

**Co-digestão anaeróbia de manipueira, casca de café e esterco bovino:
Um estudo de otimização do processo de metanização**

**Anaerobic co-digestion of manure, coffee husk and bovine manure: A
study to optimize the methanization process**

DOI:10.34117/bjdv7n1-091

Recebimento dos originais: 05/12/2020

Aceitação para publicação: 07/01/2021

Juliana Gomes Barreto Souza Leite

Bacharel em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

E-mail: anailuj.gbs@gmail.com

Roberta Souza Santos

Mestre em Biociências

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

E-mail: robertasouza_bdo@hotmail.com

Gabiela Sampaio Lima

Bacharel em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

E-mail: gabisampioli@gmail.com

Carolline Cruz da Silva

Bacharel em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

E-mail: carollinecruzs@gmail.com

Fábia Giovana do Val de Assis

Doutora em Microbiologia Agrícola

Instituição: Centro Tecnológico de Desenvolvimento Regional de Viçosa CENTEV

Endereço: Av. Oraida Mendes de Castro, 6000 - Novo Silvestre, Viçosa - MG, 36576-400

E-mail: fabi_zoo@yahoo.com.br

Elizama Aguiar de Oliveira

Doutora em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus - BA, 45662-900

E-mail: eaoliveira@uesc.br

Patrícia Lopes Leal

Doutora em Microbiologia Agrícola

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Hormindo Barros, 58 - Candeias, Vitória da Conquista - BA, 45029-094

E-mail: patricial@ufba.br

RESUMO

O interesse pela produção de biogás tem se intensificado principalmente pelo aumento da demanda energética, além da crescente preocupação com as questões ambientais. Propôs-se neste trabalho avaliar a potencialidade da co-digestão anaeróbia de manipueira, casca de café e esterco bovino para a produção de biogás, a fim de otimizar as condições de operação do biodigestor, em um tempo de retenção hidráulica de 15 dias. Foram conduzidas três etapas experimentais aplicando o delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o efeito das variáveis e da interação entre elas (níveis de carga orgânica volumétrica, temperatura, pH, adição/concentração celular de bactérias celulolíticas e adição de micronutrientes) sobre o processo de metanização. Os resultados demonstraram que as condições ideais para metanização foram definidas como: 40mL de manipueira; 95mL de casca de café; 40mL de esterco bovino; pH 6; adição de 1,5.106UFC.mL⁻¹ de inóculo bacteriano, temperatura de 30°C; adição de 46,97 e 4,41mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e MnSO₄.H₂O, respectivamente.

Palavras-chave: Bioenergia, metano, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The interest in biogas production has been intensified by the increase in energy demand, as well as the problem with environmental issues. The potential of anaerobic co-digestion of cassava, coffee husk and bovine manure for the biogas production was proposed in order to optimize the biodigester operation, in a hydraulic storage time of 15 days. The experimental stages were conducted using the central rotational compound (DCCR) to evaluate the effect of the variables and the interaction between them (volumetric organic load, temperature, pH, cell /cellulolytic addition and research and addition of micronutrients) on the process of methanization. The results demonstrated that, as the ideal conditions for methanization were defined as: 40mL of cassava; 95 ml of coffee husk; 40 mL of bovine manure; pH 6; addition of 1.5.106 UFC.mL⁻¹ of bacterial inoculum, temperature 30°C; addition of 46.97 and 4.41mg.L⁻¹ of FeSO₄.7H₂O and MnSO₄.H₂O, respectively.

Keywords: Bioenergy, methane, agroindustrial waste.

1 INTRODUÇÃO

A escassez de recursos naturais não-renováveis, aumento da demanda e suas implicações ambientais, têm estimulado a pesquisa e desenvolvimento de tecnologias alternativas de suprimento energético (VICHI, MANSOR, 2009). Neste contexto, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como matéria-prima para conversão em vetores energéticos vem sendo sugerida como alternativa economicamente viável para amenizar parcialmente a dependência por combustíveis fósseis, além disso, reduzir o

custo do tratamento desses resíduos, que, por vezes, podem acarretar em impactos ambientais devido ao elevado acúmulo no meio ambiente (ANGENENT et al., 2004; JINGURA, MATENGAIFA, 2009; SCHIEVANO et al., 2009).

Dentre as biotecnologias de conversão da biomassa em energia secundária, considerada eficiente para estabilização de resíduos orgânicos, destaca-se a digestão anaeróbia (DA) responsável pela geração de biogás (HAGOS et al., 2016). O biogás é uma fonte de energia sustentável, consiste em 50- 70% de metano (CH_4) e 20- 50% de dióxido de carbono (CO_2), e pequenas quantidade de outros gases, como gás sulfídrico (H_2S) e amônia (NH_4) (ANGELIDAKI et al., 2018). O conteúdo energético do biogás está diretamente relacionado ao conteúdo de CH_4 , por isso, pode ser utilizado para geração de eletricidade e calor quando necessário, e pode ser armazenado (PLUGGE, 2017).

A digestão anaeróbia é considerada uma tecnologia madura para converter biomassa em energia, podendo em um período de 12-15 dias, gerar entre 200 a 400 m^3 de CH_4 por tonelada de material orgânico tratado, o que significa uma produção de aproximadamente $1\text{m}^3\text{h}^{-1}\text{ton}^{-1}$ (YU, SCHANBACHER, 2010). O rendimento da transformação de 1m^3 de CH_4 em eletricidade é de aproximadamente 1,8kWh, portanto, a digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é alternativa viável para produção de energia elétrica renovável.

Na Alemanha e no Reino Unido, o uso do metano equivale a 10% do consumo total de energia elétrica doméstica (SCARLAT et al., 2018). Os Estados Unidos, a Inglaterra e a Itália também detêm capacidades expressivas instaladas em biogás, com 790MW, 680MW e 220MW, respectivamente (TETRPLAN, 2012). Em um estudo realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (2010), o potencial energético brasileiro era de 311MW, o que colocaria o país como um dos maiores geradores dessa energia elétrica no mundo. Entretanto, no Brasil, os investimentos no aproveitamento do biogás ainda são incipientes, principalmente se avaliado o potencial da produção de resíduos agroindustriais.

O Brasil é considerado um dos produtores mais proeminentes de resíduos de biomassa da América Latina (RAMBO et al., 2015). A alta disponibilidade de subprodutos orgânicos provenientes das atividades agroindustriais brasileiras representa, simultaneamente, uma oportunidade e um desafio em, praticamente, todas as regiões do país (FREITAS et al., 2010). Dentre esses resíduos agroindustriais gerados em elevados volumes no Brasil com possível potencial de aplicação na biodigestão anaeróbia para

geração de biogás, estão a manipueira, gerada pelo processamento da mandioca para produção de farinha, a casca de café, resultante do beneficiamento do grão, e rejeito animal (esterco), advindo da bovinocultura (BATTISTA et al., 2016; CORREIA, 2018; CHAVES et al., 2020).

