAPAS (1, 2 E 3) DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO RESÍDUO CONDICIONADO A BIODIGESTÃO ANAERÓBICA (35 °C E 45 °C)



São 45 placas no total, BHI (13), MRS (19) e PDA (13), como demonstrado na FIGURA 23. As características dos microrganismos com potenciais para a biodigestão observadas foram: coloração branca, filamentos na superfície do agar e espalhamento radial (FUNGPDA35 (H, M) e FUNFPDA45 (H, M)); coloração bege, colônias regulares e brilhantes (BACTBHI35 (H, M) e BACTBHI45 (H, M)); Coloração branca, colônias regulares e brilhantes BACTMRS35 (H, M) e BACTMRS45 (H, M).

FIGURA 23- DEMONSTRAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM PLACAS DE PETRI NOS MEIOS BHI, MRS E PDA (MICRORGANISMOS + MATRIZES, 35 °C E 45 °C)



	Microrganismos (PDA)	Microrganismos (BHI)	Microrganismos (MRS)
1	FUNGPDA35H (mãe) ¹	BACTBHI35H (mãe) ¹	BACTMRS35H (mãe) ¹
2	FUNGPDA35H (G1) ¹	BACTBHI35H (G1) ¹	BACTMRS35H (G1) ¹
3	FUNGPDA35H (G1) ¹	BACTBHI35H (G1) ¹	BACTMRS35H (mãe) [*]
4	FUNGPDA35H (G1) ¹	BACTBHI35H (G1) ¹	BACTMRS35H (mãe) [*]
5	FUNGPDA45H (mãe) [*]	BACTBHI35H (mãe) [*]	BACTMRS35H (mãe) [*]
6	FUNGPDA45H (mãe) [*]	BACTBHI35H (mãe) [*]	BACTMRS35H (mãe) [*]
7	FUNGPDA45H (mãe) [*]	BACTBHI35H (mãe) [*]	BACTMRS35H (mãe) [*]
8	FUNGPDA45H (mãe) [*]	BACTBHI35H (mãe) [*]	BACTMRS35H (mãe) [*]
9	FUNGPDA35M (mãe) [*]	BACTBHI35H (mãe) ²	BACTMRS35H (mãe) [*]
10	FUNGPDA35M (mãe) [*]	BACTBHI35H (G1) ²	BACTMRS35H (mãe) [*]
11	FUNGPDA35M (mãe) [*]	BACTBHI35H (G1) ²	BACTMRS35H (mãe) [*]
12	FUNGPDA35M (mãe) ¹	BACTBHI45H (mãe) [*]	BACTMRS35H (mãe) ²
13	FUNGPDA35M (G1) ¹	BACTBHI45H (mãe) [*]	BACTMRS35H (G1) ²
14			BACTMRS45H (mãe) [*]
15			BACTMRS45H (mãe) [*]
16			BACTMRS45H (mãe) ¹
17			BACTMRS45H (G1) ¹
18			BACTMRS35M (mãe) [*]
19			BACTMRS35M (mãe) [*]
Mãe	9	8	16
G1	4	5	3
TOTAL	13	13	19
Placas		45	

*NÃO REALIZADO GERAÇÕES;

Microrganismo a partir do RSU potenciais para a biodigestão

FONTE: Autor (2020)

Entre os microrganismos isolados do resíduo, foram selecionados 4 tipos diferentes que não se repetiam, conforme apresentado na TABELA 26. Esses microrganismos demonstraram características desejáveis, como a formação de bolhas de gás no interior das placas, resultando no deslocamento do meio de cultura, além de apresentarem colônias uniformes e contagem de células viáveis superior a $1,0 \times 10^7$ UFC·mL⁻¹. Essa seleção foi realizada visando o delineamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB), com o objetivo de quantificar a produção de biogás e biometano nos biodigestores.

TABELA 26- QUANTIDADE DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA EXECUÇÃO DO DELINEAMENTO DO TIPO PB UTILIZANDO RESÍDUO ALIMENTAR EM VIA ÚMIDA (PDA E BHI)

Meios	Código	Microrganismo isolados	Unidade formadora de Colônia (UFC·mL ⁻¹)
*PDA	2	FUNGPDA	1,47 x 10 ¹² (est.)
*PDA	4	FUNGPDA	1,49 x 10 ¹² (est.)
*BHI	5	BACTBHI	7,25 x 10 ⁹ (est.)
*BHI	6	BACTBHI	2,21 x 10 ⁹ (est.)

* Microrganismos isolados selecionados para o *Plackett-Burman*

Após a contagem, foram selecionados e armazenados 4 tipos de microrganismos do resíduo alimentar em glicerol 80 % (-21 °C) até a realização do delineamento de experimento *Plackett-Burman* (PB).

5.2.2.2 Ativações de cepas microbianas de isolados (lodo de ETE)

A contagem de microrganismos foi realizada no lodo de ETE proveniente da codigestão anaeróbica em via úmida de resíduo alimentar de frutas e verduras com ágar (BHI, PDA e MRS), utilizando o método de aplicação em profundidade descrito no tópico 5.2.2.1. A contagem de células viáveis totais no lodo estabilizado e enriquecido, com 3 meios de cultura, foi apresentada na TABELA 27. Para o isolamento dos microrganismos, realizou-se o enriquecimento do lodo em meios de cultura na forma de caldos e contagem em ágar específicos: a) *Brain Heart Infusion* (BHI), b) *Potato Dextrose Broth/ Potato Dextrose Agar* (PDA) (ou seja, meio de cultura denominado Batata Dextrose Ágar e c) ágar *De Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) vide TABELA 30 na proporção de 2,5 g de lodo para 25 g de meios de cultura (previamente esterilizado) incubados a 35 °C em jarra de anaerobiose por 24 h.

TABELA 27- CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NO LODO ESTABILIZADO E ENRIQUECIDO COM CALDOS NUTRIENTES: PCA, BHI E MRS. AMOSTRA DE LODO DISPONIBILIZADO POR CSBIOENERGIA (LODO DE ETE PROVENIENTE DA CODIGESTÃO ANAERÓBICA EM VIA ÚMIDA DE RESÍDUO DE FRUTAS E VERDURAS DO CEASA DE CURITIBA-PR E ESGOTO SANITÁRIO)

Valores estimados	PCA (UFC.mL ⁻¹)	BHI (UFC.mL ⁻¹)	MRS (UFC.mL ⁻¹)	média total (UFC.mL ⁻¹)
Lodo enriquecido*	1,21 x 10 ⁸	7,39 x 10 ⁸	1,87 x 10 ⁸	3,49 x 10 ⁸
Lodo estabilizado**	1,14 x 10 ⁶	1,19 x 10 ⁶	6,50 x 10 ⁴	7,98 x 10 ⁵

*Lodo enriquecido, material enriquecimento em caldo nutriente.

**Lodo estabilizado, material conservado em condições ambientes 27 °C ± 2 °C.

Os isolados, 9 grupos de microrganismos no lodo enriquecido, sendo que 3 eram em meio PDA, 3 em BHI e 3 em MRS. A TABELA 28 contém os valores da contagem de células viáveis referentes ao isolamento. Após a realização da contagem, foram selecionados e armazenados em glicerol 80 % os 5 tipos de microrganismos que apresentaram maior concentração de células viáveis, até a realização do delineamento de experimento *Plackett-Burman*.

TABELA 28- VALORES DAS QUANTIDADES DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA O PB LODO (UFC·mL⁻¹) EM MEIO PDA, BHI E MRS EM 35 °C

Meios	Código	Microrganismo isolados	Unidade formadora de Colônia (UFC·mL ⁻¹)
PDA	1	FUNGPDAL	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
PDA	2	FUNGPDAL	8,00 x 10 ⁶ (est.)
PDA	3	FUNGPDAL	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
BHI	1	BACTBHIL	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
*BHI	2	BACTBHIL	5,080 x 10⁸ (est.)
*BHI	3	BACTBHIL	1,860 x 10⁹ (est.)
*MRS	1	BACTMRS	1,325 x 10⁹ (est.)
*MRS	2	BACTMRS	1,041 x 10⁹ (est.)
*MRS	3	BACTMRS	1,521 x 10⁹ (est.)

* Microrganismos isolados selecionados para o *Plackett-Burman*.

Estimado: est.

5.2.2.3 Ativações de cepas microbianas de isolados (bactérias lácticas)

As bactérias lácticas ou também denominadas bactérias ácido-láticas (BAL) *Lactobacillus acidophilus* (BLA), *Lactobacillus casei* (BCL) e *Bifidobacterium animalis* (BBA) *subsp.* foram reativadas em caldo (MRS) para o delineamento de experimento *Plackett-Burman*, como está descrito no tópico 5.2.2.1 deste capítulo. A contagem de células viáveis está apresentada na TABELA 29.

TABELA 29- VALORES DAS QUANTIDADES DE CÉLULAS VIÁVEIS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DO BANCO DE CEPAS DO LENGEBIO (*Lactobacillus acidophilus* (BLA); *Lactobacillus casei* (BLL); *Bifidobacterium animalis* (BBA))

Bactérias lácticas	Unidade formadora de colônia (UFC·mL ⁻¹)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (BLA)	8,15 x 10 ⁹ (est.)
<i>Lactobacillus casei</i> (BLL)	1,23 x 10 ¹⁰ (est.)
<i>Bifidobacterium animalis</i> (BBA)	2,65 x 10 ⁹ (est.)

est. = estimado

5.2.2.4 Coloração de Gram de cepas microbianas de isolados

No estudo, foi realizado o procedimento de coloração de Gram nos grupos de microrganismos isolados que apresentaram relevância na produção de biogás e

biometano, de acordo com o planejamento experimental. Essa técnica permitiu a observação do formato das bactérias, classificando-as em bacilos ou cocos. Além disso, as bactérias foram divididas em dois grupos principais: as Gram+ (positivas), capazes de reter o corante cristal violeta, e as Gram- (negativas), que não retêm o corante primário e adquirem a coloração do segundo corante, após a lavagem com solvente orgânico. Essa classificação resultou em microrganismos Gram+ (com coloração roxa) e Gram- (com coloração vermelha ou rosada), seguindo a metodologia descrita por Moyes, Reynolds e Breakwell (2009).

5.2.2.5 Microrganismos isolados para o delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (PB)

O resumo dos microrganismos que foram isolados do resíduo alimentar, do lodo de ETE, bem como as bactérias lácticas reativadas e o lodo enriquecido em 3 tipos de meios de cultura estão apresentados na TABELA 30. Foram codificados os inoculantes para plotagem na matriz do delineamento de experimento.

TABELA 30- RELAÇÃO E CODIFICAÇÃO DAS CEPAS MICROBIANAS ISOLADAS E SELECIONADAS PARA O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB (RESÍDUO; LODO ENRIQUECIDO (ISOLADO); BACTÉRIAS LÁCTICAS E LODO ENRIQUECIDO)

Fonte	Microrganismos	Códigos para o delineamento experimental PB
Resíduo	2 - FUNGPDAR	RA
Resíduo	4 - FUNGPDAR	RB
Resíduo	5 - BACTBHIR	RC
Resíduo	6 - BACTBHIR	RD
Lodo enriquecido (isolado)	2 - BACTBHIL	LA
Lodo enriquecido (isolado)	3 - BACTBHIL	LB
Lodo enriquecido (isolado)	1 - BACTMRS�	LC
Lodo enriquecido (isolado)	2 -BACTMRS�	LD
Lodo enriquecido (isolado)	3 - BACTMRS�	LE
Bactérias lácticas	<i>BLA</i>	TA
Bactérias lácticas	<i>BLL</i>	TB
Bactérias lácticas	<i>BBA</i>	TC
Lodo enriquecido	PDA-LODO	EA
Lodo enriquecido	BHI-LODO	EB
Lodo enriquecido	MRS-LODO	EC
Total de cepas microbianas para PB		15

5.2.2.6 Atividade enzimática e enzimas selecionadas para a hidrólise da biodigestão

As enzimas utilizadas foram selecionadas pelas frações da composição do resíduo orgânico (carboidrato, proteína, lipídeos e fibras); para a fração de carboidratos, foram utilizadas 2 enzimas, sendo elas: α -amilase (EAA 1002-14) e a

amiloglucosidase (GlucoGo 2X); para fração de proteína, foi utilizada protease (NP-100); para a fração de lipídeos, foi utilizada lipase (LP-100), e; na fração de fibras, foi utilizada a enzima celulase (celluclast 1,5L).

A descrição das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise do resíduo orgânico para a biodigestão está apresentada nas TABELAS 31 e 32.

TABELA 31- GRUPOS DE ENZIMAS COMERCIAIS (α -AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE, PROTEASE, LIPASE E CELULASE) TESTADOS COM POTENCIAL PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS ALIMENTARES (A)

Enzimas	Nome Comercial	Atividade Enzimática	Temperatura °C	pH	Empresa
α -Amilase	EAA 1002-14	450.000 U·g ⁻¹	35	4,5-6,0	Global Food
Amiloglucosidase	GlucoGo 2X	1.526 U·g ⁻¹	40-65	3,5-5,0	Tecnoglobo
Protease	NP-100	1.500 U·g ⁻¹	37	6,8-8,0	Jiangsu Boli
Lipase	LIPASE LP-100	22.000 U·g ⁻¹	35-55	3,0-12,0	Jiangsu Boli
Celulase	Celluclast 1,5L	2.500 U·g ⁻¹	~50	4,5-6,0	Novozymes

TABELA 32- PARÂMETROS DE GRUPOS DE ENZIMAS COMERCIAIS (α -AMILASE, AMILOGLUCOSIDASE, PROTEASE, LIPASE E CELULASE) TESTADAS COM POTENCIAL PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS ALIMENTARES (B)

Enzimas	Atividade Enzimática	Temperatura °C	pH	Ref.
EAA	450.000 U·g ⁻¹	35	4,5-6,0	Fuwa (1954)
GLU	1.526 U·g ⁻¹	40-65	3,5-5,0	Bernfeld (1955)
NP1	1.500 U·g ⁻¹	37	6,8-8,0	Charney e Tomarelli (1947)
LP1	22.000 U·g ⁻¹	35-55	3,0-12,0	Krieger (1995)
CLA	2.500 U·g ⁻¹	~50	4,5-6,0	Miller (1959)

A atividade enzimática da α -amilase foi avaliada seguindo a metodologia baseada na redução do complexo amido-iodo, adaptada do método de Fuwa (1954) com algumas modificações nos volumes dos reagentes. O procedimento envolveu a adição de uma alíquota de 200 μ L de solução de amido P.A. (Neon) a 1% m/v, preparada em tampão acetato a 0,1M com pH 7,0. Em seguida, foram adicionados 200 μ L das amostras provenientes do tanque de hidrólise coletadas em diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 horas), bem como amostras do biodigestor obtidas no décimo dia de processo, devidamente diluídas em solução tampão acetato com o mesmo pH. As adições foram realizadas em tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 35 (\pm 2 °C) durante 15 min. Para interromper a reação, adicionou-se uma solução de ácido acético glacial (Vetec/ 99 %) (400 μ L) e 400 μ L de solução de iodo/iodeto (iodo a 0,2 % p.v⁻¹, iodeto de potássio a 2 % p.v⁻¹ e água destilada, 1:1:3). Na sequência, foi adicionada ao tubo 20 mL de água deionizada, homogeneizada e a absorbância lida a 700 nm em um espectrofotômetro (modelo UV-6100PC DOUBLE BEAM, Shangai,

CHN). O branco enzimático (controle) foi preparado de maneira semelhante à amostra de teste. No entanto, nas amostras, a adição de ácido acético glacial foi realizada antes de serem adicionadas. A atividade da α -amilase foi expressa em Unidades Internacionais (U). Um (01) U representa a quantidade de enzima capaz de converter 0,1 mg de amido por mL por minuto na reação sob as condições de teste (35 ± 2 °C /15 min). Uma curva padrão foi preparada utilizando soluções de amido solúvel P.A. (Neon) em diferentes concentrações ($0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para converter valores de absorbância obtidos em mg de amido por mL.

A atividade da amiloglucosidase foi quantificada pela medição dos açúcares redutores liberados após a reação enzimática. Para isso, utilizou-se o método colorimétrico de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Bernfeld (1955), com modificação no tempo de reação por Miller (1959). O meio reacional foi composto por 250 μL de solução de amido (preparada em tampão acetato 1 % m.v⁻¹ pH = 6,0), 125 μL de EBE diluído (na proporção 1:1) e 125 μL de tampão acetato no mesmo pH. A reação ocorreu em banho-maria a 50 ± 2 °C durante 30 minutos. Para interromper a reação enzimática, foi adicionada uma alíquota de 500 μL de solução de DNS, seguida de fervura por 5 minutos em banho-maria (os tubos devem ser adicionados apenas quando a água do banho estiver fervendo) e resfriamento em banho de gelo. Após isso, adicionou-se 4 mL de água destilada e homogeneizou-se a mistura. A absorbância da solução foi lida em um espectrofotômetro (Modelo UV-6100PC DOUBLE BEAM, Shanghai, CHN) a 540 nm. Para o branco enzimático, a única diferença foi a ordem de adição do EBE, que ocorreu após a adição do DNS para interromper a reação enzimática.

Para determinação da atividade enzimática da protease, utilizou-se o método de Charney e Tomarelli (1947) com modificações. Cada determinação foi realizada em triplicata por meio da quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15 %. Para determinação da atividade lipolítica, utiliza-se o método espectrofotométrico ao longo de todo o trabalho. Foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (1995). A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de glicose produzida pela ação da enzima. A quantidade de glicose liberada foi quantificada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959). Já para a atividade de celulase e hemicelulase, foi

conduzida segundo Ghose (1987) e Miller (1959), empregando-se carboximetilcelulose (CMC) como substrato.

5.2.2.7 Cálculos das massas e enzimas adicionadas aos tanques de hidrólise

Os cálculos das massas de enzimas, adicionados aos tanques de hidrólise para o delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*, foram considerados a proporção de resíduo de 60 % carboidrato, 20 % proteína, 10 % gorduras e 10 % fibras. Dessa forma, a atividade enzimática experimentalmente foi calculada pela equação 6.

$$Q = \left(Meta \cdot \left(\frac{Vt+Vr}{A} \right) \cdot X \right) \cdot 2 \quad (6)$$

em que:

Q (g ou mL) = Quantidade a ser adicionada da enzima em análise;

Meta (U·g⁻¹ ou U·mL⁻¹) = Meta a ser atingida de atividade no tanque de hidrólise (Ex: 100 U·g⁻¹ ou U·mL⁻¹);

Vt (mL) = Volume de água no tanque de hidrólise (ex: 10 mL);

Vr (mL) = Volume de resíduo adicionado no tanque (Assumir densidade de 1g·mL⁻¹) (Ex: 4,28 g);

A (U·g⁻¹ ou U·mL⁻¹) = Atividade obtida experimentalmente da enzima em análise;

X (Fração) = Composição dos macronutrientes a ser hidrolisado pela enzima.

Observação: Fator de segurança de 2x.

5.2.3 Delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (PB)

5.2.3.1 Ensaios das cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 1)

O delineamento experimental *Plackett-Burman* (PB) 15/16 (19 variáveis independentes, sendo 15 reais e 04 variáveis *dummies* e 20 experimentos, sendo que foi utilizado com intuito de selecionar os microrganismos (cepas isoladas) inoculados na concentração de 10⁸ UFC·mL⁻¹ que apresentassem significância e efeitos positivos para as variáveis da biodigestão nas respostas: média de biometano (%), média do volume de biogás (mL), média do volume de biometano (mL), volume acumulativo de

biogás bruto (mL), volume acumulativo de biogás convertida (mL · gSV⁻¹). A TABELA 33 apresenta a matriz PB 15/16 para a projeção do experimento.

TABELA 33- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *PLACKETT-BURMAN* (PB) *SCREENING DESIGN* DO TIPO 15/16 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CEPAS MICROBIANAS: (10⁸ UFC·mL⁻¹) DO BANCO DE CEPAS DO LENGEBIO NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. 16 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 17 A 20) DO EXPERIMENTO CONTROLE (C).

	Resíduo				Lodo enriquecido (isolado)					Bactérias lácticas			Lodo		
	RA	RB	RC	RD	LA	LB	LC	LD	LE	TA	TB	TC	EA	EB	EC
1	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0
2	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸
3	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0
4	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸
5	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0
6	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0
7	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0
8	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	0
9	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸
10	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0	10 ⁸
11	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸	0
12	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸	10 ⁸
13	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0	10 ⁸
14	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0	0
15	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	0
16	0	10 ⁸	10 ⁸	0	0	0	0	10 ⁸	0	10 ⁸	0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Para a realização do delineamento experimental *Plackett-Burman* (PB), foram utilizados frascos de vidro de 100 mL (septo mais lacre) com o volume utilizado de meio equivalente a 60 mL (FIGURA 24). O experimento foi operado contendo 14,5 gSV·L⁻¹, em que foram adicionados 4g de resíduo alimentar padronizado a 14 *mesh* (até 1,18 mm) e 60 mL de lodo de ETE (Estação de Tratamento de Esgoto). Os experimentos foram conduzidos a temperatura de 35 ± 2 °C e os resultados preliminares foram obtidos em 10 dias.

FIGURA 24- DEMONSTRAÇÃO DA MONTAGEM DOS ENSAIOS PARA DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB (RESÍDUO; LODO ENRIQUECIDO (ISOLADO); BACTÉRIAS LÁCTICAS E LODO ENRIQUECIDO)



Fonte: Autor (2022).

5.2.3.2 Ensaio das cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 2)

O delineamento do tipo *Plackett-Burman* (PB) foi utilizado com intuito de selecionar os microrganismos isolados em laboratório que apresentaram significâncias e efeitos positivos para as variáveis da biodigestão (ETAPA 1 tópico 5.2.3.1). O delineamento experimental *Plackett-Burman* (PB) foi *screening design* para avaliação do efeito dos microrganismos do LENGEBIO nas respostas: perda de massa (%), média de metano (%), média de biogás (mL), soma de biogás (mL), soma de biogás convertida ($14,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}^{-1}$). A matriz 7/8 para a projeção do experimento com a quantidade de colônias celular adicionar em cada ensaio ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) está apresentado na TABELA 34. Os parâmetros e o trabalho seguem os descritos no tópico 5.2.3.1).

