

Ricardo Luis Radis Steinmetz

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DROGAS VETERINÁRIAS NA
PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE BIOGÁS DE SUBSTRATOS
AGROPECUÁRIOS**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catari-
na, como requisito para obtenção do
Grau de Doutor em Engenharia Quí-
mica.

Orientador: Prof. Dr. Hugo M. Soares

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC

Steinmetz, Ricardo Luis Radis

Avaliação do Efeito de Drogas Veterinárias na Produção Específica de Biogás de Substratos Agropecuários / Ricardo Luis Radis Steinmetz ; orientador, Hugo Moreira Soares - Florianópolis, SC, 2016.

168 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Biogás. 3. Dejeito. 4. Inibição. 5. Antibióticos. I. Soares, Hugo Moreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Ricardo Luis Radis Steinmetz

**AValiação DO EFEITO DE DROGAS VETERINÁRIAS NA
PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE BIOGÁS DE SUBSTRATOS
AGROPECUÁRIOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 17 de maio de 2016.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Willibaldo Schmidell Netto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Airton Kunz, Dr.
Embrapa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Cléo Rodrigo Bressan, Dr.
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dedico este trabalho as minhas amadas
Marília e Vanessa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PósENQ) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade e viabilidade de realização do doutoramento. Estendo o agradecimento à Rede BiogásFert pelo fomento aos experimentos, objetos de estudo da tese.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Dr. Hugo Soares pela orientação e auxílio na construção do conhecimento ao longo destes quatro anos. De mesma forma, agradeço ao Dr. Marcio Busi pelas colaborações na função de conselheiro acadêmico junto à Embrapa Suínos e Aves.

Agradeço ao Dr. sc. agr. Hans Oechsner, do *Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie* da Universidade de Hohenheim pela tutoria durante o período de capacitação efetuado na Alemanha, assim como agradeço aos demais colegas daquele grupo de pesquisa.

Expresso minha gratidão à Dr^a. Gizelle Bedendo, ao Prof. Dr. Paulo Belli e ao Prof. Dr. Airton Kunz pelas importantes contribuições efetuadas durante o exame de qualificação. Também agradeço ao Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto, ao Prof. Dr. Agenor Furigo Junior e ao amigo Prof. Dr. Cléo Rodrigo Bressan pelo rico debate e contribuições durante a banca de defesa da tese. Ao Dr. Airton também agradeço pelo coleguismo e longa caminhada na área científica.

Um especial agradecimento eu destino para minha família, em especial a minha querida esposa Dr^a. Vanessa Gressler, tanto pelo suporte sentimental quanto profissional.

Por fim, gostaria de dividir os agradecimentos com meus colegas do LTBR (UFSC), do LAFQ (Embrapa) e do LEAA (Embrapa). Em especial ao companheirismo dos colegas e estudantes do Laboratório de Estudos em Biogás da Embrapa: André, Deisi, Thais, Juan, Vanessa, Marcos, Gabrielle e outros que passaram pelo laboratório neste período.

Muito obrigado!

"Não podemos esquecer o método científico."
(Eliseu Alves, 2015)

RESUMO

A digestão anaeróbia dos dejetos de animais permite a mitigação dos impactos ambientais e possibilita a geração concomitante de metano, que pode ser impulsionada pela digestão conjunta com substratos agrícolas. Porém, pouco se sabe sobre a ação das drogas veterinárias presentes nos dejetos sob a degradação de substratos de fonte celulósica. Portanto, ainda existe desafio para avaliação do potencial de produção de biogás (ou metano) destes substratos, uma vez que as metodologias padronizadas para ensaios de digestão anaeróbia preconizam o uso de inóculos anaeróbios adaptados aos substratos agropecuários e às condições mesofílicas. Em função destes fatores o trabalho propõe: i) estabelecer metodologia, em escala laboratorial, para enriquecimento de inóculo anaeróbio mesofílico para atender aos requisitos da norma VDI 4630; ii) investigar a influência de drogas veterinárias na produção de biogás de substratos agropecuários. Para isso foi avaliado método para aclimação de mistura de três fontes de inoculantes, mantidos em condição mesofílica em reator de 40 litros, por meio de ciclos de alimentação e reinoculação. O inóculo enriquecido demonstrou-se eficaz na digestão de substratos de referência (celulose, gelatina, cama de aviário e lodo), com recuperação de biogás a 99%. Também foram efetuados ensaios para avaliar a inibição na produção de biogás, conforme recomendações da Organização Internacional para Padronização (ISO). A inibição da produção de biogás pelas tetraciclinas foi significativa (CI_{10} em 3 dias entre 5,1 e 68 mg/L) em comparação com as concentrações encontradas em dejetos de suínos (podendo chegar até 764,4 mg/L). O efeito inibitório agudo na digestão da celulose seguiu a seguinte ordem: doxiciclina ~ metaciclina > tetraciclina ~ clortetraciclina > oxitetraciclina. A digestão anaeróbia reduziu o teor de tetraciclinas entre 46,04 e 98,75%. Já a inibição pelos compostos tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina foi menos significativa e pode ser considerada imperceptível nas concentrações estimadas em dejetos de suínos. Porém, o acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta (acético > 57 mg/L; propiônico > 111 mg/L; iso-butírico > 10 mg/L; iso-valérico > 116 mg/L) em altas concentrações de antibióticos indicam que estes compostos podem favorecer outros processos inibitórios paralelos na digestão anaeróbia.

Palavras-chave: Biogás, Dejetos, Inibição, Antibióticos.

ABSTRACT

The anaerobic digestion of animal manure allows mitigating the environmental impacts and enables concomitant generation of methane which can be improved by co-digestion of agricultural substrates. However, little is known about the action of veterinary drugs present in manure in the degradation of cellulose source substrates. Therefore, there is still challenging to assess the biogas potential (or methane) of these substrates, since the standardized methodologies for anaerobic digestion assays suggest the use of anaerobic inoculum acclimated to agricultural substrates and mesophilic conditions. Because of these factors this work proposes: i) establish a methodology, in laboratory scale, for enrichment of mesophilic anaerobic inoculum to attend of VDI 4630 guidelines; ii) investigate the influence of veterinarian drugs in biogas production of agricultural substrates. To this was evaluated a method for acclimation of 3 inoculants sources mixture maintained in mesophilic condition in a 40-L reactor, through feeding and re-inoculation cycles. The enriched inoculum shown effectiveness on digestion of reference substrates (cellulose, gelatin, poultry litter and sludge) with 99% of biogas yield. It was also carried out tests to evaluate the inhibition on biogas production, as recommended by the International Standardization Organization (ISO). Inhibition of biogas by tetracycline compounds was significant (IC_{10} after 3 days between 5.1 and 68 mg/L) in comparison with the concentrations found in pig manure (up to 764.4 mg/L). The acute inhibitory effect on cellulose digestion followed the following order: doxycycline ~ methacycline > tetracycline ~ chlortetracycline > oxytetracycline. Anaerobic digestion reduced the tetracycline compounds content between 46.04 and 98.75%. Inhibition by compounds tiamulin, tylosin, gentamicin and lincomycin was less significant and could be imperceptible on the estimated concentrations occurrence in swine manure. However, the accumulation of short chain organic acids (acetic > 57 mg/L; propionic > 111 mg/L; iso-butyric > 10 mg/L; iso-valeric > 116 mg/L) at high concentrations of antibiotics could indicate that these compounds may favor other parallel inhibitory effect in anaerobic digestion.

Keywords: Biogas, Manure, Inhibition, Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contribuição ao potencial de produção metanogênica, para diferentes fontes de resíduos, no estado de Santa Catarina.	31
Figura 2. Diagrama simplificado das fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese da digestão anaeróbia	37
Figura 3. Crescimento relativo entre as metanogênicas.	43
Figura 4. Exemplo do perfil produção de biogás de um substrato em processo batelada.	47
Figura 5. Potencial de biogás para diferentes substratos.	50
Figura 6. Exemplo de aparatos experimentais para mensurar a produção de metano.	56
Figura 7. Principais mecanismos de ação dos antibióticos.	61
Figura 8. Estrutura molecular das principais tetraciclinas	62
Figura 9. Estrutura molecular dos antibióticos tilosina A, tiamulina, lincomicina e gentamicina.	64
Figura 10. Desenho em corte (A), e fotografia (B) do reator de PVC/PTFE utilizado na aclimação do inóculo anaeróbio sob condições mesofílicas. Detalhe da parte superior do reator (C).	74
Figura 11. Desenho da vista lateral (A) e fotografia frontal da estufa contendo o sistema HBT (B). Detalhe do reator de seringa de 100 mL (C).	88
Figura 12. Perfil das variáveis monitorados no reator de aclimação, perado a 37°C, alimentado em regime semi-contínuo, com reinoculações em ciclos de 30 a 45 dias: a) relação de sólidos e b) pH e relação entre acidez e alcalinidade.	93
Figura 13. Resultados de performance do inóculo sob aclimação para ensaios de PBB e PBM de amostra padrão de celulose microcristalina.	96
Figura 14. Concentração de arqueas metanogênicas para amostras dos inóculos iniciadores e aclimatado, referentes aos dias de aclimação 206 e 421.	98

- Figura 15. Perfil do volume acumulado de biogás em função do tempo de digestão de celulose microcristalina na presença de concentrações crescentes de: a) tetraciclina, b) clortetraciclina, c) oxitetraciclina, d) metaciclina e e) doxiciclina..... 102
- Figura 16. Perfil dos modelos de regressão de inibição do $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ e do $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ em função das concentrações de tetraciclinas avaliadas. . 104
- Figura 17. Perfil de produção cumulativa de biogás, em função do tempo, da digestão de amostra de concentrado para bovinos na presença de concentrações crescentes de: a) tiamulina, b) tilosina, c) lincomicina e d) gentamicina..... 111
- Figura 18. Perfil dos modelos de regressão de inibição do $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ e do $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ em função das concentrações dos compostos investigados. 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de recuperação de biogás e metano para a digestão anaeróbia em dejetos de suínos, por diversos autores.....	33
Tabela 2. Exemplo de microorganismos envolvidos nas diferentes etapas da digestão anaeróbia.....	38
Tabela 3. Alterações de energia livre (ΔG^0) para conversão anaeróbia de propionato, butirato, benzoato e etanol por bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio em culturas puras a 35 °C.....	39
Tabela 4. Relações entre acidez e alcalinidade em reatores anaeróbios conforme experiências empíricas de Lilli et al. (2011).	42
Tabela 5. Resumo de valores de constantes cinéticas para vários substratos utilizados em reatores anaeróbios mesofílicos	46
Tabela 6. Estimativa de potencial e composição do biogás de substratos puros.	49
Tabela 7. Resumo de métodos cinéticos anaeróbios	52
Tabela 8. Sugestão de substratos para avaliar a atividade dos diferentes grupos tróficos de microrganismos.	53
Tabela 9. Revisão: ocorrência de antibióticos em resíduos da suinocultura.	67
Tabela 10. Estimativa da ocorrência de antibióticos, de uso profilático e/ou como promotores de crescimento, em dejetos de suínos no Brasil.	68
Tabela 11. Proporção de substratos usados para alimentação do inóculo.	76
Tabela 12. Resumo dos períodos de aclimação do inóculo usados nos ensaios de PBB e PBM.....	77
Tabela 13. Primer, sondas, sequências e tamanho de fragmentos usados na análise qPCR.....	80
Tabela 14. Desenho experimental para os ensaios de toxicidade por adição de tetraciclina.	83
Tabela 15. Desenho experimental para os ensaios de toxicidade por adição de profiláticos.	87

Tabela 16. Composição da amostra padrão de ração concentrada	88
Tabela 17. Características observadas nos inóculos utilizados no estudo.	92
Tabela 18. Comparações entre resultados de PBB e PBM para amostras de referência.....	100
Tabela 19. Média das velocidades máximas específicas de geração de biogás e tempo de ocorrência de máxima para cada concentração das tetraciclinas investigadas.....	103
Tabela 20. Equações de regressão que apresentaram melhor ajuste aos pontos experimentais de inibição do Biogás _{72h} e do Biogás _{máx} para cada tetraciclina avaliada e estimativa das CI ₁₀ e CI ₅₀	105
Tabela 21. Concentrações das tetraciclinas adicionadas, observadas e expectativas baseadas no tempo de meia vida.....	108
Tabela 22. Médias das velocidades máximas específicas de produção de biogás e do tempo de ocorrência de máxima para cada concentração dos compostos investigados.....	112
Tabela 23. Equações de regressão para inibição do Biogás _{72h} e do Biogás _{máx} para tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina, e estimativas das CI ₁₀ e CI ₅₀ para cada parâmetro.....	114
Tabela 24. Concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta observados nas amostras após os ensaios de digestão anaeróbia, para os tratamentos com a maior concentração dos antibióticos.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Agricultura de Baixa emissão de Carbono.
AI	Alcalinidade intermediária.
AL	Amônia livre.
AME	Atividade metanogênica específica.
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica.
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.
AP	Alcalinidade parcial.
ASBR	do inglês, Anaerobic Semi-batch Reactor ou Reator Anaeróbio operado em Semi-batelada.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BMP	do inglês, Biochemical Methane Potential.
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão.
DIN	do alemão, Deutsches Institut für Normung ou Instituto Alemão para Normatização.
EFS	Extração em fase sólida (do inglês, solid phase extraction - SPE).
ETDS	Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos.
GEE	Gases de efeito estufa.
HBT	Teste de recuperação de biogás Hohenheim (do inglês, Hohenheim Biogas-yield Test)
ISO	acrônimo utilizado para identificar a Organização Internacional para Padronização (L'Organisation Internationale de Normalisation).
KTBL	do alemão, Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft eV ou Curatório de Tecnologia e Estruturas na Agricultura.
LEB	Laboratório de Estudos em Biogás.
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MCTI	Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação.
MF	Matéria fresca, para valores expressos na base natural da amostra.
PBB	Potencial Bioquímico de Biogás.
PBM	Potencial Bioquímico de Metano.
qPCR	do inglês, Real-time Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.
SPAC	Sistema de Produção com Animais Confinados.
UASB	do inglês, Upflow Anaerobic Sludge Blank Reactor ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo.

LISTA DE SÍMBOLOS

S	Quantidade de substrato.
S_0	Quantidade de substrato no tempo zero.
X	Quantidade de células.
P	Quantidade de produto.
P_0	Quantidade de produto no tempo zero.
$P_{máx}$	Quantidade máxima de produto formado.
V	Volume.
t	Tempo.
μ_X	Velocidade específica de crescimento celular.
$\mu_{Xmáx}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular.
μ_P	Velocidade específica de formação de produto.
$\mu_{Pmáx}$	Velocidade máxima específica de formação de produto.
K_s	Constante de afinidade (ou de saturação do substrato).
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células.
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto.
dV/dt	Função derivada do volume em função da variação do tempo.
I	Percentual de inibição.
V_t	Volume de biogás observado para o substrato na presença de inibidor.
V_c	Volume de biogás observado para o substrato controle (sem inibidor).
CI_{50}	Concentração inibitória que causa 50% de redução na produção de gás (metano ou biogás).
CI_{10}	Concentração inibitória que causa 10% de redução na produção de gás (metano ou biogás).
m/z	Relação massa/carga.
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida.
Biogás_{72h}	Volume de biogás produzido em 72 horas.
$\text{Biogás}_{máx}$	Volume máximo de biogás produzido, equivalente a Produção Bioquímica de Biogás (PBB).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 O PROJETO REDE BIOGASFERT	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 REVISÃO	29
3.1 A AGROPECUÁRIA E O BIOGÁS	29
3.1.1 Oportunidades	29
3.1.2 Fragilidades técnicas e desafios	32
3.2 FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	35
3.2.1 Fatores que influenciam a digestão anaeróbia	40
3.2.1.1 Potencial hidrogeniônico (pH), ácidos de cadeia curta e a relação acidez/alcalinidade	41
3.2.1.2 Características do substrato e relação de nutrientes	42
3.2.1.3 Temperatura	42
3.2.1.4 Substâncias inibidoras	43
3.2.2 Cinética anaeróbia e o potencial metanogênico	44
3.3 MÉTODOS PARA ESTUDOS DA CINÉTICA ANAERÓBIA	49
3.3.1 Atividade Metanogênica Específica (AME)	51
3.3.2 Normas ISO 13641 - Water quality - Determination of inhibition of gas production	53
3.3.3 Norma ISO 11734:1995 - Evaluation of “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measuring of biogas production	54
3.3.4 Norma ASTM E2170-01(2008) - Determining anaerobic biodegradation potential of organic chemicals under methanogenic conditions	54
3.3.5 Norma DIN 38414-8 - Determination of amenability to anaerobic digestion	55

3.3.6 Norma VDI 4630 - Fermentation of organic materials: Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data and fermentation tests	55
3.3.7 Aparatos experimentais	55
3.3.8 Inoculo para ensaios de PBB e PBM	57
3.4 DROGAS VETERINARIAS	58
3.4.1 Drogas veterinárias na produção animal	58
3.4.2 Classes e formas de ação dos antibióticos	60
3.4.2.1 Tetraciclinas	62
3.4.2.2 Diterpenos	63
3.4.2.3 Macrolídeos	63
3.4.2.4 Lincosaminas	63
3.4.2.5 Aminoglicosídeos	65
3.4.3 Incidência de drogas veterinárias em dejetos de suínos	65
3.4.4 Impactos ambientais e interações na digestão anaeróbia	69
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1 ACLIMATAÇÃO DE INÓCULO ANAERÓBIO MESOFÍLICO	73
4.2.1 Inóculos iniciadores	73
4.2.2 Reator para aclimatação do inóculo em escala laboratorial	74
4.2.3 Produção e aclimatação do inóculo anaeróbio	75
4.2.4 Procedimentos analíticos	76
4.2.4.1 Ensaio de PBB e PBM	76
4.2.4.2 Análise do biogás	77
4.2.4.3 Análises químicas e físicas	78
4.2.4.4 Ensaios de AME	79
4.2.4.5 Extração de DNA e análise qPCR	79
4.2.4.6 Avaliações intra e interlaboratoriais	80
4.2.4.7 Análise estatística	81
4.3 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM DROGAS VETERINÁRIAS	81
4.3.1 Tetraciclinas	82

4.3.1.1 Reagentes	82
4.3.1.2 Desenho experimental	82
4.3.1.3 Avaliação da concentração residual das tetraciclinas	83
4.3.2 Profiláticos e/ou promotores de crescimento	85
4.3.2.1 Reagentes	85
4.3.2.2 Inóculo	86
4.3.2.3 Desenho experimental	86
4.3.2.4 Determinação de ácidos orgânicos de cadeia curta	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1 ACLIMATAÇÃO DE INÓCULO ANAERÓBIO MESOFÍLICO	91
5.1.1 Avaliação dos inóculos iniciadores e operação do reator de aclimação	91
5.1.2 Desempenho do inóculo aclimatado na recuperação de biogás e metano	95
5.1.3 Avaliação microbiológica	98
5.1.4 Avaliação interlaboratorial	99
5.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM DROGAS VETERINÁRIAS	101
5.2.1 Tetraciclinas	101
5.2.2 Profiláticos e/ou promotores de crescimento	110
6 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	121
ANEXO A - Ocorrência de antibióticos em efluentes da suinocultura	131
ANEXO B - Resultados das cinéticas anaeróbias	139

1 INTRODUÇÃO

A produção de animais tem se intensificado no Brasil e no mundo e com ela cresce também a geração de resíduos. Por um lado estes resíduos representam um problema ambiental e por outro apresentam potencial energético por meio da geração de biogás. Diferente das expectativas frustradas ocorridas na década de 80 e meados dos anos 2000, a cadeia do biogás está em processo de consolidação no cenário nacional em função dos recentes avanços ocorridos na política energética brasileira.