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de biogás (metano) a partir da co-digestão anaeróbia de resíduos do processamento da mandioca (manipueira), da cafeicultura (casca de café) e da bovinocultura (esterco), enriquecidos com bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas a fim de acelerar a degradação do substrato lignocelulósico (casca de café) para o maior rendimento de produção de biogás. O delineamento experimental composto central rotacionado (DCCR) foi aplicado a fim de investigar as melhores condições operacionais (níveis de carga orgânica volumétrica, temperatura, pH, concentração celular do inoculante bacteriano e adição de nutrientes) para otimização da produção de biogás com alto teor de metano (CH₄).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BIODIGESTORES E GASÔMETROS

Biodigestores de bancada foram construídos utilizando Kitassatos (250mL) ligados por meio de mangueiras de silicone aos seus respectivos gasômetros, tipo cúpula flutuante, formados por tubos de PVC (100mm e 75mm) de 20cm de altura, comportando volume máximo de 880cm³ de biogás.

2.2 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS ANAERÓBIAS FACULTATIVAS

Para o isolamento das bactérias foram aplicadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) do esterco bovino fresco, seguidas do método de plaqueamento em superfície, utilizando o meio de cultivo ágar nutriente (AN), acrescido de nistatina (1%). O ensaio foi conduzido em triplicata e as placas mantidas sob incubação à 30°C, por 72 horas. Após crescimento das colônias, culturas puras foram obtidas e submetidas à testes qualitativos para determinação do potencial de degradação de celulose, sob condições anaeróbias. Para isso, as cepas puras foram semeadas em placas contendo meio de cultivo com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. O ensaio foi conduzido em triplicata e as placas foram mantidas incubadas em jarra de anaerobiose, à 30°C, por 72 horas. Placas que apresentaram crescimento bacteriano indicaram a habilidade da cepa

em degradar celulose sob condições anaeróbias. Essas culturas foram transferidas para tubos contendo glicerol, e mantidas à temperatura de -80°C .

O preparo do inóculo para adição nos biodigestores envolveu a reativação das cepas sob cultivo em caldo nutriente, a 30°C , sob agitação de 100rpm, até atingir o valor de D.O. correspondente ao final de fase logarítmica de crescimento. As culturas assim preparadas foram misturadas de modo a se obter uma concentração final de 10^6 UFCmL^{-1} de cada isolado. Em seguida, o consórcio bacteriano foi adicionado ao conteúdo dos biodigestores, nas concentrações prevista no delineamento experimental.

A identificação das cepas de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas foi mediante a extração de DNA segundo o método descrito por FAN et al. (1995) com algumas modificações. As amostras foram submetidas a PCR específica para o gene 16S do rRNA. Os produtos das PCRs foram analisados após eletroforese em gel de Agarose 1% e visualizados sob luz UV após a adição de brometo de etídio $0,5\mu\text{g/mL}$. Os amplicons foram purificados com lavagens de isopropanol 65% e etanol 70% e tiveram sua concentração ajustada para o ideal. Os genes e amplicons alvos foram sequenciados. Estes foram enviados à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genomas e Proteomas. As reações de sequenciamento foram analisadas de acordo com o protocolo para o ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As sequencias foram obtidas em formato de cromatograma e comparadas à publicada no GenBank, por meio da verificação de similaridades pelo programa BLAST (BENSON et al., 2009). O alinhamento dos nucleotídeos foi realizado pelo método Clustal-W (THOMPSON et al., 1997).

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A influência das condições de operação dos biodigestores sobre a produção de CH_4 foi avaliada em três etapas experimentais distintas, aplicando o delineamento composto central rotacional (DCCR). Este tipo de planejamento estatístico avaliou os efeitos da interação dos parâmetros operacionais (níveis de carga orgânica volumétrica, temperatura, pH, concentração celular do inoculante bacteriano e adição de nutrientes) considerados como variáveis independentes sobre a resposta (produção de CH_4 por cm^3). Cada variável foi estudada em cinco níveis diferentes ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ e $+\alpha$), com quatro pontos axiais e três repetições do ponto central (Tabela 1). Os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória para não introduzir análise sistemática de erros de dados.

Tabela 1 - Níveis dos fatores experimentais em termos reais e codificados aplicados no delineamento experimental dos três estágios experimentais, utilizando o DCCR.

| Etapa experimental 1 | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|----|----|----|-------|
| Variáveis* | Valores atribuídos | | | | |
| | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| Manipueira (%) | 3,18 | 10 | 20 | 30 | 36,82 |
| Casca de café (%) | 13,18 | 20 | 30 | 40 | 46,82 |
| Esterco bovino (%) | 0 | 5 | 20 | 35 | 45,23 |

| Etapa experimental 2 | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|-----|-----|-----|-------|
| Variáveis | Valores atribuídos | | | | |
| | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| Inoculum (mL)** | 1,16 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 2,84 |
| Temperature (°C) | 23,18 | 30 | 40 | 50 | 56,82 |
| pH | 5,32 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 8,68 |

| Etapa experimental 3 | | | | | |
|--|--------------------|-----|-----|-----|-------|
| Variáveis | Valores atribuídos | | | | |
| | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹) | 13,03 | 18 | 30 | 42 | 46,97 |
| MnSO ₄ .H ₂ O (mg.L ⁻¹) | 1,59 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 4,41 |

*Concentração (%) em relação ao volume final de 200mL.

**O inóculo correspondeu à mistura de duas cepas bacterianas cuja concentração celular final foi de 106 UFC.mL⁻¹

Os modelos estatísticos testados no ajuste dos valores obtidos experimentalmente para as três etapas, foram avaliados segundo análise de variância (ANOVA, $p < 0.10$) e coeficiente de determinação. A análise estatística dos coeficientes, a influência dos fatores e suas interações sobre as respostas foram analisadas por intermédio do software Statistica 7.0®.

2.4 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA CARGA VOLUMÉTRICA DOS SUBSTRATOS UTILIZADA NO ABASTECIMENTO DOS BIODIGESTORES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Foi avaliado o efeito da concentração das três variáveis: manipueira, casca de café e esterco bovino (variáveis independentes) sobre a produção de CH₄. Nesta etapa não foi aplicado inóculo, somente a microbiota endógena dos substratos. Para obtenção do volume final de 200mL, os biodigestores foram completados com água destilada (%). Todos os volumes foram medidos com auxílio de uma proveta de 50mL.

Para a condução dos ensaios, foi utilizada manipueira mantida em repouso sob condições ambiente (não controladas), durante 8 dias, a fim de reduzir a carga de cianeto (ponto de ebulição do HCN: 25,6°C). A casca de café utilizada foi na forma de farinha, obtida após secagem em estufa de ventilação, a 40°C e trituradas em liquidificador, sem granulometria definida. Por fim, o esterco bovino empregado nos ensaios de biodigestão foi proveniente de animais pertencentes à unidade experimental de bovinocultura, da

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Os animais foram criados sob confinamento e alimentados, exclusivamente com plantas forrageiras locais.

Após abastecimento dos biodigestores, conforme delineamento proposto (Tabela 1), o pH foi ajustado para 7.0, e os frascos foram mantidos a 40°C, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 15 dias.

2.5 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DO INOCULANTE BACTERIANO, TEMPERATURA E PH SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Os biodigestores foram abastecidos de acordo com o melhor resultado obtido no item 2.4, seguindo o mesmo preparo dos materiais e TRH descritos. As variáveis estudadas foram: adição/concentração celular de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas, pH do meio e temperatura (°C) de incubação dos biodigestores (Tabela 1); a resposta avaliada foi a produção de CH₄.