TABELA 34- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB) SCREENING DESIGN DO TIPO 7/8 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CEPAS MICROBIANAS: (10^8 UFC·mL⁻¹) DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 13 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 8 A 11), NA ETAPA 2

Ensaio	Variáveis independentes (microrganismos isolados)						
	RA+RB	LD	TA	TB	TC	EA	EB
1	0	0	0	10^8	10^8	10^8	0
2	10^8	0	0	0	0	10^8	10^8
3	0	10^8	0	0	10^8	0	10^8
4	10^8	10^8	0	10^8	0	0	0
5	0	0	10^8	10^8	0	0	10^8
6	10^8	0	10^8	0	10^8	0	0
7	0	10^8	10^8	0	0	10^8	0
8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
9	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
10	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
11	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

inoculados juntos: RA+RB

5.2.3.3 Ensaio de enzimas e cepas microbianas de isolados (resíduo orgânico e lodo) (ETAPA 3 e 4)

O delineamento do tipo *Plackett-Burman* (PB) foi utilizado com intuito de selecionar as enzimas comerciais que apresentassem influência na produção de biometano e outras variáveis da biodigestão (significância e efeito positivo). O delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (PB) *screening design* foi utilizado para avaliação do efeito das enzimas comerciais do Laboratório LENGEBIO nas respostas: volume acumulativo de biometano (mL) e de biogás (mL). A matriz 7/8 para a projeção do experimento, sendo 8 variáveis independentes e 7 dependentes com 5 reais, 2 variáveis *dummies* e 13 experimentos mais 2 controles (TABELA 35) (ETAPA 3). Quanto para o delineamento experimental *Plackett-Burman* (PB) de microrganismo e enzimas 11/12 (11 variáveis independentes, sendo 8 reais e 03 variáveis *dummies* e 15 experimentos mais 2 controles, sendo que foi utilizado com intuito de selecionar os microrganismos (cepas isoladas) inoculados na concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ e enzimas comerciais que apresentassem significância e efeitos positivos para as variáveis da biodigestão nas respostas: volume acumulativo de biometano (mL) e de biogás (mL) (TABELA 36) (ETAPA 4) os microrganismos utilizados foram a partida das melhores resposta da ETAPA 2.

TABELA 35- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB) SCREENING DESIGN DO TIPO 7/8 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ENZIMAS: (100 U·g⁻¹) COMERCIAIS NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 13 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 8 A 11), NA ETAPA 3

	α-amilase (AL)	Amiloglucosidase (AM)	Protease (P)	Lipase (L)	Celulase (C)
1	0	0	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹
2	100 U·g ⁻¹	0	0	0	0
3	0	100 U·g ⁻¹	0	0	100 U·g ⁻¹
4	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	0
5	0	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0
6	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹
7	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	0
8	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹
9	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹
10	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹
11	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0

TABELA 36- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB) SCREENING DESIGN DO TIPO 11/12 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS: (100 U·g⁻¹; 10⁸ UFC·mL⁻¹) NA PRODUÇÃO DE BIOMETANO POR VIA ÚMIDA. TOTAL DE 17 EXPERIMENTOS MAIS QUADRUPPLICATAS (ENSAIOS DE 12 A 15), NA ETAPA 4

	α-amilase (AL)	Amiloglucosidase (AM)	Protease (P)	Lipase (L)	Celulase (C)	EA	EB	LD
1	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	0	0	0	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸
2	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	0	0	0	≥1·10 ⁸
3	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	0	0	0	0
4	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	≥1·10 ⁸	0	0
5	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	≥1·10 ⁸	0
6	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	100 U·g ⁻¹	≥1·10 ⁸	0	≥1·10 ⁸
7	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸	0
8	0	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	0	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸
9	0	0	0	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	≥1·10 ⁸	0	≥1·10 ⁸
10	100 U·g ⁻¹	0	0	0	100 U·g ⁻¹	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸	0
11	0	100 U·g ⁻¹	0	0	0	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸
17	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	100 U·g ⁻¹	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸	≥1·10 ⁸

O experimento realizado para o *Plackett-Burman* de enzimas tem como características: duração de 13 dias, de modo que os 3 primeiros dias operam aerobiamente em um *Shaker* (modelo: TECNAL, TE-424, BR) com agitação de 100 rpm e 28 °C, sendo este o tanque de hidrólise (resíduo alimentar, enzimas e água), e os 10 dias subsequentes em sistema anaeróbico, com adição de lodo de ETE, operando sem agitação a 35 °C. Para a realização do PB de enzimas, foi considerado os cálculos das massas de enzimas adicionados aos tanques de hidrólise: a

composição alimentar do resíduo alimentar utilizado, a atividade enzimática obtida experimentalmente das enzimas testadas e o volume total utilizado no tanque de hidrólise descrito no tópico 5.2.2.6.

5.2.4 Análise do biogás

Os volumes produzidos de biogás dos biodigestores foram quantificados com uso de uma seringa tipo de vidro com capacidade volumétrica de 20 mL, apresentando erro de $\pm 4 \%$ (ARTICLASS, Itália) com auxílio de uma válvula de três vias. Quanto ao percentual de biometano no biogás, foi realizado pelo método de captura de CO₂ em solução alcalina de hidróxido de sódio a 2 mol·L⁻¹ (EMBRAPA, 2021). Os ensaios foram realizados em temperatura controlada de 35 °C (± 2 °C).

5.2.5 Análise estatística descritiva

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio-padrão. Para comparar as variáveis respostas, foram cheçadas a normalidade e homoscedasticidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene (≥ 3 amostras) respectivamente. A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi para diferenciar os efeitos estatisticamente $n < 0,05$. Utilizou o Software STATISTICA 10 (Statsoft, EUA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Efeitos dos microrganismos isolados (ETAPA 1)

Os valores médios e soma, utilizados para o delineamento dos experimentos com apenas microrganismo estão apresentados na TABELA 37.

TABELA 37- VALORES DE PERDA DE MASSA, MÉDIA DE METANO, MÉDIA DE VOLUME DE BIOGÁS E BIOMETANO, VOLUME ACUMULATIVO PARA BIOGÁS E BIOMETANO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PB 15/16 (ETAPA 1)

Ensaio	Perda de massa (%)	Média de metano (%)	Média do volume de Biogás (mL)	Média do volume de biometano (mL)	Volume acumulativo de biogás (mL)	Volume acumulativo de biogás (mL·gSV ⁻¹)
1	26	83	54	45	542	623
2	24	79	53	42	530	609
3	20	78	58	45	584	671
4	24	77	61	47	613	704
5	26	75	72	54	718	825
6	24	79	63	50	626	720
7	27	80	60	49	603	693
8	26	78	59	46	589	677
9	26	76	63	48	633	728
10	25	76	71	54	707	813
11	27	78	58	45	581	668
12	28	77	62	47	616	708
13	29	76	59	45	586	674
14	30	76	77	58	765	879
15	28	78	67	52	667	767
16	29	77	70	54	700	805
17	25	79	49	39	494	568
18	25	79	50	39	501	576
19	25	80	65	52	654	751
20	26	81	60	49	602	691

Os ensaios que apresentaram os maiores volumes acumulativos de metano (em mL), em um período de 10 dias, foram os ensaios 14, 16, 10, 5 e 15, com percentuais de 31%, 23%, 22%, 20% e 20%, respectivamente, em relação ao grupo de controle. Nesses ensaios, foram inoculados microrganismos, como bactérias lácticas, microrganismos do resíduo alimentar, lodo e enriquecido do lodo, que mostraram uma significância positiva de acordo com o delineamento experimental. As TABELAS 40 a 47 e a FIGURA 25 apresentam os valores significativos e os efeitos dos microrganismos adicionados para cada variável analisada.

As análises de variância (ANOVA) para a perda de massa, obtidas a partir dos testes do experimento de triagem do PB com fatores de dois níveis, são apresentadas na TABELA 38.

TABELA 38- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: PERDA DE MASSA NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA EM PORCENTAGEM NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	-0,46553	-	0,055936	0,014132
(2) RB	-1,79526	-	0,049331	0,000754
(3) RC	0,24526	S/E	0,075737	0,083577
(4) RD	-0,22053	S/E	0,055936	0,058726
(5) LA	-1,73026	-	0,049331	0,000812
(6) LB	-0,72000	-	0,057469	0,006311
(7) LC	0,06947	S/E	0,055936	0,340115
(8) LD	-0,42553	-	0,055936	0,016844
(9) LE	-0,00526	S/E	0,049331	0,924772
(10) TA	1,73921	+	0,073406	0,001777
(11) TB	1,82526	+	0,075737	0,001717
(12) TC	1,68921	+	0,073406	0,001883
(13) EA	1,79026	+	0,075737	0,001785
(14) EB	0,41947	+	0,055936	0,017321
(15) EC	0,09000	S/E	0,057469	0,257825
R ² = 0,99982				
R ² _{aj} = 0,99844				

S/E: Sem efeito significativo

Os microrganismos codificados TA, TB, TC, EA e EB apresentaram diferença significativa (p -valor < 0,01) e tiveram um efeito positivo na perda de massa em porcentagem. Isso significa que a presença dessas cepas microbianas afetou a perda de massa. A perda de massa é um indicativo do consumo de nutrientes e da conversão desses nutrientes em bioprodutos. Essa perda de massa ocorre devido à liberação de produtos resultantes das reações biológicas pelas células viáveis do sistema. Os dados referentes às análises de variância para a média de produção de biometano em porcentagem estão apresentados na TABELA 39.

TABELA 39- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE BIOMETANO (em %) PRODUZIDO NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	0,43876	S/E	1,009388	0,706203
(2) RB	-0,67608	S/E	0,890196	0,526881
(3) RC	0,59426	S/E	1,366718	0,706121
(4) RD	1,85694	S/E	1,009388	0,207185
(5) LA	0,41483	S/E	0,890196	0,687040
(6) LB	-0,67273	S/E	1,037048	0,583073
(7) LC	-0,81579	S/E	1,009388	0,503824
(8) LD	-1,86124	S/E	1,009388	0,206504
(9) LE	-0,02153	S/E	0,890196	0,982900
(10) TA	-1,04641	S/E	1,324655	0,512341
(11) TB	-1,43301	S/E	1,366718	0,404427
(12) TC	0,54450	S/E	1,324655	0,720895
(13) EA	-0,00574	S/E	1,366718	0,997029
(14) EB	1,18421	S/E	1,009388	0,361524
(15) EC	-0,56364	S/E	1,037048	0,641267

R² = 0,904

R²aj = 0,185

S/E: Sem efeito significativo.

% biometano (em relação ao volume de biogás bruto produzido).

Para a variável média de metano (em %) produzido no biodigestor, a análise não apresentou nenhum microrganismo com efeito significativo para o delineamento de experimento PB. Para a variável média de mL de biogás produzido, apresentado na TABELA 40, a análise apresentou 2 microrganismos codificados, LA e LD, que foram significativos para essa variável. Entretanto, apenas o microrganismo LD apresentou efeito positivo para a média de biogás (mL).

TABELA 40- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE BIOGÁS PRODUZIDO EM mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

(continua)

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	1,93316	S/E	1,184863	0,244358
(2) RB	4,40158	S/E	1,044951	0,052003
(3) RC	-0,60158	S/E	1,604312	0,743708
(4) RD	-1,69684	S/E	1,184863	0,288464
(5) LA	-5,01842	-	1,044951	0,040727
(6) LB	2,12000	S/E	1,217331	0,223719
(7) LC	1,73316	S/E	1,184863	0,281066
(8) LD	7,62316	+	1,184863	0,023317
(9) LE	0,09158	S/E	1,044951	0,938148

TABELA 40 - VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE BIOGÁS PRODUZIDO EM mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	(conclusão)
				p-valor
(10) TA	5,08474	S/E	1,554937	0,082157
(11) TB	3,08842	S/E	1,604312	0,194093
(12) TC	6,26474	S/E	1,554937	0,056440
(13) EA	1,93842	S/E	1,604312	0,350426
(14) EB	-2,06684	S/E	1,184863	0,223213
(15) EC	-1,96000	S/E	1,217331	0,248672
R ² = 0,99				
R ² aj: 0,93				

S/E: Sem efeito significativo

Os dados referentes às análises de variância (ANOVA), a partir do estudo PB 19/20 para a variável volume acumulativo de biogás produzido (mL), estão apresentados na TABELA 41. Os microrganismos codificados que apresentaram significância para resposta “soma de biogás” foram LA e LD, com p-valor < 0,01. Apenas o microrganismo LD apresentou efeito significativo positivo.

TABELA 41- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS EM mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	19,3316	S/E	11,84863	0,244358
(2) RB	44,0158	S/E	10,44951	0,052003
(3) RC	-6,0158	S/E	16,04312	0,743708
(4) RD	-16,9684	S/E	11,84863	0,288464
(5) LA	-50,1842	-	10,44951	0,040727
(6) LB	21,2000	S/E	12,17331	0,223719
(7) LC	17,3316	S/E	11,84863	0,281066
(8) LD	76,2316	+	11,84863	0,023317
(9) LE	0,9158	S/E	10,44951	0,938148
(10) TA	50,8474	S/E	15,54937	0,082157
(11) TB	30,8842	S/E	16,04312	0,194093
(12) TC	62,6474	S/E	15,54937	0,056440
(13) EA	19,3842	S/E	16,04312	0,350426
(14) EB	-20,6684	S/E	11,84863	0,223213
(15) EC	-19,6000	S/E	12,17331	0,248672
R ² = 0,99				
R ² aj. = 0,93				

S/E: Sem efeito significativo.

As análises de variância do experimento de triagem com fatores de dois níveis- volume acumulativo de biogás produzido expressa em (mL/gSV) - estão apresentados na TABELA 42. Apenas o microrganismo LD apresentou efeito significativo positivo para essa variável.

TABELA 42- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: SOMA DE BIOGÁS PRODUZIDO EM 14,5 gSV·L⁻¹ NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	22,2202	S/E	13,61911	0,244358
(2) RB	50,5929	S/E	12,01093	0,052003
(3) RC	-6,9147	S/E	18,44037	0,743708
(4) RD	-19,5039	S/E	13,61911	0,288464
(5) LA	-57,6830	-	12,01093	0,040727
(6) LB	24,3678	S/E	13,99231	0,223719
(7) LC	19,9214	S/E	13,61911	0,281066
(8) LD	87,6225	+	13,61911	0,023317
(9) LE	1,0526	S/E	12,01093	0,938148
(10) TA	58,4453	S/E	17,87284	0,082157
(11) TB	35,4991	S/E	18,44037	0,194093
(12) TC	72,0085	S/E	17,87284	0,056440
(13) EA	22,2807	S/E	18,44037	0,350426
(14) EB	-23,7568	S/E	13,61911	0,223213
(15) EC	-22,5287	S/E	13,99231	0,248672

R² = 0,99

R² aj = 0,93

S/E: Sem efeito significativo ao nível de 95 % de confiança.

Quanto à variável “média de metano por mL”, os microrganismos que apresentaram efeito significativo positivo foram RA, RB, LD, TA e TC, com p-valor <0,01, apresentados na TABELA 43.

TABELA 43- VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE METANO mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	1,57895	+	0,282451	0,030542
(2) RB	2,98947	+	0,249098	0,006872
(3) RC	0,01053	S/E	0,382440	0,980541
(4) RD	-0,02105	S/E	0,282451	0,947368
(5) LA	-3,41053	-	0,249098	0,005292
(6) LB	1,20000	S/E	0,290191	0,053803

(continua)

TABELA 43 - VALORES DA ANÁLISE ESTATÍSTICA, ERRO PADRÃO, p-VALOR E EFEITO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM FATORES DE DOIS NÍVEIS: MÉDIA DE METANO mL NO BIODIGESTOR POR VIA ÚMIDA NA ETAPA 1

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(7) LC	0,77895	S/E	0,282451	0,110176
(8) LD	4,57895	+	0,282451	0,003783
(9) LE	0,18947	S/E	0,249098	0,526316
(10) TA	3,36842	+	0,370670	0,011894
(11) TB	1,61053	S/E	0,382440	0,052027
(12) TC	5,36842	+	0,370670	0,004734
(13) EA	1,61053	S/E	0,382440	0,052027
(14) EB	-1,02105	S/E	0,282451	0,068727
(15) EC	-1,80000	-	0,290191	0,025020

R² = 0,99

R² aj = 0,99

S/E: Sem efeito significativo ao nível de 95 % de confiança

Os microrganismos testados no PB que influenciaram positivamente e significativamente nas variáveis- perda de massa (%); média de metano (%); média de Biogás (mL); média de metano (mL); volume acumulativo de biogás (mL); volume acumulativo de biogás (mL · gSV⁻¹) - estão apresentados na TABELA 44.

TABELA 44- RESUMO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MICRORGANISMOS QUE INFLUENCIARAM POSITIVAMENTE NAS VARIÁVEIS BIOGÁS E BIOMETANO (EFEITO; ERRO PADRÃO E p-VALOR)

Microrganismos	Efeito	Efeito	Erro padrão	p-valor
(1) RA	1,579	+	0,282	0,031
(2) RB	2,989	+	0,249	0,007
(8) LD	7,623	+	1,185	0,023
(10) TA	1,739	+	0,073	0,002
(11) TB	1,825	+	0,076	0,002
(12) TC	1,689	+	0,073	0,002
(13) EA	1,790	+	0,076	0,002
(14) EB	0,419	+	0,056	0,017

A FIGURA 25 contém, de forma simplificada, as cepas bacterianas que foram utilizadas no delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*. Foram isolados inoculantes de 4 fontes diferentes, sendo estas: resíduo alimentar, lodo de ETE, lodo de ETE enriquecido e bactérias lácticas. Foram destacados em verde os inoculantes

que resultaram em efeitos positivos significativos para o sistema, de modo que os demais apresentaram efeito negativo ou nenhum efeito.

FIGURA 25- SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTARAM EFEITO SIGNIFICATIVO POSITIVO DURANTE O PROCESSO DE BIODIGESTÃO VIA ÚMIDA A 35 °C

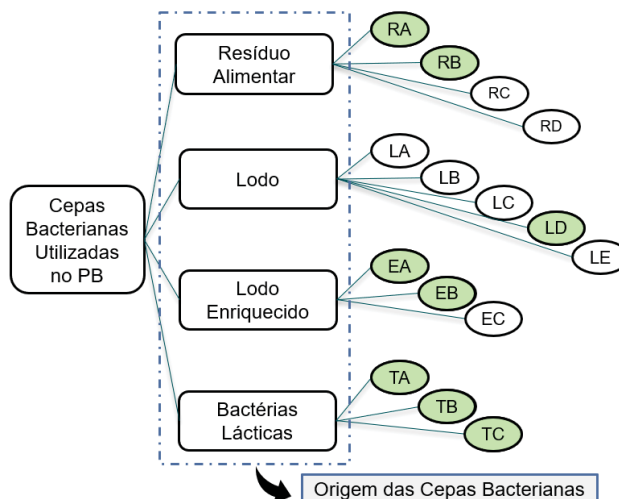
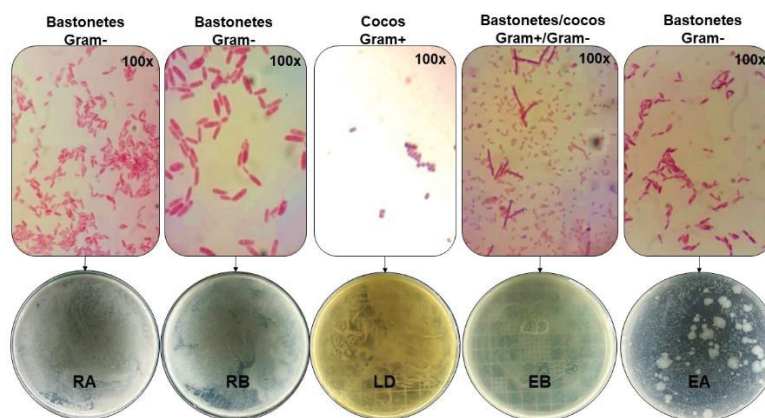


FIGURA 26- MICRORGANISMOS ISOLADOS COM EFEITO SIGNIFICATIVO POSITIVO DURANTE O PROCESSO DE BIODIGESTÃO DIFERENCIANDO EM FORMA E COLORAÇÃO DE GRAM



Aumento: 100x(óleo); NA: 1,40 e WD 0,13mm.

A partir da FIGURA 25, pode-se verificar o efeito positivo de 8 microrganismos, sendo estes: RA e RB (oriundos do resíduo alimentar), LD (oriundo do lodo de ETE), EA e EB (oriundo do lodo de ETE enriquecido) e TA, TB e TC (oriundas das bactérias lácticas presentes no LENGEBIO); enquanto os inoculantes restantes não apresentaram efeito, ou apresentaram efeito negativo. Desta forma, verifica-se a importância da seleção de microrganismos para uma melhor eficiência do processo, de modo a se utilizar os microrganismos que apresentam efeito positivo no sistema. Os microrganismos destacados em verde foram testados experimentalmente para

coloração de Gram com seu efeito positivo no incremento da produção volumétrica acumulada de biometano (FIGURA 26).

Como parte da pré-seleção dos grupos de microrganismos do resíduo e do lodo, a coloração de Gram (FIGURA 26) foi realizada. Os resultados revelaram que dos cinco grupos microbianos codificados, os dois provenientes do resíduo (RA e RB) apresentaram características semelhantes tanto na coloração de Gram-negativa quanto na forma de bastonetes. Essa semelhança também foi observada para o grupo codificado EA; por outro lado, o grupo isolado do lodo apresentou características de coloração de Gram-positiva e formato de cocos. Vale ressaltar que o grupo EB se destacou por exibir características que englobam tanto a coloração de Gram-positiva quanto a forma de cocos.

Em estudo realizado por Resende *et al.*, (2014) 593 cepas bacterianas foram isoladas de um efluente de biodigestão anaeróbica. Encontraram-se cocos Gram-positivos (CGP), sendo os mais observados com 28 espécies diferentes identificadas, 25 % CGP/C+ e 75 % CGP/C-. Os mais prevalentes foram *Enterococcus faecium* (15 %), *Enterococcus hirae* (12 %) e *Streptococcus bovis* (8 %). *Escherichia coli* (83 %) foi a mais prevalente entre os otorrinolaringologistas, seguida por *Morganella morganii* (7 %) e *Citrobacter freundii* (3 %). Para bastonetes Gram-negativos não fermentadores, foram observadas 19 espécies diferentes, *A. faecalis* (18 %) e *Pseudomonas alcaligenes* (18 %) foram as mais identificadas.

Entre outras bactérias encontradas na biodigestão o *Clostridium* é uma bactéria Gram-positiva e é responsável pela degradação de compostos orgânicos e por produzir ácidos graxos voláteis por meio da reação *Stickland*. Representado como uma bactéria Gram-positiva, está relacionada à hidrólise de biopolímeros complexos (HE *et al.*, 2018).

No estudo de Jiang *et al.* (2020), em que avaliou vários estudos com microrganismo na digestão anaeróbica com patogenicidade que foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* e quistos de *Giardia* em 26 das 30 amostras de lamas brutas e em todas as 25 amostras tratadas. Em 8 ETEs suecas, indicou-se que 67 % das 64 amostras de lodo bruto e 55 % das 69 amostras tratadas foram positivas para *Salmonella*. A *Salmonella* foi detectada em estrume de metade das 30 granjas de porcos irlandesas amostradas, com a maioria dos isolados sendo *S. typhimurium* multirresistente a drogas.

5.3.2 Efeitos dos microrganismos isolados (ETAPA 2)

A análise de variância estática com $p < 0,05$ foi utilizada para mostrar qual microrganismo mostrou efeitos significativos e positivos para as respostas: perda de massa (%), soma de metano (mL) e soma de biogás (mL) e seus valores médios estão apresentados na TABELA 45.