Neste contexto, a produção de biogás dos dejetos dos animais pode ser potencializada por meio da digestão conjunta com substratos agrícolas e florestais (ex.: resíduos, culturas energéticas, subprodutos da industrialização de alimentos, etc).

Porém, junto com a intensificação da produção agropecuária também ocorreu o aumento do uso de drogas veterinárias para ampliar os níveis de produtividade. Tais drogas exercem efeito antibiótico aos microrganismos anaeróbios e, sendo assim, existe um desafio quanto ao conhecimento dos efeitos destes compostos na recuperação de biogás e metano durante a digestão conjunta destes resíduos.

1.1 O PROJETO REDE BIOGASFERT

Com finalidade de reunir informações técnico-científicas para atender as metas estabelecidas ao Plano ABC, a Embrapa e a Itaipu Binacional, juntamente com outras nove instituições (incluindo a Universidade Federal de Santa Catarina), iniciaram em 2012 o projeto "Tecnologias para produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC" ou "Projeto Rede BiogásFert" (EMBRAPA, 2016).

A Rede BiogásFert visa oferecer para a sociedade soluções tecnológicas para a produção e uso integrados de biogás e biofertilizantes orgânicos e organominerais a partir de dejetos animais nos diferentes sistemas de produção agropecuários, contemplando bovinocultura, suinocultura e avicultura.

O projeto contempla o plano de ação "Potencial metanogênico e adaptação de modelos de biodigestores de maior eficiência energética", o qual vinculou e suportou financeiramente as atividades desenvolvidas neste trabalho de tese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de drogas veterinárias na digestão anaeróbia de substratos agropecuários, utilizando a medida do potencial específico de produção de biogás.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Adequar e validar metodologia, em escala laboratorial, para produção e manutenção de inóculo mesofílico anaeróbio destinado a uso em ensaios de medida do potencial bioquímico de biogás de acordo com requisitos da norma VDI 4630;
- 2) Investigar a influência e remoção de antibióticos da classe das tetraciclinas, nos níveis usados na suinocultura, no processo de digestão anaeróbia de substratos agropecuários em condições mesofílicas;
- 3) Investigar a influência dos antibióticos tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina, nos níveis usados como profiláticos ou promotores de crescimento na suinocultura, no processo de digestão anaeróbia de substratos agropecuários em condições mesofílicas.

3 REVISÃO

3.1 A AGROPECUÁRIA E O BIOGÁS

3.1.1 Oportunidades

Nas últimas décadas a intensificação da produção de animais por meio de Sistemas de Produção com Animais Confinados (SPAC) tem acompanhado o aumento da produtividade no Brasil. O país é o maior exportador de proteína animal, onde ocupa o lugar de maior exportador mundial de carnes bovina e de frango, e quarto lugar entre os exportadores de suínos (ABPA, 2015). Para ilustrar o crescimento ocorrido na agropecuária verificamos que o Brasil detém 3,26% da produção mundial de suínos, com crescimento médio anual de 5,7% enquanto que a média de crescimento mundial foi de apenas 2,2% (EMBRAPA, 2015). Neste cenário, Santa Catarina representa a maior contribuição para a produção brasileira, com cerca de 20% do total de animais.

O aumento da produtividade é reflexo da intensificação e melhoria técnica de produção, ações que alavancaram também a geração de resíduos e o uso dos biodigestores nas propriedades rurais. A rota principal de destinação dos dejetos dos animais é o uso na agricultura por meio da aplicação no solo como uma forma de reaproveitamento de nutrientes (nitrogênio e fósforo) (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009). Dentre as três atividades descritas acima, a suinocultura é a atividade que apresenta maiores desafios quanto ao gerenciamento dos resíduos, em função da concentração dos animais e a quantidade de água presente nos efluentes, o que requer estratégias para mitigar os impactos ambientais ao ar, água e solo (BELLI FILHO et al., 2001). É comum encontrar propriedades que utilizam biodigestores para tratamento parcial dos dejetos como etapa prévia a disposição ao solo. Esse arranjo, baseado na digestão anaeróbia, tem sido apontado como alternativa para sustentabilidade da suinocultura quanto à mitigação de gases de efeito estufa (GEE) e permitir integração dos sistemas pecuária-lavoura-floresta (CHERUBINI et al., 2015).

Os impactos causados pelos GEE nas alterações do clima global têm provocado reflexões sobre as atividades antropogênicas, especialmente as atividades agropecuárias (GERBER et al., 2013). Para mitigar estes impactos o Brasil colaborou para a realização do Tratado de Paris, durante a Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas - COP21, e para isso está comprometido a reduzir em 37%, até 2025, e em 43%, até 2030, as emissões de gases do efeito estufa do país

(UNITED NATIONS, 2015). Para atingir estas metas o governo se utiliza do Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura (Plano ABC) que, dentre suas ações, preconiza tratar os resíduos de animais através da digestão anaeróbia. Esta ação pretende evitar a emissão de 6,9 milhões de toneladas de CO₂ equivalentes na atmosfera por meio da captura e utilização do metano produzido a partir de resíduos da pecuária, por meio de avanços em pesquisas e fomento aos produtores rurais para utilização de tecnologias para tratar os dejetos de animais (MAPA, 2012).

Outra linha de ação para redução das emissões de GEE envolve a diversificação da matriz energética. O avanço das políticas energéticas no Brasil tem despertado interesse nas energias renováveis e ampliado oportunidades de uso do biogás. No setor elétrico, a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) publicou a Resolução Normativa 482/2012, posteriormente complementada pela Resolução 687/2015, que estabelecem condições gerais para o acesso à micro e minigeração de energia elétrica distribuída. Em seguida, a ANEEL efetuou a Chamada 14/2012 para contemplar projetos estratégicos no tema: “Arranjos técnicos e comerciais para inserção da geração de energia elétrica a partir de biogás oriundo de resíduos e efluentes líquidos na matriz energética brasileira” (ANEEL, 2012a, 2012b, 2015). Recentemente a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis publicou a Resolução Nº 08, conforme caput que descreve:

“Estabelecer a especificação do biometano de origem nacional oriundo de resíduos orgânicos agrossilvopastoris destinado ao uso veicular e às instalações residenciais e comerciais a ser comercializado em todo o território nacional, (...)”

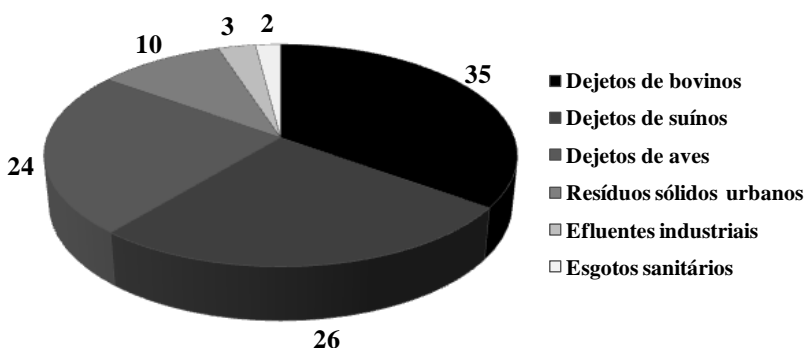
(ANP, 2015)

Esta resolução estabelece, portanto, o biometano como o biogás purificado a teores superiores a 96,5 % (mol) de metano, assim, permitindo um marco inédito para fortalecer as relações comerciais do biogás proveniente de substratos agropecuários.

Este potencial destaca-se em estados com forte produção agropecuária, como Santa Catarina (SC). Belli Filho et al. (2010), entre 2008 e 2009, executaram um estudo de mapeamento dos potenciais de geração de biogás em SC. Foi verificado naquele período a estimativa de poten-

cial de aproximadamente 3 milhões de m³ de metano por dia, provenientes de quatro fontes principais de dejetos orgânicos: dejetos de criação de animais, resíduos sólidos urbanos (RSU), esgotos sanitários e efluentes industriais. A Figura 1 apresenta a contribuição dos potenciais de produção de biometano conforme as fontes dos resíduos.

Figura 1. Contribuição ao potencial de produção metanogênica, para diferentes fontes de resíduos, no estado de Santa Catarina.



Fonte: Adaptado de Inventário do Potencial de Geração de Metano no Estado de Santa Catarina (BELLI FILHO; CASTILHO JUNIOR; GOSMANN, 2010).

O estudo de Belli Filho et al. (2010) demonstrou que os dejetos de animais somaram as maiores contribuições dos potenciais de geração de metano (85%) e que o potencial total de produção de biometano estimado para SC representou cerca de 1,5 vezes a quantia de gás natural comercializada pela Companhia de Gás de Santa Catarina em 2009. No cenário nacional, a Associação Brasileira de Biogás e Biometano (Abiogás) estima que o Brasil tenha potencial para gerar 23 bilhões de m³ de biometano (equivalente a 37 milhões de megawatts) por ano, a partir de RSU (3 bilhões de m³/ano), rejeitos da agricultura e dejetos de animais (8 bilhões de m³/ano), e resíduos da produção de cana-de-açúcar (outros 12 bilhões de m³/ano) (ORDOÑEZ, 2016). Além disso, se considerarmos a digestão de outros substratos de fonte agrícola conjuntamente com os dejetos dos animais, veremos que existe um número ainda maior de possibilidades para produção mais efetiva de biogás ou biometano (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010).

Esse conjunto de cenários corrobora e indica para a expansão da cadeia do biogás no país com base nos resíduos da agropecuária. A gama de oportunidades ao uso do biogás se amplifica, tornando insepa-

rável das necessidades do agronegócio em aplicar soluções para mitigar os impactos ambientais e ao mesmo tempo tornar-se sustentável energeticamente. Por isso, é cada vez mais necessária a evolução de pesquisas voltadas a digestão anaeróbia de substratos agropecuários e também a geração de índices técnicos que representem as realidades regionais.

3.1.2 Fragilidades técnicas e desafios

Apesar das oportunidades ao biogás de resíduos agropecuários, especialmente na suinocultura, existe carência de dados técnicos aplicáveis à realidade brasileira. Faltam dados confiáveis ou padronizados sobre a cinética de produção de biogás, ou de metano, de substratos comuns ao agronegócio brasileiro e isso pode acarretar em inúmeras incertezas e fragilidades para o desenvolvimento da cadeia do biometano. Para exemplificar essa problemática, a Tabela 1 apresenta resultados de uma busca bibliográfica usando os termos “produção específica de biogás”, “produção específica de metano” e “dejetos de suínos”.

Tabela 1. Valores de recuperação de biogás e metano para a digestão anaeróbia em dejetos de suínos, por diversos autores.

Fonte	Local	Biogás	Metano	Unidade
FNR (2010)	Europa	-	180-360	m ³ _N /tSV
Kabas et al. (2013)	Europa	-	225-500	L _N /kgSV
KTBL (2014)	Alemanha	551	336	L _N /kgSV
Campos et al. (2005)	Brasil	-	0,01	m ³ /kgDBO
Salomon & Lora (2005)	Brasil	-	0,35	m ³ /kg
Oliveira & Hiragashi (2006)	Brasil	0,45	-	m ³ /kgSV
Kunz & Oliveira (2006)	Brasil	0,37-0,50	-	m ³ /kgSV
Gusmão (2008)	Brasil	0,19-3,21	0,14-1,99	m ³ /kgSV
Dal Mago (2009)	Brasil	-	0,56	m ³ /kgSV
Santos & Nardi Junior (2013)	Brasil	560 0,5-0,7	280 -	m ³ /tST m ³ /m ³ dejetos
Cestonaro do Amaral et al. (2016)	Brasil	0,33-0,97	0,17-0,64 0,86-7,15	m ³ _N /kgSV m ³ _N /m ³ dejetos

Nota: A letra N que acompanha a unidade representa que ocorreu correção de volume do gás às condições normais de temperatura (273 K) e pressão (1013 hPa) - CNTP.

As três primeiras referências apresentam dados da Europa, que em alguns estudos têm sido usados para realizar a avaliação técnica-econômica-ambiental no cenário brasileiro (BERNS; SCHNICKE; BOMBONATTI, 2015). Este fato já apresenta uma grande vulnerabilidade aos projetos no Brasil pela simples suposição de os substratos apresentarem as mesmas características que na Europa.

Os demais dados de produção de biogás e metano são de fontes bibliográficas nacionais, porém, é possível perceber que os valores de produção de biogás, e também de metano, possuem grande variabilidade entre os autores. Outra constatação é a falta de parametrização aos valores publicados no Brasil, ou seja, a falta de rigores metrológicos na expressão dos resultados. Dentre as referências nacionais, não é comum encontrar trabalhos que relatem os gases em base seca (sem considerar o volume do vapor de água) e corrigidos a temperatura e pressão conhecidas. Ainda assim, mesmo que alguns autores o tenham feito, dentre esta amostra de trabalhos apenas Amaral et al. (2016) sinalizou estas correções. Considerando condições próximas de 20 °C e uma atmosfera de pressão os gases tendem a comportar-se como gases ideais, e é amplamente conhecido pela interpretação da Lei dos gases ideais (Equação I)

que, para massa constante da amostra gasosa, o volume do gás (ou mistura de gases) sofre variação diretamente proporcional à temperatura e inversamente proporcional à pressão.

$$P.V = n.R.T \qquad \text{Equação I}$$

Onde: P é a pressão exercida ao gás, V é o volume da amostra, n é a quantidade de mols da amostra gasosa, R é a constante universal dos gases perfeitos e T é a temperatura do sistema.

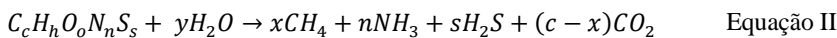
Outro fator que gera distorções é o uso não padronizado das unidades de medida para expressar a fração orgânica da amostra e por consequência basear a produção de gás em uma base específica. Como é possível visualizar na Tabela 1 é comum encontrar resultados que remetem a diferentes parâmetros: sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos suspensos voláteis (SSV), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou até baseado no volume (ex. m^3) no caso de efluentes e dejetos de suínos. Parâmetros como a DBO e a DQO são bastante difundidos para expressar a fração orgânica em efluentes de origem sanitária ou industrial (AQUINO et al., 2007). No ensaios para avaliação de degradabilidade de lodos de origem sanitária, industrial, ou da fração orgânica de RSU, também é possível encontrar recomendações quanto ao uso do teor de SV ou SSV, pois, a determinação de DQO e DBO nestes casos torna-se inviável ou passível de incertezas (ANGELIDAKI et al., 2009). Para os substratos agropecuários (resíduos e culturas energéticas) os resultados costumam ser expressos em base no teor de sólidos voláteis (SV) e isso é convencionalizado pela norma VDI 4630 (2006).

Todos estes agravantes limitam a comparação dos resultados por inexistência de fatores que permitam a rastreabilidade (ou interconversão) dos resultados obtidos pelos autores. Em outras palavras, é possível sim expressar o volume do biogás ou metano em condições diferentes das condições normais de temperatura e pressão (CNTP), desde que os autores expressem as condições utilizadas nos ensaios cinéticos e assim permitir a conversão de valores para executar comparações ou projeção sob outras condições. O mesmo princípio deve ser aplicado para os parâmetros utilizados para definição da produção específica do biogás e metano. Neste caso os parâmetros que expressem relação direta com a fração orgânica (aquela passível de ser transformada em gás pela atividade biológica) devem ser preconizados. Além disso, a expressão de parâmetros físicos e químicos do substrato facilmente auxiliaria no processo de interpretação e replicação dos resultados.

Por fim, mesmo existindo métodos padronizados e reconhecidos internacionalmente para os estudos cinéticos da digestão anaeróbia, verifica-se que poucos autores utilizam estes protocolos. Talvez o maior agravante disso resida na dificuldade de obter inóculo anaeróbio em condições estáveis para realização dos testes de digestão. Algumas normas recomendam utilizar inóculos com atividades satisfatórias, previamente adaptados e provindos de digestores de plantas em grande escala operando em condições ótimas (VDI, 2006). Nos países europeus, como Alemanha e Itália, com a abundância de unidades de produção de biogás que praticam digestão de mistura de substratos (definida como codigestão) em condições mesofílicas, pode ser simples lograr inóculo em condições satisfatórias para um ensaio cinético. Em países como o Brasil, esse tipo de inóculo é bastante difícil de obter em função das distâncias e menor nível tecnológico dos reatores anaeróbios disponíveis, portanto, a aclimação do inóculo é necessária.

3.2 FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Os processos anaeróbios são definidos como processos biológicos onde a matéria orgânica é metabolizada em ambiente livre de oxigênio ou seus precursores. Os processos anaeróbios podem ser classificados entre fermentação anaeróbia e respiração anaeróbia, dependendo da via metabólica utilizada pelo microrganismo e do tipo de acceptor de elétrons envolvido. A digestão anaeróbia é um processo no qual um consórcio de diferentes tipos de microrganismos, que realizam fermentação e respiração anaeróbia por interações simbióticas, promove a transformação da matéria orgânica em uma mistura gasosa denominada biogás (BITTON, 2005; CHERNICHARO, 2007; KHANAL, 2008). O biogás é basicamente constituído de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), baseado nas características do substrato e de acordo com estequiometria da Equação II, III e IV, proposta por Buswell e Neave (1930). Em função de outros processos intermediários e paralelos é possível que o biogás também contenha pequenas porções de outros gases como hidrogênio (H_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e amônia (NH_3) (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010).



onde,

$$x = \frac{1}{8} \cdot (4c + h - 2o - 3n - 2s) \quad \text{Equação III}$$

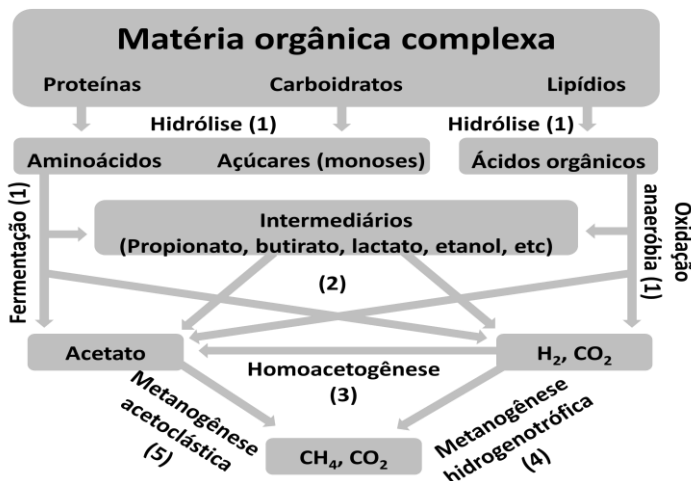
$$y = \frac{1}{4} \cdot (4c - h - 2o + 3n - 3s) \quad \text{Equação IV}$$

Nesta equação também podem ser considerados os termos referentes a produção celular. Porém, estima-se que os microrganismos anaeróbios acidogênicos aproveitam em média 15% do substrato para produzir novas células, enquanto os metanogênicos aproveitam menos de 3%. (BITTON, 2005) Portanto, considerando o baixo fator de conversão de substrato em células ($Y_{XS} \leq 0,05$ gSSV/gDQO) pelas metanogênicas, para fins práticos é comum desprezar a produção de células para estimar a produção teórica de metano por meio da relação estequiométrica.