O inoculante bacteriano empregado nesta etapa experimental consistiu de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas isoladas a partir de amostras frescas do próprio esterco bovino (Item 2.2). A intenção de adicionar o inoculante bacteriano foi de acelerar o processo de degradação do material lignocelulósico presente na casca de café.

2.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MEIO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Nesta terceira etapa experimental, foi avaliado o efeito da adição/concentração dos nutrientes FeSO₄.7H₂O e MnSO₄.H₂O (variáveis independentes) sobre a produção de CH₄. Os níveis dos fatores analisados são apresentados na Tabela 1.

A adição dos nutrientes foi realizada no início do experimento, nas concentrações indicadas no planejamento, sendo feita a homogeneização dos mesmos com a carga orgânica. Valores dos parâmetros: carga orgânica de abastecimento, concentração de inoculante bacteriano, pH e temperatura foram definidos nos itens 2.4 e 2.5 como os que melhor proporcionaram produção de biogás, sendo reproduzidos nesta etapa do experimento. O TRH dos biodigestores, assim como nas etapas anteriores, foi de 15 dias.

2.7 DETERMINAÇÃO DO VOLUME E TEOR DE CH₄ DO BIOGÁS PRODUZIDO

O volume de biogás produzido foi avaliado diariamente, durante a condução das três etapas experimentais descritas (itens 2.4, 2.5 e 2.6), mediante a leitura de gasômetro deslocado. Foi utilizada a equação 1 para quantificar o volume de biogás produzido de acordo com as Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP) segundo a metodologia de BARANA (2000).

$$\frac{P_0 \times V_0}{T_0} = \frac{P_1 \times V_1 \times F}{T_1}$$

Equação (1)

Onde: P₀- pressão na CNTP, V₀- volume na CNTP, T₀- temperatura na CNTP, P₁- pressão local de Vitória da Conquista- BA, V₁- volume medido, T₁- temperatura medida, F- fator de correção de umidade.

As concentrações de metano (CH₄), de gás carbônico (CO₂), de gás sulfídrico (H₂S) e de amônia (NH₃) foram quantificadas utilizando o kit de análise de biogás com biofoto da Alfakit, de acordo com as recomendações do fabricante. Desta forma foi possível avaliar a influência das variáveis independentes sobre o volume e qualidade de biogás produzido (teor de CH₄).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA CARGA VOLUMÉTRICA DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS NO ABASTECIMENTO DOS BIODIGESTORES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

A qualidade da mistura orgânica usada para alimentar o biodigestor anaeróbio é fator importante para alcançar produção e qualidade satisfatórias de biogás (ADELEKAN, BAMGBOYE, 2009). Neste estudo, foi possível observar que a relação entre as concentrações de manipueira, casca de café e esterco bovino propostas pela matriz do DCCR, influenciaram a produção de produção de CH₄ (Tabela 2). Com exceção do ensaio 2, no qual não foi detectada a produção de metano, todas as demais relações de concentração entre manipueira, casca de café e esterco bovino avaliadas neste estudo permitiram a produção de biogás com, pelo menos, 50% de teor de CH₄ (Figura 2). Isso confirma a tendência da composição do biogás produzido a partir de resíduos de origem agroindustrial ou florestal, que é em torno de 60% de metano e 40% de CO₂, com pouca variação de cultura para cultura (ZHENG et al., 2014).

Tabela 2 - Matriz de planejamento experimental (DCCR 1) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (manipueira, casca de café e esterco bovino) e produção de CH₄

| Ensaio | Valores codificados | | | Valores reais ** | | | Variável resposta |
|---------|---------------------|---------------|----------------|------------------|-------------------|--------------------|------------------------------------|
| | Manipueira | Casca de café | Esterco bovino | Manipueira (%) | Casca de café (%) | Esterco bovino (%) | CH ₄ (cm ³) |
| 1 | -1,00 | -1,00 | -1,00 | 10,00 | 20,00 | 5,00 | 60,14 |
| 2 | -1,00 | -1,00 | 1,00 | 10,00 | 20,00 | 35,00 | 0,00 |
| 3 | -1,00 | 1,00 | -1,00 | 10,00 | 40,00 | 5,00 | 111,68 |
| 4 | -1,00 | 1,00 | 1,00 | 10,00 | 40,00 | 35,00 | 71,60 |
| 5 | 1,00 | -1,00 | -1,00 | 30,00 | 20,00 | 5,00 | 26,73 |
| 6 | 1,00 | -1,00 | 1,00 | 30,00 | 20,00 | 35,00 | 125,94 |
| 7 | 1,00 | 1,00 | -1,00 | 30,00 | 40,00 | 5,00 | 90,20 |
| 8 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 30,00 | 40,00 | 35,00 | 116,93 |
| 9 | -1,68 | 0,00 | 0,00 | 3,18 | 30,00 | 20,00 | 76,37 |
| 10 | 1,68 | 0,00 | 0,00 | 36,82 | 30,00 | 20,00 | 114,68 |
| 11 | 0,00 | -1,68 | 0,00 | 20,00 | 13,18 | 20,00 | 128,86 |
| 12 | 0,00 | 1,68 | 0,00 | 20,00 | 46,82 | 20,00 | 192,34 |
| 13 | 0,00 | 0,00 | -1,68 | 20,00 | 30,00 | 0,00 | 57,27 |
| 14 | 0,00 | 0,00 | 1,68 | 20,00 | 30,00 | 45,23 | 12,89 |
| 15 (C)* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 30,00 | 20,00 | 133,15 |
| 16 (C) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 30,00 | 20,00 | 114,54 |
| 17 (C) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 30,00 | 20,00 | 152,24 |

* (C) representa o ponto central

** Concentração (%) em relação ao volume final de 200mL.

Para alguns tratamentos, como os referentes aos ensaios 1 e 9, a composição do biogás apresentou teor de CH₄ igual ou maior que 80%, porém sob as condições desses ensaios, o volume de biogás foi inferior a 70cm³ (Figura 1). Diferente disso, observou-se no ensaio 12 que as condições experimentais (20% de manipueira; 46,82% de casca de café e 20% de esterco bovino, em relação ao volume final do biodigestor) possibilitaram alto volume de biogás produzido (300cm³, aproximadamente), sendo composto por mais de 77% de CH₄, o que correspondeu a 192,34cm³ de CH₄ gerado, ao final de 15 dias de TRH (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido por SELVANKUMAR et al. (2017) que reportaram a produção de CH₄ (144cm³.kg⁻¹) em biodigestores abastecidos com casca de café e esterco bovino na proporção de 3:1 dessas biomassas.