TABELA 45- RESPOSTAS EXPERIMENTAIS VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS (mL) VOLUME ACUMULATIVO DE METANO (mL) E PERDA DE MASSA (%) PARA O DELINEAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN 7/8 PARA OS MICRORGANISMOS (ETAPA 2)

Ensaio	Volume acumulativo de Biogás (mL)	Volume acumulativo de Metano (mL)	Perda de Massa (%)
1	524	339	26
2	979	620	26
3	917	583	26
4	580	381	27
5	602	372	26
6	627	399	26
7	961	604	26
Média (8,9,10 e 11) *	966	589	27
Média (12 e 13) **	623	384	25

*ensaio com todos os microrganismos; ** ensaio sem microrganismo.

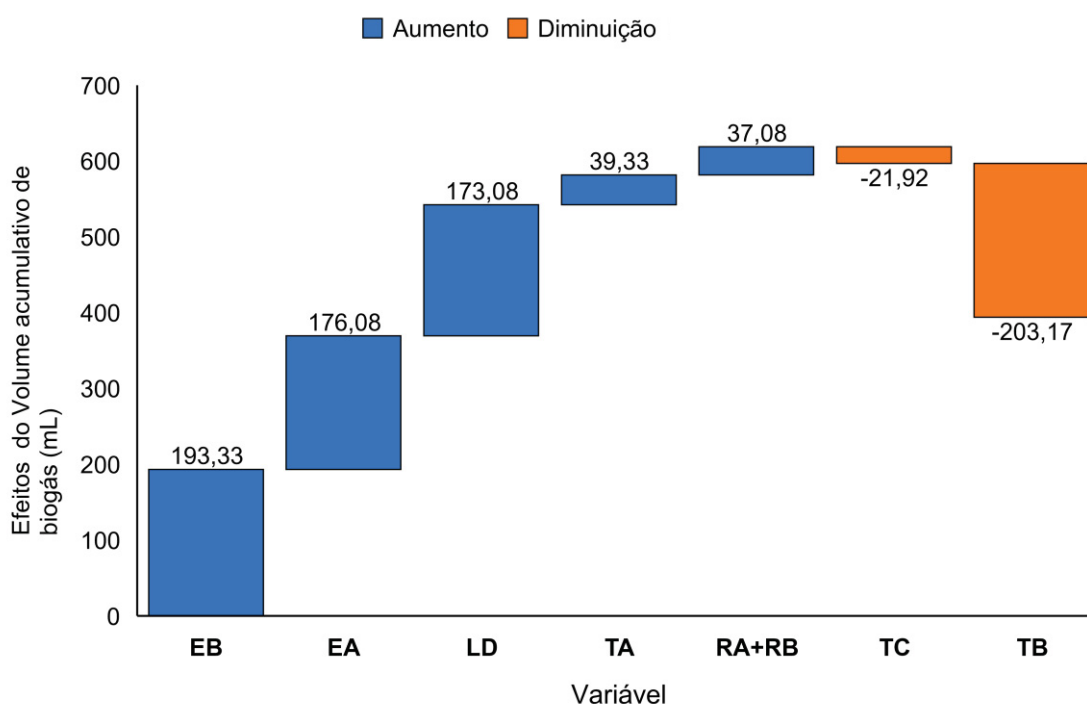
Os ensaios que apresentaram valores elevados de volume acumulativo de metano (mL) em 10 dias com biodigestão por via úmida foram os ensaios 2, 7 e 3 com o percentual de 61 %, 57 % e 52 %, respectivamente, relacionada ao aumento com o controle. Os dados referentes as análises de variância (ANOVA) resultante dos ensaios do PB para as variáveis biogás (mL), metano (mL) e perda de massa (%) estão apresentados na TABELA 46.

TABELA 46- ANÁLISE ESTATÍSTICA DO VOLUME ACUMULATIVO DE BIOGÁS (mL) VOLUME ACUMULATIVO DE METANO (mL) E PERDA DE MASSA (%) PARA O DELINEAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN 7/8 DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2

Microrganismo	Biogás (mL)		Metano (mL)		Perda de massa (%)	
	Efeitos	p-valor	Efeitos	p-valor	Efeitos	p-valor
RA+RB	37,08	0,094467	22,89	0,252103	0,42	0,657924
LD	173,08	0,005001	106,73	0,017639	0,36	0,703463
TA	39,33	0,085271	10,01	0,558026	-0,01	0,989294
TB	-203,17	0,003637	-131,11	0,011794	0,70	0,485762
TC	-21,92	0,216376	-16,95	0,359324	0,27	0,770721
EA	176,08	0,004833	104,17	0,018494	0,26	0,780630
EB	193,33	0,004014	110,56	0,016469	-0,00	1,000000
R ²	0,99811		0,99268		0,5416	
R ² aj	0,99150		0,96707		0,000	

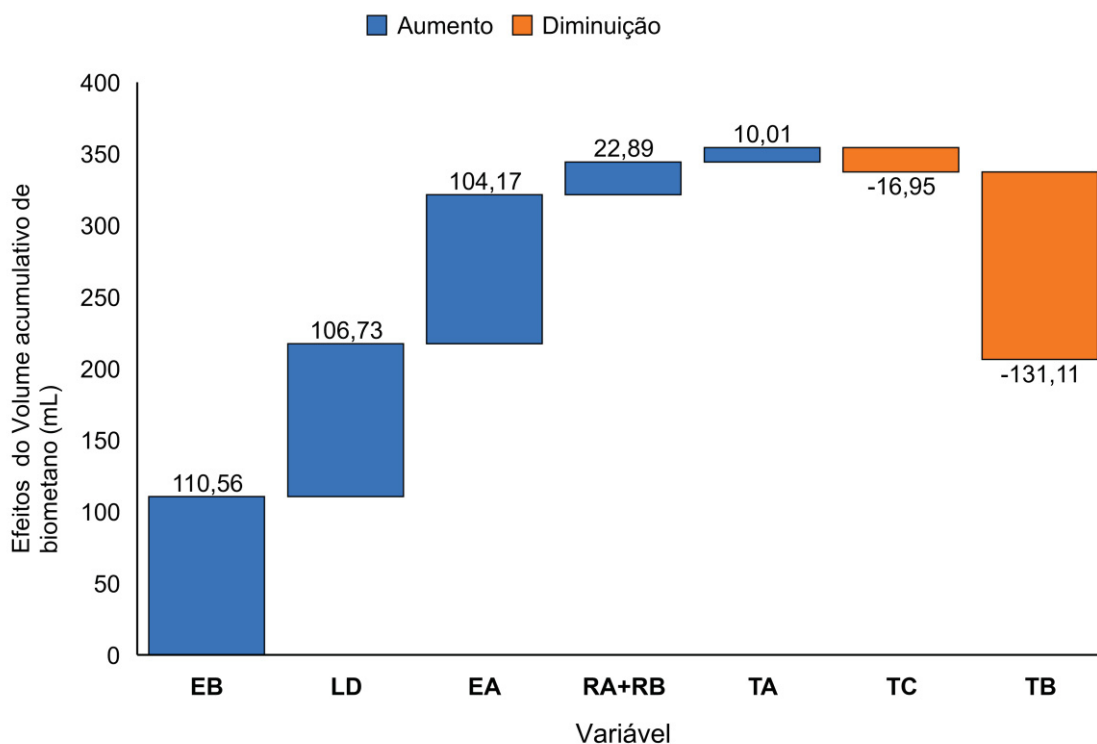
Os dados referentes as análises de variância (ANOVA) a partir do estudo PB para o volume acumulativo de biogás produzido (mL) estão apresentados na FIGURA 27. Os microrganismos codificados que apresentaram significância para resposta “biogás (mL)” foram o EB (193,33), EA (176,08) e ED (173,08) com p-valor < 0,05 com efeito positivo, quanto o TB (-203,17) apresentou efeito significativo negativo.

FIGURA 27- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2



Quanto à variável “metano acumulado (mL)”, os microrganismos que apresentaram efeito significativo (p-valor <0,05) positivo foram: EB, EA e LD e com valores de 110,6; 104,2 e 106,2, respectivamente. Apenas o microrganismo TB mostrou significância negativa para essa variável. Os efeitos da influência que os microrganismos têm no processo acumulativo de metano (mL) estão demonstrados na FIGURA 28.

FIGURA 28- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (MICRORGANISMOS) ETAPA 2



Desta forma, os microrganismos selecionados nessa etapa foram: EB, LD e EA. Os microrganismos TA e RA+RB, mesmo não apresentando significância para o teste, poderão ser incluídos devido aos seus resultados para as variáveis estudadas, pois não apresentaram em nenhum momento efeitos negativos.

Podemos destacar que os microrganismos da biodigestão são amplamente reconhecidos por sua notável capacidade de converter compostos de alto peso molecular em substâncias de menor massa que podem ser facilmente assimiladas através da digestão anaeróbica. Esse processo é impulsionado pela produção de enzimas extracelulares microbianas (FERDES, 2020). A diversidade microbiana pode ser explorada para produzir enzimas com maior eficiência catalítica, uma grande variedade de perfis de substrato e estabilidade a altas temperaturas e inibidores.

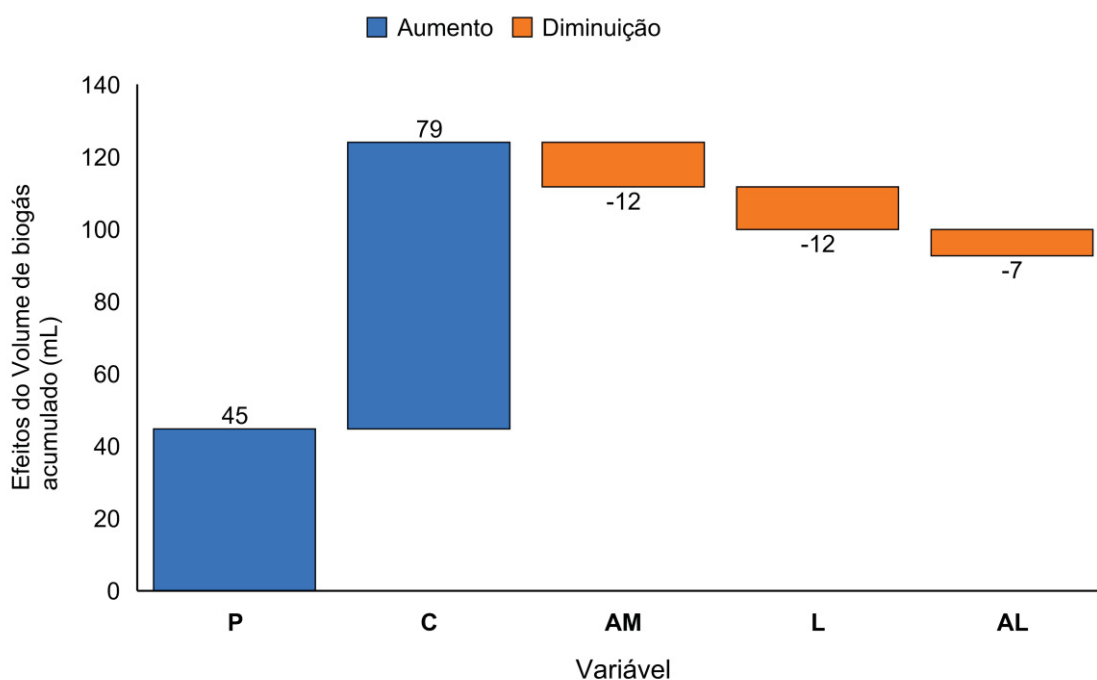
Em estudo, realizado por He *et al.* (2018), investigou-se a adição de uma comunidade microbiana no processo de biodigestão com o objetivo de degradar óleos de cozinha, resultando em um aumento na eficiência da biodigestão; durante a pesquisa, os microrganismos predominantes identificados foram os metanógenos acetoclásticos do gênero *Methanosaeta*, enquanto os gêneros *Syntrophomonas*,

Anaerovibrio e *Synergistaceae* foram as bactérias mais comumente observadas no estudo, podendo ser consideradas para nossa pré-seleção de microrganismos.

5.3.3 Efeitos enzimáticos na composição do resíduo orgânico (ETAPA 3)

As variáveis respostas referentes ao “volume de biogás acumulado (mL)” são observadas na FIGURA 29. O gráfico apresenta os efeitos da influência das enzimas no processo acumulativo de biogás. As enzimas que demonstraram efeito significativo (p -valor $< 0,1$) positivo foram: Celulase (C) e Protease (P). As enzimas Amiloglucosidase (AM), Lipase (L) e α -Amilase (AL) apresentam significância negativa para essa variável.

FIGURA 29- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS) ETAPA 3

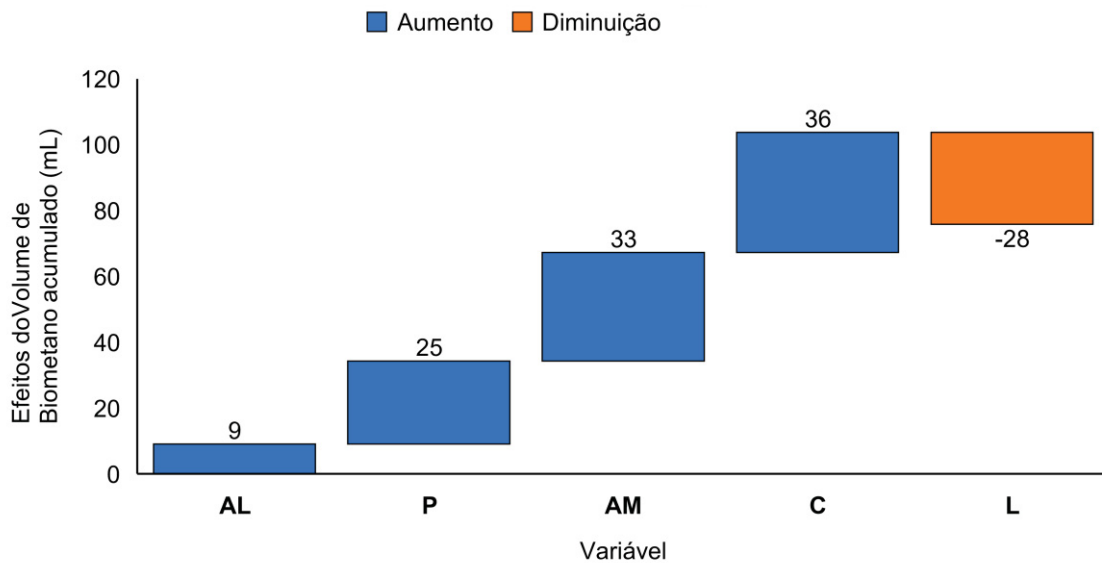


α -Amilase (AL); amiloglucosidase (AM); protease (P); lipase (L) e celulase (C)

Quando às variáveis respostas sobre “volume de biometano acumulado (mL)”, o gráfico com os efeitos de influência das enzimas no processo acumulativo de biometano aponta que as enzimas com efeito significativo (p -valor $< 0,1$) positivo foram: Celulase (C), Amiloglucosidase (AM), Protease (P) e α -Amilase (AL). O gráfico é observado pela FIGURA 30. O “comportamento da produção de metano durante 10

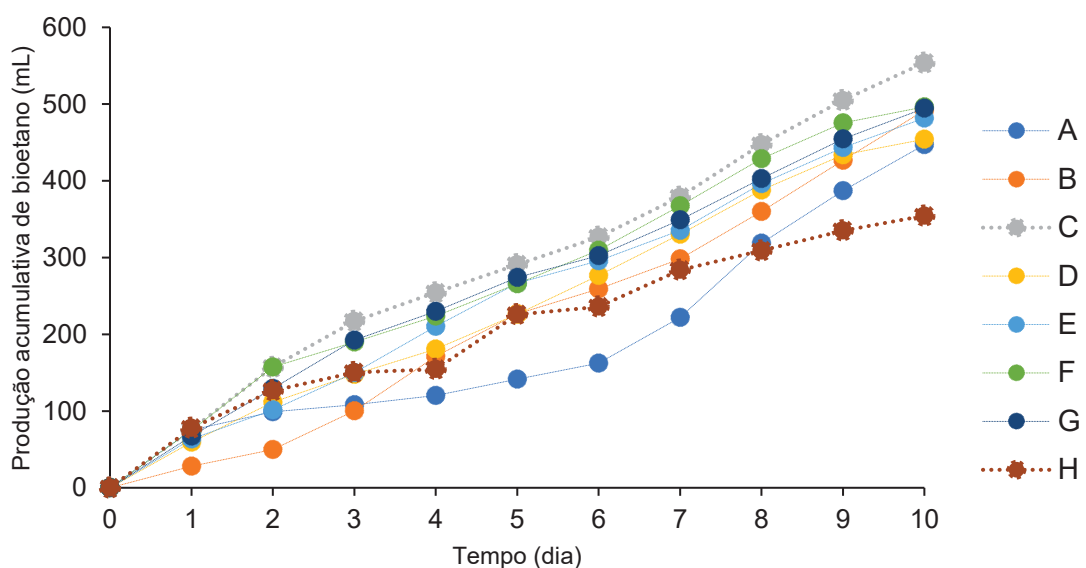
dias” é observado na FIGURA 30, por esse gráfico, é possível analisar que o comportamento acumulativo foi crescente, para a produção de biometano, em todos os testes. A amostra que apresentou menor volume acumulativo foi a H, referente ao controle dos testes.

FIGURA 30- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS) ETAPA 3



α -Amilase (AL); amiloglucosidase (AM); protease (P); lipase (L) e celulase (C)

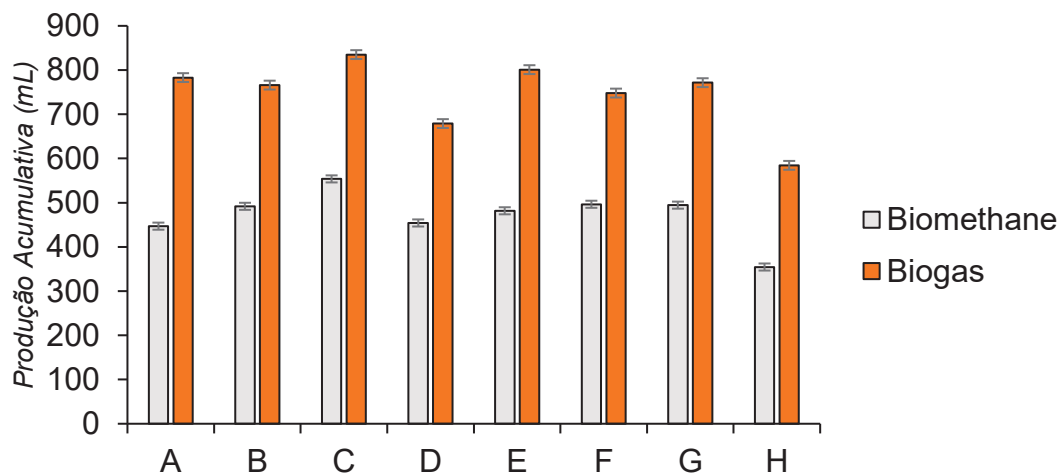
FIGURA 31- GRÁFICO DO PERFIL DE COMPORTAMENTO DOS VALORES DE PRODUÇÃO DO BIOMETANO COM O USO DE ENZIMAS DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ETAPA 3)



Ensaio: Lipase e Celulase (A); α -Amilase (B); Amiloglucosidase e Celulase (C); α -Amilase, Amiloglucosidase e Lipase (D); Protease e Lipase (E); Amiloglucosidase e Protease (F); Todas as enzimas (G) e Controle sem enzimas e sem tanque de hidrólise (H).

O comparativo entre o volume acumulativo de biometano e biogás, é apresentado na FIGURA 32; os gráficos apresentam o volume total de biogás superior ao volume de biometano para todos os testes realizados com enzimas e o controle (H).

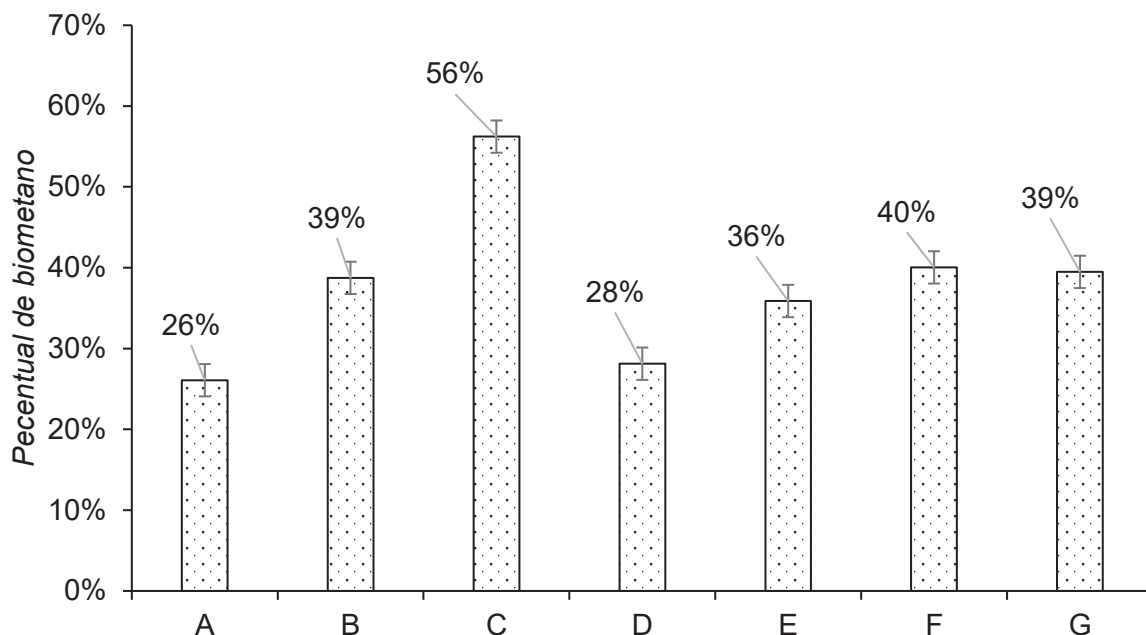
FIGURA 32- VOLUME ACUMULATIVO DE BIOMETANO E BIOGÁS DOS EXPERIMENTOS COM ENZIMAS DURANTE 10 DIAS (ETAPA 3)



Ensaio: Lipase e Celulase (A); α -Amilase (B); Amiloglucosidase e Celulase (C); α -Amilase, Amiloglucosidase e Lipase (D); Protease e Lipase (E); Amiloglucosidase e Protease (F); Todas as enzimas (G) e Controle sem enzimas e sem tanque de hidrólise (H).

O aumento de biometano dos ensaios (A, B, C, D, E, F e G) foi comparado com o ensaio controle (H), em que não houve tratamento do tanque de hidrólise e sem adição de enzimas. Os percentuais comparativos são expostos nos gráficos da FIGURA 33 e apresentam um ganho significativo entre 26 e 50 % de aumento na produção de biometano.

FIGURA 33- VALORES DO PERCENTUAL DE AUMENTO DE BIOMETANO COM O USO DE ENSIMAS NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO (ETAPA 3)



Ensaio: Lipase e Celulase (A); α -Amilase (B); Amiloglucosidase e Celulase (C); α -Amilase, Amiloglucosidase e Lipase (D); Protease e Lipase (E); Amiloglucosidase e Protease (F); Todas as enzimas (G).