Em linhas gerais a digestão anaeróbia é considerada um processo que envolve quatro fases (ou etapas) principais conforme demonstrado no diagrama simplificado da Figura 2: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (CHERNICHARO, 2007; KHANAL, 2008; DEUBLEIN, STEINHAUSER, 2010). A transformação de macromoléculas complexas como proteínas, carboidratos (polissacarídeos) e lipídios em produtos como metano e dióxido de carbono é realizada por meio de vários estágios metabólicos por diversos grupos de microrganismos. Durante a atividade anaeróbia o que se observa é a ocorrência da oxidação parcial de compostos complexos, resultando nos precursores do metano, acetato e hidrogênio. Além disso, a degradação da matéria orgânica envolve a atuação de microrganismos procarióticos anaeróbios facultativos e obrigatórios, cujas espécies pertencem ao grupo de bactérias hidrolíticas-fermentativas, bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio e também microrganismos metanogênicos.

A primeira fase (ou etapa) no processo de degradação anaeróbia consiste na hidrólise de materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais podem atravessar as paredes celulares das bactérias fermentativas. Essa conversão é realizada através da ação de enzimas extracelulares excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas (grupo 1 Tabela 2). As proteínas degradam-se em aminoácidos, os carboidratos em açúcares e os lipídeos em ácidos graxos (BITTON, 2005; CHERNICHARO, 2007; KHANAL, 2008; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010).

Figura 2. Diagrama simplificado das fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Khanal (2008)

Na acidogênese, os produtos oriundos da fase de hidrólise são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas e convertidos em compostos simples, que podem ser excretados pelas células. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos de cadeia curta (1C a 5C), alcoóis, gás carbônico, hidrogênio, amônia, além de novas células. A etapa de acidogênese é realizada por um diversificado grupo de bactérias fermentativas, como o da espécie *Clostridium*, que forma esporos e pode sobreviver em ambientes totalmente adversos, e da espécie *Bacteroides*, normalmente presentes nos tratos digestivos (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). A maioria das bactérias acidogênicas é anaeróbia estrita, porém, algumas espécies são facultativas, podendo metabolizar o material orgânico pela via oxidativa, utilizando o oxigênio eventualmente presente no meio e que pode tornar-se tóxico às anaeróbias estritas (CHERNICHARO, 2007).

Tabela 2. Exemplo de microrganismos envolvidos nas diferentes etapas da digestão anaeróbia.

Etapas da biodigestão anaeróbia	Microrganismos
Hidrólise e acidogênese (1)	<i>Clostridia</i> , <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Eubacterium cellulosolvens</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Selenomonas sp</i> , <i>Megasphaera sp</i> , <i>Lachnospira multiparus</i> , <i>Peptococcus anaerobicus</i> , <i>Bifidobacterium sp</i> , <i>Staphylococcus sp</i>
Acetogênese (2 e 3)	<i>Syntrophomonas wolinii</i> , <i>S. wolfei</i> , <i>Syntrophus buswellii</i> , <i>Clostridium bryantii</i> , <i>Acetobacterium woddii</i> , <i>Desulfovibrio sp</i> , <i>Desulfotomaculum sp</i>
Metanogênese hidrogenotrófica (4)	<i>Methanobacterium sp</i> , <i>Methanobrevibacter sp</i> , <i>Methanospirillum sp</i>
Metanogênese acetoclástica (5)	<i>Methanosarcina sp</i> e <i>Methanosaeta sp</i>

Fonte: adaptado de Bitton (2005)

A seguinte etapa é a acetogênese, em que as bactérias acetogênicas (grupo 2 – Tabela 2) convertem os produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para a próxima fase do processo. Dentre esses produtos gerados, destacam-se o hidrogênio, o dióxido de carbono e o acetato (CHERNICHARO, 2007). Como é possível perceber pelos valores de energia livre (ΔG^0), descritos na Tabela 3, para conversão dos substratos em acetato que essa etapa é desfavorável termodinamicamente. Porém, em um reator anaeróbio com cultura mista, é possível estabelecer sintrofismo entre acetogênicas produtoras de hidrogênio e metanogênicas consumidoras de hidrogênio. O sintrofismo ocorre pelo consumo do hidrogênio e do acetato, que por sua vez permite a continuidade do processo devido ao favorecimento de deslocamento de equilíbrio e também por estabelecer condições termodinâmicas favoráveis (ΔG^0 entre -25,6 a -132,7 kJ/mol para culturas mistas) (KHANAL, 2008).

A remoção do hidrogênio nos sistemas anaeróbios é feita pela ação de bactérias anaeróbias hidrogenotróficas, representadas por espécies de metanobactérias e de redutoras do íon sulfato. A cooperação entre as bactérias produtoras e consumidoras de hidrogênio, sob condições anaeróbias, é denominada "transferência de hidrogênio entre espécies".

Tabela 3. Alterações de energia livre (ΔG^0) para conversão anaeróbia de propionato, butirato, benzoato e etanol por bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio em culturas puras a 35 °C.

Reação	ΔG^0 (kJ/mol _{substrato})
Propionato → Acetato $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2$	+76,1
Butirato → Acetato $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48,1
Benzoato → Acetato $\text{C}_7\text{H}_5\text{CO}_2^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2$	+53
Etanol → Acetato $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9,6

Fonte: Adaptado de Khanal (2008)

O consumo de hidrogênio também pode ocorrer por meio da homoacetogênese (grupo 3) Figura 2 onde produto obtido é o acetato (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). As bactérias responsáveis por esta fase podem ser autotróficas ou heterotróficas. As autotróficas utilizam hidrogênio e dióxido de carbono, com o dióxido de carbono servindo como fonte para síntese celular. As heterotróficas, por outro lado, utilizam substratos orgânicos (formato e metanol) como fonte de carbono.

A última etapa compreende a metanogênese, realizada por organismos metanogênicos (grupos 4 e 5 – Tabela 2) pertencentes ao domínio *Archaea* (arquea em português). Arqueas apresentam propriedades morfológicas similares às bactérias (inexistência de um núcleo delimitado por uma membrana, característico das procariotas), mas com propriedades genéticas e bioquímicas similares a de eucariotos (ex.: constituição dos ribossomos) (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; SEKIGUCHI; KAMAGATA; HARADA, 2001; BITTON, 2005). As arqueas metanogênicas utilizam número limitado de substratos, compreendendo ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas, além de monóxido de carbono, produzindo assim metano e dióxido de carbono. São divididas em dois grupos principais: o que forma metano a partir de acetato ou metanol (acetoclástico) e o que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono (hidrogenotróficas) (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; BITTON, 2005; CHERNICHARO, 2007).

Existem poucas espécies de arqueas metanogênicas acetoclásticas, porém, são normalmente os microrganismos predominantes na digestão anaeróbia, pertencendo a dois gêneros principais: *Methanosaeta*, que utilizam exclusivamente o acetato, e *Methanosarcina*, que são consideradas as mais versáteis entre as arqueas metanogênicas. Existe menor número conhecido de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, sendo mais comuns as dos gêneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter* (BITTON, 2005; CHERNICHARO, 2007).

Segundo Chernicharo (2007), em efluentes sanitários, tradicionalmente cerca de 60 a 70% da conversão de metano ocorre através de via acetoclástica, portanto é necessário que esta via se desenvolva eficientemente. A fermentação ácida tende a causar abaixamento de pH, porém, a metanogênese não se desenvolverá de forma efetiva quando o pH estiver ácido. Por outro lado, como já demonstrado pela Tabela 3 é importante o desenvolvimento efetivo da atividade hidrogenotrófica e assim evitar interferências resultantes do aumento da pressão parcial de hidrogênio. Dessa forma, para que a digestão anaeróbia ocorra de forma eficiente, é necessário manter um equilíbrio entre a produção de ácidos e a metanogênese.

Porém, em reatores operando com substratos agropecuários é comum observar maior ocorrência populacional de hidrogenotróficas dentre as metanogênicas (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010). Por exemplo, Da Silva et al. (2015) investigaram amostras de sistemas de tratamento de dejetos de suínos em escala plena e por sua vez encontraram prevalência de hidrogenotróficas *Methanospirillum* em 80% das amostras. Isso demonstra que existe uma relação um pouco diferenciada na ecologia de arqueas na digestão de substratos agropecuários se comparado com efluentes sanitários, por exemplo. Isso pode estar atribuído às diferenças nas relações C/N dos substratos e nas cargas orgânicas aplicadas nos processos com efluentes sanitários e resíduos agropecuários.

3.2.1 Fatores que influenciam a digestão anaeróbia

Grande variedade de fatores influencia a digestão anaeróbia, positiva ou negativamente. Os principais fatores ambientais que devem ser observados são:

3.2.1.1 Potencial hidrogeniônico (pH), ácidos de cadeia curta e a relação acidez/alcalinidade

O pH altera os equilíbrios de dissociação das moléculas e dessa forma altera as cargas dos sítios ativos das enzimas modificando suas estruturas e, conseqüentemente perdendo suas especificidades. Existem microrganismos que possuem uma faixa mais ampla de sobrevivência do que outros. Podemos diferenciar em dois grupos principais que dependem de faixas estabelecidas de pH para obter ótima produtividade. As bactérias produtoras de ácidos (acidogênicas) e as produtoras de metano (metanogênicas). As acidogênicas preferem pH entre 5,5 e 6,5. Já as metanogênicas preferem a faixa entre 7,8 e 8,2. Em ambiente com ambas as culturas coexistindo, a faixa ótima de pH abrange 6,8 a 7,4 (BITTON, 2005). É comum encontrar relatos de reatores anaeróbios alimentados com dejetos de animais que apresentam valores elevados de pH ($> 7,5$) mas em condições de estabilidade (LI; LIU; SUN, 2015). Em alguns casos, a digestão pode ocorrer em dois reatores, um deles favorecendo condições de acidogênese e outro metanogênese. Apesar de não existir uma regra, considerando que a metanogênese é uma etapa limitante, quando os dois grupos de microrganismos estão presentes em um único digestor é recomendado que o pH permaneça próximo da neutralidade (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010; KHANAL, 2008).

Por outro lado, as etapas de acidogênese e acetogênese produzem como metabólitos ácidos de cadeia curta (1C a 5C), principalmente acético, propiônico e butírico. Quando ocorre a produção excessiva destes ácidos pode ocorrer um decréscimo no pH e inibir a atividade das metanogênicas. Portanto, a concentração destes intermediários é um fator importante pois pode afetar a capacidade tampão (alcalinidade) no reator anaeróbio. Normalmente a alcalinidade em um reator anaeróbio varia de 1000 a 5000 $\text{mg}_{\text{CaCO}_3}/\text{L}$ e a estabilidade do processo também pode ser avaliada pela relação entre acidez (devida aos ácidos de cadeia curta) e a alcalinidade. Como exemplificado na Tabela 4 por experiências empíricas de Lilli et al. (2011), para fins práticos, considera-se que a valores entre 0,1 a 0,25 $\text{mg}_{\text{Ác. acético}}/\text{mg}_{\text{CaCO}_3}$ são considerados normais ou de subcarga no reator enquanto valores próximos de 0,35 $\text{mg}_{\text{Ác. acético}}/\text{mg}_{\text{CaCO}_3}$ são encontrados em sistemas de maior produtividade de metano. Já valores acima deste de podem indicar acúmulo dos ácidos e valores próximos ou superiores a 0,45 $\text{mg}_{\text{Ác. acético}}/\text{mg}_{\text{CaCO}_3}$ geralmente estão vinculados ao colapso da metanogênese no reator (CHERNICHARO, 2007; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010).

Tabela 4. Relações entre acidez e alcalinidade em reatores anaeróbios conforme experiências empíricas de Lilli et al. (2011).

Razão Acidez/Alcalinidade mg _{Ac. acético} /mg _{CaCO₃}	Condição do reator
> 0,4	Reator em sobrecarga
0,3 - 0,4	Maior produtividade de metano
< 0,3	Reator em subcarga

Fonte: Adaptado de Lilli et al. (2011)

3.2.1.2 Características do substrato e relação de nutrientes

O substrato determina o potencial e a velocidade da degradação anaeróbia. Se um componente do substrato de importância vital se esgota, os microrganismos reduzem o seu metabolismo. Por conseguinte, é muitas vezes necessário suplementar a falta de substâncias (carboidratos, lipídios, proteínas, substâncias minerais e oligoelementos). Para o desenvolvimento eficiente de biomassa microbiana e geração efetiva do metano estima-se que a relação molar de nutrientes C:N:P:S seja de 500-1000:15-20:5:3. Caso a relação C/N aumente, pode ocorrer formação de amônia e possibilidade de inibição da metanogênese. Caso a relação fique muito baixa, pode influenciar negativamente na formação de proteínas, com consequências no metabolismo e na estrutura dos microrganismos (KHANAL, 2008).

Neste contexto também são importantes elementos traços como Fe, Co, Ni, Se, W, e Mg. Tais elementos são essenciais para algumas etapas do metabolismo das metanogênicas e das bactérias fermentativas, pois são cofatores (BITTON, 2005).

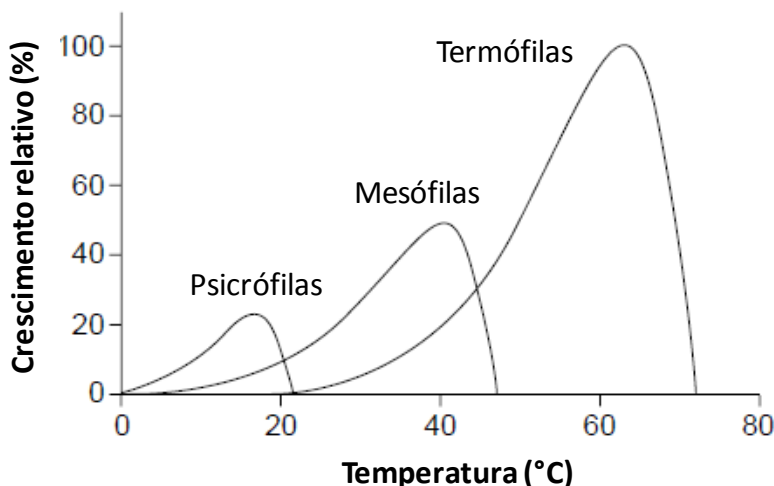
Estes são alguns motivos que a digestão conjunta de substratos tende a desempenhar resultados mais favoráveis do que a degradação isolada. Isso também explica a tendência de uso de substratos com maior potencial nutricional e energético (substratos agrícolas) para incrementar a produção de biogás de dejetos de animais.

3.2.1.3 Temperatura

A eficiência dos processos biológicos, especialmente os anaeróbios, é extremamente dependente da temperatura. Os processos anaeróbios podem operar em temperaturas entre 10 e 45 °C. Em temperaturas inferiores a 10 °C, apesar de existir, a atividade metanogênica é considerada praticamente desprezível. Já para temperaturas elevadas (geralmente

te superiores a 65 °C) ocorre desnaturação proteica e portanto rompimento da parede celular. A Figura 3 apresenta uma comparação entre o crescimento relativo das metanogênicas conforme sua faixa de temperatura ótima de crescimento. Ou seja, o crescimento relativo segue a seguinte ordem: termofílicas > mesofílicas > psicofílicas, portanto, a temperatura tem forte influência na cinética de crescimento das metanogênicas. Por esse motivo, via de regra, a velocidade de conversão anaeróbia da matéria orgânica em metano aumenta com o aumento da temperatura, porém considera-se as faixas mais eficientes a temperaturas de 32 a 40 °C para metanogênicas mesofílicas e de 50 a 58 °C para as termofílicas (BITTON, 2005; KHANAL, 2008).

Figura 3. Crescimento relativo entre as metanogênicas.



Fonte: Adaptado de Lettinga, Rebac e Zeeman (2001).

3.2.1.4 Substâncias inibidoras

Microrganismos anaeróbios são inibidos por substâncias presentes no substrato ou por compostos gerados no próprio metabolismo. Como citado anteriormente a produção de excessiva de ácidos orgânicos pode ser um fator inibidor. Amônia, nitrato, metais tóxicos, compostos halogenados, pesticidas, desinfetantes, antibióticos, taninos e cianetos também são exemplos de inibidores. Por outro lado, também é interessante que microrganismos anaeróbios são capazes de aclimatar-se e degradar compostos tóxicos e refratários. Em alguns casos a tolerância é

manifestada após período de aclimação aos tóxicos (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010; KHANAL, 2008).

A inibição por amônia ocorre na digestão de substratos com elevado teor de nitrogênio. O equilíbrio entre íon amônio e amônia livre (AL) pode ser favorecido para formação de AL sob valores altos de pH ($pK_a \sim 9,24$). É conhecido que valores maiores que 100 mg de N como AL/L podem prejudicar a produção de metano. A hipótese neste caso é que a AL cause inibição por ser facilmente permeável à membrana celular, causando desbalanço protônico e deficiência de potássio no interior da célula (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). Já o nitrato promove inibição, pois compete com as fases iniciais da fermentação anaeróbia por os substrato orgânicos para promover a desnitrificação (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010). Compostos sulfurados também promovem competição por substrato entre as redutoras de sulfato e as metanogênicas, mas também podem inibir o processo em função da toxicidade do sulfito a um grupo variado de bactérias (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

A inibição por compostos tóxicos e refratários ocorre de diferentes formas, sendo na maioria dos casos ainda não elucidada por completo. No caso dos antibióticos, especialmente das drogas veterinárias (objeto deste estudo) o mecanismo de inibição geralmente é relacionado ao mesmo mecanismo de ação do agente antimicrobiano. Esse assunto será novamente abordado no item 3.3, adiante.

3.2.2 Cinética anaeróbia e o potencial metanogênico

Ao efetuar o balanço de massa em um reator anaeróbio é necessário levar em consideração que o termo de geração (ou consumo) está diretamente vinculado a fase da digestão anaeróbia que controla a cinética global. Isso quer dizer que a velocidade de produção de metano, a partir de uma substância orgânica bruta, estará vinculada as velocidades de todas as fases da digestão anaeróbia. Caso uma das etapas seja limitante (velocidade inferior às demais) ela passará a ser a etapa controladora da cinética global (KHANAL, 2008).

Portanto, a velocidade da reação vai estar diretamente vinculada a composição do substrato e a capacidade dos microrganismos em degradar os compostos. Substratos que contém carboidratos complexos (ex.: fibras insolúveis) a hidrólise pode se tornar a etapa controladora devido a complexidade da matriz a ser degradada (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010; KHANAL, 2008). Enquanto os açúcares são

hidrolisados e acidificados em espaço de tempo curto (poucas horas), a degradação da celulose prossegue muito mais lentamente, e a velocidade depende da quantidade de lignina presente. Os substratos de fonte agrícola são exemplo onde a fase limitante da velocidade na digestão anaeróbia usualmente é a hidrólise, pois a celulose necessita ser hidrolisada a monômeros de glicose. Este processo é realizado por enzimas específicas (ex.: β -glucosidase) que rompem ligações β -1,4 glicosídicas e que pode levar de dois a três dias para ocorrer de forma efetiva (MILLER; WOLIN, 1995; YU et al., 2012).