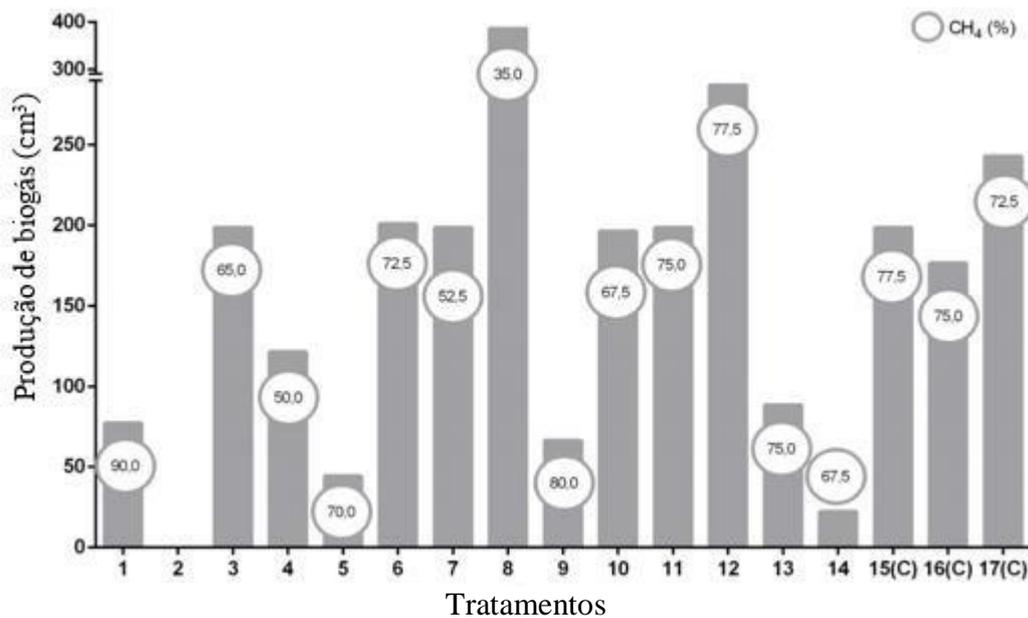
Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) ao nível de confiança de 90% (p-valor > 0.10) para a variável resposta (produção de CH₄), sendo possível notar que o F-calc (21.057) foi significativo quando comparado ao F-tabelado (2.451), com valor de R² igual a 0.90. Os valores do erro puro indicaram baixa falta de ajuste do modelo e boa reprodutibilidade do mesmo (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) da produção de CH₄ para as variáveis: manipueira, casca de café e esterco bovino.

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calc | F-tab |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------|-------|
| Regressão | 37822.53 | 5 | 7564.506 | 21.057 | 2.451 |
| Resíduos | 3951.51 | 11 | 359.228 | | |
| Falta de ajuste | 3240.72 | 9 | 360.08 | 1.013 | 9.381 |
| Erro | 710.79 | 2 | 355.39 | | |
| Total | 41774.04 | 16 | | | |

R² = 0.90

Figura 1. Efeito da carga volumétrica dos substratos usados nos biodigestores para produção de biogás (cm³) e seu conteúdo em CH₄ (%). Os tratamentos indicam as relações entre as concentrações de cada substrato (manipueira, casca de café e esterco bovino) determinadas pela matriz DCCR (Tabela 2).



Os coeficientes da equação de regressão foram obtidos a partir da análise de variância (ANOVA), na qual os termos não significativos (p -valor > 0.10) foram removidos dos modelos matemáticos. Como o valor de F_{calc} foi maior que o de F_{tab} , considerou-se que o modelo proposto pelo tipo de planejamento usado foi válido. Desta forma, pôde-se, então, descrever empiricamente o modelo matemático da produção de CH₄ em função das variáveis significativas (Equação 2).

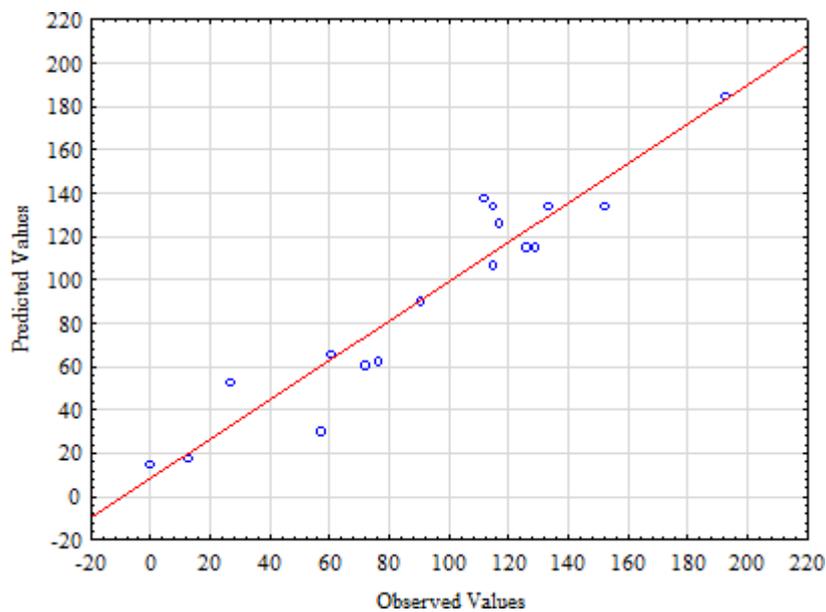
$$Y = 134.5666 - 17.6816M^2 + 13.2404M + 20.8217C - 39.0530E^2 + 28.2701ME$$

Equação (2)

Onde Y é a resposta prevista que indica o rendimento de CH₄ (cm³), e M, C e E são, respectivamente, as variáveis independentes manipueira, casca de café e esterco bovino.

Os valores obtidos do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente ajustado ($R^2_{adj.}$) foram 0.90 e 0.86, respectivamente, para manipueira e esterco bovino. Isso significa que os modelos estatísticos têm bom ajuste, sendo capaz de explicar mais de 86% dos valores observados. A Figura 2 mostra o gráfico dos valores previstos pela Equação 4 em função dos resultados experimentais correspondentes, os pontos estão distribuídos ao acaso próximos da linha, demonstrando excelente concordância. O modelo também não apresentou falta de ajuste significativa (Tabela 3).

Figura 2. Valores de produção de CH₄ determinados experimentalmente (Observed Values) versus valores previstos (Predicted Values) pelo modelo quadrático da equação 3. A linha diagonal representa a concordância exata.



A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis que foram significativos (p -valor < 0.10) para a produção de CH₄ e demais cálculos estatísticos para o planejamento, estão apresentadas na Tabela 4, em que (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Nota-se que o efeito da manipueira (M), casca de café (C) e esterco bovino (E), bem como da interação de M e E foram significativas no intervalo de confiança de 90%.