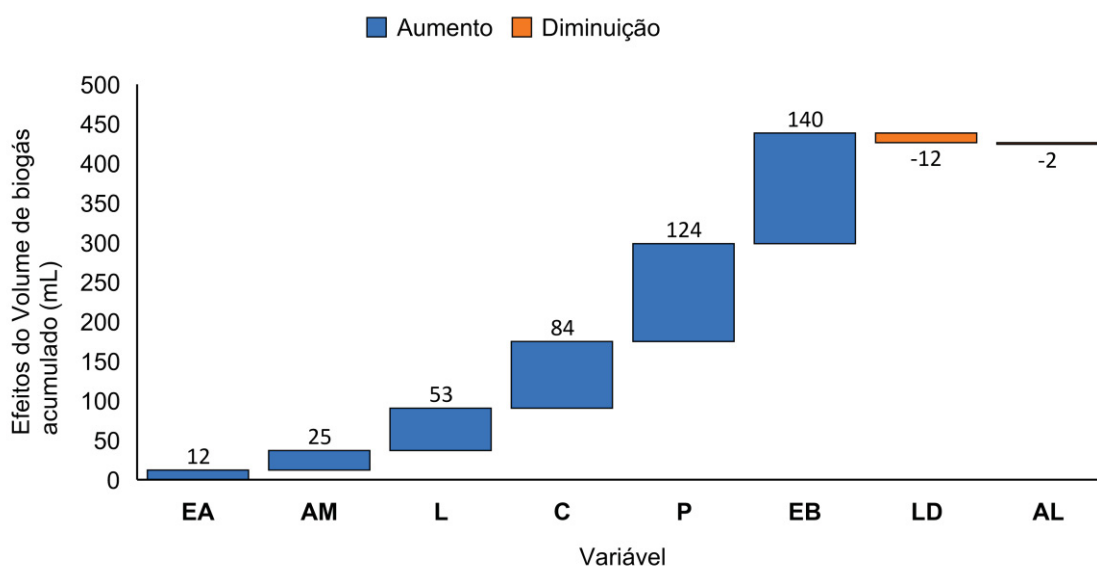
Dessa forma, foi constatado que todas as enzimas testadas exerceram influência na produção de biogás e biometano. Portanto, é possível selecionar as cinco enzimas para a Etapa 4, na qual foram submetidas à interação com os grupos de microrganismos isolados neste estudo. No entanto, apesar da lipase apresentar efeitos negativos nas respostas (biogás e biometano), ela foi incluída para compor a composição percentual do resíduo orgânico, a fim de avaliar seu efeito na interação com os microrganismos do laboratório.

As enzimas trazem uma ampla gama de benefícios de processamento, melhorando a eficiência da produção de biogás através da redução do tempo de produção, substituindo tratamentos químicos ou físicos, reduzindo energia consumo e menos desperdício (FERDES *et al.*, 2020). Segundo Wang *et al.* (2016), a presença de enzimas, como a celulase, amilase e protease adicionada diretamente ao biodigestor, pode aumentar a produção de metano 110,79 % em conjunto com codigestão de esterco bovino.

5.3.4 Efeitos do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (PB) que utilizou enzimas e microrganismos (**ETAPA 4**)

As análises anteriores foram realizadas também para os ensaios contendo enzimas e microrganismos. As variáveis respostas referentes ao “volume de biogás acumulado (mL)” são observadas na FIGURA 34, que mostra o gráfico com os efeitos de influência das enzimas e microrganismos no processo acumulativo de biogás. As amostras que apresentaram efeito significativo (p -valor $< 0,1$) positivo foram: Celulase (C), Protease (P), Lipase (L), Amiloglucosidase (AM) e isolados do lodo por meio BHI (EB) e PDA (EA). Já os ensaios α -Amilase (AL) e isolados do lodo por meio MRS (LD) apresentam significância negativa para essa variável.

FIGURA 34- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOGÁS (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS + MICRORGANISMOS) ETAPA 4



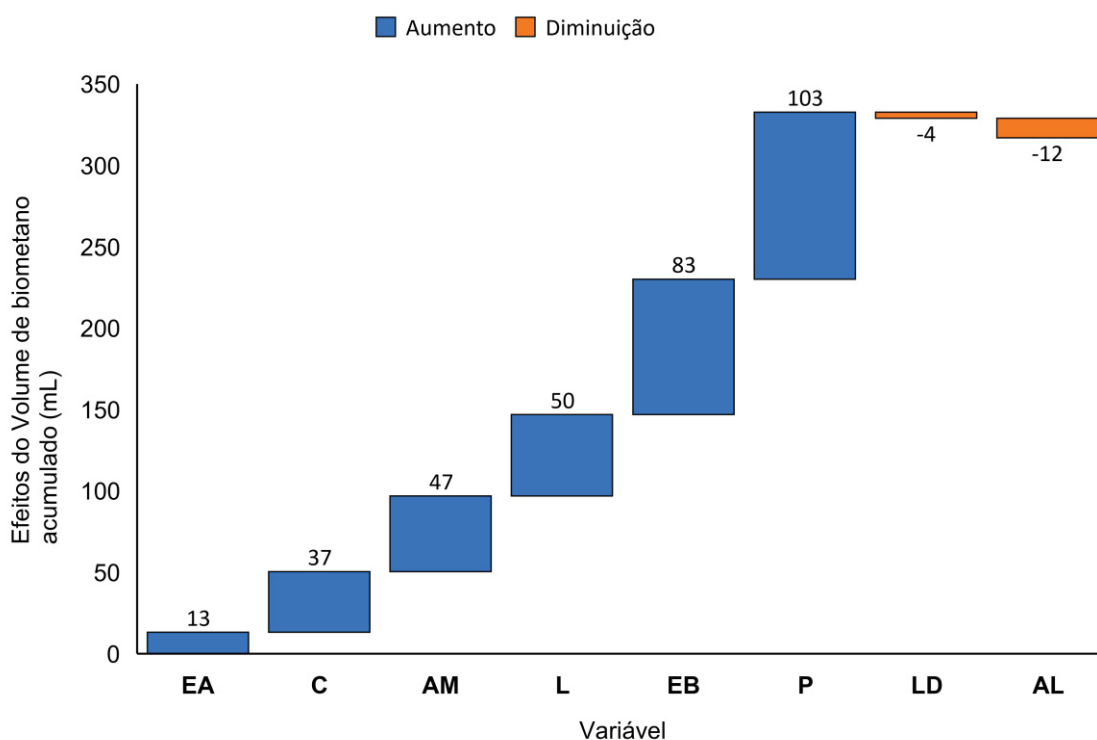
α -Amilase (AL); amiloglucosidase (AM); protease (P); lipase (L); celulase (C); isolado do lodo por meio MRS (LD); Lodo enriquecido PDA (EA) e Lodo enriquecido BHI (EB)

Quanto às variáveis respostas sobre “volume de biometano acumulado (mL)”, o gráfico (FIGURA 35) com os efeitos de influência das enzimas e microrganismos no processo acumulativo de biometano aponta que as enzimas com efeito significativo (p -valor $< 0,1$) positivo foram: Celulase (C), Amiloglucosidase (AM), Protease (P), Lipase (L) e os microrganismos foram os isolados do lodo por meio PDA (EA) e BHI

(EB). Todavia a α -Amilase (AL) e os microrganismos isolados do lodo enriquecido por MRS (LD) apresentaram efeito negativo na produção.

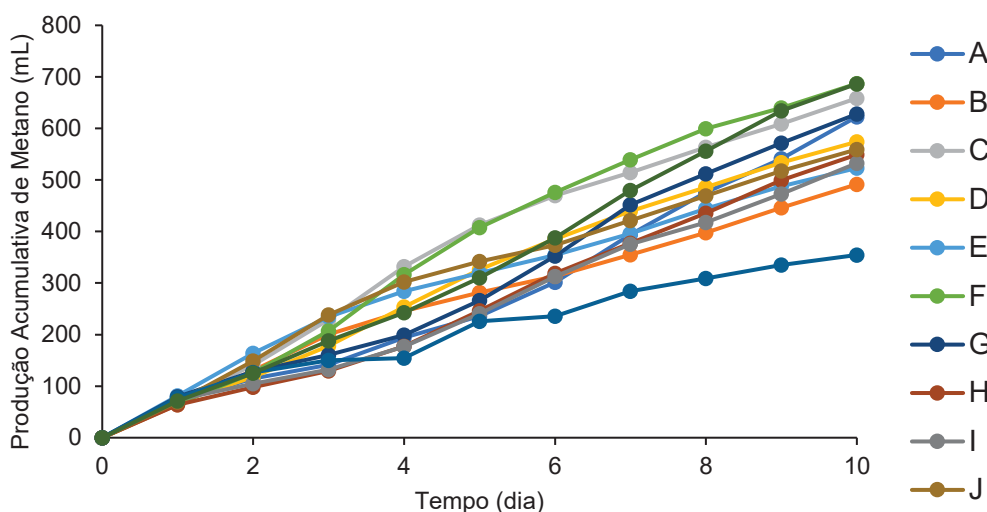
Ao analisar o comportamento da produção de biometano durante 10 dias para todos os ensaios, percebe-se que todos apresentaram um comportamento crescente de produção. Tendo como o resultado menos expressivo o ensaio L, representado pelo controle, o qual não houve adição de enzimas e de microrganismos.

FIGURA 35- GRÁFICO DOS EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A VARIÁVEL “BIOMETANO (mL)” DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ENZIMAS + MICRORGANISMOS) ETAPA 4



α -Amilase (AL); amiloglucosidase (AM); protease (P); lipase (L); celulase (C); isolado do lodo por meio MRS (LD); Lodo enriquecido PDA (EA) e Lodo enriquecido BHI (EB)

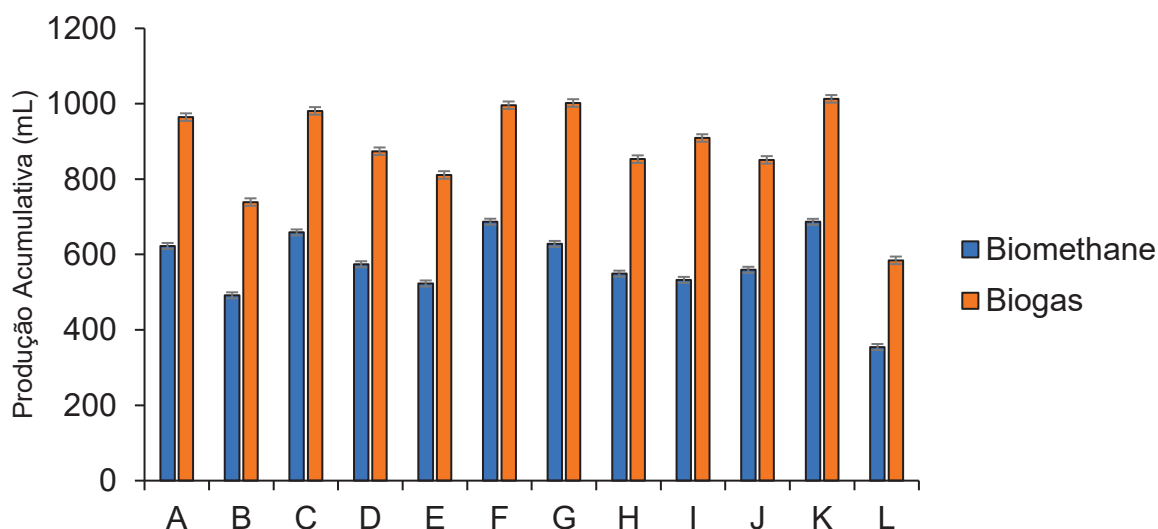
FIGURA 36- GRÁFICO DO PERFIL DE COMPORTAMENTO DOS VALORES DE PRODUÇÃO DO BIOMETANO COM O USO DE ENZIMAS + MICRORGANISMOS DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (ETAPA 4)



Ensaio: A (AL, P, EB e LD); B (AL, AM, L e LD); C (AM, P e C); D (AL, P, C e EA); E (AL, AM, P, C, EA e LD); F (AM, P, L, EA e EB); G (P, C, EB e LD); H (L, C, EA e LD); I (AL, C, EA e EB); J (AM, EA, EB e LD).

O comparativo entre o volume acumulativo de Biometano e Biogás é apresentado na FIGURA 37. Os gráficos apresentam um volume total de biogás superior ao volume de biometano para todos os testes realizados com enzimas e microrganismos e para o controle (L).

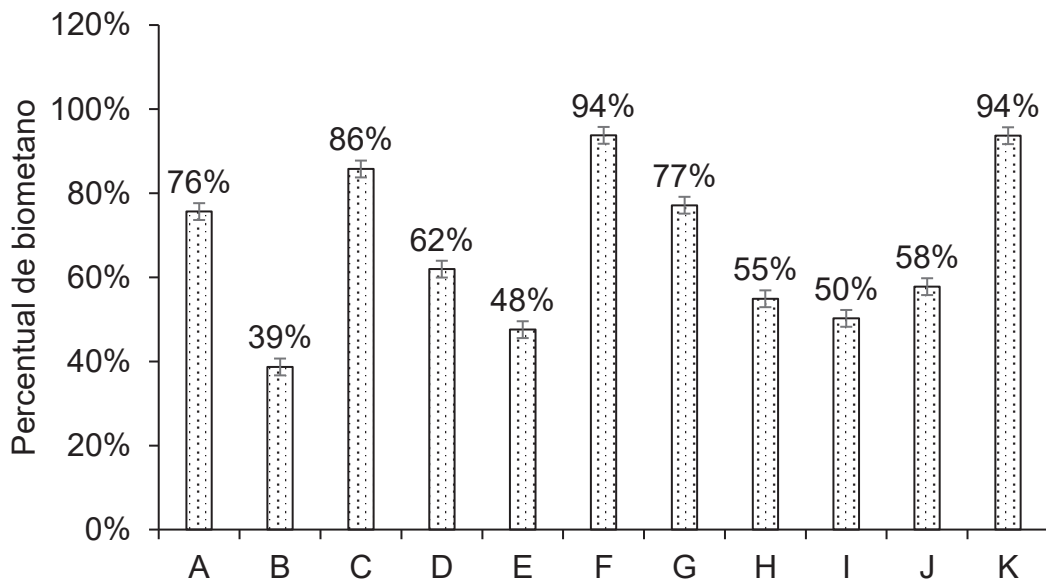
FIGURA 37- VOLUME ACUMULATIVO DE BIOMETANO E BIOGÁS DOS EXPERIMENTOS COM ENZIMAS + MICRORGANISMOS DURANTE 10 DIAS (ETAPA 4)



Ensaio: A (AL, P, EB e LD); B (AL, AM, L e LD); C (AM, P e C); D (AL, P, C e EA); E (AL, AM, P, C, EA e LD); F (AM, P, L, EA e EB); G (P, C, EB e LD); H (L, C, EA e LD); I (AL, C, EA e EB); J (AM, EA, EB e LD); K (todos as enzimas e microrganismos) e L (controle sem tanque de hidrolise e sem adição de enzimas e microrganismos).

O aumento de biometano dos ensaios (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K) foi comparado com o ensaio controle (L). Os percentuais comparativos são expostos nos gráficos da FIGURA 38 e apresentam um ganho significativo entre 39 e 94 % de aumento na produção de metano.

FIGURA 38- VALORES DO PERCENTUAL DE AUMENTO DE BIOMETANO COM O USO DE ENSIMAS + MICRORGANISMOS NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO (ETAPA 4)



Ensaio: A (AL, P, EB e LD); B (AL, AM, L e LD); C (AM, P e C); D (AL, P, C e EA); E (AL, AM, P, C, EA e LD); F (AM, P, L, EA e EB); G (P, C, EB e LD); H (L, C, EA e LD); I (AL, C, EA e EB); J (AM, EA, EB e LD); K (todos as enzimas e microrganismos).

Das combinações estudadas neste trabalho, todas apresentaram um aumento na resposta de biometano. No entanto, em relação aos efeitos nas respostas de biogás e biometano, apenas o microrganismo testado e a enzima α -amilase demonstraram efeitos negativos. Nesse sentido, os microrganismos EA e EB, obtidos a partir do enriquecimento do lodo de estação de tratamento de esgoto, foram selecionados como os que apresentaram as melhores respostas para este estudo. Quanto às enzimas, foram selecionadas as enzimas AM, L, P e C como as mais promissoras. No entanto, é importante ressaltar que o efeito da enzima AL foi negativo para as respostas, porém, essa enzima atua em conjunto com a AM, e não isoladamente. Portanto, seu uso deve ser atribuído em conjunto com a AM para uma melhor influência.

O uso de enzimas na biodigestão é uma estratégia promissora para melhorar a eficiência do processo de produção de biogás. De acordo com Ferdes *et al.* (2020), o pré-tratamento microbiológico e enzimático é uma das estratégias mais eficazes e de baixo custo para valorização do biogás. Isso ocorre porque a atividade enzimática pode quebrar as moléculas complexas presentes na matéria orgânica, facilitando a sua degradação pelas bactérias e, conseqüentemente, aumentando a produção de biogás. Além disso, o pré-tratamento enzimático também pode melhorar a qualidade do biogás produzido, reduzindo a quantidade de impurezas e melhorando a sua capacidade calorífica.

Outro aspecto importante do uso de enzimas na biodigestão é o seu potencial para aumentar a produção de metano, que é o principal componente do biogás. De acordo com o estudo de Wang *et al.* (2016), a presença de enzimas no meio não afeta significativamente a comunidade bacteriana e pode aumentar a produção de metano. Isso ocorre porque as enzimas podem promover a quebra de moléculas complexas que são difíceis de serem degradadas pelas bactérias, liberando nutrientes que podem ser utilizados para a produção de metano. Além disso, as enzimas também podem melhorar as condições de pH do meio, favorecendo o crescimento das bactérias produtoras de metano.

Em resumo, o uso de enzimas na biodigestão é uma estratégia promissora para melhorar a eficiência do processo de produção de biogás. Os estudos indicam que o pré-tratamento enzimático é uma das estratégias mais eficazes e de baixo custo para valorização do biogás, permitindo a quebra de moléculas complexas e facilitando a sua degradação pelas bactérias. Além disso, as enzimas também podem aumentar a produção de metano, favorecendo a qualidade e a quantidade do biogás produzido.

5.4 CONCLUSÕES

O estudo possibilitou o isolamento de microrganismos a partir do resíduo alimentar e do lodo de uma estação de tratamento de esgoto, os quais contribuíram para a produção de biogás e biometano. Além disso, os experimentos realizados permitiram reduzir o número de variáveis independentes relacionadas aos microrganismos isolados, enriquecidos em caldo nutriente e enzimas comerciais utilizadas. Essas enzimas comerciais incluíram: α -amilase (EAA 1002-14; Global

Food), amiloglucosidase (GlucGo 2X; Tecnoglobo), protease (NP-100; Jiangsu Boli), lipase (Alphase LP; Jiangsu Boli) e celulase (celluclast 1,5L; Novozymes). A seleção dos microrganismos mais promissores foi realizada por meio do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*, codificados como EA e EB. Os ensaios que envolveram a adição de enzimas ou microrganismos constataram um aumento na produção de biogás e biometano em comparação com o grupo de controle.

Considerando a redução das variáveis e os efeitos positivos observados na produção de biogás e biometano, o próximo capítulo (Capítulo 6) tem como objetivo otimizar as quantidades de enzimas e grupos microbianos na mistura (blend) para melhorar as condições ideais e a eficiência na produção de biogás e biometano a partir de resíduos alimentares.

OPTIMIZING FOOD WASTE BIODIGESTION: PRE-SELECTION OF MICROBIAL GROUPS AND ISOLATED ENZYMES USING THE PLACKETT-BURMAN EXPERIMENTAL DESIGN

Pablo Inocência Monteiro ^{a*}, André Bellin Mariano ^b; Bianca do Santos Padilha ^c; Yann Domingues de Moraes ^c; Letícia Zaguine ^c, Leonardo de Castro Melo ^d, Leonardo Rey Oliveira Lopes ^f; Marcelo Lacerda de Moraes ^e; Michele Rigon Spier ^{ac*}.

^a Federal University of Paraná; Graduation Program in Food Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^b Federal University of Paraná; Department of Electrical Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^c Federal University of Paraná; Department of Chemical Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^d Federal University of Paraná; Department of Environmental Engineering, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^e Federal University of Paraná; Department of Chemistry, Av. Francisco H. dos Santos, 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná State, Brazil; zip code: 81531-980.

^f State University of Campinas, Department of Bioenergy, Street. Monteiro Labato| 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo State, Brazil; zip code: 13083-862.

^g State University of Campinas, Department of Environmental Engineering, Street. Monteiro Labato, 80, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo State, Brazil; zip code: 13083-862.

*Corresponding author: spier@ufpr.br; pabloinocencio@ufpr.br.



ISSN 1696-8352
revistaobservatoriolatinoamericano.com

[Register](#) [Login](#)

[ABOUT](#) [EDITORIAL POLICIES](#) [ARCHIVES](#) [CURRENT](#) [CITATIONS - GOOGLE SCHOLAR](#)

[Q SEARCH](#)

[CITATIONS - ALTMETRICS](#) [H5 INDEX](#) [INDEXING & ABSTRACTING](#) [QUALIS CAPES](#) [CONTACT](#)

[HOME](#) / [Qualis CAPES](#)

Qualis CAPES

The journal *Observatório de la Economía Latinoamericana* was evaluated by [Qualis CAPES 2017-2020](#) in Brazil, with the following strata (more information access the [Sucupira Platform](#)):

Qualis CAPES (Brazil) 2017-2020:

PUBLIC AND BUSINESS ADMINISTRATION, ACCOUNTING AND TOURISM - A4

BIODIVERSITY - A4

BIOTECHNOLOGY - A4

FOOD SCIENCE - A4

POLITICAL SCIENCE AND INTERNATIONAL RELATIONS - A4

AGRICULTURAL SCIENCES I - A4

ENVIRONMENTAL SCIENCES - A4

[MAKE A SUBMISSION](#)

LANGUAGE

[English](#)

[Português \(Brasil\)](#)

CURRENT ISSUE

[ATOM 1.0](#)

[RSS 2.0](#)

[RSS 1.0](#)

CAPÍTULO 6- OTIMIZAÇÃO DE UM BIOACELERADOR PARA A BIODIGESTÃO DE RESÍDUO ORGÂNICO USANDO FERRAMENTA DE DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Resumo: Avanços na tecnologia de biodigestores têm sido promovidos pelo crescente estudo da digestão anaeróbica, com o intuito de melhorar os processos relacionados à carga de resíduo utilizados. Essa pesquisa apresenta avanços na tecnologia de biodigestores por meio do estudo da digestão anaeróbica. O objetivo é melhorar os processos de tratamento de resíduos orgânicos e produção de biogás. O estudo utilizou a ferramenta estatística Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimizar a combinação de microrganismos e enzimas. Os resíduos alimentares foram fornecidos pelos restaurantes próximos à Universidade Federal do Paraná, e o lodo de ETE foi usado como inoculante. Foram testados dois microrganismos (EA e EB) e cinco enzimas (amilase, protease, lipase, celulase e amiloglucosidase). Foram realizados 50 ensaios com concentração de 14,5 g de sólidos voláteis por litro. O experimento foi configurado como 2^{6-1} , com 32 experimentos base, 12 experimentos axiais e 2 experimentos centrais com 4 repetições. Foram avaliadas as variáveis dependentes produção de biogás acumulada (BG) e produção de biometano acumulada (BM). Os resultados mostraram que as variáveis independentes EB e CA tiveram efeitos negativos e significativos na produção de BG e BM. Com as condições de processo otimizadas, o bioacelerador melhorou significativamente as respostas de BG e BM em comparação com os ensaios de controle em 72 % e 88 %, respectivamente. Em conclusão, a técnica de biodigestão é uma opção viável para o tratamento de resíduos orgânicos e a utilização de bioaceleradores pode ser uma abordagem promissora para melhorar o desempenho dos processos de biodigestão.