Outro exemplo é a degradação de lipídeos e ácidos de cadeia longa também que tem como etapa limitante da velocidade global da digestão anaeróbia na oxidação anaeróbia e acetogênese. Porém, na ausência de etapas prévias que controlam a velocidade da digestão anaeróbia, a metanogênese será a etapa controladora. Muitos autores atribuem a baixa relação $Y_{X/S}$ e a elevada sensibilidade dos organismos metanogênicos às variações ambientais (inibição) como a principal causa para que a formação de metano seja a etapa limitante da velocidade em reatores anaeróbios (BAUER et al., 2008; CHERNICHARO, 2007; DE VRIEZE et al., 2015; WILLIAMS et al., 2013).

Além disso, usualmente assume-se que a cinética de crescimento microbiano, por consequência também a formação de metano na digestão anaeróbia, é função da concentração do substrato. Sendo assim, podendo ser utilizado o modelo cinético descrito por Monod (1949), conforme a Equação V:

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Equação V}$$

onde, μ_x é a velocidade específica de crescimento celular para a concentração de substrato S , $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento celular e K_s é a constante de afinidade (ou de saturação do substrato) que corresponde a concentração de substrato na qual μ_x atinge metade de seu valor máximo ($\mu_x = \mu_{m\acute{a}x}/2$) (MONOD, 1949).

Mais tarde foram propostas derivações do modelo de Monod, porém contemplando os efeitos de inibição passíveis de ocorrer nos processos biológicos. De maneira geral, os modelos principais que exemplificam o fenômeno de inibição estão relacionados a inibição pelo substrato (Equação VI) e pelo produto (Equação VII). Nestes casos $K_{I,S}$ representa a constante de inibição por substrato e $K_{I,P}$ a constante de inibição por produto (JERUSALIMSKY & NERONOVA, 1965; apud SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{I,S}}{K_{I,S} + S} \quad \text{Equa\c{c}\~{o} VI}$$

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{I,P}}{K_{I,P} + P} \quad \text{Equa\c{c}\~{o} VII}$$

Na Tabela 5 s\~{a}o apresentados alguns valores usuais das constantes cin\~{e}ticas em reatores anaer\~{o}bios em condi\c{c}\~{o}es mesof\~{i}licas. \c{E} poss\~{i}vel observar pelos valores de K_s que existe uma tend\~{e}ncia de redu\c{c}\~{a}o dos valores a cada etapa seguinte da digest\~{a}o anaer\~{o}bia, o que corrobora com a import\~{a}ncia de cada etapa no controle da velocidade global.

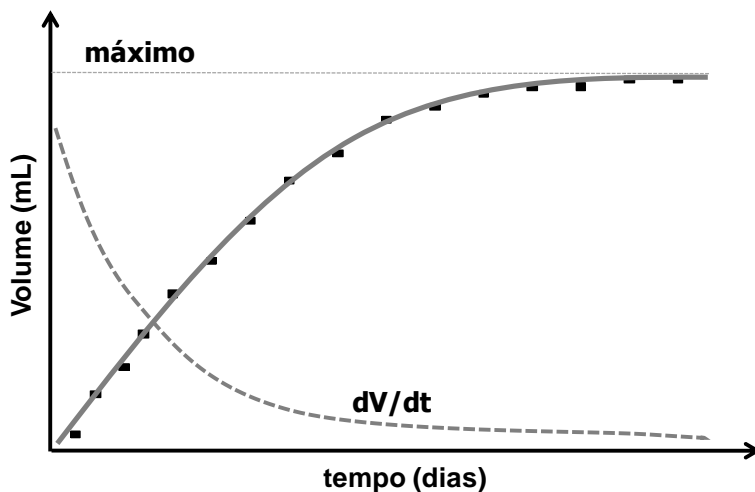
Tabela 5. Resumo de valores de constantes cin\~{e}ticas para v\~{a}rios substratos utilizados em reatores anaer\~{o}bios mesof\~{i}licos

Substrato	Etapa	K_s (mgDQO/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gSSV/gDQO)
Carboidratos	Acidog\~{e}nese	22,5 – 630	7,2 – 30	0,14 – 0,17
\c{A}cidos de cadeia longa de cadeia curta	Oxida\c{c}\~{a}o anaer\~{o}bia	105 – 3180	0,085 – 0,55	0,04 -0,11
		12 – 500	0,13 – 1,20	0,025 – 0,047
Acetato	Metanog\~{e}nese	11 – 421	0,08 – 0,7	0,01 – 0,054
H ₂ e CO ₂		4,8x10 ⁻⁵ – 0,6	0,05 – 4,07	0,017 – 0,045

Fonte: Adaptado de (CHERNICHARO, 2007)

Ao efetuarmos a digest\~{a}o de um substrato puro (ex.: sacarose) adicionado em batelada em reator de volume constante, contendo condi\c{c}\~{o}es adequadas para a digest\~{a}o anaer\~{o}bia (temperatura, nutrientes, pH, microrganismos com atividade adequada, sem limita\c{c}\~{o}es de hidr\~{o}lise, etc.) obteremos um gr\~{a}fico do volume cumulativo de gases em fun\c{c}\~{a}o do tempo conforme a Figura 4.

Figura 4. Exemplo do perfil produção de biogás de um substrato em processo batelada.



Este gráfico representa a cinética de formação de produto [$P = P(t)$], demonstrada pelo volume acumulado de biogás (ou metano) em função do tempo e nele é possível observar algumas informações importantes. Se relacionarmos o volume máximo acumulado de gás com a quantidade de substrato adicionado ao reator (como $DQO_{\text{adicionada}}$ ou $SV_{\text{adicionado}}$) obteremos o Potencial Bioquímico de Biogás (PBB) e/ou o Potencial Bioquímico de Metano (PBM), também conhecido pela sigla em inglês BMP (Biochemical Methane Potential). Tal parâmetro é muito importante para avaliar o potencial energético pela conversão de metano intrínseca do substrato (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010; VDI, 2006). Caso avaliarmos a redução da concentração de substrato, também será possível determinar o fator de conversão ($Y_{P/S}$) de substrato em produto (P), definido pela Equação VIII. Neste caso P_0 e S_0 representam as concentrações iniciais de produto e substrato, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad \text{ou} \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Equação VIII}$$

Se considerarmos que a quantidade inicial de produto é desprezível ($P_0 = 0$), que durante a reação não houve limitações cinéticas, que no tempo final teremos a máxima formação de produto ($P = P_{\text{máx}}$) e que a concentração final de substrato será desprezível se comparada com

a concentração inicial ($S = 0$), então podemos reescrever como na Equação IX (SCHMIDELL et al., 2001).

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_0} \quad \text{Equação IX}$$

Esta equação também é usualmente denominada como coeficiente de eficiência de formação de biogás ou metano (do inglês, biogás yield), expresso como o volume de gás na CNTP (mL_N) produzido com relação a massa de substrato removido ($\text{DQO}_{\text{removida}}$ ou $\text{SV}_{\text{removido}}$).

Outro fator que pode ser identificado é a velocidade de formação de produto, que é a derivada de P em cada ponto dP/dt . Portanto, por meio da derivação dos incrementos de volume de gás e tempo (dV/dt) também é possível identificar a velocidade de produção de gases na digestão anaeróbia. Quando dP/dt é ponderado pela quantidade de microrganismos no reator obteremos então a velocidade específica de formação de biogás ou metano (μ_P), definida pela Equação X. (FLORENTINO; BISCARO; PASSOS, 2010; KRÜMPPEL et al., 2016). Usualmente também é descrita como a produção específica de biogás ou metano, expressa como $\text{mL}_N/(\text{gSV}_{\text{inóculo.d}})$.

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad \text{Equação X}$$

Como já vimos anteriormente, existe uma relação estequiométrica entre os constituintes do substrato e a quantidade de gases que serão produzidos durante a digestão anaeróbia. Ou seja, quando conhecidos os componentes químicos de um substrato (C, H, O, N e S) é possível estimar a quantidade de metano a ser recuperado (BUSWELL; NEAVE, 1930) pela aplicação das Equação II, Equação III e Equação IV. Porém, é de conhecimento que a quantidade de biogás e metano produzidos são dependendo das concentrações de carboidratos, gorduras e proteínas da amostra (VDI, 2006). Na Tabela 6 são demonstrados volumes médios de biogás que são produzidos para cada tipo de substância.

É possível verificar que as gorduras tem maior capacidade de produzir biogás e também maiores concentrações de metano. Porém, a digestão anaeróbia de apenas um destes substratos isoladamente pode estar fadada a baixas eficiências de conversão em metano. Sabe-se que a velocidade de degradação segue a seguinte ordem: carboidratos > proteínas > lipídeos e, conforme demonstrado no item 3.2, a estabilidade do processo na digestão anaeróbia depende do balanço na ecologia de grupos de bactérias e arqueas (espécies formadoras de ácidos, aceto-

gênicas e metanogênicas). Um dos fatores que regula esse balanço é a qualidade nutricional e também está vinculado com a velocidade de degradação dos constituintes do substrato. Portanto, mesmo que utilizemos substratos constituídos por gorduras puras, dificilmente teremos a garantia de que ocorrerá a conversão em metano de forma eficiente (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010; KHANAL, 2008).

Tabela 6. Estimativa de potencial e composição do biogás de substratos puros.

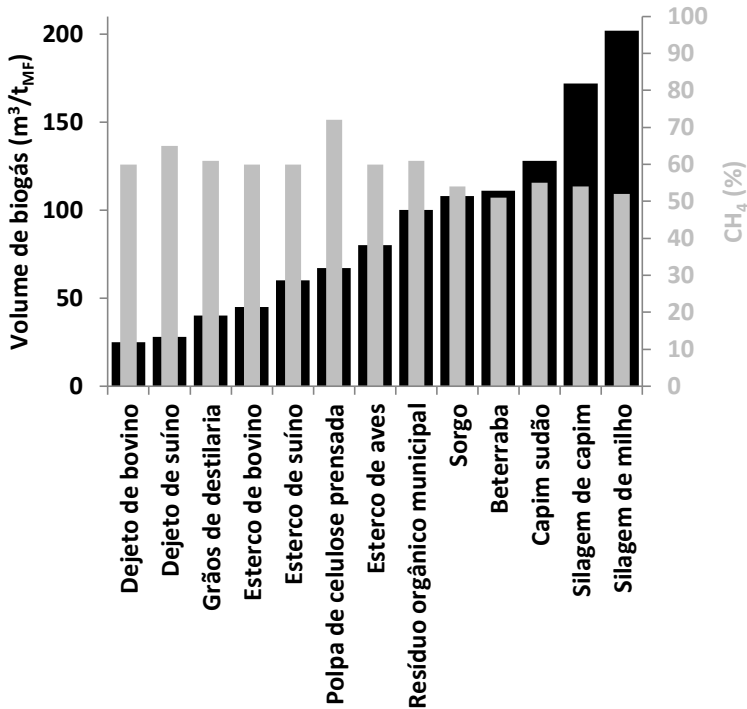
Substrato	PBB (L _N /kgSV _{adicionado})	Composição aproximada	
		CH ₄ (%)	CO ₂ (%)
Carboidratos	750	50	50
Gorduras	1390	72	28
Proteínas	800	60	40

Fonte: Adaptado de VDI 4630 (2006).

Na Figura 5 são apresentados os potenciais bioquímicos de biogás de resíduos diversos e algumas culturas agrícolas, constantes na base de dados do Curatório Alemão de Agricultura (KTBL, 2014). As barras claras demonstram a quantidade máxima de biogás que cada substrato produz separadamente e as barras escuras demonstram a concentração de metano no biogás. Estes valores são resultados de PBB, obtidos por ensaios cinéticos em batelada realizados em laboratório, de acordo com recomendações da norma VDI 4630 (2006) que será abordada a seguir. O potencial cresce nos substratos à direita do gráfico e isso tem relação com o crescimento dos teores de SV e variações na composição química, pois os teores de celulose também tendem a ser maiores nestes substratos.

3.3 MÉTODOS PARA ESTUDOS DA CINÉTICA ANAERÓBIA

Para avaliar a cinética da digestão anaeróbia (atividade de microrganismos, características de degradabilidade de substratos, etc.) existem ensaios laboratoriais, executados em pequena escala e sob condições controladas ou monitoradas. A caracterização da composição química e física dos resíduos é uma etapa imprescindível, porém, são de extrema importância os ensaios biocinéticos para visualizar a real interação entre microrganismos e substratos. Estes ensaios cinéticos consistem em testes respirométricos anaeróbios e geralmente envolve a avaliação a produção de biogás ou de metano a partir da massa conhecida de biomassa (ou matéria orgânica definida como SV, DQO ou COT) do inóculo ou do substrato.

Figura 5. Potencial de biogás para diferentes substratos.

Fonte: KTBL (2014)

Diversos métodos, padronizados ou não, são disponíveis na literatura para avaliação da cinética anaeróbia (ANGELIDAKI et al., 2009; AQUINO et al., 2007; LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011). Alguns têm foco na eficiência dos microrganismos, outros focam na degradabilidade do substrato em condições anaeróbias, outros têm por objetivo avaliar o potencial de metanização (ou potencial energético) do substrato e também aqueles que avaliam a toxicidade de substâncias inibidoras no processo anaeróbio. Porém, todos os métodos baseiam-se na incubação de substrato(s) mesclado com inóculo anaeróbio, em batelada e em condições controladas. A Tabela 7 descreve um resumo dos métodos usuais e padrão para estudo da cinética anaeróbia.

3.3.1 Atividade Metanogênica Específica (AME)

Este ensaio é principalmente utilizado para avaliar o desempenho dos microrganismos metanogênicos no lodo anaeróbico ou inóculo. Segundo Aquino et al. (2007) a AME pode ser utilizada como um parâmetro de monitoramento da eficiência da população metanogênica presente em um reator biológico. O ensaio é baseado na medida da velocidade de produção de metano em função da massa de inóculo e geralmente expresso com base nas unidades $\text{gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$. Ou seja, é a velocidade máxima específica de formação de gás metano ($\mu_{\text{Pmáx}}$), obtida pela obtenção do valor máximo da função dV/dt demonstrada na Figura 4 (FLORENTINO; BISCARO; PASSOS, 2010).

As primeiras considerações sobre o teste AME foram feitas com base em ensaios em batelada por De Zeeuw (1984), que mediu a taxa de produção de metano de lodos, a partir de uma carga orgânica e concentração de SV conhecidas. No estudo de De Zeeuw, o substrato aplicado variou de uma mistura de ácidos voláteis (acetato, propionato e butirato) até o uso de um só substrato, principalmente o acetato, além de adicionar soluções de metais à solução de nutrientes garantindo que não houvesse limitações nutricionais para a produção de metano.

Porém, hoje na literatura internacional há uma vasta diversidade de protocolos para a realização dos ensaios de AME. Apesar da AME ser um parâmetro bastante importante, os métodos disponíveis não possuem padronização, variando método e instrumentação de autor para autor. As diferenças metodológicas vão desde o procedimento de incubação do inóculo (concentração de biomassa, tipo e concentração de substrato, relação alimento/microrganismo, tipo e concentração de nutrientes, tempo de incubação, etc), até diferenças na forma de quantificação do volume de gases produzidos ou do metano presente no biogás (AQUINO et al., 2007). A temperatura de incubação é uma das variáveis que diferem nos procedimentos, sendo aplicadas faixas entre 27 e 35 °C. Como o procedimento baseia-se em avaliar a atividade dos microrganismos metanogênicos, geralmente é empregada uma mistura de ácidos orgânicos de cadeia curta (C_2 , C_3 e C_4) como substratos para o ensaio. Porém, é consenso que a quantidade de substrato e nutrientes seja adicionada em excesso afim de que a cinética de degradação se aproxime de uma pseudo ordem zero e dependa exclusivamente da concentração dos microrganismos presentes no inóculo. Outro fator que é variável é o tipo de gás utilizado na purga do frasco reacional para expulsar o oxigênio residual e garantir ambiente estritamente anaeróbico. Alguns autores utilizam gás nitrogênio enquanto outros usam uma mistura de metano

(50 a 80% v/v) e gás carbônico (20 a 50% v/v) a fim de simular o biogás presente na atmosférica do frasco.

Tabela 7. Resumo de métodos cinéticos anaeróbios.

SIGLA	Propósito e/ou aplicação
AME	Mensura a atividade específica de produção de metano em lodos anaeróbios. Utilizado para efetuar comparações entre inóculos ou avaliar eficiência em reatores anaeróbios.
ISO 13641	Ensaio de toxicidade anaeróbia. Baseia-se na medida da inibição da produção de biogás após 3 dias de incubação. Utilizado para avaliar a influência de compostos químicos diversos na digestão anaeróbia.
ISO 11734	Estima a degradação de substâncias orgânicas diversas pela medida da produção de biogás.
ASTM E2170-01	Estima a degradação de substâncias químicas pela medida da produção de biogás e por análises químicas da concentração residual. Método reconhecido nos EUA.
DIN 38414-8	Mensura a degradação de lodos e efluentes por meio da medida da produção de biogás.
VDI 4630	Método para mensurar o PBB e PBM. Aplicado a diversos tipos de substratos, inclusive resíduos agropecuários e culturas agrícolas. Método reconhecido na Alemanha e países europeus.

Segundo Angelidaki et al. (2009), lodos anaeróbios não granulares ativos devem apresentar AME ao acetato de $0,1 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$, enquanto que lodos granulares devem apresentar valores de $0,3 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$ para serem considerados ativos. Para fins práticos, os testes de atividade são utilizados para avaliar a efetividade dos microrganismos. Além da AME para avaliar as rotas acetoclástica e hidrogenotrófica, também é possível avaliar as diferentes etapas da digestão anaeróbia e assim verificar a efetividade do lodo ou inóculo. Na Tabela 8 é demonstrada sugestão de substratos para avaliar a atividade dos diferentes grupos tróficos de microrganismos de um reator anaeróbio.

Tabela 8. Sugestão de substratos para avaliar a atividade dos diferentes grupos tróficos de microrganismos.

Microrganismos	Tipo e concentração inicial de substrato
Hidrolíticos	1 g de celulose/L
Acidogênicos	1 g de glicose/L
Proteolíticos	1 g de caseína/L
Acetogênicos	0,5 g de ácido propionico/L e 0,5 g ácido n-butirico/L
Acetoclásticos	1 g de ácido acético/L
Hidrogenotróficos	Sobreprensão de 1 atm de mistura H ₂ :CO ₂ (80:20)

Fonte: Adaptado de Angelidaki et al. (2009).

3.3.2 Normas ISO 13641 - Water quality - Determination of inhibition of gas production

Esse procedimento estabelece protocolos para determinação da toxicidade de possíveis substâncias em sistemas anaeróbios. São divididas em duas normas: parte 1 que se refere ao procedimento geral do ensaio e parte 2 que se refere a adaptações de metodologia para baixas concentrações de biomassa microbiana. Basicamente os protocolos definem orientações metodológicas para estimar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) da produção de biogás. Baseia-se na incubação de um inóculo anaeróbio, juntamente com substrato padrão e mesclado a diferentes concentrações do agente inibidor ao qual se quer avaliar. Após incubação durante 3 dias a 35 °C, é efetuada a medição do volume do gás produzido e comparado com a produção de gás de testes sem adição do inibidor. Para cada nível de concentração do inibidor é efetuado o cálculo do percentual de inibição conforme a Equação XI. A equação original baseia-se na variação de pressão medida por sistemas manométricos e abaixo está apresentada por equivalência na variação de volume:

$$I [\%] = \left(1 - \frac{V_t}{V_c}\right) \cdot 100 \quad \text{Equação XI}$$

Onde, I é o percentual de inibição, V_t é o volume observado para o material teste (com inibidor) e V_c é o volume observado para o substrato controle (sem inibidor). Após, para estimar a IC₅₀ é efetuada uma avaliação visual ou via por análise de regressão entre os valores de inibição e o logaritmo das respectivas concentrações utilizadas nos testes. Também é possível expressar os resultados com base na quantidade de inóculo utilizado, ou seja miligrama do inibidor por grama de sólidos

totais do inóculo (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003).