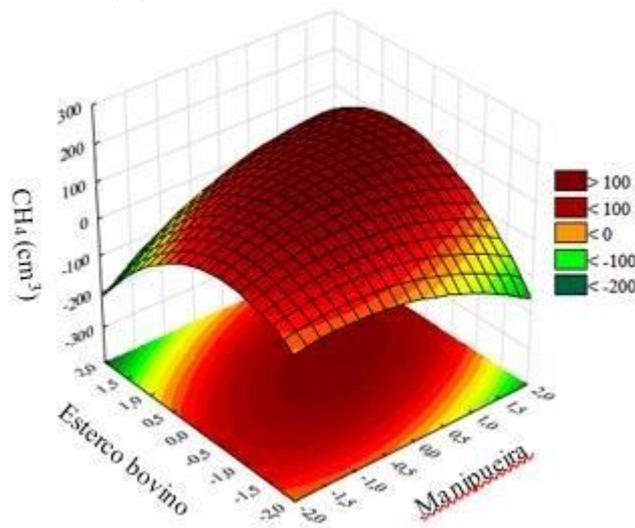
Tabela 4 - Análise dos principais efeitos significativos das variáveis independentes na produção de CH₄ no DCCR.

| Variáveis | Efeitos | Erro padrão | t-valor | p-valor |
|---------------------------------|----------|-------------|----------|----------|
| Média | 134.5666 | 13.69055 | 9.82916 | 0.000024 |
| Manipueira (L) | -35.3632 | 14.15254 | -2.49872 | 0.041069 |
| Manipueira (Q) | 26.4807 | 12.85840 | 2.05941 | 0.078433 |
| Casca de café (L) | 41.6435 | 12.85840 | 3.23862 | 0.014280 |
| Esterco bovino (Q) | -78.1060 | 14.15254 | -5.51886 | 0.000889 |
| Manipueira x Esterco bovino (L) | 56.5403 | 16.80031 | 3.36543 | 0.011995 |

Valores estatisticamente significativos a $p < 0.10$

Observou-se que o efeito linear significativo da manipueira foi negativo, ou seja, aumentando essa variável ocorrerá a diminuição da produção de CH₄. Contudo o efeito linear significativo verificado para a interação entre manipueira e esterco indicou que há sinergismo entre essas variáveis, sendo então possível aumentar a produção de CH₄ com a elevação simultânea desses substratos, conforme pode ser analisado no gráfico de superfície de resposta (Figura 3).

Figura 3. Gráfico de Superfície de Resposta para produção de CH₄ (cm³) em função das concentrações de manipueira (%) e esterco bovino (%).



Analisando ainda a Tabela 4, vale a pena ressaltar o efeito linear significativo ($p=0.014280$) e positivo relacionado à casca de café, sugerindo que a concentração dessa variável no sistema foi determinante para se obter melhores produções de CH₄. Esse resultado é bastante interessante visto que a trituração da casca de café, foi o único pré-tratamento aplicado neste estudo, não havendo nenhuma etapa de pré-tratamento mecânico, químico, e/ou térmico que por vezes é necessária, quando substratos lignocelulósicos são submetidos a biodigestão anaeróbia. CORRO et al. (2013) verificaram que a produção de metano a partir de polpa de café sem pré-tratamento juntamente com esterco bovino exigiu um longo tempo de digestão (oito meses) para obter a concentração de metano de 60% v/v. De acordo com BATISTA et al. (2016), a geometria favorável de interação entre particulado de biomassa e células microbianas na fase metanogênica tende a favorecer a formação de agregado microbiano denso, denominado grânulo, o que é importante para a performance da biodigestão e consequente produção de CH₄.

3.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DO INÓCULO BACTERIANO, TEMPERATURA E PH SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Para a biodigestão de biomassa lignocelulósica, como a casca de café, tem sido sugerida a inoculação de altas concentrações celular de bactérias com habilidade de acelerar a quebra da celulose, hemicelulose e lignina, além de degradar os componentes tóxicos (como taninos e fenóis), para garantir uma produção eficiente de biogás (CORRO et al. 2013). Somado à isso, parâmetros como temperatura e pH são, reconhecidamente, influenciadores do processo de biodigestão na geração do biogás e merecem ser avaliados (BOUALLAGUI et al., 2003; WEILAND, 2010; MUVHIIWA et al., 2016). Diante disso, buscou-se para etapa do estudo avaliar a influência da adição/concentração de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas, temperatura (°C) e pH sobre a produção de biogás, conforme matriz gerada pelo DCCR (Tabela 5). Os biodigestores foram abastecidos com 40mL de manipueira; 95mL de casca de café e 40mL de esterco bovino (relação de carga orgânica definida a partir dos resultados obtidos anteriormente) e o TRH foi de 15 dias.

Tabela 5 - Matriz de desenho experimental (DCCR 2) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (concentração de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas, temperatura e pH) e produção de CH₄.

| Ensaio | Valores codificados | | | Valores reais | | | Variável resposta |
|--------|---------------------|------------|-------|---------------|------------|------|------------------------------------|
| | Inóculo (mL) | Temp. (°C) | pH | Inóculo (mL)* | Temp. (°C) | pH | CH ₄ (cm ³) |
| 1 | -1,00 | -1,00 | -1,00 | 1,50 | 30,00 | 6,00 | 419,30 |
| 2 | -1,00 | -1,00 | 1,00 | 1,50 | 30,00 | 8,00 | 287,13 |
| 3 | -1,00 | 1,00 | -1,00 | 1,50 | 50,00 | 6,00 | 116,20 |
| 4 | -1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,50 | 50,00 | 8,00 | 133,79 |
| 5 | 1,00 | -1,00 | -1,00 | 2,50 | 30,00 | 6,00 | 401,07 |
| 6 | 1,00 | -1,00 | 1,00 | 2,50 | 30,00 | 8,00 | 260,70 |
| 7 | 1,00 | 1,00 | -1,00 | 2,50 | 50,00 | 6,00 | 122,17 |
| 8 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 2,50 | 50,00 | 8,00 | 215,00 |
| 9 | -1,68 | 0,00 | 0,00 | 1,16 | 40,00 | 7,00 | 229,94 |
| 10 | 1,68 | 0,00 | 0,00 | 2,84 | 40,00 | 7,00 | 326,45 |
| 11 | 0,00 | -1,68 | 0,00 | 2,00 | 23,18 | 7,00 | 400,89 |
| 12 | 0,00 | 1,68 | 0,00 | 2,00 | 56,82 | 7,00 | 292,07 |
| 13 | 0,00 | 0,00 | -1,68 | 2,00 | 40,00 | 5,32 | 81,15 |
| 14 | 0,00 | 0,00 | 1,68 | 2,00 | 40,00 | 8,68 | 381,34 |
| 15 (C) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 40,00 | 7,00 | 243,41 |
| 16 (C) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 40,00 | 7,00 | 248,18 |
| 17 (C) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 40,00 | 7,00 | 210,96 |

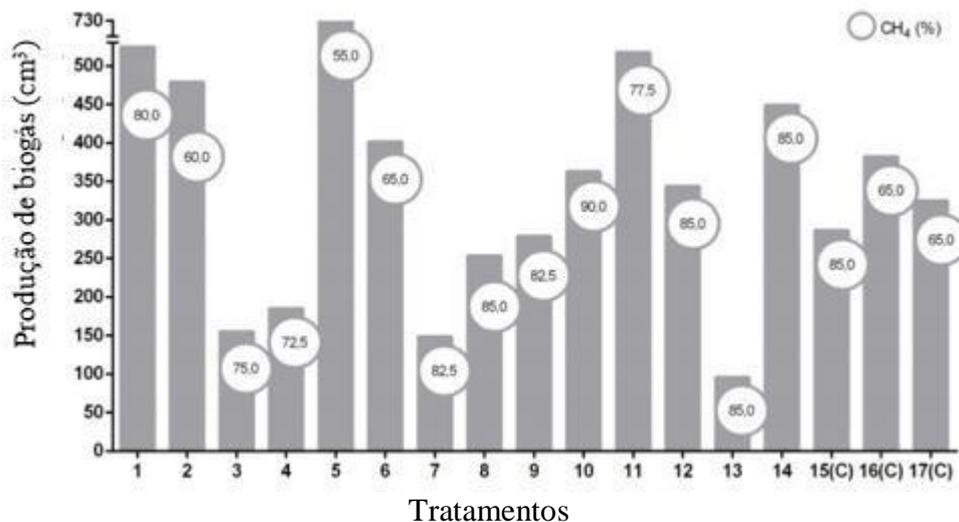
* O inóculo correspondeu à mistura de duas cepas bacterianas cuja concentração celular final foi de 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Observou-se que todos os ensaios proporcionaram produção de CH₄, que variou de 81,15cm³ (ensaio 13) a 419,30cm³ (ensaio 1). Em média, os tratamentos avaliados nesta etapa possibilitaram maior produção de metano (257,04cm³) comparada às