Palavras-chave: Biodigestores; digestão anaeróbica; produção de biogás; otimização de processos e bioaceleradores.

6.1 INTRODUÇÃO

O crescente estudo na área de digestão anaeróbica promoveu avanços no ramo de tecnologia de biodigestores, devido ao aumento da demanda por tratamento de resíduos orgânicos e produção de biogás em todo o mundo (Dar *et al.*, 2021). Os avanços da tecnologia de biodigestão anaeróbia têm proporcionado uma solução sustentável com benefícios ambientais e econômicos, para o tratamento de resíduos orgânicos e para a produção de biogás, ajudando a reduzir a dependência de combustíveis fósseis e diminuindo a emissões de gases de efeito estufa no mundo (Karki *et al.*, 2021; Zamri *et al.*, 2021).

Entre os resíduos orgânicos adequados para tratamento por digestão anaeróbica, destaca-se o resíduo alimentar, que possui alto conteúdo orgânico e excelente biodegradabilidade, além de ser rico em amido, gordura, proteína e fibras (Assis; Gonçalves, 2022; Ferdeş *et al.*, 2020; Kabaivanova *et al.*, 2022). O substrato orgânico no resíduo alimentar, além de ser ricos em macronutrientes, tem sua taxa de degradação melhorada por enzimas e a metabolização do substrato por microrganismos (Rajin *et al.*, 2020).

Os resíduos alimentares são uma importante fonte de matéria orgânica e nutrientes que podem ser convertidos em biogás. A adição de enzimas em resíduos alimentares pode melhorar significativamente a produção de biogás em digestores anaeróbicos (Rajin *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Desta forma, a atividade das comunidades microbianas possui um papel importante no desempenho e estabilidade dos resíduos alimentares na digestão anaeróbica, pois facilitam a quebra de compostos orgânicos complexos, em compostos mais simples que podem ser posteriormente metabolizados em biogás (Qin *et al.*, 2021).

As enzimas produzidas pelos microrganismos promovem a hidrólise do substrato e aumentar a taxa de digestão anaeróbica (Menzel *et al.*, 2020), além de contribui para o melhoramento da taxa de produção acumulativa de biogás no biodigestor (Panigrahi *et al.*, 2019).

A técnica de biodigestão é uma alternativa interessante para gerenciar o tratamento de grande volume diário de resíduos orgânicos, que muitas vezes sobrecarregam aterros sanitários ou controlados (Kunz *et al.*, 2022; OWAMAH *et al.*, 2021). Além de ser uma forma de saneamento básico, a biodigestão pode gerar bens

econômicos, como o biogás ou biometano e a fração líquida rica em nutrientes, que podem ser utilizados como biofertilizante (Lamolinara *et al.*, 2022).

Com o intuito de aprimorar a eficiência do processo de biodigestão de resíduos alimentares e aumentar a produção de biogás e biometano de forma mais rápida, este estudo teve como objetivo otimizar os valores ideais de grupos de microrganismos e enzimas como inoculantes, utilizando a ferramenta estatística DCCR.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Matéria-prima para a biodigestão

6.2.1.1 Substrato

Os resíduos alimentares foram fornecidos pelos restaurantes localizados nas proximidades do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná - UFPR (Curitiba, Paraná, Brasil). Ao receber esses resíduos, eles foram preparados de acordo com um padrão de 14 *mesh* e armazenados sob refrigeração a uma temperatura de -21 °C (± 2 °C) até o momento das análises.

6.2.1.2 Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE)

A CS Bioenergia, uma *joint venture* entre a SANEPAR e o Grupo Cattalini em São José dos Pinhais, Paraná, forneceu o lodo de ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) utilizado como inoculante. Este lodo é o resultado da codigestão úmida de resíduos de frutas e vegetais do CEASA (Central de Abastecimento do Paraná, Curitiba, Brasil) juntamente com esgoto sanitário e foi armazenado a uma temperatura de 25 °C (± 4 °C) na ausência de luz.

6.2.1.3 Microrganismos e enzimas

Os microrganismos e enzimas foram cedidos pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia LENGEBIO-UFPR, em Curitiba, Brasil. Dois

microrganismos isolados, denominados EA e EB, foram testados, juntamente com enzimas como amilase, protease, lipase, celulase e amiloglucosidase.

6.2.2 Análise de sólidos no resíduo orgânico e lodo de ETE

Tanto os resíduos alimentares (matéria orgânica) quanto o lodo de ETE (inoculante) foram caracterizados (TABELA 47). As análises consistiram na determinação da concentração de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e umidade, tanto para base seca quanto para base úmida determinados pelo método gravimétrico, fazendo-se uma adaptação da metodologia descrita em (APHA, AWWA e WEF, 2005; APHA, 1992; APHA, 2017).

Para ST, foi transferido de 1 a 5 g da amostra para a cápsula de porcelana, em que é colocado em um forno de 103 a 105 °C por 1 h. Após resfriado em dessecador, o processo é repetido até massa constante. Na determinação de SF e voláteis, 1 a 5 g de amostra foi transferida para um forno de mufla frio, aquecido a 550 ± 50 °C e deixada por 1 h. Em sequência, resfriada em dessecador e foi repetido o procedimento até massa constante. Como as amostras constituem de material orgânico para evitar perda por redução do material, foi realizado o acendimento sobre um queimador de gás sob um exaustor.

TABELA 47- VALORES DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO RESÍDUO ALIMENTAR E LODO (ST; SV E SF)

Análises	Resíduo orgânico (RSU)		Lodo (ETE)	
	Base úmida	Base seca	Base úmida	Base seca
ST (%)	21,50	100,00	4,30	100,00
SV (%)	19,00	92,39	2,57	59,81
SF (%)	2,00	7,61	1,73	40,19
Umidade (%)	79,00	0,00	95,70	0,00

ST= Sólidos totais, SV= Sólidos voláteis, SF= Sólidos Fixos

6.2.3 Contagem de microrganismos do resíduo alimentar e no lodo de ETE

Utilizando o método de aplicação em profundidade (*Pour-Plate*) descrito por Holt *et al.*, (1994), a contagem de microrganismos foi realizada no resíduo alimentar utilizando ágar *Brain Heart infusion* (BHI) e ágar padrão de contagem (PCA). A caracterização de contagem do resíduo alimentar foi estimada em $1,00 \times 10^5$ (est.) UFC·mL⁻¹ para BHI e $1,00 \times 10^5$ (est.) UFC·mL⁻¹ para PCA.

Para o Lodo de ETE, o mesmo método de aplicação em profundidade (*Pour-Plate*), foi realizado. As contagens de microrganismos no lodo de ETE proveniente da codigestão anaeróbica em via úmida de resíduo alimentar de frutas e verduras foram utilizando ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e ágar *Potato Dextrose Agar* (PDA). A caracterização da contagem de células viáveis totais, presentes no lodo de ETE, foi realizada por meio da divisão em dois tipos de amostras: lodo estabilizado (LE), sem adição prévia de caldo nutritivo, e lodo enriquecido (LR), com adição de caldo nutritivo equivalente ao meio utilizado para a contagem. A contagem de UFC·mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitro) para o LE foi de 1,14×10⁶ (est.) em PDA e 1,14×10⁶ (est.) em BHI. Já a contagem para o LR foi de 1,21×10⁸ (est.) em PDA e 7,38×10⁸ (est.) em BHI.

Para o isolamento prévio dos microrganismos, o lodo foi enriquecido em meios de cultura na forma de caldos e, posteriormente, estes colocados em placas de Petri e contado em ágar específico, utilizando BHI e PDA na proporção de 2,5g de lodo para 25g de meio de cultura previamente esterilizado. O material foi incubado a 35 °C por 24 horas.

No estudo, foram utilizados microrganismos isolados a partir do lodo e enriquecidos em PDA e BHI. A TABELA 48 apresenta os valores da contagem de células viáveis dos microrganismos (UFC·mL⁻¹), dos quais foram selecionados os 5 tipos com maior concentração de células viáveis ≥1×10⁶ (est.). Posteriormente armazenando-se em glicerol 80 % com temperatura controlada. Esses microrganismos foram utilizados em um delineamento preliminar de seleção, em que selecionou EA (2b) e EB (3c) para o estudo.

TABELA 48- CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS (UFC·mL⁻¹) DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM PDA E BHI

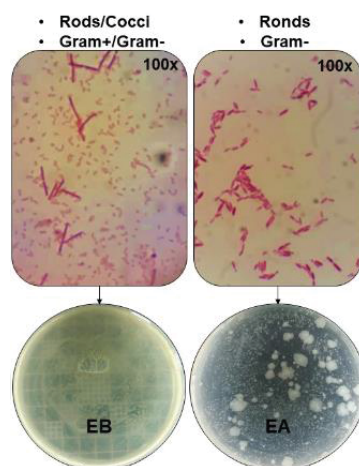
Meios	Código	Microrganismos isolados	Unidade formadora de Colônia (UFC·mL ⁻¹)
PDA	1a	EA	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
*PDA	2b	EA	8,00 x 10⁶ (est.)
PDA	3c	EA	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
BHI	1a	EB	<1,00 x 10 ⁶ (est.)
BHI	2b	EB	5,080 x 10 ⁸ (est.)
*BHI	3c	EB	1,860 x 10⁹ (est.)

* Microrganismos isolados selecionados para o DCCR.

Os microrganismos escolhidos para o delineamento do DCCR foram submetidos à análise de coloração de Gram (MOYES, REYNOLDS e BREAKWELL,

2009), e avaliados quanto à sua morfologia, apresentando-se como bacilos ou cocos. A ilustração apresentada na FIGURA 39 mostra os dois grupos de microrganismos identificados neste estudo. O primeiro grupo, denominado EA (2b), possui formato de bastonetes e apresenta coloração Gram-negativa. Já o segundo grupo, chamado EB (3c), apresenta formatos de bastonetes e cocos, sendo observada tanto coloração Gram-negativa quanto positiva.

FIGURA 39- MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (EB E EA)



6.2.4 Atividade enzimática e enzimas selecionadas para a hidrólise da biodigestão

As enzimas utilizadas foram selecionadas com base na composição do resíduo orgânico, considerando os carboidratos, proteínas, lipídios e fibras presentes. Para a decomposição dos carboidratos, foram empregadas duas enzimas: a α -amilase (EAA 1002-14) e a amiloglucosidase (GlucGo 2X). Para a quebra das proteínas, utilizou-se a enzima protease (NP-100); para os lipídios, a enzima lipase (LP-100); e para as fibras, a enzima celulase (celluclast 1,5L).

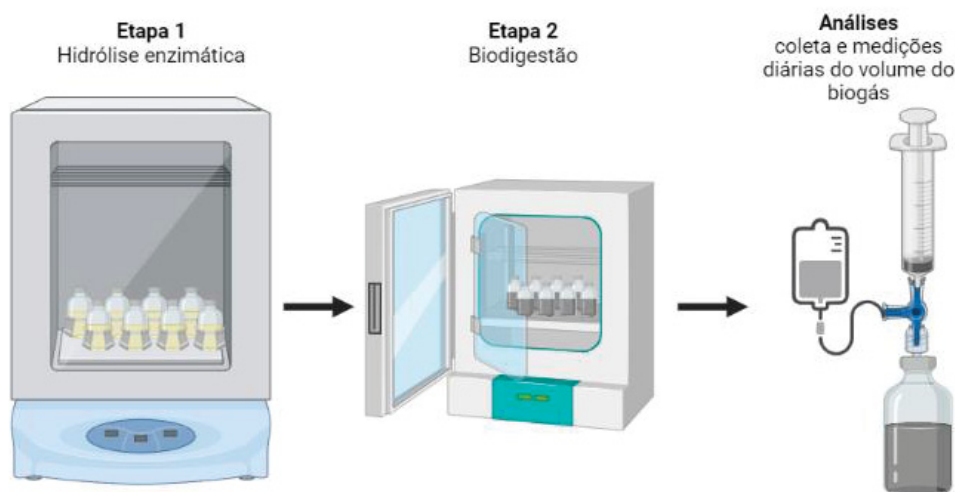
6.2.5 Biodigestão

6.2.5.1 Parâmetros e etapas do processo

Para conduzir o delineamento experimental composto por 50 ensaios do (DCCR), utilizaram-se frascos de vidro com capacidade de 100 mL, contendo 60 mL

de volume de trabalho (40 mL de *headspace*). A vedação dos frascos foi realizada com tampas lacradas, que consistiram em um septo, um lacre metálico, e cera de vela, a fim de evitar a perda de volume de gás formado durante a execução do experimento. Os ensaios foram operados com uma concentração de 14,5 g de sólidos voláteis por litro (14,5 gSV·L⁻¹), sendo adicionados 4 g de resíduo alimentar padronizado com granulometria de até 14 *mesh* (1,18 mm), 56 mL de lodo (ETE) e, conforme resultados obtidos em testes preliminares, foram introduzidas enzimas (Etapa 1) e inoculantes microbianos (Etapa 2) (FIGURA 40 e 41).

FIGURA 40- DEMONSTRAÇÃO DAS ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR PARA A BIODIGESTÃO EM FRASCOS DE 100 mL



FONTE: Autor, 2023.

A etapa inicial, conhecida como hidrólise enzimática, foi executada em frascos contendo enzimas isoladas e resíduos alimentares. Para isso, ensaios foram preparados mediante a adição de enzimas e resíduos alimentares, os quais foram alocados em frascos de vidro com tampa e incubados em um agitador do tipo *shaker* (Tecnal, SP) a 28 °C e 90 rpm, durante 72 h.

Na segunda etapa, denominada Biodigestão, um volume determinado do líquido hidrolisado obtido na etapa anterior (hidrólise enzimática) foi transferido para frascos com tampa lacrada (utilizando septo, lacre metálico, fita isolante e cera de vela) para evitar a perda do gás produzido durante a biodigestão. Em seguida, lodo proveniente de ETE e inoculantes microbianos foram adicionados aos frascos, os quais foram incubados em estufa a 35 °C.

FIGURA 41- ILUSTRAÇÕES EXPERIMENTAIS DA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM SHAKER a 28 °C E 90 RPM DURANTE 72 h E DO PROCESSO DE BIODIGESTÃO EM ESTUFA A 35 °C DURANTE 10 DIAS



As análises da produção de biogás e biometano foram realizadas durante os primeiros 10 dias do processo, sendo que a produção foi monitorada até o 25º dia para ambas as variáveis.

6.2.5.2 Análise de biogás

A quantidade de biogás produzida pelos biodigestores foi medida utilizando uma seringa tipo vidro com capacidade volumétrica de 20 mL e com erro de $\pm 4\%$ (ARTICLASS, Itália), juntamente com uma válvula de três vias. A porcentagem de biometano presente no biogás foi determinada pelo método de captura de CO_2 em solução alcalina de hidróxido de sódio a $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em um dispositivo tipo *Orsat* adquirido da EMBRAPA em 2021. Todos os experimentos foram conduzidos em uma temperatura controlada de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

6.2.6 Planejamento experimental utilizando a ferramenta estatística DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)

6.2.6.1 Planejamento experimental

O DCCR foi utilizado neste estudo para otimizar o processo de biodigestão, seguindo os critérios padrão que incluem um fator aleatório em todos os delineamentos. A influência de seis variáveis independentes (EA, EB, CA, C, L e P) sobre a produção acumulativa de biogás e biometano foi investigada utilizando um DCCR com quatro repetições no ponto central e doze pontos axiais. O experimento

foi configurado como 2^{6-1} , com 32 experimentos base, 12 experimentos axiais e 2 experimentos centrais com 4 repetições. Os níveis codificados e decodificados das variáveis foram selecionados com base em testes preliminares e estão apresentados na TABELA 49. Os dados experimentais foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem, onde Y representa a variável de resposta, e $\beta_0, \dots, \beta_{66}$ representam os parâmetros do modelo, enquanto x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 e x_6 representam as variáveis independentes ($x_1= EA, x_2= EB, x_3= CA, x_4= C, x_5= L$ e $x_6= P$). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de uma via ($p<0,05$) e análise multivariada, usando o software Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, EUA), versão 10.

Equação (7)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_4 \cdot x_4 + \beta_5 \cdot x_5 + \beta_6 \cdot x_6 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \beta_{33} \cdot x_3^2 + \beta_{44} \cdot x_4^2 + \beta_{55} \cdot x_5^2 + \beta_{66} \cdot x_6^2 + \beta_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + \beta_{14} \cdot x_1 \cdot x_4 + \beta_{15} \cdot x_1 \cdot x_5 + \beta_{16} \cdot x_1 \cdot x_6 + \beta_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + \beta_{24} \cdot x_2 \cdot x_4 + \beta_{25} \cdot x_2 \cdot x_5 + \beta_{26} \cdot x_2 \cdot x_6 + \beta_{34} \cdot x_3 \cdot x_4 + \beta_{35} \cdot x_3 \cdot x_5 + \beta_{36} \cdot x_3 \cdot x_6 + \beta_{45} \cdot x_4 \cdot x_5 + \beta_{46} \cdot x_4 \cdot x_6 + \beta_{56} \cdot x_5 \cdot x_6 + \varepsilon$$

TABELA 49- VALORES CODIFICADOS E DECODIFICADOS DE VARIÁVEIS DE PROCESSAMENTO (NÍVEIS -2,38; -1; 0; +1; E +2,38)

Variáveis independentes	Unid.	Níveis				
		-2,38	-1	0	+1	+2,38
X_1 Microrganismos enriquecidos em meio PDA (EA)	UFC·mL ⁻¹ 1	1,05 ×10 ⁹	3,50 ×10 ⁹	5,25 ×10 ⁹	7,00 ×10 ⁹	1,05 ×10 ¹⁰
X_2 microrganismos enriquecidos em meio BHI (EB)	UFC·mL ⁻¹ 1	1,38 ×10 ⁹	4,60 ×10 ⁹	6,90 ×10 ⁹	9,20 ×10 ⁹	1,38 ×10 ¹⁰
X_3 Conjunto de enzima Amilase* (CA)	U·g ⁻¹	9	30	45	60	80
Conjunto de enzima Amiloglucosidase** (CA)	U·g ⁻¹	9	30	45	60	80
X_4 Celulase (C)	U·g ⁻¹	9	30	45	60	80
X_5 Lipase (L)	U·g ⁻¹	9	30	45	60	80
X_6 Protease (P)	U·g ⁻¹	9	30	45	60	80

UFC·mL⁻¹= Unidade formadora de colônia por mL.

U·g⁻¹= Unidade de atividade enzimática (U) quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores.

6.2.6.2 Análise de superfície de resposta

A partir dos resultados da análise estatística, foi construída uma superfície de resposta tridimensional para visualização dos efeitos das variáveis independentes

sobre a variável dependente volume acumulativo de biogás e biometano. Foi realizada uma análise de sensibilidade para avaliar a influência relativa das variáveis independentes sobre a variável dependente volume acumulativo de biogás e biometano, usando o software Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, EUA), versão 10.

6.2.6.3 Otimização e validação

A análise de otimização do processo foi realizada para determinar as condições ideais das variáveis independentes que maximizassem ou minimizassem a variável dependente de volume acumulativo de biogás (BG) e biometano (BM), considerando as restrições técnicas e operacionais. A metodologia utilizada para otimizar o processo e validar as condições experimentais seguiu a abordagem proposta por Peron-Schlosser *et al.* (2021). A desejabilidade foi utilizada para otimizar a formulação do bioacelerador para as respostas de volume acumulativo de biogás e biometano (valores médios). Para validar a otimização da formulação obtida pela análise de múltiplas respostas, os biodigestores foram preparados nas condições ideais de acordo com Derringer e Suich (1980). Os experimentos de validação foram realizados em triplicata, e os resultados de acumulação de biogás e biometano foram tratados com o software Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, EUA), versão 10.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Planejamento experimental

Os resultados obtidos do experimento DCCR 2⁵ são apresentados de forma sucinta na TABELA 50. Os dados relacionados às variáveis dependentes, que incluem o volume acumulativo de biogás (BG) e biometano (BM), foram submetidos a uma análise de regressão de segunda ordem (Equação 7) em relação às variáveis independentes. A análise estatística dos resultados foi conduzida com um intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$) e os coeficientes de regressão dos modelos de segunda ordem obtidos estão apresentados nas TABELAS 51 e 52.

TABELA 50-MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) 2⁵ + CONFIGURAÇÃO COM AS RESPOSTAS BIOGÁS (BG) E BIOMETANO (BM) ACUMULATIVO DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO

EA ^a (x ₁)	EB ^b (x ₂)	CA ^c (x ₃)	C ^d (x ₄)	L ^e (x ₅)	P ^f (x ₆)	BG ^g	BM ^h
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	766	501
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	745	489
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	823	543
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	761	496
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	819	507
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	951	594
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	863	545
-1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	867	584
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	1019	652
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	786	506
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	953	630
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	671	458
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	872	569
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	828	587
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	285	81
-1 (3,50 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	727	512
+1 (3,50 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	777	506
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	794	509
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	889	591
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	831	522
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	759	438
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	983	638
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	871	641
+1 (7,00 ×10 ⁹)	-1 (4,60 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	979	640
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	-1 (30)	770	507
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	577	336
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	664	455
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	-1 (30)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	961	633
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	+1 (60)	658	456
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	-1 (30)	+1 (60)	-1 (30)	893	589
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	-1 (30)	-1 (30)	912	592
+1 (7,00 ×10 ⁹)	+1 (9,20 ×10 ⁹)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	+1 (60)	790	483
-2,38 (1,05 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	886	599
+2,38 (1,05 ×10 ¹⁰)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	920	600
0 (5,25 ×10 ⁹)	-2,38 (1,38 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	803	523
0 (5,25 ×10 ⁹)	+2,38 (1,38 ×10 ¹⁰)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	661	457
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	-2,38 (9)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	706	477
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	+2,38 (80)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	342	81
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	-2,38 (9)	0 (45)	0 (45)	879	594
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	+2,38 (80)	0 (45)	0 (45)	848	557
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	-2,38 (9)	0 (45)	804	519
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	+2,38 (80)	0 (45)	855	561
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	-2,38 (9)	939	602
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	+2,38 (80)	900	575
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	828	572
0 (5,25 ×10 ⁹)	0 (6,90 ×10 ⁹)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	0 (45)	847	588

^a Microrganismos enriquecidos em meio PDA (UFC·mL⁻¹); ^b Microrganismos enriquecidos em meio BHI (CFU·mL⁻¹); ^c Conjunto de enzima (Amilase e Amiloglucosidase) (U·g⁻¹); ^d Celulase (U·g⁻¹); ^e Lipase (U·g⁻¹); ^f Protease (U·g⁻¹); ^g Produção de Biogás acumulativa (mL); ^h Produção de Biometano acumulativa (mL).