Este procedimento dedica-se a avaliação da toxicidade aguda ao processo anaeróbio. Não existem procedimentos normatizado para ensaios de toxicidade crônica (ensaios de longa duração).

3.3.3 Norma ISO 11734:1995 - Evaluation of “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measuring of biogas production

Essa norma da Organização Internacional para Padronização (1995) apresenta a descrição de teste cinético padronizado para avaliação de compostos orgânicos frente a microrganismos anaeróbios. O teste consiste na exposição do inóculo anaeróbio ao composto químico de interesse por um período superior a 60 dias. Para adequação do inóculo anaeróbio são efetuadas lavagens para retiradas de contaminantes e então o inóculo é acondicionado em meio de cultura isento de substrato, à temperatura controlada de 35 °C. A avaliação da produção de biogás é efetuada através de medidas manométricas.

3.3.4 Norma ASTM E2170-01(2008) - Determining anaerobic biodegradation potential of organic chemicals under methanogenic conditions

Similar a norma ISO 11734:1995, essa norma elaborada pelo órgão de metrologia dos EUA também apresenta a descrição de teste cinético de degradação compostos químicos orgânicos frente a condições anaeróbias (ASTM INTERNATIONAL, 2001). O procedimento da norma é original de 2001 e foi revisado em 2008. O teste consiste na exposição do inóculo anaeróbio ao composto químico de interesse por um período entre 25 a 30 dias, praticamente nas mesmas condições estipuladas pela norma ISO 11734:1995. A avaliação da produção de biogás é efetuada através de medidas manométricas. Ambas as normas ISO e ASTM são aplicadas principalmente na avaliação de novas substâncias usadas em medicamentos, pesticidas, derivados da indústria petroquímica, dentre outros.

3.3.5 Norma DIN 38414-8 - Determination of amenability to anaerobic digestion

Esta norma é um dos primeiros procedimentos padronizados descritos formalmente. Apesar de hoje ter sido substituída pela norma VDI 4630, ainda é referenciada para construção do sistema de tubos eudiômetros, aparato utilizado para medir volumetricamente a produção de biogás durante a digestão anaeróbia. Numa tradução direta: “Determinação da degradabilidade em digestão anaeróbia”, foi originalmente desenvolvida pelo Instituto Alemão para Normatização (DIN) para aplicação na avaliação da degradabilidade de efluentes e esgotos. Ela estabelece condições básicas para execução de ensaios cinéticos em batelada para avaliação da degradação anaeróbia de substratos orgânicos através de testes volumétricos de produção de biogás (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 1985).

3.3.6 Norma VDI 4630 - Fermentation of organic materials: Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data and fermentation tests

Norma desenvolvida pela Associação Alemã de Engenheiros é reconhecida na União Europeia e outras partes do mundo, pois estabelece condições bastante detalhadas para execução de ensaios cinéticos em batelada, semi-contínuo e contínuo para avaliação da recuperação de biogás e/ou metano de substratos orgânicos diversos. Trata-se de um aperfeiçoamento da norma DIN 38414-8 e desenvolvida para atender as necessidades de normatização em função do rápido crescimento da cadeia do biogás e expansão de energias de fonte renovável na Alemanha. Por sua vez, o procedimento da norma foi construído com foco aos substratos de origem renovável (substratos agropecuários: resíduos e culturas energéticas; além de outros resíduos provenientes de processo industriais ou urbanos). Também é usada como referência para simulação de processos em escala de bancada para auxiliar operação de plantas de produção de biogás em grande escala (VDI, 2006).

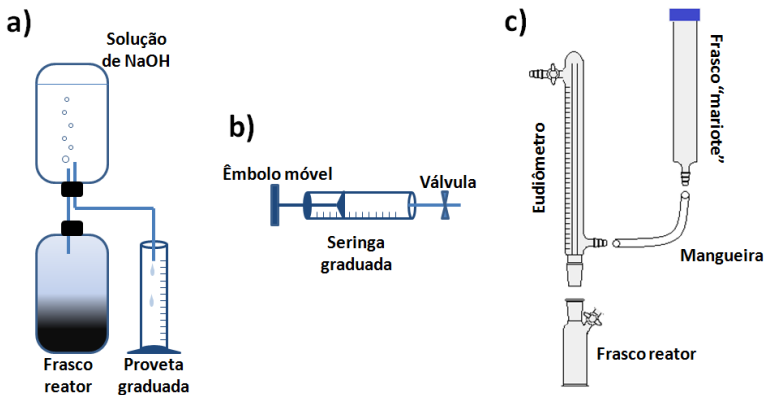
3.3.7 Aparatos experimentais

Os sistemas de medição do volume de gás se dividem em dois grupos: sistemas volumétricos (que medem variações de volume) e manométricos (que medem variações de pressão e posteriormente são convertidos em volume).

O sistema mais usual para determinação da produção dos gases é via deslocamento de líquido como demonstrado na

Figura 6a, em função da praticidade e baixo custo. O reator contendo o substrato, meio de cultura e inóculo é condicionado em reator anaeróbio (frasco de vidro ou erlenmeyer) hermeticamente fechado e acoplado a um frasco com solução de hidróxido de sódio. Os gases resultantes da digestão anaeróbia deslocam a coluna de líquido e, por consequência, o gás carbônico é solubilizado e neutralizado. O volume de gás resultante é mensurado pelo deslocamento do líquido em uma proveta. Em função do dióxido de carbono e o metano serem os gases majoritários no biogás, o volume deslocado então é considerado como o metano presente no biogás (AQUINO et al., 2007). Por fim, é possível obter um gráfico da cinética anaeróbia similar ao que foi demonstrado na Figura 4.

Figura 6. Exemplo de aparatos experimentais para mensurar a produção de metano.



Fonte: a) aparato experimental descrito por Aquino et al. (2007); b) seringa graduada (MITTWEIG et al., 2012; VDI, 2006); c) sistema reator acoplado a tubo eudiômetro e frasco mariote (DIN, 1985; VDI, 2006).

Outro aparato amplamente difundido e recomendado em algumas normas técnicas é o conjunto de reator acoplado a tubo eudiômetro

Figura 6c. Este aparato experimental também se baseia no deslocamento de um líquido selante, neste caso uma solução de sulfato ou cloreto de sódio em nível de saturação e acidificada a pH menor que 2 (DIN, 1985). Neste caso o propósito é reter o biogás no interior do eudiômetro e evitar a solubilização de CO_2 no líquido. A leitura do volume

de gases produzidos é efetuada manualmente pela equalização da pressão interna e externa, mantendo o frasco mariote em mesmo nível que a solução interna do eudiômetro. O volume é mensurado pela graduação presente no tubo eudiômetro (VDI, 2006).

Um sistema mais compacto é o Hohenheim Biogas-yield Test (HBT), que consiste em seringas de vidro graduadas, com a extremidade fechada por uma válvula. Assim o interior da seringa atua como o frasco reator e o volume de gás produzido é medido pelo deslocamento do êmbolo da seringa (MITTWEG et al., 2012; VDI, 2006). A seringa é depositada em um rotor no interior de uma estufa com temperatura controlada.

Além dos sistemas volumétricos manuais, existem sistemas comerciais com instrumentos automatizados. Estes são providos de sensores que são acoplados a um registrador de dados ou um computador.

As medidas manométricas são efetuadas por sensores de pressão hermeticamente acoplados aos frascos reacionais. A produção do biogás força a elevação da pressão, que é mensurada e transformada em variação de volume (nas CNTP). Porém, esse procedimento necessita de grande volume livre de atmosfera no interior do frasco e por isso possui algumas limitações quando ocorre o aumento de pressão. A pressão é diretamente proporcional na solubilidade de alguns gases como dióxido de carbono, amônia (NH_3) e sulfeto de hidrogênio (H_2S). Ou seja, variações bruscas de pressão podem acarretar em mudanças na alcalinidade, além de favorecimento de processos inibitórios resultantes da solubilização da amônia ou alteração na atividade das sulfetogênicas.

3.3.8 Inoculo para ensaios de PBB e PBM

A precisão dos dados de PBB e PBM em um ensaio cinético é altamente dependente das capacidades metabólicas do inoculo utilizado. A redução da atividade metanogênica do consórcio microbiano pode levar a resultados não reprodutíveis e subestimar a produção de biogás (ANGELIDAKI et al., 2009; BAUER et al., 2008). Neste contexto, Angelidaki et al. (2009) sugerem a utilização de um inoculo fresco proveniente de reator anaeróbico ativo, isto é, plantas de biogás que degradam dejetos ou lodo de reatores anaeróbicos de plantas de tratamento de esgoto doméstico. Ou seja, inóculos que contêm composição microbiana ampla (bactérias hidrolíticas, bactérias acidogênicas e arqueas metanogênicas). A recomendação é de que estes inóculos sejam pré-incubados durante período de 2 a 5 dias antes dos ensaios, a fim de minimizar a influência de material orgânico biodegradável residual.

Além disso, fontes de inóculo e processos de aclimação são dois fatores ligados que governam o potencial biodegradabilidade do substrato. Por exemplo, Gu et al. (2014) observaram associação entre a fonte do inóculo e o uso ou não de processo de aclimação sobre a velocidade de produção de biogás de substratos celulósicos. De Vrieze et al. (2015) identificaram diferenças na eficiência de degradação do substrato, dependendo da estrutura das comunidades metanogênicas do inóculo. Os principais métodos padrão para determinação da PBB ou PBM são baseados no uso de inóculo obtido a partir de biodigestores em condições mesofílicas (DIN 38414-8, 1985; ISO 11734, 1995; VDI 4630, 2006). O método VDI 4630 (2006) orienta o uso de inóculo de digestores operando sob codigestão de substratos de origem agrícola. Portanto, as variações entre origem e métodos de enriquecimento e de aclimação do inóculo precisam ser padronizadas para que os ensaios sejam reprodutíveis e rastreáveis (DIN, 1985; LI et al., 2013; VDI, 2006). Conforme já citado na Tabela 8 é recomendado utilizar substâncias de referência para avaliar a atividade do inóculo e um dos substratos mais utilizados é a celulose microcristalina de elevada pureza.

Em países onde o mercado de biogás é forte (ex.: Alemanha, Itália e outros países da Europa) obter amostra de inóculo em condições mesofílicas é relativamente fácil. No entanto, no Brasil esse fato é um grande limitador em função da menor disponibilidade de plantas de digestão anaeróbia em larga escala, da maior distância entre as plantas de biogás e os laboratórios ou centros de pesquisa, da menor estabilidade dos reatores (consequência do menor investimento em controle de processo usados no Brasil), além da quase inexistência de instalações que praticam codigestão em condições mesofílicas.

3.4 DROGAS VETERINARIAS

3.4.1 Drogas veterinárias na produção animal

É conhecido que são utilizados antibióticos em larga escala na produção de animais no Brasil (MAPA, 2008). Estima-se que o consumo para uso em animais é a responsável por 70% dos antibióticos produzidos no mundo, o que causa grande preocupação na comunidade internacional em função dos riscos ambientais que estão envolvidos no uso exacerbado e indiscriminado dos medicamentos (CDDEP, 2015). Estima-se que o consumo global de antibióticos na produção de bovinos, frangos e suínos aumentará em 67% entre 2010 a 2030. A estimativa do consumo de drogas veterinárias para o grupo de países que inte-

gram o BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), pode chegar a 99% neste mesmo período, e isso representa até sete vezes o crescimento populacional projetado para estes países, sendo este o principal indício do crescimento vinculado a produção animal (VAN BOECKEL et al., 2015). A estimativa do consumo de antibióticos entre 2010 e 2030 no Brasil pode crescer em 99%, bem acima do crescimento populacional no mesmo período (VAN BOECKEL et al., 2015).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) reconhece que o uso excessivo de antibióticos no setor agropecuário tem relação com o aumento da resistência antimicrobiana, sendo uma ameaça global emergente de saúde pública e capaz de afetar a segurança alimentar para as gerações futuras (FAO, 2015). Apesar de existirem movimentos para a redução do uso de drogas veterinárias, a intensificação da produção animal acaba por gerar maior demanda por medicamentos para manter os padrões sanitários e evitar perdas de produtividade (MORÉS, 2014).

Na produção animal os antibióticos são administrados de quatro abordagens básicas, que se diferenciam pelo objetivo de uso, dose e duração de tratamento (DIAS et al., 2011; SCHLÜSENER; BESTER; SPITELLER, 2003). A primeira abordagem é o uso como promotor de crescimento, pela aplicação de compostos com baixa absorção intestinal, administrados na forma oral, com a finalidade de resultar em ganhos de desempenho dos animais. O uso de promotores foi banido na União Europeia em 2006 e esta em vias de ser limitado nos EUA. No Brasil, o MAPA (2008) autoriza e regulamenta o uso de antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas para uso como aditivos na ração de animais para fins de melhoria na eficiência alimentar.

A segunda abordagem é o uso profilático, administrado de forma individual ou em um grupo de animais antes que uma doença possa ocorrer. A terceira é denominada como uso metafilático, para tratamento de animais em risco, ou seja, para prevenir em um grupo de animais a disseminação de um agente infeccioso assim que alguns animais adoecem. Todas estas abordagens anteriores são consideradas subterapêuticas (baixas dosagens, serem por tempo prolongado), já o uso terapêutico envolve o tratamento individual ou a um grupo de animais já doentes, tipicamente doses mais elevadas (DIAS et al., 2011; VENGLOVSKY; SASAKOVA; PLACHA, 2009).

Os antibióticos são entregues aos animais por meio dos alimentos, da água, ou por outras vias, como formas injetáveis. Após a administração, o antibiótico pode ser adsorvido e parcialmente metabolizado

antes de ser excretado pela urina ou fezes (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; ZHOU et al., 2013).

No relatório denominado “A situação dos antibióticos no mundo” (ou do inglês, “The State of World’s Antibiotics” - CDDEP, 2015) é demonstrado que, desde os anos 1940, infecções que antes eram de fácil tratamento estão tornando-se de difícil cura agora, aumentando os custos de saúde pública, aumentando a mortalidade de pacientes, com consequências individuais e para a sociedade como um todo. O relatório ainda aborda algumas causas relacionadas ao desenvolvimento resistência aos antibióticos em microrganismos e a geração das chamadas super bactérias (ou, do inglês, “super bugs”). O contato direto com os subprodutos animais (carne, ovos, leite e os dejetos dos animais) é uma maneira de dissipar os compostos antibióticos e também as bactérias resistentes aos mesmos para os seres humanos. Sabe-se que existe uma relação entre a utilização de dejetos no solo e na ocorrência de patógenos em plantas e, conseqüentemente, à oferta de alimentos (FRANZ; SEMENOV; VAN BRUGGEN, 2008). Alguns autores supõem que a resistência aos antibióticos encontrada em microrganismos nos dejetos, solos e plantas é uma evidência de que o uso excessivo de antibióticos na produção animal é parte significativa do problema com a resistência de microrganismos que atingem os seres humanos (BROWNING, 2012; WOOLHOUSE; WARD, 2013). Recentemente, a discussão sobre o assunto cresceu junto com o número de estudos sobre a avaliação de risco à saúde humana, mas a dissipação da resistência genética no ambiente ainda é considerada incerta (DU; LIU, 2012; MALCHI; MAOR; CHEFETZ, 2015; PROSSER; SIBLEY, 2015).

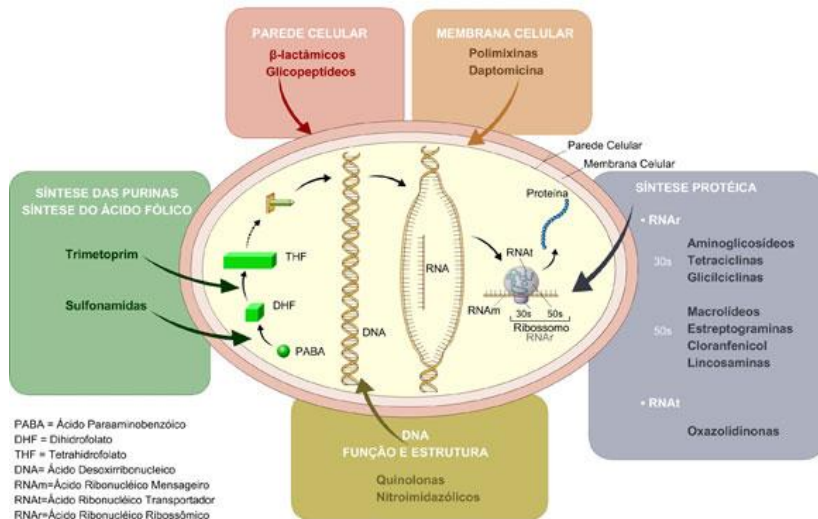
3.4.2 Classes e formas de ação dos antibióticos

Existe uma infinidade de compostos conhecidos, e formulação disponível comercialmente para uso veterinário. Estes compostos são geralmente classificados conforme a estrutura molecular do princípio ativo, mas também podem ser subdivididos conforme outras características: origem, biossíntese, atividade (farmacocinética e farmacodinâmica), espectro de ação, mecanismos de ação, etc. A origem e a biossíntese estão relacionadas a forma como o composto é obtido, por exemplo: por bactérias, por fungos ou de forma sintética (ANVISA).

Os mecanismos de ação principais são exemplificados na Figura 7. Basicamente são caracterizados pela ação na parede celular e/ou na membrana celular, que promovem a lise da célula, ou interferem na formação de proteínas podendo atuar em funções celulares básicas co-

mo: a síntese de purinas e/ou formação de ácido fólico, alterações no ácido ribonucleico (RNA) e no ácido desoxirribonucleico (DNA). Em outras palavras, são capazes de interferir na viabilidade e multiplicação celular.

Figura 7. Principais mecanismos de ação dos antibióticos.



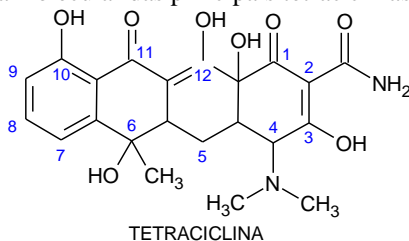
Fonte: ANVISA

No controle das infecções (uso terapêutico) a seleção do antibiótico estará relacionada com a atividade, primeiramente deverá atingir concentração ideal no local da infecção, ser capaz de atravessar a parede celular, apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e permanecer tempo suficiente para exercer o efeito inibitório desejado (ANVISA). No emprego como promotores de crescimento ou como profiláticos as doses são geralmente menores que ao uso terapêutico, porém em períodos de tempo maiores (DIAS et al., 2011; MORÉS, 2014). A seguir serão detalhadas as classes dos compostos objeto de estudo desta tese de doutorado.

3.4.2.1 Tetraciclínas

As tetraciclínas se caracterizam pelo esqueleto do octaidronafteno, sistema formado de quatro anéis condensados. Antimicrobianos primariamente bacteriostáticos, quando em concentrações terapêuticas. Apresentam amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários (ANVISA). As tetraciclínas entram na célula por difusão, em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica. A tetraciclina, molécula básica e representante desta família de antibióticos, obtida por hidrólise da 7-clortetraciclina. Posteriormente surgiram novas tetraciclínas como a oxitetraciclina, a metaciclina (intermediário da síntese de outras tetraciclínas). A diferença estrutural das principais moléculas de tetraciclínas é demonstrada na Figura 8.