condições avaliadas na etapa anterior (93,27cm³). A mesma tendência foi observada para pureza do biogás produzido, com pelo menos, 55% de teor de CH₄ (Figura 4). Para alguns tratamentos, como os referentes aos ensaios 1 e 11, além do volume de biogás ter sido expressivo (525 e 517cm³, respectivamente), os teores de CH₄ na composição do biogás também foram elevados (80 e 77,5%, para o ensaio 1 e 11, respectivamente).

As espécies de bactérias utilizadas como inóculo nesta etapa experimental foram identificadas como *Escherichia fergusonii* e *Bacillus cereus*. Ambas espécies são reconhecidas pela habilidade em degradar polímeros complexos em amplas faixas de temperatura (21,8 a 45,8°C para *E. ergusonii* e 10 a 50°C, para *B. cereus*) (GAASTRA et al., 2014; GRIFFITHS, SCHRAFT, 2017). No entanto, neste estudo a inoculação dessas bactérias não surtiu efeito significativo (p-valor > 0.10) sobre a produção de biogás. Isso deve estar relacionado à microbiota endógena do esterco bovino usado para abastecer o biodigestor, que pode ter inibido o consórcio bacteriano adicionado, minimizando, portanto a necessidade de inoculação com bactérias específicas (CORRO et al., 2013).

Figura 4. Efeito da concentração de bactérias celulolíticas anaeróbias facultativas, temperature e pH na produção de biogás (cm³) e seus respectivos conteúdos (%) de CH₄. Os tratamentos indicam as condições de operação do biodigestor determinadas pela matriz DCCR (Tabela 5).



Nenhum efeito significativo (p-valor > 0.10) foi verificado para a variável pH, neste estudo. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de a maioria dos ensaios ter fixado valores de pH maiores que 6 (Tabela 5). De acordo com BRUNO e OLIVEIRA (2008), pH variando entre 6 e 8 condiciona crescimento ideal de áruceas metanogênicas, ocorrendo assim, estabilidade na formação de metano.

A única variável com efeito significativo (p-valor = 0,02) para o modelo foi a temperatura (T), ao nível de confiança de 90% (Tabela 6). O efeito observado foi linear

negativo, ou seja, quanto menor for a temperatura para operação do biodigestor, maior produção de biogás ocorrerá. Este é um dado curioso, uma vez que estudos têm reportado temperaturas iguais ou superiores a 30°C, como ideais no processo de biodigestão anaeróbia para produção de biogás (MUVHIIWA et al., 2016; FLECK et al., 2017).

Tabela 6 - Análise dos principais efeitos significativos das variáveis independentes do DCCR na produção de CH₄.

| Variáveis | Efeitos | Erro padrão | t-valor | p-valor |
|-----------------|----------|-------------|----------|----------|
| Média | 237.015 | 54.89426 | 4.31767 | 0.003490 |
| Temperatura (L) | -141.183 | 51.55761 | -2.73835 | 0.028987 |

Valores estatisticamente significativos a $p < 0.10$

Contudo, a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7, revelou baixo valor de R^2 (0.64), como também de R^2 adj. (0.62), indicando que o modelo pode não ser confiável para explicar a produção de CH₄, em função das três variáveis, o que explicaria os resultados inesperados de efeitos principais supracitados. A falta de ajuste também foi bastante expressiva, sendo o F cal $<$ F tab ($11.76 < 9.41$). Desta forma, pode-se, então, descrever empiricamente o modelo matemático da produção de CH₄ em função apenas da temperatura que foi a variável significativa (Equação 3).

$$Y = 237.0150 - 70.5914T$$

Equação (3)

Onde Y é a resposta prevista que indica o rendimento de CH₄ (cm³), T é a variável independente.

Tabela 7- Análise de variância (ANOVA) da produção de CH₄ para as variáveis: temperatura, inóculo e pH

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F- calc | F- tab |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|----------|--------|
| Regressão | 115.694 | 1 | 115.694 | 0.02732 | 3.073 |
| Resíduos | 63529.3 | 15 | 4235.287 | | |
| Falta de ajuste | 62709.0 | 13 | 4823.769 | 11.76099 | 9.415 |
| Erro | 820.3 | 2 | 410.15 | | |
| Total | 179223.3 | 16 | | | |

$R^2 = 0.64$

3.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS

A digestão de mais de um substrato no mesmo digestor pode gerar sinergismo positivo e nutrientes adicionados podem apoiar o crescimento microbiano, beneficiando o processo de digestão anaeróbia, devido ao melhor balanço carbono e nutriente (EL-

MASHAD, ZHANG, 2010). Desta forma, o objetivo desta etapa experimental foi avaliar o efeito da adição de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sobre a produção de CH_4 , em biodigestores abastecidos com 40mL de manipueira; 95mL de casca de café e 40mL de esterco bovino (relação de carga orgânica definida a partir dos resultados obtidos na primeira etapa experimental). A carga orgânica teve o pH ajustado para 6 e recebeu a adição de $1,5 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de inóculo bacteriano. Os biodigestores foram operados a 30°C , em um TRH de 15 dias (condições ideais estabelecidas na segunda etapa experimental).

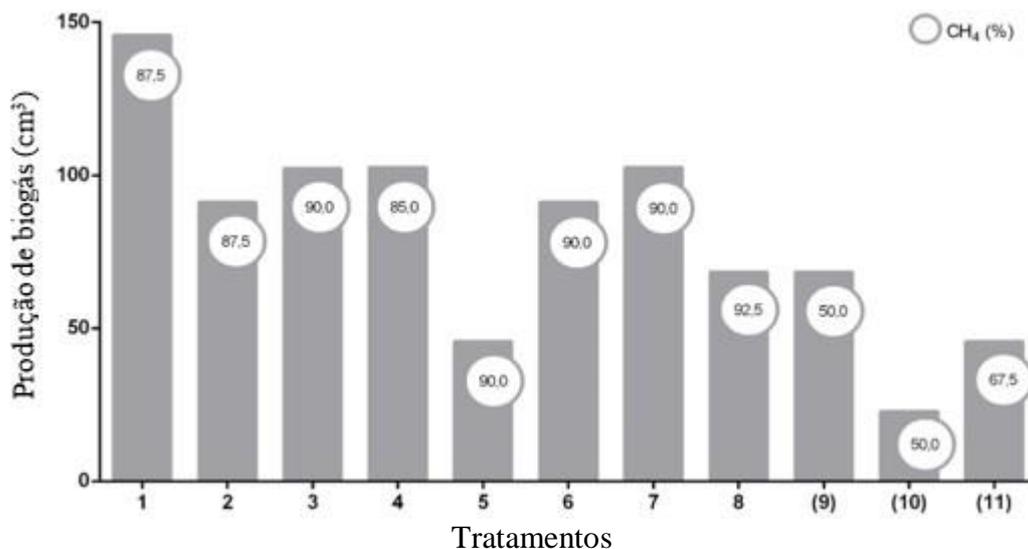
Os valores das variáveis independentes estudadas ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e a produção de CH_4 (variável resposta) estão apresentadas na Tabela 8. O ensaio 1, que continha 18 e $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, respectivamente, foi o tratamento que possibilitou maior produção de CH_4 ($127,60 \text{ cm}^3$).