Foram registrados os resultados dos experimentos realizados com planejamento experimental para avaliar as variáveis dependentes produção de biogás acumulada (BG) e produção de biometano acumulada (BM). Os valores obtidos para a produção de BG variaram de 285 mL a 1019 mL, com uma média de 806 mL acumulados. Para a produção de BM, os valores variaram de 81 mL a 652 mL, com uma média de 524 mL acumulados.

Na resposta de BG e BM, constatou-se que as variáveis independentes EB (x_2) e CA (x_3), em maior quantidade, exibiram efeitos linear e quadrático significantes e negativos para esta resposta. No entanto, quando EB (x_2) e CA (x_3) estão presentes em menor quantidade, com valores próximos ao nível 0 do delineamento, o efeito conjunto apresenta-se positivo, conforme evidenciado na superfície de resposta (FIGURAS 41 e 42). Esse efeito semelhante repete-se nas combinações EA (x_1) e CA (x_3), CA (x_3) e L (x_5). No entanto, apenas para BM a variável L(x_5) apresentou efeito significativo e positivo.

De acordo com Wang *et al.* (2020), altas concentrações de amilases podem levar à inibição da produção de biogás devido à hidrólise excessiva dos carboidratos, o que pode provocar a diminuição do pH e da alcalinidade e desestabilizar a comunidade microbiana. Além disso, (Nugrah *et al.*, 2021; Rejin *et al.*, 2020) também afirmam que altas concentrações de amilases podem resultar em hidrólise excessiva dos carboidratos, gerando acúmulo de ácidos graxos voláteis e redução do pH, o que compromete a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela produção de biogás. Zhen *et al.*, (2021) investigaram os efeitos da adição de diferentes concentrações de amilase na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos e observaram que concentrações elevadas (acima de 3 g/L) resultaram em diminuição significativa da produção de biogás. Isto ocorre, segundo os autores, devido à inibição da atividade metabólica das bactérias, enquanto concentrações mais baixas (até 1 g/L) não afetaram significativamente a produção de biogás.

Em contrapartida, Jha *et al.* (2021) avaliaram os efeitos da adição de amilase em diferentes concentrações na digestão anaeróbia de lodo de esgoto e observaram que concentrações superiores a 0,5 g/L reduziram a produção de biogás em até 30 %, provavelmente devido à inibição da atividade dos microrganismos. Em resumo, diversas pesquisas têm apontado que altas concentrações de amilases podem prejudicar a produção de biogás em sistemas de digestão anaeróbia, comprometendo

a atividade metabólica dos microrganismos e levando à redução do pH e da alcalinidade.

De acordo com Harirchi *et al.* (2022), altas concentrações de bactérias durante o processo de digestão anaeróbia podem levar a um acúmulo de ácidos graxos voláteis e diminuição da produção de biogás. Embora a alta concentração de bactérias possa acelerar a taxa de degradação da matéria orgânica, ela também pode gerar excesso de ácidos orgânicos, inibindo os microrganismos responsáveis pela produção de biogás e comprometendo a eficiência do processo. Gandhi *et al.* (2022) também encontraram evidências de que altas concentrações de bactérias podem prejudicar a produção de biogás, observando que a adição de uma maior quantidade de inóculo pode levar ao acúmulo de ácidos graxos voláteis e redução do pH, comprometendo a atividade dos microrganismos e reduzindo a produção de biogás em experimentos em escala laboratorial. Com pode ser observado nos ensaios do delineamento o volume tanto para biogás quanto para biometano os valores menores foram apresentavam tanto para as variáveis EB (x_2) e CA (x_3), em alta concentração.

Segundo Li *et al.* (2019), em seus estudos, comprovaram que a adição de lipase aumentou a produção de biometano em 38 %, além de aumentar a produção de ácidos graxos voláteis e reduzir o tempo necessário para alcançar a produção máxima de biometano. Nos ensaios da resposta de BM, pode-se observar que a presença da variável L (x_5) ajudou a elevar os resultados, como pode ser observado na FIGURA 41.

Para a obtenção de modelos válidos ($p \leq 0,05$), com bom R^2 para todas as respostas, alguns efeitos não significativos foram incorporados ao resíduo dos modelos. Os modelos ajustados (com $R^2 \geq 0,6$ e R^2 ajustado $\geq 0,5$) são apresentados na TABELA 50. O modelo do delineamento experimental de BG, está demonstrada na equação 8 e a equação 9 o do BM.

Equação (8)

$$Y_1 = 863,51 - 33,47 \cdot x_2 - 19,75 \cdot x_2^2 - 13,75 \cdot x_3 - 56,52 \cdot x_3^2 - 35,11 \cdot x_6 + 13,39 \cdot x_6^2 + 27,94 \cdot x_1 \cdot x_2 + 47,56 \cdot x_1 \cdot x_4 - 35,69 \cdot x_2 \cdot x_3 - 41,75 \cdot x_2 \cdot x_6 - 24,62 \cdot x_3 \cdot x_4 + 47,31 \cdot x_3 \cdot x_5 - 33,06 \cdot x_4 \cdot x_6$$

Equação (9)

$$Y_2 = 589,25 - 19,69 \cdot x_2 - 14,79 \cdot x_2^2 - 18,91 \cdot x_3 - 52,09 \cdot x_3^2 + 10,60 \cdot x_5 - 5,91 \cdot x_5^2 - 22,57 \cdot x_6 + 2,66 \cdot x_6^2 + 22,31 \cdot x_1 \cdot x_3 + 35,56 \cdot x_1 \cdot x_4 - 23,14 EB \cdot x_3 - 23,04 EB \cdot x_4 - 35,80 \cdot x_2 \cdot x_6 - 19,41 \cdot x_3 \cdot x_4 + 38,51 \cdot x_2 \cdot x_5 - 25,93 \cdot x_4 \cdot x_6$$

TABELA 51- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO BG E BM EM 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)

	FV ^a	SS ^b	GL ^c	MS ^d	F calculado	F tabelado	p-valor
BG	Regressão	919199	14	65657	267,05	2,00	0,0000*
	Resíduos	8113	33	246			
	Total	927312	47				
R ² = 0,71 R ² aj = 0,59							
BM	Regressão	604481	16	37780	198,30	1,98	0,0000*
	Resíduos	5906	31	191			
	Total	610387	47				
R ² = 0,70 R ² aj = 0,54							

^a = Fator de variação; ^b = Soma dos quadrados; ^c = Grau de liberdade; ^d = Quadrado médio; * = p-valor < 0,05

Os modelos para as variáveis BG e BM apresentaram valores satisfatórios de R² (0,71 e 0,70, respectivamente) e foram estatisticamente significativos de acordo com a ANOVA (p ≤ 0,05). O ajuste de modelos para microrganismos é frequentemente desafiador, devido à complexidade das interações metabólicas e à grande variação nas respostas observadas. De acordo com Lee *et al.* (2020a), valores de R² de 0,70 ou superiores são frequentemente considerados aceitáveis para análises que envolvem modelos de microrganismos. Além disso, valores moderados de R² ajustado, como 0,5 ou mais, são geralmente considerados aceitáveis, desde que o modelo seja validado e os resultados sejam interpretados com cautela, como destacado por Lee *et al.* (2020b). Essa observação é compartilhada por Pirt (1975), que ressalta que para modelos de crescimento de microrganismos, valores moderados de R² ajustado são geralmente aceitáveis, tendo em vista a alta variabilidade observada nesses sistemas complexos e um limite inferior de 0,5 é considerado razoável.

FIGURA 42- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (DCCR) PARA A PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOGÁS (mL) EM FUNÇÃO DO CONJUNTO CA x EA (A); C x EB (B); CA x EB (C); P x CA (D); L x CA (E); C x CA (F) DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)

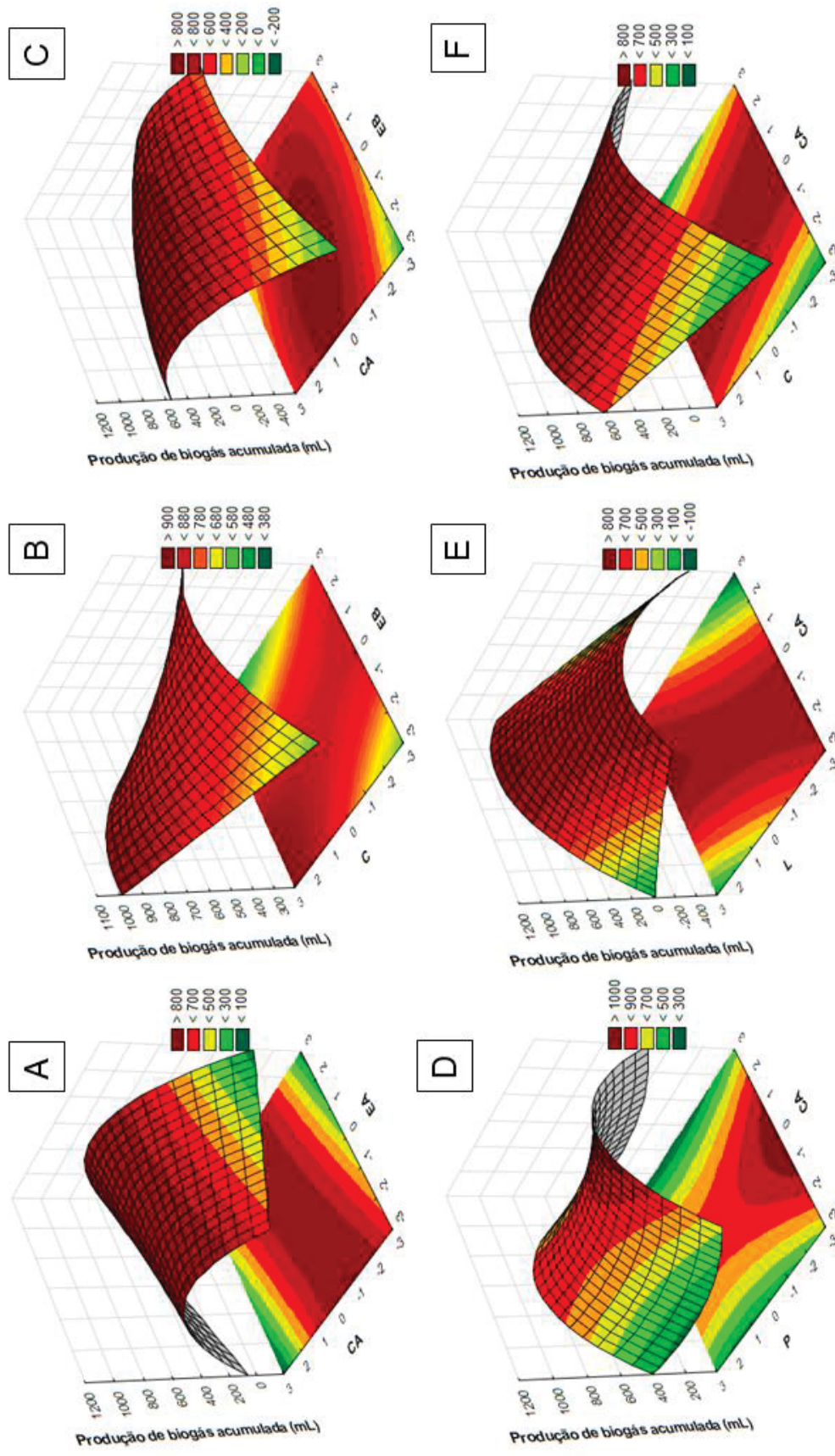
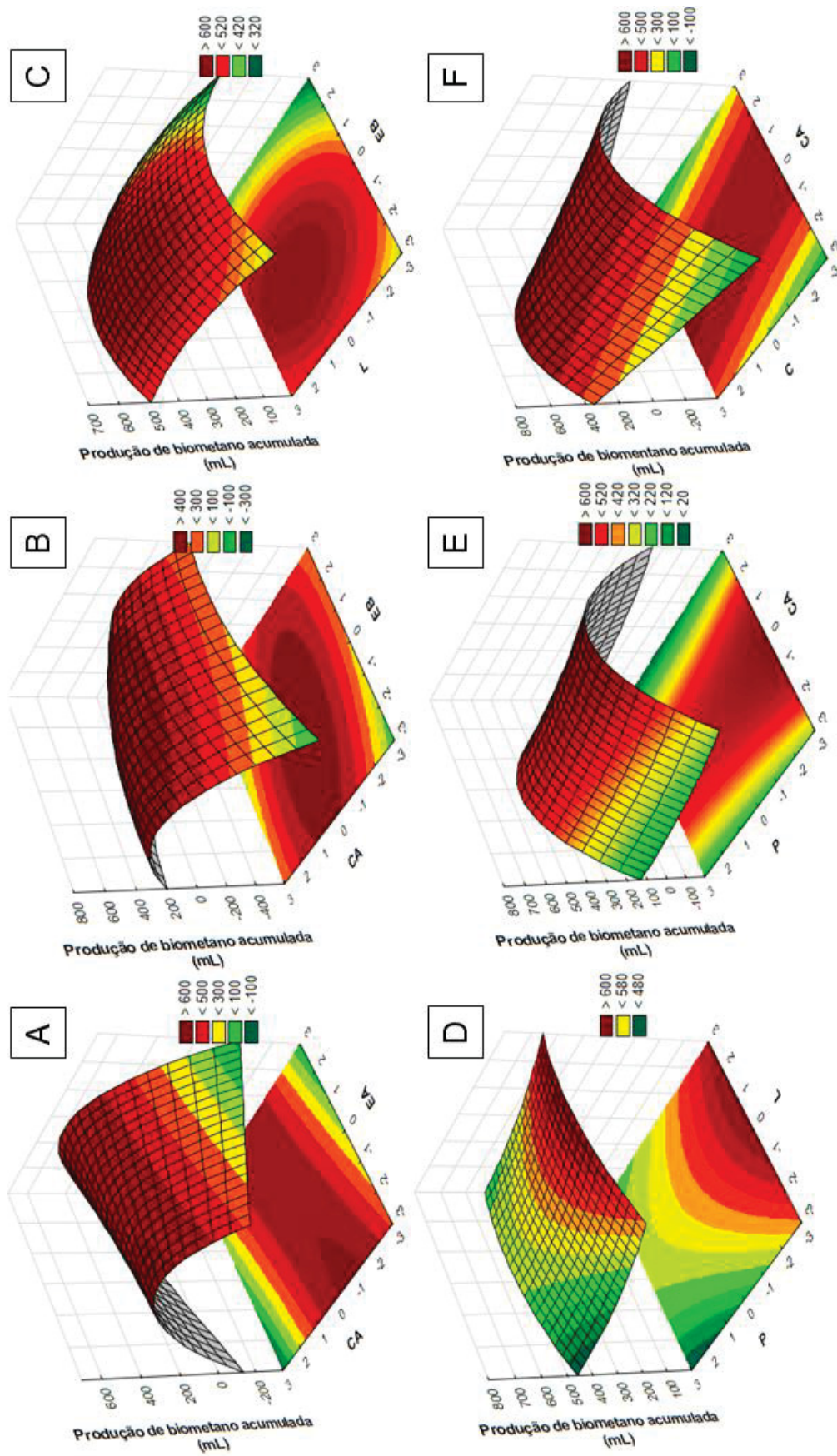


FIGURA 43-SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (DCCR) PARA A PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BIOMETANO (mL) EM FUNÇÃO DO CONJUNTO CA x EA (A); CA x EB (B); L x EB (C); P x L (D); P x CA (E); C x CA (F) DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO (35 °C)



6.3.2 Desejabilidade e validação experimental da otimização

Os modelos matemáticos para as variáveis BG e BM, descritos pelas Equações 5 e 6 foram utilizados para determinar a função de desejabilidade (D). Essa função avaliou um bioacelerador com maior produção acumulativa de biogás e biometano. A função individual (*di*) foi obtida a partir dos valores mínimo e máximo de cada variável de resposta, derivados dos resultados experimentais obtidos durante o DCCR 2⁵, conforme demonstrado na TABELA 50. O perfil de desejabilidade é apresentado na Figura 43, onde as condições ideais de processo foram determinadas com base no valor máximo de conveniência geral da função D (0,54), sendo elas: EA = 5,25 x 10⁹ UFC·mL⁻¹, EB = 6,90 x 10⁹ UFC·mL⁻¹, CA = 45 U·g⁻¹, C = 45 U·g⁻¹, L = 45 U·g⁻¹ e P = 45 U·g⁻¹. As condições ideais foram validadas experimentalmente, conforme apresentado na TABELA 51. A análise dos desvios relativos (% DR) para cada variável de resposta (TABELA 51) permite concluir que a metodologia utilizada para a otimização das condições do processo foi satisfatória.

FIGURA 44- PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA PRODUÇÃO ACUMULATIVA DE BG E BM EM 10 DIA DE PROCESSO A 35 °C

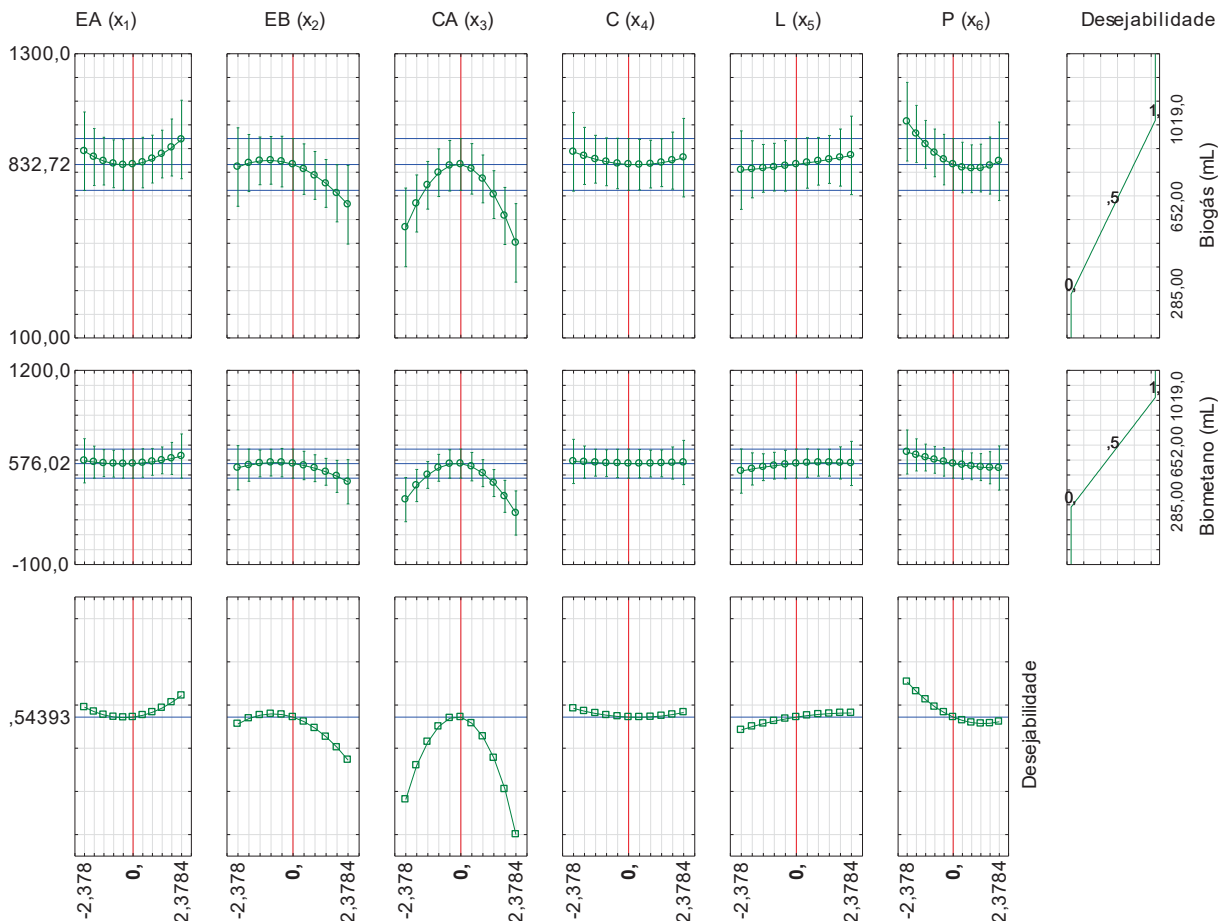


TABELA 52- MODELAGEM DA BIODIGESTÃO COM BG E BM: COMPARAÇÃO ENTRE VALORES PREDITOS, EXPERIMENTAIS E VALORES DO ENSAIO CONTROLE DURANTE 10 DIAS DE PROCESSO A 35 °C

Modelo	p-valor	R ²	R ² ajustado	Valor predito	Valore experimental	Ensaio Controle	DR ^c (%)
BG ^a	0,00002	0,71	0,59	864	1008 ± 8,3	584 ± 6,3	14,29
BM ^b	0,00016	0,70	0,54	590	667 ± 7,9	355 ± 3,0	11,54

^a = equação (8);

^b = equação (9);

^c = Desvio relativo (RD): [(Valor experimental - Valor previsto) /Valor experimental] × 100.

O valor experimental medido para as variáveis BG e BM foi superior ao valor previsto pela função de desejabilidade, o que indica um aumento na eficiência do biodigestor. Em outras palavras, as respostas obtidas para essa propriedade mostraram que, sob as condições de processo otimizadas, o bioacelerador melhorou significativamente as respostas de BG e BM em comparação com os ensaios de controle de 72 % (1,72 vezes) e 88 % (1,88 vezes), respectivamente, e as diversas condições de processo testadas no DCCR 2⁵ (TABELA 50). Além disso, observou-se que o valor de biometano (11,54 %) superou a previsão (14,29 %) do biogás resultante da otimização.