Figura 8. Estrutura molecular das principais tetraciclínas



Congênera	Substituintos	Posição(ões)
Clortetraciclina	-Cl	7
Oxitetraciclina	-OH, -H	5
Metaciclina	-OH, -H; =CH ₂	5; 8
Doxiciclina	-OH, -H; -CH ₃ , -H	5; 8

Na produção animal (suínos e aves) as tetraciclínas são utilizadas principalmente com função terapêutica, com doses elevadas, por aplicação parenteral. Os maiores usos são direcionados para infecções nos trato respiratório, urinário, gastroentérico e no tratamento de doenças oftálmicas bacterianas. É amplamente utilizado no tratamento de mastite na bovinocultura leiteira (DIAS et al., 2011).

3.4.2.2 Diterpenos

A tiamulina é um dos principais representantes da classe dos diterpenos, antibiótico semissintético derivado da pleuromutilina e recomendada para o tratamento de infecções respiratórias e desenteria. No Brasil tem uso bastante difundido, mas com aplicação restrita na produção de suínos, utilizado em todas as fases de produção como aditivo na ração animal em teor de até 11 mg/kg. Fumarato de tiamulina (Figura 9) é um dos principais compostos empregados (MAPA, 2008).

3.4.2.3 Macrolídeos

Quimicamente, os macrolídeos são moléculas lipofílicas constituídas por uma lactona macrocíclica com 14, 15 ou 16 carbonos ligada a moléculas de açúcares (desosamina, cladinose, micaminose, micarose, micosamina) através de ligações glicosídicas, podendo apresentar caráter básico. Os macrolídeos são classificados em grupos, baseando-se no número de carbonos do grupo lactona. A eritromicina, a roxitromicina e a claritromicina pertencem ao grupo de 14 carbonos; a azitromicina pertence ao grupo de 15 carbonos; enquanto que a espiramicina, josamicina, tilmicosina e tilosina pertencem ao grupo de 16 carbonos (SISMOTTO; PASCHOAL; REYES, 2013).

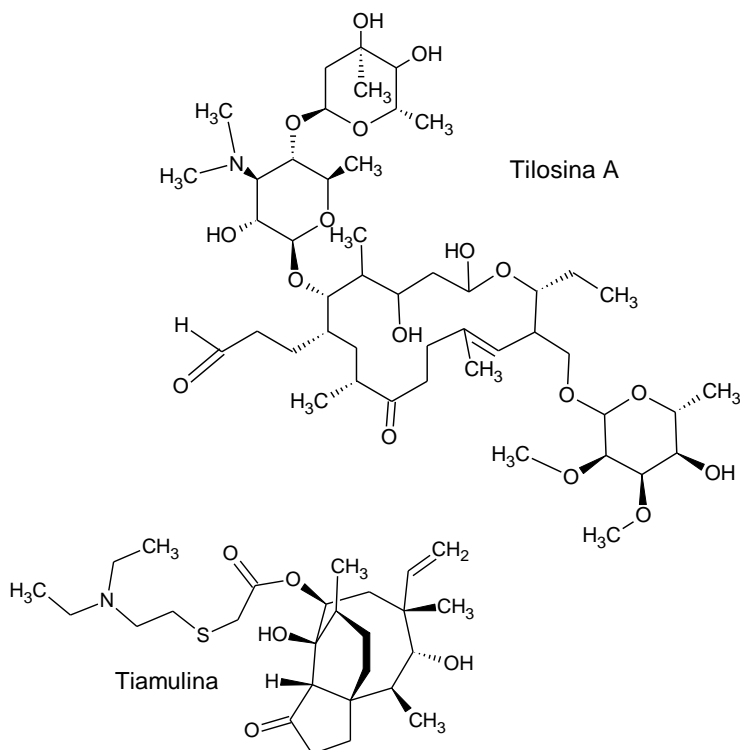
A tilosina é o macrolídeo mais utilizado na produção animal, tanto como aditivo na alimentação de aves (4 a 55 mg/kg de ração) e de suínos (11 a 110 mg/kg de ração), quanto para uso terapêutico em bovinos. A tilosina é produzida pelo *Streptomyces fradiae* e é ativa contra algumas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasmas Gram-positivos, sendo usada exclusivamente na medicina veterinária. O composto de maior predominância é a tilosina A, mas quantidades variáveis de desmicosina (tilosina B), macrocina (tilosina C) e relomicina (tilosina D) também estão presentes em sua composição (Figura 9).

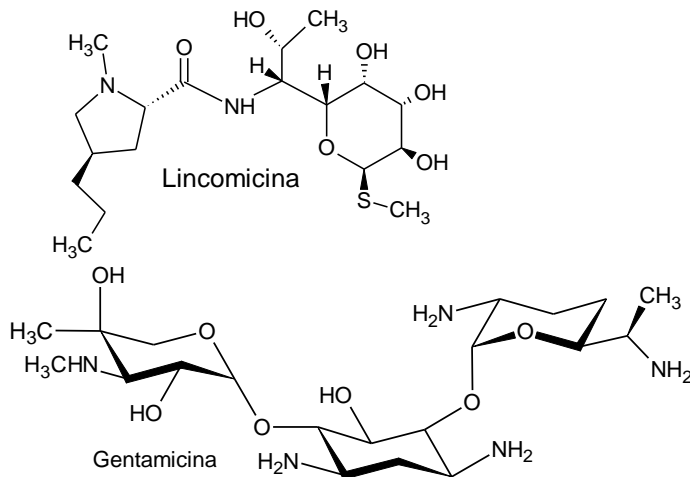
3.4.2.4 Lincosaminas

A principal representante das lincosaminas é a lincomicina, também representada na Figura 9. São antibióticos derivados de aminoácido propil-higrínico unido por ligação amídica a um derivado contendo enxofre de uma octose. Suas estruturas contêm uma função básica, o nitrogênio pirrolidínico. Inibem a síntese proteica nos ribossomos, ligando-se a subunidade 50S, sendo, portanto, bacteriostáticas. Desta forma alteram a superfície bacteriana, facilitando a opsonização, fagocitose e destrui-

ção intracelular dos microrganismos. São agentes bacteriostáticos, mas podem ser bactericidas em concentrações altas (ANVISA). É utilizada como aditivo na ração de suínos nas fases de crescimento e terminação em teor de até 22 mg/kg, e na alimentação de frangos de corte sob doses entre 2,2 e 4,4 mg de lincomicina por kg de ração. Em ambos os casos o uso na ração não é terapêutico, apenas com foco na prevenção de doenças dos animais (MAPA, 2008). Além da administração na ração, a lincomicina também pode ser administrada por solubilização na água ingerida pelos animais.

Figura 9. Estrutura molecular dos antibióticos tilosina A, tiamulina, lincomicina e gentamicina.





3.4.2.5 Aminoglicosídeos

A gentamicina é o antibiótico representante da classe dos aminoglicosídeos. Ligam-se à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas defeituosas. Para atuar, o aminoglicosídeo deve primeiramente ligar-se à superfície da célula bacteriana e posteriormente deve ser transportado através da parede por um processo dependente de energia oxidativa (ANVISA). A estrutura da gentamicina está representada na Figura 9.

3.4.3 Incidência de drogas veterinárias em dejetos de suínos

Para proporcionar maior entendimento quanto ao possível impacto causado por antibióticos utilizados na produção de animais, especialmente na suinocultura, foi efetuada revisão sobre ocorrência de drogas veterinárias encontradas em dejetos de suínos e efluentes da suinocultura. As ocorrências de artigos indexados nas bases Web of Science, Scielo, Google Scholar, PubMed e Scopus nos últimos 16 anos é apresentada no ANEXO A e uma compilação das informações para os antibióticos tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina são demonstrados na Tabela 9.

Para estimar o cenário brasileiro e simular as concentrações possíveis de serem encontradas nas amostras *in natura* de dejetos de suínos é apresentada a Tabela 10. Nela foram utilizadas as concentrações recomendadas de cada composto, além das doses de ingestão diária

e as mesmas ponderadas pela quantidade de dejetos excretados em Cada fase de produção.

Após a compilação dos dados apresentados no ANEXO A e avaliação das metodologias descritas nos manuscritos foi possível realizar algumas considerações:

1º) Existe grande divergência metodológica entre os procedimentos de coleta, métodos de preparo de amostra e técnicas analíticas empregadas. Portanto, há incertezas atribuídas aos valores reportados pelos autores. Por exemplo, durante o preparo de amostras geralmente os autores efetuaram processo de filtração. Porém, alguns utilizavam a fração líquida filtrada, outros se restringiram a avaliação da fração sólida.

Tabela 9. Ocorrência de antibióticos em resíduos da suinocultura.

Antibiótico	Concentração	País	Referência
Tiamulina	43 µg/L	Alemanha	Schläsener et al., 2003
	2,14-5,08 µg/L	China	Ben et al., 2008
	5,5-21,7 µg/L	China	Pan et al., 2011
	2,5-240 µg/L	USA	Campagnolo et al., 2002
	4,2-5,0 mg/L	USA	Zilles et al., 2005
Lincomicina	93,3-215,5 µg/L	Canadá	Peru et al., 2006
	56,76 µg/L	Taiwan/China	Lin et al., 2008
	2,52-9,78 µg/L	Canadá	Kutcha et al., 2009.
	0,4 mg/L	Japão	Tagiri-Endo et al., 2009
	0,046-3,0 mg/L	Coréia	Sim et al., 2011
Tilosina	166 µg/L (17 mg/kg nas fezes)	China	Zhou et al., 2013
	1,00 µg/L	Taiwan/China	Lin et al., 2008
	0,56-42 µg/l	Japão	Tagiri-Endo et al., 2009
Gentamicina	9,97 µg/L	Coréia	Sim et al., 2011
	Não encontradas informações		

Tabela 10. Estimativa da ocorrência de antibióticos, de uso profilático e/ou como promotores de crescimento, em dejetos de suínos no Brasil.

Antibiótico	Fase de criação	Concentração na ração ^a [g.1000 kg ⁻¹]	Ingestão diária de ração ^b [kg.(suíno.d) ⁻¹]	Ingestão de água [L.(suíno.d) ⁻¹]	Ingestão diária de antibiótico [mg.(suíno.d) ⁻¹]	Produção de dejetos [L.(suíno.d) ⁻¹]	Estimativa máxima no dejetos ^c [mg.L ⁻¹]
Tiamulina	Todas	11	<1 - 3,5		<11 - 38,5	8,6 ^c	<1,35 - 4,0
	Creche (leitões)		1,5 - 1,9		33 - 41,8	1,4 ^c	8,97 - 26,9
Lincomicina	Terminação	22	3,1 - 3,5		68,2 - 77	4,46 ^d	4,58 - 15,5
	Inicial (leitões + matriz)	22 - 110	<1		<22 - 110	16 - 27 ^c	<0,24 - 6,2
Tilosina	Creche (leitões)	22 - 44	1,5 - 1,9		33 - 83,6	1,4 ^c	7,07 - 53,7
	Terminação	11 - 22	3,1 - 3,5		34,1 - 77	4,46 ^d	2,29 - 15,5
Gentamicina	Creche (leitões)	1,98 ^e mg/L	-	ND	ND	1,4 ^c	ND
	Terminação	11,8 ^f mg/L	-	8,83 ^d	104	4,46 ^d	6,99 - 21,0

a - Recomendações do MAPA.

b - Fonte: sistemasproducao.cnpia.embra.br/FonteHTML/Suinos/SPSuinos/nutricao.html

c - Fonte: docsagencia.cnpia.embra.br/suino/bipers/bipers11.pdf

d - Fonte: Tavares et al. (2014)

f - FDA/USA Guidelines (não foram encontradas restrições de concentração no Brasil) - Antibiótico é administrado por dissolução na água fornecida aos animais.

i - Estimativas de concentração baseadas nos níveis de excreção de 30 a 90% e considerando não ocorrer diluições do dejetos. ND - Não determinado ou informações não encontradas.

2º) Não há padronização na nomenclatura utilizada para identificar as amostras. É possível encontrar termos como: “manure”, “pig sludge”, “pig wastewater”, “fezes”, “dung samples of pig”, “effluent”, “flush water”, dentre outros. Em poucos casos os autores retratam as características químicas e físicas básicas da amostra e identificam com detalhes de onde a amostra foi coletada, deixando em dúvida se a amostra sofreu algum processo de diluição, pré-tratamento ou estocagem anterior a amostra.

3º) Não foram encontradas ocorrências de estudos no Brasil, nem para países da América Latina. Porém, se levarmos em consideração 4 antibióticos (Tiamulina, Lincomicina, Tilosina e Gentamicina) utilizados como aditivos em ração na produção de suínos no Brasil, podemos efetuar um comparativo entre valores passíveis de serem excretados e encontrados nos dejetos de suínos e as concentrações encontradas na literatura (Tabela 9). É necessário atenção que os valores observados na literatura (Tabela 9) são inferiores aos estimados para a excreção dos animais na produção brasileira (Tabela 10).

3.4.4 Impactos ambientais e interações na digestão anaeróbia

Sabe-se que uma fração significativa (entre 30 a 90% - Sarmah et al. 2006) dos antibióticos administrados são excretados na forma original ou na forma de metabólitos (ALCOCK; SWEETMAN; JONES, 1999; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). A taxa de excreção depende do composto químico, do nível de dosagem, da idade do animal e da espécie (STALLONES et al., 1980). No material excretado, alguns metabólitos permanecem biologicamente ativos e também que outros metabólitos inativos podem ser transformados de volta no composto parental bioativo sob condições específicas (ZHOU et al., 2012).

Os dejetos dos animais são geralmente usados no solo como fonte de nutrientes. Como exemplo que ocorre na suinocultura, os efluentes são armazenados temporariamente em reservatórios e posteriormente espalhados em áreas agrícolas (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009). Os solos, as águas superficiais e subterrâneas, que direta ou indiretamente recebem estes resíduos podem apresentar contaminação aos antibióticos presentes no dejetos (CHEN et al., 2012a). Depois de repetidas aplicações, os compostos mais persistentes se acumulam no ambiente (ZHOU et al., 2013). Uma vez presentes na água ou solo os antibióticos podem afetar organismos aquáticos e terrestres, alterar atividade microbiana, modificar a ecologia de ecossistemas e ainda causar o desenvol-

vimento de resistência antimicrobiana (HEUER; SCHMITT; SMALLA, 2011; KNAPP et al., 2010; ZHOU et al., 2013).

Para reduzir o impacto ambiental dos dejetos no ambiente alguns processos de tratamento podem ser aplicados (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009). Ao efetuar a depuração do efluente é possível favorecer a redução de patógenos existentes nos dejetos dos animais (DA SILVA et al., 2015).

A ação dos antibióticos é objeto de estudo nas últimas décadas para a digestão anaeróbia de efluentes urbanos, hospitalares e industriais. Também são encontrados estudos direcionados ao uso dos dejetos dos animais como substrato. Porém, avaliando o cenário brasileiro com possibilidades de codigestão de substratos agrícolas junto aos dejetos de animais para potencializar a produção de biogás, pouco se sabe sobre a inibição dos antibióticos nestes casos. Portanto, são necessários estudos para avaliar o potencial de inibição, com base nas proporções das drogas veterinárias usadas na suinocultura brasileira, envolvendo a digestão conjunta dos dejetos com outros substratos agropecuários.

Em linhas gerais os antibióticos excretados pelos animais também são degradados durante a estocagem ou tratamento dos dejetos, mas em maior ou menor velocidade dependendo de inúmeros fatores como: temperatura, atividade de microrganismos, presença ou não de oxigênio, fontes externas, etc (DU; LIU, 2012). Como exemplos, podemos citar alguns antibióticos da classe dos macrolídeos que são considerados pouco persistentes, com meia vida inferior a 2 dias, muito divergentes das tetraciclina, que por outro lado podem apresentar meia vida superior a 100 dias (MASSÉ; SAADY; GILBERT, 2014). Porém, apesar dos macrolídeos serem considerados pouco persistentes, Schlüsener et al. (2006) encontraram elevada persistência (> 200 dias) para o macrolídeo tiamulina durante estocagem de dejetos a 20 °C.

Por outro lado, os compostos podem também apresentar toxicidade aos sistemas biológicos de tratamento (DREHER et al., 2012; SHI et al., 2011). Por exemplo, tetraciclina em concentrações superiores a 9 mg/L podem reduzir em mais de 50% a produção de metano na digestão anaeróbia de dejetos de suínos (ÁLVAREZ et al., 2010). Sanz et al. (1996) encontraram níveis de inibição de 20% na produção de metano quando avaliada adição do antibiótico gentamicina em concentrações de 35 mg/L. Na ocasião, os autores avaliaram a toxicidade sob a degradação de ácidos acético, propiônico e butírico após incubação por duas semanas. Após este período foi relatada persistência de ácidos propiônico e butírico em ordem de 10 a 50% do total adicionado, indicando uma possível inibição de microrganismos acetogênicos.

Gartiser et al. (2007) realizaram estudo baseado em esquemas das normas ISO 13641 (ISO, 2003) e encontraram concentração de gentamicina que induziu a inibição de 50% da produção de biogás (IC₅₀) na faixa de 57,2-231,8 mg/L (ou mg de antibiótico por g de ST do inóculo). Para realização destes ensaios os autores basearam-se na inibição do biogás após 7 dias de incubação, a 35 °C, e utilizando como inóculo o lodo anaeróbio de estação de tratamento de efluentes urbanos. Resultados similares foram obtidos por Sanz et al. (1996) que encontraram 20% de inibição na produção de metano para concentrações do antibiótico tilosina de 15 mg/L, causando acúmulo de ácido propiônico e butírico na ordem de 10 a 90% da massa de ácidos adicionada.

Outros autores relataram problemas de formação excessiva de espumas em reator anaeróbio quando alimentado com dejetos de suínos de animais que haviam sido medicados com licomicina. Apesar de não identificarem a concentração do antibiótico no dejetos, Fischer et al. (1981) relataram que o reator anaeróbio operou sob condição de “estresse” quando alimentado com este dejetos. Além da formação de espumas, os autores informaram declínio de até 75% na produção de biogás e acúmulo de ácido propiônico em concentrações superiores a 3000 mg/L. Já Ji et al. (2013) utilizaram um método ultrarrápido (15 min) baseado em luminescência para avaliar a inibição aguda da lincomicina em sistemas anaeróbios. Os autores encontraram CI₅₀ em níveis de 3,5-5,7 mg/L e relataram efeitos sinérgicos quando lincomicina foi ministrada em conjunto com amoxicilina, kanamicina e ciprofloxacina. Segundo este mesmo estudo houve também forte sinergismo de inibição pela lincomicina quando presente os metabólitos etanol, acetato, propionato e butirato. Os autores relacionaram estes resultados a possíveis reduções de desempenhos em reatores anaeróbios quando operados sob condições de sobrecarga ou outras razões que levam ao acúmulo destes metabólitos.

Em outro estudo, Loftin et al. (2005) efetuaram avaliações de inibição de produção de biogás após incubação por 72 e 336 horas usando inóculo de lagoas anaeróbias de sistemas de tratamento de dejetos de suínos. Eles observaram os antibióticos lincomicina e tilosina apresentavam platôs de inibição entre 20 a 45% sob doses de 1 e 25 mg/L. Estes mesmos autores também observaram os inóculos provenientes de lagoas que recebiam menor concentração de antibióticos sofreram maior inibição na produção de metano.