Tabela 8 - Matriz de desenho experimental (DCCR 3) com valores codificados e reais das variáveis de estudo ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e produção de CH_4 .

| Ensaio | Valores codificados | | Valores reais | | Variável resposta |
|--------|---|--|--|---|---------------------------------|
| | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | CH_4 (Cm^3) |
| 1 | -1,00 | -1,00 | 18,00 | 2,00 | 127,60 |
| 2 | -1,00 | 1,00 | 18,00 | 4,00 | 79,76 |
| 3 | 1,00 | -1,00 | 42,00 | 2,00 | 91,97 |
| 4 | 1,00 | 1,00 | 42,00 | 4,00 | 87,17 |
| 5 | -1,41 | 0,00 | 13,03 | 3,00 | 41,00 |
| 6 | 1,41 | 0,00 | 46,97 | 3,00 | 82,00 |
| 7 | 0,00 | -1,41 | 30,00 | 1,59 | 92,29 |
| 8 | 0,00 | 1,41 | 30,00 | 4,41 | 63,23 |
| 9(C) | 0,00 | 0,00 | 30,00 | 3,00 | 34,18 |
| 10(C) | 0,00 | 0,00 | 30,00 | 3,00 | 11,39 |
| 11(C) | 0,00 | 0,00 | 30,00 | 3,00 | 30,75 |

A média de metano produzido nos ensaios propostos para esta etapa experimental foi menor ($67,40 \text{ cm}^3$) quando comparado às etapas anteriores ($93,27$ e $257,04 \text{ cm}^3$, nas etapas 1 e 2, respectivamente). O volume e qualidade do biogás também variaram entre as diferentes concentrações de nutrientes propostas nos ensaios desta etapa experimental (Figura 5). Com exceção dos ensaios referentes ao ponto central (9, 10 e 11), os demais ensaios proporcionaram a produção de biogás com teor de CH_4 superior a 80%.

Figura 5. Efeito da concentração de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na produção de biogás (cm^3) e seu conteúdo (%) de CH_4 . Os tratamentos indicam as condições de operação do biodigestor determinadas pela matriz DCCR (Tabela 8).



A análise de variância foi realizada (ANOVA) e os valores de R^2 (0.77) e do R^2_{adj} (0.74) obtidos foram significativos, para ambos os nutrientes, indicando que os modelos são capazes de prever com boa confiança a produção de CH_4 (Tabela 9). O F-cal (30,603) foi maior que o F-tab (3,36). A falta de ajuste não foi significativa, uma vez que observou-se $F\text{-cal} < F\text{-tab}$ ($2,273 < 9,349$). O valor do erro puro foi relativamente baixo, demonstrando que o modelo tem boa reprodutibilidade. O modelo também não apresenta falta de ajuste significativa.

Tabela 9- Análise de variância da produção de CH_4 para os micronutrientes: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F- calc | F- tab |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------|--------|
| Regressão | 9197.12 | 1 | 9197.12 | 30.6032 | 3.36 |
| Resíduos | 2704.75 | 9 | 300.528 | | |
| Falta de ajuste | 2402.73 | 7 | 343.247 | 2.273 | 9.349 |
| Erro | 302.02 | 2 | 151.01 | | |
| Total | 11901.87 | 10 | | | |

$R^2 = 0.77$

Desta forma, pôde-se, descrever empiricamente o modelo matemático da produção de CH_4 em função das variáveis significativas (Equação 4).

$$Y = 24.7803\text{Fe}^2 + 32.9071\text{Mn}^2$$

Equação (4)

Onde Y é a resposta prevista que indica o rendimento de CH_4 (cm^3), e Fe e Mn são, respectivamente, as variáveis independentes $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

As variáveis independentes e a interação entre elas não apresentaram efeito linear significativo (p -valor > 0.10) sobre a produção de CH_4 . Por outro lado, as variáveis $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Fe^2) e $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Mn^2) apresentaram efeito quadrático significativo (p -valor < 0.10), com efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração dessas variáveis, melhor é a resposta do modelo (Tabela 10).

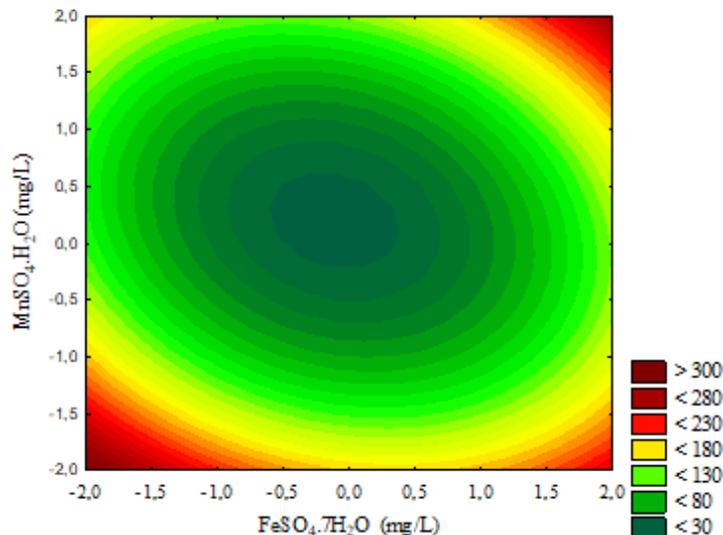
Tabela 10 - Análise dos principais efeitos significativos das variáveis independentes do DCCR na produção de CH_4 .

| Variáveis | Efeito | Erro padrão | t-valor | p-valor |
|-----------|---------|-------------|---------|----------|
| Fe (Q) | 49.5606 | 19.57479 | 2.53186 | 0.052411 |
| Mn (Q) | 65.8141 | 19.57479 | 3.36219 | 0.020060 |

Valores estatisticamente significativos a $p < 0.10$

Segundo FERMOSO et al. (2009), o uso de micronutrientes, especialmente os de Fe, em biodigestores precisa ser dosado para manter o metabolismo e o crescimento microbiano. A dosagem precisa equilibrar a oferta de uma mínima quantidade de micronutrientes para apoiar uma atividade microbiana desejada ou com uma taxa de crescimento em nível máximo de fornecimento de micronutrientes. Acima dessa dosagem os metais podem ser inibitórios ou tóxicos. Porém, neste estudo, foi possível reconhecer que a adição combinada desses micronutrientes, tanto em baixas como em altas concentrações, proporcionaram as maiores produções de CH_4 (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de contorno para a razão dos fatores de concentração de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e $MnSO_4 \cdot H_2O$ na produção de CH_4 (cm^3).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A co-digestão de casca de café, manipueira e esterco bovino em biodigestores de bancada foi satisfatória para o processo de metanização. A carga orgânica dos substratos influenciaram significativamente o processo de produção de biogás. A inoculação de bactérias celulolíticas anaeróbias (*Escherichia fergusonii* e *Bacillus cereus*) não surtiu em maior rendimento de metano, sugerindo que a microbiota endógena dos substratos são suficientes para a conversão da biomassa lignocelulósica em metano. A adição de micronutrientes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) resultou em efeito positivo significativo sobre a produção de biogás.