6.4 CONCLUSÃO

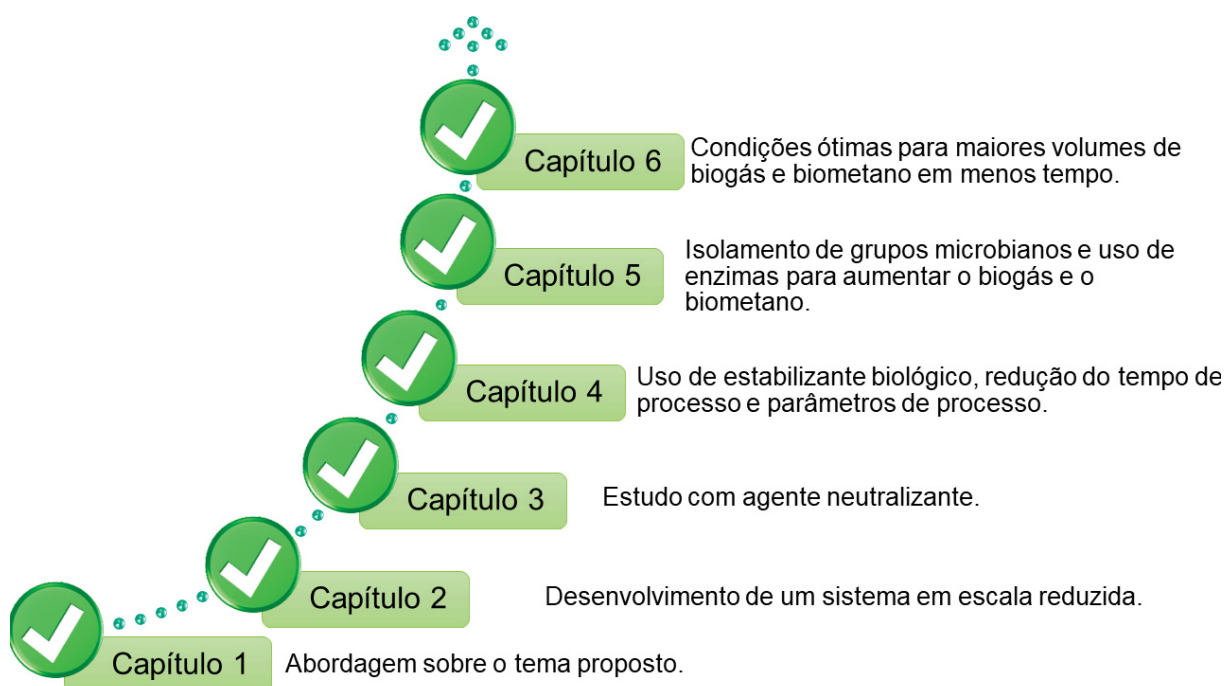
Em conclusão, a técnica de biodigestão tem se consolidado como uma opção viável para o tratamento de resíduos orgânicos, e o aperfeiçoamento contínuo dessa técnica é fundamental para atender às demandas crescentes de gerenciamento de resíduos. Neste estudo, foi demonstrado que a utilização de um bioacelerador, um blend de microrganismos e enzimas, por meio de um DCCR 2⁵ o qual foi capaz de acelerar a produção de biogás e biometano. As condições otimizadas para a obtenção de maiores volumes desses gases foram EA = 5,25 x 10⁹ UFC·mL⁻¹, EB = 6,90 x 10⁹ UFC·mL⁻¹, CA = 45 U·g⁻¹, C = 45 U·g⁻¹, L = 45 U·g⁻¹ e P = 45 U·g⁻¹, resultando em um aumento de 72 % (v/v) no volume de biogás e 88 % (v/v) no volume de biometano. Esses resultados indicam que o desenvolvimento de bioaceleradores pode ser uma abordagem promissora para melhorar o desempenho dos processos de biodigestão, um desafio importante para a biotecnologia.

ASPECTOS RELEVANTES DOS RESULTADOS

- Impacto significativo das vias úmida e extrasseca nos primeiros dias de biodigestão, exigindo controle químico ou biológico para manter a microflora anaeróbia.
- Uso de acetato de sódio (CH_3COONa) como agente neutralizante nas melhores configurações de neutralização durante os experimentos de ajuste de pH.
- Demonstração do perfil do biogás e biometano, através da seleção de parâmetros do sistema de biodigestão, codigestão com frascos de vidro de 100 mL, adição de neutralizantes, alterações na atmosfera inicial, tamanho de partícula e quantidade de sólidos voláteis.
- Contribuição do isolamento de microrganismos do resíduo alimentar e do lodo de estação de tratamento de esgoto, para a produção de biogás e biometano em biodigestores anaeróbicos, com redução das variáveis independentes relacionadas aos microrganismos isolados, enriquecidos e enzimas comerciais.
- Elaboração de um *blend* otimizado que aumentou em menos tempo a produção de biogás e biometano na biodigestão de resíduos alimentares.

CONCLUSÕES GERAIS

O estudo desenvolveu um sistema de biodigestão em frascos de vidro de 100 mL e investigou diferentes aspectos da produção de biogás e biometano. A utilização de um bioacelerador e a otimização de parâmetros aumentaram a produção desses gases, juntamente com a adição de enzimas e microrganismos selecionados. Foram avaliadas variáveis, como temperatura, presença de recicláveis, granulometria do resíduo e controle do pH. A temperatura mesofílica foi mais eficiente na produção de biogás do que a temperatura termofílica. A ausência de recicláveis no processo contribuiu para o bom funcionamento do biodigestor e o aumento acumulativo do biogás. A padronização do processo foi alcançada tratando a granulometria do resíduo para uma faixa máxima de 2 mm. Os processos úmido e extrasseco apresentaram impacto nos primeiros dias da biodigestão, exigindo controle químico para manter a microflora anaeróbia. A biodigestão é uma opção viável para o tratamento de resíduos orgânicos, com potencial de aprimoramento por meio de bioaceleradores, otimização de parâmetros e seleção adequada de microrganismos e enzimas. Essas descobertas promissoras contribuem para melhorar os processos de biodigestão e avançar a biotecnologia no gerenciamento de resíduos.



SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a viabilidade do aumento de escala da biodigestão, utilizando a otimização proposta.
- Realizar a caracterização do biogás produzido por meio da cromatografia gasosa.
- Investigar a seleção de grupos de microrganismos específicos e construir uma árvore fenotípica para uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos na biodigestão acelerada.
- Estudo da fração líquida do biodigestor como biofertilizante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. **Egyptian journal of petroleum**, v. 27, n. 4, p. 1275-1290, 2018.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004: **resíduos sólidos**: classificação. Rio de Janeiro, v. 77, 2004.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. NBR. 8419: 1992 Versão Corrigida: 1996. **Apresentação de projetos de aterros**. Rio de Janeiro.

ABRELPE (Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais). Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2022. Disponível em: <https://abrelpe.org.br/panorama/>.

ABRELPE, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS. **Caderno Informativo Recuperação Energética: Resíduos Sólidos Urbanos**. São Paulo, 2019.

ABU YAZID, N.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 224, 2017.

ABUBAKAR, I. R.; MANIRUZZAMAN, K. M.; DANO, U. L.; ALSHIHRI, F. S.; ALSHAMMARI, M. S.; AHMED, S. M. S., ALRAWAF, T. I. Environmental sustainability impacts of solid waste management practices in the global South. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, p. 12717, 2022.

ACHARYA, V. V.; CHAUDHURI, P. Modalities of protein denaturation and nature of denaturants. **Inter J Pharm Sci Rev and Res**, v. 69, p. 19-24, 2021.

ADO, G. B.; BEZERRA, M. Geração e Aproveitamento Energético do Biogás. **Projeto PROBIOGÁS**, 2016.

AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

AKINOSHO, H.; YEE, K.; CLOSE, D.; RAGAUSKAS, A. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 66, 2014.

ALFAKIT. **Kit Análise de Biogás com Biofoto Microprocessado- Kit permite analisar a composição dos gases do biogás**. Brasília, 2022. Disponível em: < <https://alfakit.com.br/produtos/kit-analise-de-biogas-com-biofoto-microprocessado-cod-2297/>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

ALI SHAH, F.; MAHMOOD, Q.; MAROOF SHAH, M.; PERVEZ, A.; AHMAD ASAD, S. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

AL-KHATIB, I. A.; MONOU, M., ZAHRA, A. S. F. A.; SHAHEEN, H. Q.; KASSINOS, D. Solid waste characterization, quantification and management practices in developing countries. A case study: Nablus district–Palestine. **Journal of environmental management**, v. 91, n. 5, p. 1131-1138, 2010.

ALVES, I. **Avaliação da codigestão na produção de biogás**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, UFRJ. Rio de Janeiro, 2016.

ANGELIDAKI, I., XIE, L., LUO, G., ZHANG, Y., OECHSNER, H., LEMMER, A. Biogas upgrading: current and emerging technologies. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels*, p. 817-843, 2019.

ANNAMALAI, N.; THAVASI, R.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 4, p. 424-429, 2011.

APARICIO, E.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; LARA, A.; LOREDO-TREVIÑO, A.; AGUILAR, C. N.; KOSTAS, E. T.; RUIZ, H. A. Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. **Sustainable seaweed technologies**, p. 393-446, 2020.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION et al. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, 2017.

ARIUNBAATAR, J.; PANICO, A.; ESPOSITO, G.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. **Applied energy**, v. 123, p. 143-156, 2014.

ARTHUR, R.; ANTONCZYK, S.; OFF, S.; SCHERER, P. A. Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Wheat Straw in a CSTR System with 'Synthetic Manure': Impact of Nickel and Tungsten on Methane Yields, Cell Count, and Microbiome. **Bioengineering**, v. 9, n. 1, p. 13, 2022.

ASSIS, T. I.; GONÇALVES, R. F. Valorization of food waste by anaerobic digestion: A bibliometric and systematic review focusing on optimization. **Journal of Environmental Management**, v. 320, p. 115763, 2022.

BALK, M.; WEIJMA, J.; STAMS, A. JM. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1361-1368, 2002.

BELL, E. L.; FINNIGAN, W.; FRANCE, S. P.; GREEN, A. P.; HAYES, M. A.; HEPWORTH, L. J.; FLITSCH, S. L. Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 46, 2021.

BJÖRNSSON, L.; MURTO, M.; MATTIASSON, B. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 844-849, 2000.

BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; CHEIKH, R. B.; HAMDI, M. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 989–995, 2005.

BRASIL. (2010a) Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1. 3 p.

BRASIL. (2010b) Constituição; Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro de 2010. **Regulamenta a Lei**, n. 12.305, 2010.

BREDHOLT, S.; SONNE-HANSEN, J.; NIELSEN, P.; MATHRANI, I. M.; AHRING, B. K. *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. nov., a cellulolytic, extremely thermophilic, anaerobic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 991-996, 1999.

BROWNE, J. D.; MURPHY, J. D. Assessment of the resource associated with biomethane from food waste. **Appl. Energy**, v. 104, p. 170-177, 2013.

CABBAI, V., BALLICO, M., ANEGGI, E., GOI, D. BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic codigestion with sewage sludge. **Waste management**. v. 33, n. 7, p. 1626–32, jul. 2013.

CAI, G.; ZHAO, L.; WANG, T.; LV, N.; LI, J.; NING, J.; ZHU, G. Variation of volatile fatty acid oxidation and methane production during the bioaugmentation of anaerobic digestion system: Microbial community analysis revealing the influence of microbial interactions on metabolic pathways. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142425, 2021.

ÇAKMAK, E. K.; UGURLU, A. Enhanced biogas production of red microalgae via enzymatic pretreatment and preliminary economic assessment. **Algal Research**, v. 50, p. 101979, 2020.

CARNEIRO, R. B.; GONZALEZ-GIL, L.; LONDOÑO, Y. A.; ZAIAT, M.; CARBALLA, M.; LEMA, J. M. Acidogenesis is a key step in the anaerobic biotransformation of organic micropollutants. **Journal of hazardous materials**, v. 389, p. 121888, 2020.

CECCHI, T.; DE CAROLIS, C.; CECCHI, T.; DE CAROLIS, C. Food Processing Industries, Food Waste Classification and Handling, Target Compounds. Biobased Products from Food Sector Waste: Bioplastics, **Biocomposites, and Biocascading**, p. 17-78, 2021.

CHEN, Y.; CHEN, Q.; ZHANG, L.; ZHOU, Q. Enhancing anaerobic digestion of organic waste by enzyme addition: A review. **Bioresource technology**, 329, 2021.

CHERNICHARO, C. A. L.; ANAEROBIOS, Reatores. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. **Reatores anaeróbios**, v. 5, p. 379, 2007.

CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167-173, 2014.

CIRNE, D. G.; LEHTOMÄKI, A.; BJÖRNSSON, L.; BLACKALL, L. L. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 516-527, 2007.

COSSU, R.; MORELLO, L.; STEGMANN, R. Biochemical processes in landfill. Solid Waste Landfilling: Concepts, Processes, **Technologies**. eds. Cossu R., Stegmann R. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p. 91-115, 2018.

DAR, ROUF AHMAD; BALA, SAROJ; PHUTELA, URMILA GUPTA. Advancement in Biogas Technology for Sustainable Energy Production. Biomolecular Engineering Solutions for Renewable Specialty Chemicals: **Microorganisms**, Products, and Processes, p. 359-385, 2021.

DE OLIVEIRA, B. P. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS ALIMENTARES. 2016.

DE SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984.

DERRINGER, G.; SUICH, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, 12(4), 214– 219.

DI MARIA, F.; SORDI, A.; CIRULLI, G.; GIGLIOTTI, G.; MASSACCESI, L.; CUCINA, M. Co-treatment of fruit and vegetable waste in sludge digesters. An analysis of the relationship among bio-methane generation, process stability and digestate phytotoxicity. **Waste management**, v. 34, n. 9, p. 1603–1608, set. 2014.

DOMINGUES, M. P. P.; SILVA, M. B. G. TRATAMENTO E VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS: PRODUÇÃO DE BIOGÁS E BIOFERTILIZANTES. 2017. 30 f. **Tese de conclusão de curso** - Curso de Química, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2017.

DU SHIN, J., XU, C. C., KIM, S. H., KIM, H., MAHMOOD, N., & KIM, M. Biomass conversion of plant residues. In: **Food Bioconversion**. Academic Press, 2017. p. 351-383.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; DEPRA, M. C. C. Sustainability Metrics and Indicators of Environmental Impact: **Industrial and Agricultural Life Cycle Assessment**. Elsevier, 2021.

ELLACURIAGA, M.; CASCALLANA, J. G.; GONZÁLEZ, R., GÓMEZ, X. High-solid anaerobic digestion: Reviewing strategies for increasing reactor performance. **Environments**, v. 8, n. 8, p. 80, 2021.

FARDIN, J. F.; DE BARROS J.R. O.; D., AUGUSTO, P. F. Biomass: Some Basics and Biogas. In: **Advances in Renewable Energies and Power Technologies**. Elsevier, 2018. p. 1-37.

FERDEȘ, M.; DINCĂ, M. N.; MOICEANU, G.; ZĂBAVĂ, B. Ș.; PARASCHIV, G. Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: a review. **Sustainability**, v. 12, n. 17, p. 7205, 2020.

FERDEȘ, M., PARASCHIV, G., IONESCU, M., DINCĂ, M. N., MOICEANU, G., & ZĂBAVĂ, B. Ș. Anaerobic Co-Digestion: A Way to Potentiate the Synergistic Effect of Multiple Substrates and Microbial Diversity. **Energies**, 16(5), p. 2116, 2023.

FERRER, I.; GARFÍ, M.; UGGETTI, E.; FERRER-MARTÍ, L.; CALDERON, A.; VELO, E. Biogas production in low-cost household digesters at the Peruvian Andes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1668–1674, 2011.

FIOROTO, C. K. S.; SCHÜROFF, H. P.; TURCHETTO, Q.; EMANUELLI, I. P.; LIZAMA, M. D. L. A. P.; GONÇALVES, J. E. Composição Química de Resíduos de Alimentos como Fonte Alternativa de Nutrientes: Sustentabilidade Aliado a Promoção da Saúde. **Revista Valore**, v. 4, p. 70-83, 2019.

FLORES, R. M. Original of Coal as Gas Source and Reservoir Rocks. **Fueling the Future**, v. 3, p. 97-165, 2014.

FORSTER-CARNEIRO, T.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: Focusing on the inoculum sources. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3195–3203, 2007.

FRICKE, K.; PEREIRA, C. Global Trends in Waste Management. Alemanha: Technische Universität Braunschweig/ Center for **Research, Education and Demons- tration in Waste Management**, 2013.

GANDHI, B. P.; OTITE, S. V.; FOFIE, E. A.; LAG-BROTONS, A. J.; EZEMONYE, L. I.; SEMPLE, K. T.; MARTIN, A. D. Kinetic investigations into the effect of inoculum to substrate ratio on batch anaerobic digestion of simulated food waste. **Renewable Energy**, v. 195, p. 311-321, 2022.

GERARDI, M. H. **The microbiology of anaerobic digesters**. New Jersey: John Wiley & Sons. 2003.

GOMES, J. N. C. **POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DA BIOMETANIZAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS DO CÂMPUS PAMPULHA DA UFMG**. 2014. 94 f, Belo Horizonte, 2014.

GONÇALVES, I. R. Estudo da produção de biogás a partir de resíduos alimentares. 2014. **Dissertação** de Mestrado.

GTI: Gas Technology, Inc. **HIMET- A two-stage anaerobic digestion process for converting waste to energy**. 2003.

HARIRCHI, S.; WAINAINA, S.; SAR, T.; NOJOURI, S. A.; PARCHAMI, M.; PARCHAMI, M.; TAHERZADEH, M. J. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. **Bioengineered**, v. 13, n. 3, p. 6521-6557, 2022.

HATTORI, S.; KAMAGATA, Y.; HANADA, S.; SHOUN, H. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1601-1609, 2000.

HE, J.; WANG, X.; YIN, X. B.; LI, Q.; LI, X.; ZHANG, Y. F.; DENG, Y. Insights into biomethane production and microbial community succession during semi-continuous anaerobic digestion of waste cooking oil under different organic loading rates. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

HERNANDEZ-EUGENIO, G.; FARDEAU, M. L.; CAYOL, J. L.; PATEL, B. K.; THOMAS, P.; MACARIE, H.; OLLIVIER, B. *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1217-1223, 2002.

HOLOHAN, B. C.; DUARTE, M. S.; SZABO-CORBACHO, M. A.; CAVALEIRO, A. J.; SALVADOR, A. F.; PEREIRA, M. A.; ALVES, M. M. Principles, advances, and perspectives of anaerobic digestion of lipids. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 8, p. 4749-4775, 2022.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Eds.). (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology** (9th ed.). Williams and Wilkins Publishers.

HUANG, C.; JIANG, X.; SHEN, X.; HU, J.; TANG, W.; WU, X.; YONG, Q. Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, p. 111822, 2022.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ; IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **IAL, Normas Analíticas**, 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2008**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45351.pdf>. Acesso em: 30/05/2020.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Diagnóstico dos Resíduos Sólidos de Logística Reversa Obrigatória**. Brasília, 2012. Disponível em:

<http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120807_relatorio_residuos_solidos_reversa.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Diagnóstico dos Resíduos Sólidos de Logística Reversa Obrigatória**. Brasília, 2012. Disponível em:

<http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120807_relatorio_residuos_solidos_reversa.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2020.

IZUMI, K.; OKISHIO, Y. K.; NAGAO, N.; NIWA, C.; YAMAMOTO, S.; TODA, T. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 601-608, 2010.

JANESCH, E.; PEREIRA, J.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Phase separation in anaerobic digestion: a potential for easier process combination?. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 3, p. 711971, 2021.

JHA, P.; PARK, J. H.; PARK, H. D. Inhibition of anaerobic digestion performance by the addition of amylase: focusing on biogas production and microbial community analysis. **Process Safety and Environmental Protection**, 146, 231-238, 2021.

JIANG, Y.; XIE, S. H.; DENNEHY, C.; LAWLOR, P. G.; HU, Z. H.; WU, G. X.; GARDINER, G. E. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 120, p. 109654, 2020.

JIANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Strategies for stable anaerobic digestion of vegetable waste. **Renewable Energy**, v. 44, p. 206–214, ago. 2012.

JONASSON, P.; KJELLSSON, A.; SETHSON, I.; JONSSON, B. H. Denatured states of human carbonic anhydrase II: an NMR study of hydrogen/deuterium exchange at tryptophan-indole-Hn sites. **FEBS letters**, v. 445, n. 2-3, p. 361-365, 1999.

KABAIVANOVA, L.; PETROVA, P.; HUBENOV, V.; SIMEONOV, I. Biogas production potential of thermophilic anaerobic biodegradation of organic waste by a microbial consortium identified with metagenomics. **Life**, v. 12, n. 5, p. 702, 2022.

KARKI, R.; CHUENHART, W.; SURENDRA, K. C.; SHRESTHA, S.; RASKIN, L.; SUNG, S.; KHANAL, S. K. Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 125001, 2021.

KHALID, S. A.; ELSHERIF, W. M. Types of Microorganisms for Biodegradation. In: **Handbook of Biodegradable Materials**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 195-220.

KHANAL, S. K.; LÜ, F.; WONG, J. W.; WU, D.; OECHSNER, H. Anaerobic digestion beyond biogas. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125378, 2021.

KIRAN, E. U., TRZCINSKI, A. P., NG, W. J., LIU, Y. Bioconversion of food waste to energy: A review. **Fuel**, v. 134, p. 389– 399, out. 2014.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high-rate methane production—A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821-1830, 2014.

KRISTOFERSON, L. A.; BOKALDERS, V. **Renewable energy technologies: their applications in developing countries**. Elsevier, 2013.

KUCZMAN, O.; GUERI, M. V. D.; DE SOUZA, S. N. M.; SCHIRMER, W. N.; ALVES, H. J.; SECCO, D.; HERNANDES, F. B. Food waste anaerobic digestion of a popular restaurant in Southern Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 196, p. 382-389, 2018.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DO AMARAL, A. C. Fundamentals of anaerobic digestion, biogas purification, use and treatment of digestate. 2022.

LAMOLINARA, B.; PÉREZ-MARTÍNEZ, A.; GUARDADO-YORDI, E.; FIALLOS, C. G.; DIÉGUEZ-SANTANA, K.; RUIZ-MERCADO, G. J. Anaerobic digestate management, environmental impacts, and techno-economic challenges. **Waste Management**, v. 140, p. 14-30, 2022.

LAZIM, H.; MANKAI, H.; SLAMA, N.; BARKALLAH, I.; LIMAM, F. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 531-537, 2009.

LE BORGNE, S.; BAQUERIZO, G. Microbial ecology of biofiltration units used for the desulfurization of biogas. **ChemEngineering**, v. 3, n. 3, p. 72, 2019.

LEE, D. H.; BEHERA, S. K.; KIM, J. W.; PARK, H. S. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: A lab-scale study. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 876– 882, 2009.

LEE, H. J.; HAN, S. K.; CHOI, Y. E.; SHIN, H. S. Enhancement of anaerobic digestion of agricultural biomass by co-digesting with food waste and by using enzymes. **Energies**, 13(17), 4487, 2020.

LEE, J.; KIM, J.; KIM, Y.; LEE, U. An efficient approach for determining optimal conditions of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production from food waste. **Journal of Environmental Management**, v. 271, p., 2020b.

LEE, S.; KIM, J.; LEE, J.; CHOI, B.; LEE, S. Modeling bacterial growth rate using mathematical methods: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 576209, 2020a.

LEUNG, D. Y. C.; WANG, J. An overview on biogas generation from anaerobic digestion of food waste. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 2, p. 119-131, 2016.