Os mecanismos de inibição pelos antibióticos na digestão anaeróbia ainda são pouco conhecidos, mas acredita-se estarem relacionados com as características de ação da classe de cada antibiótico: bloqueio da

síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, interferência nas funções de membranas, etc (SANZ; RODRÍGUEZ; AMILS, 1996). Há uma grande variedade de trabalhos com estudos que explicam estas ações inibitórias baseados no cultivo de culturas puras de microrganismos. Entretanto é bem menor o número de estudos que demonstram as interações que ocorrem durante a digestão anaeróbia de dejetos de animais e praticamente inexistentes aqueles que relacionam a inibição em sistemas de codigestão com outros substratos agropecuários.

Sendo assim, podemos citar os trabalhos de Shimada et al. (2008, 2011) que durante a operação de um ASBR (do inglês, Anaerobic Semi-batch Reactor), inoculado com lodo anaeróbio do tratamento de efluentes de cervejaria, alimentado com glicose aplicou cargas crescentes de tilosina. Sob concentrações de 1,67 mg de tilosina por litro de alimentação os autores observaram decréscimo na velocidade de consumo de propionato redução na produção de metano mesmo sem impacto na eficiência de remoção de DQO. Já em concentrações na faixa de 167 mg/L foi relatado grande queda no desempenho do reator: redução na velocidade de consumo de glicose, acúmulo de acetato e propionato, além de acentuada redução na eficiência de remoção de DQO. Os autores identificaram desproporção entre as bactérias fermentativas e arqueas, com grande impacto nas metanogênicas acetoclásticas. Bactérias Gram-positivas mantiveram atividade mesmo em elevada concentração de tilosina, já bactérias sintróficas oxidadoras de propionato foram detectadas com menor frequência após aumento da concentração do antibiótico.

Porém, estudos como estes relatados acima são limitados ao uso de substratos puros (ex. glicose) e pouco se sabe sobre a interferência na digestão de substratos agropecuários ou quando se utiliza mistura de dejetos de animais com resíduos agrícolas (fonte celulósica).

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ACLIMATAÇÃO DE INÓCULO ANAERÓBIO MESOFÍLICO

Em função das limitações abordadas anteriormente para obtenção de inóculo anaeróbico mesofílico estável e padronização dos ensaios de digestão anaeróbia, foi sugerido o desenvolvimento de metodologia para aclimação de inóculo em laboratório conforme descrito a seguir. A aclimação do inóculo e as atividades analíticas descritas neste tópico foram realizadas no Laboratório de Estudos em Biogás da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC.

4.2.1 Inóculos iniciadores

Como fonte de microrganismos anaeróbios para o processo de aclimação em laboratório foi utilizada mistura de volumes iguais (1+1+1) de inóculos iniciadores de três diferentes fontes: A) lodo de reator UASB (do inglês, Upflow Anaerobic Sludge Blank Reactor ou Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo) da Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves - Concórdia/SC. O reator UASB é alimentado com dejetos de suínos das granjas experimentais da Embrapa, operado sem controle de temperatura, conforme descrito por Kunz et al. (2006); B) dejetos de bovinos (vacas leiteiras), criadas em sistema de semi-confinamento e alimentadas em pastagem, de granja local (distante 5 km da Embrapa). O dejetos foi coletado por raspagem do piso nas instalações de ordenha, as quais são diariamente limpas, constituindo assim apenas amostras de dejetos excretadas no dia da coleta; e C) lodo anaeróbico granular de reator UASB, operado em condições mesofílicas (38-42 °C), de estação de tratamento de efluentes de indústria de gelatinas (60 km de distância do laboratório).

Foram coletadas alíquotas dos inóculos iniciadores A e B para a primeira inoculação no reator PVC/PTFE e também previamente a cada nova necessidade de reposição ao reator (ciclos de 30 a 45 dias). Já as alíquotas do inóculo iniciador C foram coletadas antes da primeira inoculação do reator e sequencialmente após períodos de 6 a 8 meses. Entre este intervalo de tempo, frações do inóculo C foram armazenadas no laboratório em recipiente de 20 litros de polipropileno, em temperatura ambiente (20 °C), em atmosfera sob selo de água para permitir a liberação dos gases produzidos e evitar contato com oxigênio. As reposições do inóculo iniciador C ao reator de aclimação, neste período de esto-

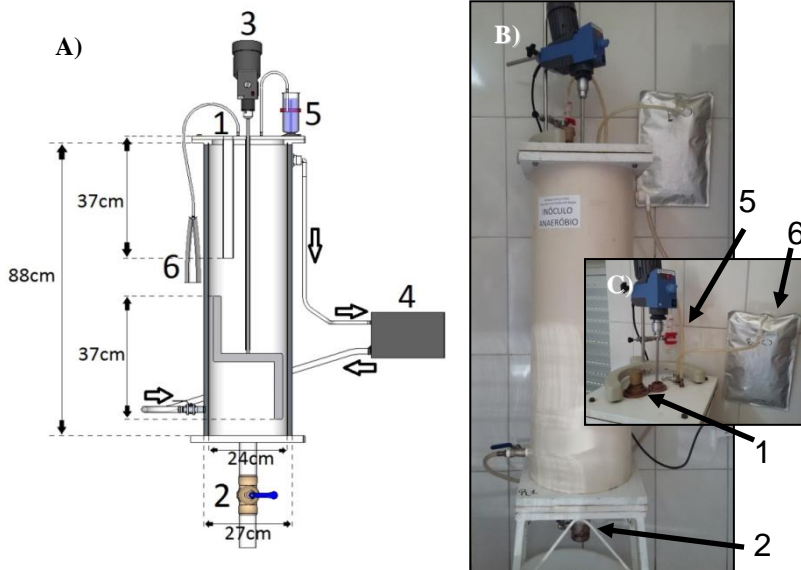
cagem, eram efetuadas por meio de alíquotas homogêneas desta fração armazenada em laboratório em intervalos de acordo com os ciclos de 30 a 45 dias.

4.2.2 Reator para aclimação do inóculo em escala laboratorial

Durante os primeiros 70 dias de aclimação do inóculo, a mistura de inóculos iniciadores foi mantida em recipiente de 20 litros de polipropileno, condicionado em banho de água termostatizado confeccionado em uma caixa térmica de poliestireno aberta e controlado por termostato acoplado a resistência elétrica submersa na água ($37 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$). Durante duas semanas (dias 1 a 14), a mistura foi alimentada conforme descrito no item 4.2.3 e agitada manualmente uma vez ao dia.

Com objetivo de promover melhor desempenho e reduzir o trabalho manual, aos 70 dias de aclimação, o inóculo foi transferido para um reator construído em PVC/PTFE com capacidade de 40 litros, conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Desenho em corte (A), e fotografia (B) do reator de PVC/PTFE utilizado na aclimação do inóculo anaeróbico sob condições mesofílicas. Detalhe da parte superior do reator (C).



Legenda: 1) tubo de alimentação, 2) válvula para retirada de inóculo, 3) sistema de agitação, 4) banho termostatizado, 5) selo de água e 6) coletor de gás.

O reator é constituído com dois tubos de PVC concêntricos (ambos com 88 cm de comprimento, 24 e 27 cm de diâmetro interno, respectivamente), fechado nas extremidades com suportes de PTFE. A alimentação do inóculo foi realizada por meio de um tubo de PVC com 37 cm de comprimento (3 cm de diâmetro interno) instalado na parte superior. O reator é provido de sistema de agitação contínua (40-60 rpm, $< 20 \text{ N/m}^2$), constituído de pá de agitação de aço inoxidável em formato de “S” acoplada por uma haste em um rotor (RW 20 digital, IKA/China). Para garantir estanqueidade, o tubo de alimentação e o tubo da haste de agitação permaneceram sempre submersos no líquido dentro do reator. A parede externa (entre os tubos concêntricos de PVC) foi preenchida com água sob circulação por um banho termostatizado (JMB-5, Julabo/Alemanha) para garantir temperatura de $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ao inóculo. Na base, o reator é provido de uma válvula do tipo “registro esfera” para coleta de material interno. Na parte superior ainda há duas olivas de 0,7 cm de diâmetro interno para permitir a saída do biogás, o qual são conectadas por meio de uma mangueira de Tygon[®] (1 cm de diâmetro) a um selo de água, mantido com 10 mm de coluna de água para permitir a saída dos gases e impedir entrada de ar.

4.2.3 Produção e aclimatação do inóculo anaeróbio

Inicialmente foram misturadas alíquotas de 6 litros de cada um dos inóculos iniciadores A, B e C na proporção 1+1+1 (v). A mistura foi mantida em recipiente de 20 litros de polipropileno como descrito anteriormente. Após 70 dias, o inóculo foi peneirado e a fração menor que 2 mm foi mesclada com mais 3 litros de cada inóculo iniciador e transferido para o reator de 40 litros. Em seguida foram adicionados 12 litros de água destilada para promover a redução do teor de sólidos. O inóculo foi então mantido sob agitação contínua e em condições mesofílicas.

Com objetivo de manter a atividade anaeróbia e tornar o inóculo adaptado a diferentes substratos, foram realizadas alimentações diárias com mistura de substratos descritos na Tabela 11. A carga de alimentação foi estabelecida em 0,3 gSV/(L.d). A mistura de substratos era adicionada ao reator uma vez ao dia, após suspensão em 100 mL de água destilada. Ou seja, alimentação uma vez ao dia e baseada em uma dieta distribuída de proteínas, carboidratos e lipídios. A grama (proveniente do resíduo de podas dos jardins da Embrapa, foi seca a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa com circulação de ar e após cominuída em moinho de facas até tamanho de partícula inferior a 1 mm) foi usada como fonte de celulose, lignina e clorofila. Foi utilizada ração formulada para suínos em fase de lactação,

a base de milho e farelo de soja, sem adição de pré-mix ou conservantes (sem adição de antibióticos ou fungicidas). O leite em pó serviu como fonte de lactose, aminoácidos, alguns lipídios e micronutrientes. E por fim, foi utilizado também óleo de girassol como fonte lipídica.

Tabela 11. Proporção de substratos usados para alimentação do inóculo.

Substrato	Proporção de alimentação % (m/m, baseada em SV)
Gramma seca e moída	30
Ração para suínos	30
Leite em pó	25
Óleo vegetal	15

O processo de aclimação (inoculação, alimentação, coleta e reinoculação) foi conduzido em ciclos de 30 a 45 dias. Após a inoculação com os inóculos iniciadores o reator foi alimentado diariamente durante 23 a 38 dias. Em seguida a alimentação foi interrompida por 7 dias para reduzir a linha de base de produção de biogás do inóculo. Frações entre 2,5 a 6 litros de inóculo foram coletadas para caracterização química, física e uso como inoculante nos ensaios de PBB e PBM. No dia seguinte, novas frações dos inóculos iniciadores (proporções iguais) foram repostas no reator e o ciclo de manutenção iniciou novamente.

4.2.4 Procedimentos analíticos

4.2.4.1 Ensaio de PBB e PBM

Os ensaios cinéticos para avaliação da resposta do inóculo para recuperação de biogás e metano foram conduzidos conforme recomendações da norma VDI 4630 (2006). Aos primeiros 10 dias de aclimação foram coletadas amostras do inóculo e avaliados diferentes tratamentos: sem modificações, após peneiramento (< 2 mm) e após diluição 10% (m/v), usando solução de nutrientes de acordo com recomendado na norma ISO 11734 (1995). Após este período frações do inóculo foram coletadas em períodos entre 30 a 45 dias e somente peneiradas antes do uso nos ensaios anaeróbios. A Tabela 12 demonstra a relação dos ensaios de digestão anaeróbia conforme os períodos em que ocorrerão alterações no processo de aclimação ou pré-condicionamento do inóculo.

Os ensaios de PBB e PBM foram realizados em batelada, por meio de reatores de vidro de 250 mL acoplados a tubos eudiômetros de

vidro de 500 mL. O reator foi incubado com 200 g de inóculo e 1 a 2 g de amostra de substrato, de acordo com o teor de SV (respeitando a proporção $SV_{amostra}/SV_{inóculo} \leq 0.5$). O sistema foi mantido a 37 °C e a produção de biogás foi mensurada diariamente até estabilidade ($dV/dt < 1\%$ do volume acumulado de biogás). A produção de biogás foi efetuada por deslocamento do nível do líquido selante (solução de $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ a 200 g/L e pH 4, conforme DIN 38414-8, 1985) no tubo eudiômetro. O volume de biogás seco foi obtido pela subtração do volume de vapor de água (baseado na pressão de vapor da água para o sistema) e após o volume foi normalizado a 273 K e 1013 hPa, conforme orientações da VDI 4630 (2006). A contribuição de biogás da fração do inóculo (branco) foi subtraída e o resultado final foi ponderado em função da massa de SV da amostra adicionada ao reator. Medidas de pH no momento da incubação e ao final do ensaio foram efetuadas para assegurar que não ocorreram problemas relacionados a oscilações de alcalinidade e/ou pH. Cada ensaio anaeróbio foi efetuado em triplicata.

Tabela 12. Resumo dos períodos de aclimação do inóculo usados nos ensaios de PBB e PBM.

Ensaio	Tempo	Estocagem	Processo	Prétratamento
1		Bombona de polietileno de 20 L	Inóculos misturados e estocados	<i>in natura</i>
2	10			Peneirado (2 mm)
3				Diluído a 10% (m/v)
4	70			Peneirado (2 mm)
5-7	71-252	Reator PV/PTFE de 40 L	Ciclo 45 dias	Peneirado (2 mm) dV~ 2.5 L
8-13	253-570			Peneirado (1 mm) dV~ 2.5 L
14-23	571-875		Ciclo 30 dias	Peneirado (1 mm) dV~ 6 L

4.2.4.2 Análise do biogás

O biogás produzido foi coletado dos tubos eudiômetros em intervalos esporádicos (dependendo da quantidade de gás produzida), usando sacos de amostragem de plástico/alumínio (Hermann Nawrot AG, Germany), e os teores de metano e dióxido de carbono foram determinados por sensor infravermelho dispersivo portátil BIOGAS5000 (Landtec, USA).

4.2.4.3 Análises químicas e físicas

Uma vez por semana foram coletados 150 mL do inóculo para determinação de pH, ST e SV (APHA; AWWA; WEF, 2012). Em paralelo, 50 mL de inóculo foram centrifugados (3493.g/10 minutos) e determinada a relação entre acidez e a alcalinidade por titulação conforme método descrito por Buchauer (1998). As mesmas avaliações analíticas foram efetuadas nas amostras dos inóculos iniciadores a cada nova coleta ou reposição no reator de aclimação. Todas análises foram conduzidas em duplicata.

pH: As determinações de pH foram efetuadas por potenciometria utilizando pHmetro HI 8424 (Hanna Instruments, Romênia).

ST e SV: As determinações de ST foram efetuadas por gravimetria após secagem de aproximadamente 50 mL de amostra em estufa com circulação de ar a 105 °C até massa constante. As determinações de SV foram realizadas após calcinação por 1 hora em mufla a 550 °C. Em ambos os casos os cadinhos de porcelana com amostra eram arrefecidos em dessecador até massa constante (cerca de 1 hora). O cálculo dos teores de sólidos foi efetuado por meio das Equação XII e Equação XIII, onde: m_{cad} é a massa do cadinho calcinado, m_{cad+a} é a massa do cadinho com a amostra fresca; $m_{cad+ase}$ é a massa do cadinho calcinado com a amostra seca em estufa (105 °C) e m_{cad+cz} é a massa do cadinho calcinado com o resíduo de cinzas da amostra após calcinação (550 °C).

$$ST \left[\frac{g \text{ de ST}}{kg \text{ de amostra}} \right] = \left(\frac{m_{cad+ase} - m_{cad}}{m_{cad+a} - m_{cad}} \right) \cdot 0,001 \quad \text{Equação XII}$$

$$SV \left[\frac{g \text{ de SV}}{kg \text{ de amostra}} \right] = ST - \left(\frac{m_{cad+cz} - m_{cad}}{m_{cad+a} - m_{cad}} \right) \cdot 0,001 \quad \text{Equação XIII}$$

Relação acidez/alcalinidade: As determinações de acidez e alcalinidade foram determinadas por titulação potenciométrica, utilizando titulador automático 848 Titrino Plus (Methohm, Suécia). Alíquotas de 20 mL da amostra centrifugada foram tituladas com solução (0,05 mol/L) de ácido sulfúrico até pH 5,0 (volume “A”) e após até pH 4,4 (volume “B”). A relação acidez/alcalinidade foi calculada através das Equação XIV e Equação XV:

$$\text{Alcalinidade} \left[\frac{mgCaCO_3}{L \text{ de amostra}} \right] = A \cdot 250 \quad \text{Equação XIV}$$

$$Acidez \left[\frac{mg \text{Ácido acético}}{L \text{ de amostra}} \right] = [(B \cdot 1,66) - 0,15] \cdot 500 \quad \text{Equação XV}$$

4.2.4.4 Ensaios de AME

Para os ensaios de AME amostras dos inóculos anaeróbio iniciadores foram diluídos para 10 gST/L usando solução nutritiva-tampão, tal como descrito na norma ISO 11734 (1995). Os testes foram realizados no equipamento Automatic Methane Potential System II (Bioprocess Control, Suécia). Foram conduzidos em reatores de 400 mL de volume útil, providos de agitação (1 minuto a cada intervalo de 5 minutos) e condicionados em banho termostatzado a 37 °C. Cada amostra de inóculo foi condicionada em 3 frascos durante período de aproximadamente 5 dias (até redução da linha de base de produção de gás). Depois da estabilidade, 1 g/L de solução de acetato foi adicionada a dois reatores, sendo o terceiro mantido como controle. Outra batelada de testes também foi realizada nas mesmas condições, porém com adição de 1 g/L de celulose microcristalina. O volume de biogás produzido no ensaio sem adição substrato serviu para ajustar a linha de base e excluir a contribuição da produção de gases do inóculo (produção endógena). A avaliação dos dados foi realizada de acordo com Hussain & Dubey (2015), resultando na obtenção do valor de $\mu_{Pm\acute{a}x}$ pela aplicação da Equação X.

4.2.4.5 Extração de DNA e análise qPCR

Para fins de caracterização dos inóculos iniciadores e do inóculo após aclimatação, foram efetuadas coletas de amostras dos inóculos utilizados no dia 206 e 421 de aclimatação. DNA genômico foi extraído de 250 mg das amostras de por meio de kit de extração PowerSoil (Mo-Bio Laboratories Inc., EUA), de acordo com instruções do fabricante. arqueas totais, três ordens de metanogênicas (*Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* e *Methanobacteriales*) e as famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae* (YU; KIM; HWANG, 2006) foram investigadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) de acordo com primers e sondas descritos na Tabela 13.

Curvas padrão foram preparadas por diluições em série do DNA contendo clones das sequencias alvo, conforme descrito por Mezzari et al. (2013). As diluições (10^{10} to 10^3 cópias genômicas/ μ L) foram amplificadas usando QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Todos os primers foram sensibilizados por aplicação de

SYBR Green, com excessão da ordem Methanomicrobiales (Reitschuler et al., 2014). Reações com SYBR Green foram realizadas usando QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), e sondas Taqman GoTaq® Probe PCR System Kit (Promega). O setup de reações foi conduzido de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes com concentrações finais dos primers a 250 nM e sondas a 125 nM na reação de mistura. Amplificação foi conduzida em ciclos termais de dois passos para reações com SYBR Green (5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C) e com Taqman (2 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 min a 55 °C). As avaliações foram realizadas em triplicata.