AGRADECIMENTOS

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio à pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) por contribuições correntes ao fomento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ADELEKAN, B. A., & BAMGBOYE, A. I. Effect of mixing ratio of slurry on biogas productivity of major farm animal waste types. *Journal of Applied Biosciences*, 22, 1333-1343, 2009.

ANGENENT, L. T., KARIM, K., AL-DAHMAN, M. H., WRENN, B. A., & DOMÍGUEZ-ESPINOSA, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, 22(9), 477-485, 2004.

ANGELIDAKI, I., TREU, L., TSAPEKOS, P., LUO, G., CAMPANARO, S., WENZEL, H., & KOUGIAS, P. G. Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. *Biotechnology advances*, 36(2), 452-466, 2018.

BARANA, ANA CLÁUDIA. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. 2000.

BATISTA, RENATO ROCHA. Rotas de aproveitamento tecnológico de resíduo orgânico agrícola: casca de coco, casca de cacau e casca de café: destinadas à geração de energia. 2016. Dissertação de Mestrado.

BENSON, C. A., BROOKS, J. T., HOLMES, K. K., KAPLAN, J. E., MASUR, H., & PAU, A. Guidelines for prevention and treatment opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents; recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. ID: 19357635, 2009.

BOUALLAGUI, H., CHEIKH, R. B., MAROUANI, L., & HAMDI, M. Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in a tubular digester. *Bioresource technology*, 86(1), 85-89, 2003.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. Tratamento anaeróbio de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores UASB em dois estágios. *Engenharia Agrícola*, p. 364-377, 2008.

CHAVES, Y. A. O.; SPRINGER, M. V., BOLOY, R. A. M.; SOARES, O. M. C. F.; MADEIRA, J. G. F. Performance Study of a microtube system for cogeneration application using biogas from manipueira. *Bioenergy Research*, v. 12, p. 659-667, 2020.

CORREIA, I. A. S (2018). A theoretical approach to the production of biogas trough cassava production residue. 1º Congresso sobre Ambiente, Tecnologia e Educação, v. 1, p. 1-10, 2018.

CORRO, G., PANIAGUA, L., PAL, U., BAÑUELOS, F., & ROSAS, M. Generation of biogas from coffee-pulp and cow-dung co-digestion: Infrared studies of postcombustion emissions. *Energy Conversion and Management*, 74, 471-481, 2013.

EL-MASHAD, HAMED M., AND RUIHONG ZHANG. "Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste." *Bioresource technology* 101.11: 4021-4028, 2010.

FAN, SAIJUN, et al. "Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline." *Cancer research* 55.8 (1995): 1649-1654.

FERMOSO, J. et al. High-pressure gasification reactivity of biomass chars produced at different temperatures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 85, n. 1-2, p. 287-293, 2009.

FLECK, L., TAVARES, M. H., EYNG, E., ANDRADE, M. A. D. M., & FRARE, L. M. Optimization of anaerobic treatment of cassava processing wastewater. *Engenharia Agrícola*, 37(3), 574-590, 2017.

FREITAS BUENO, R.. Comparação entre biodigestores operados em escala piloto para produção de biogás alimentado com estrume bovino. *Holos Environment*, 10(1), 111-125, 2010.

GAASTRA, W., KUSTERS, J. G., VAN DUIJKEREN, E., & LIPMAN, L. J. A. (2014). *Escherichia fergusonii*. *Veterinary microbiology*, 172(1-2), 7-12. HOLM-NIELSEN, Jens Bo; AL SEADI, Teodorita; OLESKOWICZ-POPIEL, Piotr. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource technology*, v. 100, n. 22, p. 5478-5484, 2009.

GRIFFITHS, M. W., & SCHRAFT, H. *Bacillus cereus* food poisoning. In *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 395-405), 2017.

HAGOS, K., ZONG, J., LI, D., LIU, C., & LU, X. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 1485-1496, 2017.

JINGURA, R. M.; MATENGAIFA, R. Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, n. 5, p. 1116-1120, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE BRASIL. Estudo sobre o potencial de geração de energia a partir de resíduos de saneamento (lixo, esgoto), visando incrementar o uso de biogás como fonte alternativa de energia renovável. São Paulo, 2010.

MUVHIIWA, R. F., MATAMBO, T. S., CHAFA, P. M., CHIKOWORE, N., CHITSIGA, T., & LOW, M. (2016). Effect of temperature and pH on biogas production from cow dung and dog faeces. *Africa Insight*, 45(4), 167-181, 2016.

PLUGGE CM. Biogas. *Microb Biotechnol.* 2017 Sep;10(5):1128-1130. doi: 10.1111/1751-7915.12854. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28905480; PMCID: PMC5609262.

RAMBO, M. K. D., F. L. SCHMIDT, AND M. M. C. FERREIRA. "Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities." *Talanta* 144: 696-703, 2015.

SCHIEVANO, A.; D'IMPORZANO G.; AND ADANI F.. "Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production." *Journal of Environmental Management* 90.8: 2537-2541, 2009.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, JEAN-FRANÇOIS, AND FAHL F.. "Biogas: Developments and perspectives in Europe." *Renewable Energy* 129: 457-472, 2018.

SELVANKUMAR, T., SUDHAKAR, C., GOVINDARAJU, M., SELVAM, K., AROULMOJI, V., SIVAKUMAR, N., & GOVARTHANAN, M.. Process optimization of biogas energy production from cow dung with alkali pre-treated coffee pulp. *3 Biotech*, 7(4), 254, 2017.

Tetraplan, A. Estudo sobre o Potencial de Geração de Energia a partir de Resíduos de Saneamento (lixo, esgoto), visando incrementar o uso de biogás como fonte alternativa de energia renovável. Acesso em, v. 15, p. 36, 2012.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F., & HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 25(24), 4876-4882, 1997.

VICHI, F. M., AND MANSOR M. T. C. "Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial." *Química Nova* 32.3: 757-767, 2009.

YU, ZHONGTANG; SCHANBACHER, FLOYD L. Production of methane biogas as fuel through anaerobic digestion. In: *Sustainable biotechnology*. Springer, Dordrecht. p. 105-127, 2010.

WEILAND, P. "Biogas production: current state and perspectives." *Applied microbiology and biotechnology* 85.4: 849-860, 2010.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., & LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in energy and combustion science*, 42, 35-53, 2014.