- LI, Y.; ZHANG, R.; CHEN, C.; LIU, G. The impact of lipase addition on the anaerobic digestion of kitchen waste for biogas production. **Waste Management**, 87, 36-44, 2019.
- LI, Y.; PARK, S.Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 15, 821-826. 2011.
- LIM, J. W.; PARK, T.; TONG, Y. W.; YU, Z. The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. In: **Advances in bioenergy**. Elsevier, 2020. p. 1-61.
- LIU, MINRUI; WEI, YAQIN; LENG, XIAOYUN. Improving biogas production using additives in anaerobic digestion: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 297, p. 126666, 2021.
- LIU, X.; GUO, K.; HUANG, L.; JI, Z.; JIANG, H.; LI, H.; ZHANG, J. Responses of absolute and specific enzyme activity to consecutive application of composted sewage sludge in a Fluventic Ustochrept. *Plos One*, v. 12, n. 5, p. e0177796, 2017.
- LIU, Y. Taxonomy of methanogens. In: **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. 2010.
- LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171-189, 2008.
- LOPEZ-GONZALEZ, L. M.; DE LA RUBIA, M. A.; PEREZ, M. Enzyme addition in anaerobic digestion of food waste: Effect on volatile fatty acid production and microbial community structure. **Bioresource technology**, 297, 2020.
- MACENA, I. R. **Estudos sobre o metabolismo de *Bacillus cereus* isolados de alimentos adquiridos no mercado varejista da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil**. 1997.
- MACH MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540-555, 2015.
- MATHEW, M. M., KHATANA, K., VATS, V., DHANKER, R., KUMAR, R., DAHMS, H. U., & HWANG, J. S. Biological approaches integrating algae and bacteria for the degradation of wastewater contaminants—A review. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 4294, 2022.
- MATHEWS C. K.; VAN HOLDE K. E. **Biochemistry**. Redwood City, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company; 1990.
- MAURYA, R.; TIRKEY, S. R.; RAJAPITAMAHUNI, S.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Recent Advances and Future Prospective of Biogas Production. In: **Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts**. Woodhead Publishing, 2019. p. 159-178.

MCCARTY, P. L.; MCKINNEY, R. E. Volatile acid toxicity in anaerobic digestion. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 223-232, 1961.

MENZEL, T.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. **Energies**, v. 13, n. 21, p. 5555, 2020.

MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO PARANÁ. Unidades de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos Urbanos, **Apostila para a gestão municipal de resíduos sólidos urbanos 2ª Edição**. 2013. Disponível em: <http://www.meioambiente.mppr.mp.br/arquivos/File/Apostila_compostagem_Final_Pos_Print.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

MONTEIRO, P. I.; MARIANO, A. B.; DO SANTOS PADILHA, B.; DE MORAES, Y. D.; ZAGUINE, L.; DE CASTRO MELO, L.; ... E SPIER, M. R. Anaerobic digestion of food waste for biogas production in glass bottles. **Observatório de la economía latinoamericana**, 21(4), 1798-1817, (2023).

MOON, H. C.; SONG, I. S. Enzymatic Hydrolysis of Food Waste and Methane Production Using UASB Bioreactor. **International Journal of Green Energy**, v. 8, n. 3, p. 361–371, 2011.

MORRIS, E. J. Characteristics of the adhesion of *Ruminococcus albus* to cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 51, n. 2-3, p. 113-117, 1988.

MOSEY, F. E.; FERNANDES, X. A. Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk-sugars. In: **Water Pollution Research and Control Brighton**. Pergamon, p. 187-196. 1988.

MOTTE, J. C.; ESCUDIE, R., BERNET, N.; DELGENES, J. P.; STEYER, J. P., DUMAS, C. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. **Bioresource technology**, v. 144, p. 141-148, 2013.

MOYES, Rita B.; REYNOLDS, Jackie; BREAKWELL, Donald P. Differential staining MUNOZ, R.; KOUGIAS, P. G. Biogas Upgrading: Current and Emerging Technologies. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. Academic Press, p. 817-843, 2019.

MURTHY, P. S., NAIDU, M. M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n. 2, p. 199-205, 2010.

MUTHUDINESHKUMAR, R.; ANAND, R. Anaerobic digestion of various feedstocks for second-generation biofuel production. In: **Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment**. Woodhead Publishing, 2019. p. 157-185.

NAZARI, L., SARATHY, S., SANTORO, D., HO, D., RAY, M. B., & XU, C. C. Recent advances in energy recovery from wastewater sludge. In: **Direct thermochemical liquefaction for energy applications**. Woodhead Publishing, 2018. p. 67-100.

NEVES, L., GONCALO, E., OLIVEIRA, R., ALVES, M. M. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. **Waste management**, v. 28, n. 6, p. 965–72, jan. 2008.

NGUYEN, D., NITAYAVARDHANA, S., SAWATDEENARUNAT, C., SURENDRA, K. C., KHANAL, S. K. Biogas Production by Anaerobic Digestion: Status and Perspectives. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. Academic Press, 2019. p. 763-778.

NGUYEN, D., NITAYAVARDHANA, S., SAWATDEENARUNAT, C., SURENDRA, K. C., & KHANAL, S. K. Biogas Production by Anaerobic Digestion: Status and Perspectives. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. Academic Press, 2019. p. 763-778.

NIJU, S.; SWATHIKA, M.; BALAJII, M. Pretreatment of lignocellulosic sugarcane leaves and tops for bioethanol production. In: **Lignocellulosic biomass to liquid biofuels**. Academic Press, 2020. p. 301-324.

NUGRAHA, W. D.; WAFIROH, H.; BUDIHardJO, M. A., SAFITRI, R. P. The effect of amylase and cellulase enzymes on biogas production from rice husk waste using solid-state anaerobic digestion (SS-AD) method. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012018.

ODNELL, A., RECKTENWALD, M., STENSÉN, K., JONSSON, B. H., KARLSSON, M. Activity, life time and effect of hydrolytic enzymes for enhanced biogas production from sludge anaerobic digestion. **Water research**, v. 103, p. 462-471, 2016.

OSTREM, K.; THEMELIS, N. J. Greening waste: Anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes. **Earth Engineering Center Columbia University**, p. 6-9, 2004.

OWAMAH, H. I.; IKPESENI, S. C.; ALFA, M. I.; OYEBISI, S. O.; GOPIKUMAR, S.; SAMUEL, O. D.; ILABOR, S. C. Influence of inoculum/substrate ratio on biogas yield and kinetics from the anaerobic co-digestion of food waste and maize husk. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, p. 100558, 2021.

PANG, H., XIN, X., HE, J., CUI, B., GUO, D., LIU, S., NAN, J. Effect of NaCl concentration on microbiological properties in NaCl assistant anaerobic fermentation: hydrolase activity and microbial community distribution. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 589222, 2020.

PANIGRAHI, SAGARIKA; DUBEY, BRAJESH K. A critical review on operating parameters and strategies to improve the biogas yield from anaerobic digestion of

organic fraction of municipal solid waste. **Renewable Energy**, v. 143, p. 779-797, 2019.

PARANÁ- MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO PARANÁ. Unidades de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos Urbanos, **Apostila para a gestão municipal de resíduos sólidos urbanos 2ª Edição**. 2013. Disponível em: <http://www.meioambiente.mppr.mp.br/arquivos/File/Apostila_compostagem_Final_Poss_Print.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

PERON-SCHLOSSER, B.; CARPINÉ, D.; MATOS J. R. M.; SPIER, R. M. Optimization of wheat flour by product films: A technological and sustainable approach for bio-based packaging material. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 10, p. 4522-4538, 2021.

PEZZOLLA, D., DI MARIA, F., ZADRA, C., MASSACCESI, L., SORDI, A., GIGLIOTTI, G. Optimization of solid-state anaerobic digestion through the percolate recirculation. **Biomass and Bioenergy**, v. 96, p. 112-118, 2017.
PIRT, S. John et al. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications., 1975.
POPE, K.. Global Waste Management: Models for Tackling the International Waste Crisis. **Kogan Page Publishers**, 2020.

POUR, F. H.; MAKKAWI, Y. T. A review of post-consumption food waste management and its potentials for biofuel production. **Energy Reports**, v. 7, p. 7759-7784, 2021.

POZNYAK, T. I.; ORIA, I. C.; POZNYAK, A. S. Ozonation and Biodegradation in **Environmental Engineering. Biodegradation**. cap. 11, 2019.

PRAMANIK, S. K., SUJA, F. B., ZAIN, S. M., PRAMANIK, B. K. The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports**, p. 100310, 2019.

QIAO, W., PENG, C., WANG, W., ZHANG, Z. Biogas production from supernatant of hydrothermally treated municipal sludge by up flow anaerobic sludge blanket reactor. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 9904–11, nov. 2011.

QIN, S., WAINAINA, S., LIU, H., SOUFIANI, A. M., PANDEY, A., ZHANG, Z., TAHERZADEH, M. J. Microbial dynamics during anaerobic digestion of sewage sludge combined with food waste at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors. **Fuel**, v. 303, p. 121276, 2021.

QUIDEAU, S.; SIMPSON, M.; GILLESPIE, A. Soil Organic Matter. **Digging into Canadian Soils**, 2021.

RAJIN, M., YASER, A. Z., SAALAH, S., JAGADESON, Y., AG DURAIM, M. The effect of enzyme addition on the anaerobic digestion of food waste. **Green Engineering for Campus Sustainability**, p. 119-131, 2020.

RESENDE, J. A., SILVA, V. L., DE OLIVEIRA, T. L. R., DE OLIVEIRA FORTUNATO, S., DA COSTA CARNEIRO, J., OTENIO, M. H., DINIZ, C. G. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 284-291, 2014.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in **biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

ROGOFF, M. J. Solid waste recycling and processing: planning of solid waste recycling facilities and programs. **Elsevier**, 2014.

ROGOFF, M. J.; SCREVE, F. Waste-to-energy: **technologies and project implementation**. Academic Press, 2019

ROMERO-GÜIZA M. S. The role of additives on anaerobic digestion: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 58, p. 1486 - 1499. Barcelona, 2015.

RUAN, R., ZHANG, Y., CHEN, P., LIU, S., FAN, L., ZHOU, N., ... & ANDERSON, E. Biofuels: Introduction. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. Academic Press, 2019. p. 3-43.

SALMON, S.; HOUSE, A. Enzyme-catalyzed Solvents for CO₂ separation. In: **Novel Materials for Carbon Dioxide Mitigation Technology**. p. 23-86. Elsevier, 2015.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 179-185, 2010.

SÃO JOSÉ, J. F. B. Avaliação qualitativa de cardápios em uma unidade de alimentação e nutrição localizada em Vitória-ES. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 9, n. 4, p. 975-984, 2014.

SASAKI, D., HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., & IGARASHI, Y. Methanogenic pathway and community structure in a thermophilic anaerobic digestion process of organic solid waste. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 41-46, 2011.

SATAV, D., JADHAV, P., KOR, S., AHMED, S. Conventional Anaerobic Digestion vs. Bioelectrochemical Treatment Technologies for Waste Treatment. In: **Bio-Electrochemical Systems**. CRC Press, 2022. p. 1-26.

SATYAM, Neelima. Numerical modeling of biocemented soil behavior. In: **Modeling in Geotechnical Engineering**. Academic Press, 2021. p. 101-117.

SEKIGUCHI, Y., KAMAGATA, Y., HARADA, H. Recent advances in methane fermentation technology. **Current opinion in biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 277-282, 2001.

SHAH, K. R.; BHATT, S. A. Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 3, 2011.

SHARMA, P., BANO, A., SINGH, S. P., ATKINSON, J. D., LAM, S. S., IQBAL, H. M., & TONG, Y. W. Biotransformation of food waste into biogas and hydrogen fuel—A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2022.

SHI, X., GUO, X., ZUO, J., WANG, Y., & ZHANG, M. A comparative study of thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of food waste and wheat straw: process stability and microbial community structure shifts. **Waste Management**, v. 75, p. 261-269, 2018.

SHRESTHA, A.; VAN-EERTEN JANSEN, M. C. A. A.; ACHARYA, Bishnu. Biodegradation of bioplastic using anaerobic digestion at retention time as per industrial biogas plant and international norms. **Sustainability**, v. 12, n. 10, p. 4231, 2020.

SIDDIQUA, A., HAHLADAKIS, J. N., AL-ATTIYA, W. A. K. An overview of the environmental pollution and health effects associated with waste landfilling and open dumping. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 39, p. 58514-58536, 2022.

SIDDIQUI, K. S., ERTAN, H., POLJAK, A., BRIDGE, W. J. Evaluating Enzymatic Productivity—The Missing Link to Enzyme Utility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 6908, 2022.

SIDDIQUI, Z.; HORAN, N. J.; KOFI, A. Optimisation of C: N Ratio for Co-Digested Processed Industrial Food Waste and Sewage Sludge Using the BMP Test. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**. 2011.

SILVEIRA, B., CHERNICHARO, C., CABRAL, C., SUIDEDOS, C., PLATZER, C., SILVA, G. Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto. **Brasília, DF. Ministério das Cidades**, 2015.

SINGH, P. R.; JAIN, M. K. Studies on the cellulolytic bacteria and cellulose degradation in a cattle waste-fed biogas digester. **MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 309-317, 1986.

SLOPIECKA, K., LIBERTI, F., MASSOLI, S., BARTOCCI, P., FANTOZZI, F. Chemical and physical characterization of food waste to improve its use in anaerobic digestion plants. **Energy Nexus**, v. 5, p. 100049, 2022.

SPIER, M. R., NOGUEIRA, A., ALBERTI, A., GOMES, T. A., DHILLON, G. S. Potential applications of enzymes in brewery and winery. In: **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. Academic Press, 2016. p. 261-278.

SOUZA GUIMARÃES, C., SILVA MAIA, D. R. Development of Anaerobic Biodigester for the Production of Biogas Used in Semi-Continuous System Bioprocesses: An

Efficient Alternative for Co-Digestion of Low Biodegradability Biomass. **Biomass**, v. 3, n. 1, p. 18-30, 2023.

SPIER, M. R., RODRIGUES, M., PALUDO, L., CERUTTI, M. L. Perspectives of phytases in nutrition, biocatalysis, and soil stabilization. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 89-104.

SREEKRISHNAN, T. R., KOHLI, S., RANA, V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review. **Bioresource technology**, v. 95, n. 1, p. 1-10, 2004.

SUBRAMANYAM, V; GORODETSKY, A. Municipal wastes and other potential fuels for use in IGCC systems. In: **Integrated Gasification Combined Cycle (IGCC) Technologies**. Woodhead Publishing, p. 181-219, 2017.

SUMMERSCALES, J.; GWINNETT, C. Forensic identification of bast fibres. In: **Biocomposites for High-Performance Applications**. p. 125-164. Woodhead Publishing, 2017.

SYAFRUDIN, S.; MASJHOER, J. M.; MARYONO, M. Characterization and quantification of solid waste in rural regions. **Global Journal of Environmental Science and Management**, v. 9, n. 2, p. 337-352, 2023.

SZEKELY, G.; DIDASKALOU, C. Biomimics of Metalloenzymes via Imprinting. In: **Molecularly Imprinted Catalysts**. Elsevier, 2016. p. 121-158.

TENG, Z., HUA, J., WANG, C., & LU, X. Design and optimization principles of biogas reactors in large scale applications. In: **Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology**. Elsevier, 2014. p. 99-134.

TEST METHODS FOR EVALUATING SOLID WASTE, SW-846. **United States Environmental Protection Agency (EPA)**, dezembro, 1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-compendium>>. Acesso em: 29, maio de 2020.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential oil Safety (Second Edition): A guide for health care professionals**. Elsevier Health Sciences, p. 39-67, 2014.

TSHEMESE, Z., DEENADAYALU, N., LINGANISO, L. Z., CHETTY, M. An Overview of Biogas Production from Anaerobic Digestion and the Possibility of Using Sugarcane Wastewater and Municipal Solid Waste in a South African Context. **Applied System Innovation**, v. 6, n. 1, p. 13, 2023.

ULLOA-MURILLO, L. M., VILLEGAS, L. M., RODRÍGUEZ-ORTIZ, A. R., DUQUE-ACEVEDO, M., CORTÉS-GARCÍA, F. J. Management of the organic fraction of municipal solid waste in the context of a sustainable and circular model: Analysis of trends in Latin America and the Caribbean. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 10, p. 6041, 2022.

VAN, D. P., FUJIWARA, T., LEU THO, B., TOAN, S., PHU, P., HOANG MINH, G., MINH, G. H. A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste:

Configurations, operating parameters, and current trends. **Environmental Engineering Research**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2019.

VASIEE, A., BEHBAHANI, B. A., YAZDI, F. T., MORADI, S. Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). **Microbial pathogenesis**, v. 101, p. 36-43, 2016.

VASILIADOU, I. A.; GIOULOUNTA, K.; STAMATELATOU, K. Production of biogas via anaerobic digestion. In: **Handbook of Biofuels Production**. Woodhead Publishing, 2023. p. 253-311.

VIEIRA, I. M., MARIANO, L. H., COSMANN, N. J., ROMANELLI, S. L. T. B. RESÍDUOS ORGÂNICOS: CONCEITOS, NORMAS E LEVANTAMENTO DE DADOS SOBRE SUA GESTÃO EM INSTITUIÇÕES PÚBLICAS DE ENSINO NO BRASIL. **Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão** (ISSN: 2525-4782), v. 7, n. 1, 2022.

VÍTĚZOVÁ, M., KOHOUTOVÁ, A., VÍTĚZ, T., HANIŠÁKOVÁ, N., KUSHKEVYCH, I. Methanogenic microorganisms in industrial wastewater anaerobic treatment. **Processes**, v. 8, n. 12, p. 1546, 2020.

VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., WHITMAN, W. B. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, 2009.

WAINAINA, S., LUKITAWESA, KUMAR AWASTHI, M., TAHERZADEH, M. J. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437-458, 2019.

WANG, P., WANG, H., QIU, Y., REN, L., JIANG, B. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. **Bioresource technology**, v. 248, p. 29-36, 2018.

WANG, S-L.; WANG, C-Y.; HUANG, T-Y. Microbial reclamation of squid pen for the production of a novel extracellular serine protease by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* TKU012. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3411-3417, 2008.

WANG, X., CHENG, S., LI, Z., MEN, Y., & WU, J. Impacts of cellulase and amylase on enzymatic hydrolysis and methane production in the anaerobic digestion of corn straw. **Sustainability**, v. 12, n. 13, p. 5453, 2020.

WANG, X., LI, Z., ZHOU, X., WANG, Q., WU, Y., SAINO, M., BAI, X. Study on the bio-methane yield and microbial community structure in enzyme enhanced anaerobic co-digestion of cow manure and corn straw. **Bioresource technology**, v. 219, p. 150-157, 2016.

WANG, Y., WU, S., HUANG, X., GUO, X., MA, L. Enhancing anaerobic digestion of food waste by enzyme addition: Effect of lipase and carbohydrase on biogas production and solids reduction. **Journal of Cleaner Production**, 312, 2021.

WESTERHOLM, M.; ROOS, S.; SCHNÜRER, A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. **FEMS microbiology letters**, v. 309, n. 1, p. 100-104, 2010.

WOOD, H. G.; LJUNGDAHL, L. G. Autotrophic character of acetogenic bacteria. In: Shively JM, Barton LL, editors. Variations in autotrophic life. **Academic Press**. p. 201–50, California, 1991.

XIE, L., XU, J., ZHANG, Y., HE, Y. Biogas upgrading. In: **Advances in Bioenergy**. Elsevier, 2020. p. 309-344.

XU, X., JIANG, Y., YIN, Q., YAN, X., ZHANG, L. Enhancement of methane production from microalgal biomass by pretreatment with crude enzyme extract from *Penicillium chrysogenum* and addition of surfactants. **Bioresource technology**, 319, 2021.

XU, Y., MENG, X., SONG, Y., LV, X., & SUN, Y. Effects of different concentrations of butyrate on microbial community construction and metabolic pathways in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, p. 128845, 2023.

YADAV, M., JOSHI, C., PARITOSH, K., THAKUR, J., PAREEK, N., MASAKAPALLI, S. K., VIVEKANAND, V. Reprint of: Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. **Metabolic Engineering**, 2022.

YANG, L.; GE, X. Biogas and Syngas Upgrading. In: **Advances in Bioenergy**. Elsevier, 2016. p. 125-188.

YIN, Y., LIU, Y. J., MENG, S. J., KIRAN, E. U., LIU, Y. Enzymatic pretreatment of activated sludge, food waste and their mixture for enhanced bioenergy recovery and waste volume reduction via anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 179, p. 1131-1137, 2016.

ZAGO, V. C. P.; BARROS, R. T. DE V. Gestão dos resíduos sólidos orgânicos urbanos no Brasil: do ordenamento jurídico à realidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 2, p. 219-228, 2019.

ZAMRI, M. F. M. A., HASMADY, S., AKHIAR, A., IDERIS, F., SHAMSUDDIN, A. H., MOFIJUR, M., MAHLIA, T. M. I. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, p. 110637, 2021.

ZHAN, Y., CAO, X., XIAO, Y., WEI, X., WU, S., & ZHU, J. Start-up of co-digestion of poultry litter and wheat straw in anaerobic sequencing batch reactor by gradually increasing organic loading rate: Methane production and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, 354, p.127232, 2022.

ZHANG, C., SU, H., BAEYENS, J., TAN, T. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 38, p. 383–392, 2014.

ZHANG, J., ZHAO, M., LI, C., MIAO, H., HUANG, Z., DAI, X., RUAN, W. Evaluation the impact of polystyrene micro and nanoplastics on the methane generation by anaerobic digestion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111095, 2020.

ZHANG, L.; LEE, Y.-W.; JAHNG, D. Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5048–5059, 2011.

ZHANG, W., WANG, X., XING, W., LI, R., & YANG, T. Responses of anaerobic digestion of food waste to coupling effects of inoculum origins, organic loads and pH control under high load: Process performance and microbial characteristics. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111772, 2021.

ZHANG, Y., LI, C., YUAN, Z., WANG, R., ANGELIDAKI, I., ZHU, G. The syntrophy mechanisms, microbial population, and process optimization for volatile fatty acids metabolism in anaerobic digestion. **Chemical Engineering Journal**, p. 139137, 2022.

ZHANG, Y.; BANKS, C. J.; HEAVEN, S. Anaerobic digestion of two biodegradable municipal waste streams. **Journal of environmental management**, v. 104, p. 166–74, 15 ago. 2012.

ZHANG, Z., YU, Y., XI, H., ZHOU, Y. Review of micro-aeration hydrolysis acidification for the pretreatment of toxic and refractory organic wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, p. 128343, 2021.

ZHAO, X. F., YUAN, Y. Q., CHEN, Q. K., LI, Q., HUANG, Y., WU, D., LI, L. Effect of total solids contents on the performance of anaerobic digester treating food waste and kinetics evaluation. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, 2021. p. 01026.

ZHEN, X., LUO, M., DONG, H., FANG, L., WANG, W., FENG, L., YU, Q. Analysis of enzyme activity and microbial community structure changes in the anaerobic digestion process of cattle manure at sub-mesophilic temperatures. **Green Processing and Synthesis**, v. 10, n. 1, p. 644-657, 2021.

ZHOU, M., YANG, H., ZHENG, D., PU, X., LIU, Y., WANG, L., DENG, L. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, p. 107390, 2019.