Tabela 13. Primer, sondas, seqüências e tamanho de fragmentos usados na análise qPCR.

Grupo alvo	Primers/ Sondas	Seqüência (5'– 3')	Tamanho (bp)
<i>Methanosaetaceae</i>	MST702f	TAATCCTYGARGGACCACCA	164
	MST753f	ACGGCAAGGGACGAAAGCTAGG	
<i>Archaea</i>	MST862r	CCTACGGCACCRACMAC	273
	ARC787f	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	
<i>Methanobacteriales</i>	ARC1059r	GCCATGCACCWCCTCT	343
	MBT857f	CGWAGGGAAGCTGTAAAGT	
<i>Methanosarcinales</i>	MBT1196r	TACCGTCGTCCACTCCTT	354
	MSL812f	GTA AACGATRYTCGCTAGGT	
<i>Methanosarcinaceae</i>	MSL1159r	GGTCCCCACAGWGTACC	408
	MSC380f	GAAAC CGYGATAAAGG GGA	
	MSC492f	TTAGC AAGGG CCGGG CAA	
<i>Methanomicrobiales</i>	MSC828r	TAGCG ARCAT CGTTTACG	506
	MMB749t	TYCGACAGTGAGGRACGAAAGCTG	
	MMB282f	ATCGRTACGGGTTGTGGG	
	MMB832r	CACCTAACGCRCATHGTTTAC	

4.2.4.6 Avaliações intra e interlaboratoriais

Amostra padrão de celulose microcristalina (20 µ size, Sigma-Aldrich/Alemanha) foi utilizada como substrato para avaliação de performance e controle de qualidade do inóculo nos ensaios de PBB e PBM. Em 2013 foram conduzidos 5 bateladas de ensaios com celulose, seguidos de 6 bateladas em 2014 e 10 bateladas em 2015.

Ainda em 2013 foi realizada análise de PBB e PBM de duas amostras fornecidas pelo Centro Alemão de Pesquisas em Biomassa (DBFZ). Uma amostra de silagem de milho e outra de resíduo seco de

destilaria (mescla de grãos e solúveis, identificada como DDGS) foram analisadas durante o mesmo período nos laboratórios do DBFZ e da Embrapa.

Em 2014 e 2015 foram também avaliadas amostras de referência geradas pelo Estudo Interlaboratorial em Digestão Anaeróbia da Rede BiogásFert (STEINMETZ et al., 2015). As amostras foram constituídas por celulose microcristalina, gelatina, cama de aviário e lodo seco de ETE. Os valores de referência foram estimados com base nos resultados da média e desvio padrão robustos dos resultados fornecidos pelos laboratórios participantes do estudo.

4.2.4.7 Análise estatística

Para verificar a concordância dos resultados de PBB e PBM das amostras de referência geradas nos estudos interlaboratoriais, foi aplicado teste T ($p = 0,05$) para comparação entre médias, utilizando software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, 2010).

4.3 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM DROGAS VETERINÁRIAS

Com o objetivo de avaliar a interação de drogas veterinárias durante a digestão anaeróbia, foram realizados dois experimentos de avaliação toxicológica: Um dos experimentos foi realizado com tetraciclinas e outro com um grupo de compostos usualmente utilizados como profiláticos e/ou promotores de crescimento. As tetraciclinas representam um grupo importante de antibióticos e bastante utilizado na produção de animais de maneira terapêutica, em doses injetáveis, em concentrações elevadas, porém em períodos curtos de tempo. Já os profiláticos e/ou promotores de crescimento têm a finalidade de prevenir enfermidades e agir como melhoradores de desempenho na produtividade. Estes são administrados em longos períodos de tempo, sob concentrações menores, como aditivos na ração ou na água fornecida aos animais (MORÉS, 2014).

A seleção dos compostos selecionados para este estudo foi baseada nos seguintes fatores: i) são constituintes de medicamentos ou aditivos usuais na suinocultura brasileira de acordo com o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008); ii) consulta pessoal a especialistas da Embrapa e produtores de suínos; iii) substâncias de interesse em pesquisas recentes e/ou em desenvolvimento na Embrapa; iv) pouca disponibilidade (ou inexistência) de informações disponí-

veis na literatura sobre a inibição nos processos anaeróbios; v) disponibilidade comercial de padrões analíticos (alta pureza).

4.3.1 Tetraciclinas

Os ensaios com drogas veterinárias da classe das tetraciclinas foram conduzidos no Laboratório de Estudos em Biogás da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC.

4.3.1.1 Reagentes

Foram utilizados padrões analíticos dos antibióticos utilizados neste experimento com qualidade VETRANAL™ (Sigma-Aldrich, Alemanha): hidrocloreto de tetraciclina [$C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl$], hidrocloreto de clortetraciclina [$C_{22}H_{23}ClN_2O_8.HCl$], hidrocloreto de oxitetraciclina [$C_{22}H_{24}N_2O_9.HCl$], hidrocloreto de metaciclina [$C_{22}H_{22}N_2O_8.HCl$] e hclato de doxiciclina [$C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl.0.5H_2O.0.5C_2H_6O$]. Como controle positivo foi utilizado o inibidor 3,5-diclorofenol, grau analítico, também da Sigma-Aldrich (Alemanha) conforme recomendações ISO 13641-1 (ISO, 2003).

4.3.1.2 Desenho experimental

Foram realizados ensaios de PBB usando inóculo mesofílico anaeróbio aclimatado conforme descrito no item 4.2, em ensaios batelada conforme item 4.2.4.1, por meio de incubação em reatores de 250 mL acoplados a tubos eudiômetros. Como inóculo foi utilizado material coletado do reator PVC/PTFE, após aclimação e peneiramento (< 1 mm). Como substrato foi utilizado celulose microcristalina de elevada pureza (Sigma-Aldrich, Alemanha). Para avaliação dos efeitos de inibição foram adicionados ao reator 200 g de inóculo, 1 g de substrato e adição de quantidades conhecidas e crescentes das tetraciclinas em estudo conforme demonstrado na Tabela 14. A quantidade adicionada em cada reator foi baseada em 4 ordens de grandeza (x , $x.10^1$, $x.10^2$, $x.10^3$) com a finalidade de extrapolar a faixa de concentrações identificadas no ANEXO A. Exceção ao antibiótico metaciclina que foi adicionada em 4 concentrações, mas em 3 ordens de grandeza (x , $2x$, $x.10^1$, $x.10^2$). Ao total foram realizados 23 tratamentos. Conforme recomendações da norma ISO 13641-1 (ISO, 2003) foi realizado ensaio controle com adição do inibidor 3,5-diclorofenol na concentração de 150 mg/L. Os ensaios com adição das drogas foram realizados em duplicata. Já os testes

com inóculo (tratamento 1), substrato padrão (tratamento 2) e inibidor 3,5-diclorofenol (tratamento 23) foram efetuados em triplicata.

Tabela 14. Desenho experimental para os ensaios de toxicidade por adição de tetraciclinas.

Tratamento	Inóculo (g)	Celulose (g)	Antibiótico	
			Nome	Concentração
1	200	0	Nenhum	-
2	200	1	Nenhum	-
3	200	1	Tetraciclina	0,6 mg/L
4	200	1	Tetraciclina	12 mg/L
5	200	1	Tetraciclina	60 mg/L
6	200	1	Tetraciclina	300 mg/L
7	200	1	Clorotetraciclina	0,84 mg/L
8	200	1	Clorotetraciclina	16,2 mg/L
9	200	1	Clorotetraciclina	84 mg/L
10	200	1	Clorotetraciclina	400 mg/L
11	200	1	Oxitetraciclina	2,1 mg/L
12	200	1	Oxitetraciclina	38,6 mg/L
13	200	1	Oxitetraciclina	420 mg/L
14	200	1	Oxitetraciclina	840 mg/L
15	200	1	Metaciclina	1,3 mg/L
16	200	1	Metaciclina	3,25 mg/L
17	200	1	Metaciclina	32,5 mg/L
18	200	1	Metaciclina	150 mg/L
19	200	1	Doxiclina	0,3 mg/L
20	200	1	Doxiclina	3 mg/L
21	200	1	Doxiclina	30 mg/L
22	200	1	Doxiclina	300 mg/L
23	200	1	3,5-dichlorophenol	150 mg/L

Os resultados de volume acumulado de biogás após 3 dias (Biogás_{72h}) e do volume máximo obtido após 30 dias de digestão (Biogás_{máx}), foram utilizados para obtenção dos valores de inibição pela aplicação da Equação XI e posteriormente para a geração dos modelos para estimação das concentrações de inibição da produção de biogás a 10 e 50% (CI₁₀ e CI₅₀) por análise de regressão, conforme recomendações da norma ISO 13641-1 (ISO, 2003).

4.3.1.3 Avaliação da concentração residual das tetraciclinas

Para verificar a persistência ou degradação dos antibióticos, foram efetuadas avaliações da concentração dos compostos adicionados ao

final de cada ensaio. Para isso, uma amostra ao término do procedimento de digestão (30 dias) foi constituída de amostra composta pela mistura do conteúdo dos reatores das repetições em cada tratamento. As amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até realização das análises.

A avaliação da concentração das tetraciclinas foi efetuada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O preparo das amostras foi efetuado via extração em fase sólida (EFS) e posterior determinação conforme procedimento descrito por Groth et al. (2015). Para isso em 2 mL da amostra foram adicionados 200 μL de solução 5% (m/v) de Na_2EDTA e gotas de H_2SO_4 a 10% (v/v) até pH 4. As amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 1 minuto, banho de ultrassom por 25 min centrifugação (10.000 g por 10 minutos, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) com posterior remoção do sobrenadante para um tubo limpo. Ao pellet da centrifugação foram adicionados 2 mL de tampão EDTA-MacIlvaine (pH 4,0), agitado em vórtex por 1 min. A extração por ultrassom, centrifugação e transferência do sobrenadante foi repetida por mais duas vezes e os sobrenadantes combinados. A etapa de concentração e clean-up das amostras se deu por EFS com cartuchos Oasis HLB 60 mg (Waters, EUA) com vazão à pressão atmosférica. Na etapa de EFS os cartuchos foram pré-condicionados com 3 mL metanol, seguido 3 mL de solução de ácido clorídrico 0,5 mol/L e 3 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) para então aplicação da amostra ($\Sigma \sim 8\text{ mL}$). Na sequência fez-se a etapa de lavagem com 5% (v/v) de metanol em água (3 mL), seguido de água ultrapura (3 mL), hexano (3 mL) e permanência em vácuo por 1 minuto. A eluição foi efetuada com 3 mL de uma mistura 2% (v/v) ácido fórmico em metanol. Após eluição as amostras foram secas em nitrogênio gasoso, ressuspensas em 1 mL de metanol:água (2:3 v/v) e filtradas em filtros PTFE (0,22 μm) para posterior quantificação no LC-MS/MS.

O sistema de análise utilizado consistiu em um cromatógrafo líquido Surveyor Plus acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo TSQ Quantum Access Max ambos da Thermo Scientific (EUA). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Acclaim TM 120 C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm - Thermo Scientific, EUA). O volume de injeção da amostra foi de 10 μL . O gradiente de eluição utilizado consistiu de duas fases (eluente A: água ultrapura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e eluente B: acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico) com o seguinte sistema de eluição: 0-2 minutos isocrático 95% A e 5% B; 2-3 minutos gradiente até 25% de B; 3-7 minutos isocrático 25% B; 7-12 minutos gradiente até 50% de B; 12-15 minutos isocrático 50% de B; 15-16 minutos gradiente até 100% de B; 16-18 minutos iso-

crático em 100% de B; 18-18,5 minutos gradiente até 5% de B; 18,5-22 minutos isocrático até 5% de B, em um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada por electrospray com ionização no modo positivo. O modo de quantificação para os resíduos de antibióticos utilizados foi o “Selected Reaction Monitoring”. Os íons precursores monitorados foram os de relação massa/carga (m/z) 461,1, 445,1, 479,1, 443,1 e 445,1 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina, respectivamente. Os íons produto monitorados foram: m/z 426,3 (17 eV) e 443,3 (11 eV) para oxitetraciclina; m/z 410,3 (18 eV) e 427,4 (11 eV) para tetraciclina; m/z 462,3 (16 eV) e 444,3 (19 eV) para clortetraciclina; m/z 201,1 (33 eV) e 426,3 (13 eV) para metaciclina e m/z 321,2 (30 eV) e 428,3 (17 eV) para doxiciclina.

4.3.2 Profiláticos e/ou promotores de crescimento

Para avaliação de drogas veterinárias usadas como promotores de crescimento ou profiáticos foram realizados ensaios de digestão anaeróbia usando 4 drogas veterinárias de uso frequente no Brasil. Neste caso, foram selecionados os antibióticos tiamulina, lincomicina, tilosina e gentamicina. Os ensaios descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Biogás do Instituto de Engenharia Agrícola e Bioenergia (Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie), na Universidade de Hohenheim, Stuttgart, Alemanha.

4.3.2.1 Reagentes

Os padrões de antibióticos utilizados neste experimento foram de qualidade VETRANALTM (Sigma-Aldrich, Alemanha): fumarato de tiamulina [$C_{32}H_{51}NO_8S$], hidrocloreto mono-hidratado de lincomicina [$C_{18}H_{34}N_2O_6S.HCl.H_2O$], tartarato de tilosina [$C_{50}H_{83}NO_{23}$] e sal hidrato de sulfato de gentamicina [$C_{60}H_{127}N_{15}O_{26}S$]. Como controle positivo foi utilizado o inibidor 3,5-diclorofenol (Merck, Alemanha), grau analítico, conforme recomendações ISO 13641-1 (ISO, 2003).

4.3.2.2 Inóculo

Para o experimento foi utilizado inóculo previamente aclimatado sob condições mesofílicas padronizadas no Laboratório de Biogás do Instituto de Engenharia Agrícola e Bioenergia, na Universidade de Stuttgart. O inóculo é derivado da planta experimental de biogás da Universidade de Hoheinheim (Unterer Lindenhof), de digestores operados em condições mesofílicas e alimentados com dejetos de bovino, dejetos de suíno e grande variedade de silagens (ex.: milho, pastagens, etc). A aclimação do inóculo ocorreu em reator de aço inoxidável de 100 litros de capacidade e a validação da atividade do inóculo seguiu procedimento padrão interno ao laboratório, conforme descrito por Mittweg et al. (2012).

4.3.2.3 Desenho experimental

Para os ensaios com os compostos profiláticos foi seguido o mesmo modelo do experimento descrito no item 4.3.1. A quantidade adicionada em cada reator foram baseadas em 5 ordens de grandeza (x , $x \cdot 10^1$, $x \cdot 10^2$, $x \cdot 10^3$, $x \cdot 10^4$) com a finalidade de extrapolar a faixa de concentrações identificadas no ANEXO A e estimadas na Tabela 10. O detalhamento dos tratamentos utilizados é demonstrado na

Tabela 15.

Os ensaios de digestão anaeróbia foram efetuados por meio do sistema Hohenheim Biogas-yield Test (HBT), um sistema constituído 126 seringas de 100 mL como reatores (MITTWEG et al., 2012) conforme demonstrado na Figura 11, em procedimentos batelada e de acordo com recomendações da norma VDI 4630 (VDI, 2006). A preparação dos ensaios constituiu na incubação de 30 g de inóculo em seringas de vidro de 100 mL e adição de 0,35 g de substrato padrão. Individualmente, foram adicionados volumes variáveis de 50 a 1000 μ L de solução de referência dos antibióticos, resultando nas concentrações de 0,05, 0,5, 5, 50 e 500 mg/L para tiamulina e tilosina, e de 0,1, 1, 10, 100 e 1000 mg/L para lincomicina e gentamicina. As seringas foram fechadas e mantidas em um suporte acoplado a um rotor e mantidas em estufa sob condições mesofílicas ($37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$) por um período de 35 dias. A produção de gás foi mensurada por deslocamento do pistão das seringas, sendo este corrigido às CNTP. Dependendo da quantidade de gás produzida ($dV > 20 \text{ mL}$), o volume e a qualidade do biogás eram mensurados entre uma a três vezes ao dia. O metano presente no biogás foi determinado por sensor de dispersão de infravermelho (manufatura própria do labora-

tório), o qual foi calibrado diariamente antes do uso por meio de mistura padrão de gases metano e dióxido de carbono.

Para simular a condição de codigestão com substratos agropecuários foi utilizada amostra padrão de concentrado para bovinos (KS Kälber 183 PELL, Raiffeisen Kraftfutterwerke, Alemanha). A composição da amostra encontra-se descrito na Tabela 16. Os cálculos para estimação da recuperação de metano e biogás foram efetuados de acordo com Mittweg et al. (2012).

Tabela 15. Desenho experimental para os ensaios de toxicidade por adição de profiláticos.

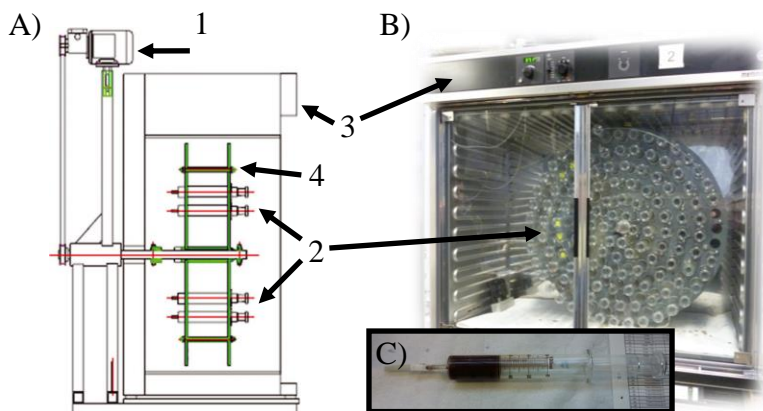
Tratamento	Inóculo (g)	Substrato (g)	Antibiótico	
			Tipo	Concentração
1	60	0	Nenhum	-
2	30	0,35	Nenhum	-
3	30	0,35	Tiamulina	50 µg/L
4	30	0,35	Tiamulina	0.5 mg/L
5	30	0,35	Tiamulina	5 mg/L
6	30	0,35	Tiamulina	50 mg/L
7	30	0,35	Tiamulina	500 mg/L
8	30	0,35	Lincomicina	100 µg/L
9	30	0,35	Lincomicina	1 mg/L
10	30	0,35	Lincomicina	10 mg/L
11	30	0,35	Lincomicina	100 mg/L
12	30	0,35	Lincomicina	1000 mg/L
13	30	0,35	Tilosina	50 µg/L
14	30	0,35	Tilosina	0.5 mg/L
15	30	0,35	Tilosina	5 mg/L
16	30	0,35	Tilosina	50 mg/L
17	30	0,35	Tilosina	500 mg/L
18	30	0,35	Gentamicina	100 µg/L
19	30	0,35	Gentamicina	1 mg/L
20	30	0,35	Gentamicina	10 mg/L
21	30	0,35	Gentamicina	100 mg/L
22	30	0,35	Gentamicina	1000 mg/L
23	30	0,35	3,5-dichlorophenol	150 mg/L

Com base nestas informações, foram obtidos os valores de inibição pela aplicação da Equação XI e posteriormente estimação das concentrações de inibição da produção de biogás a 10 e 50% (CI₁₀ e CI₅₀) por análise de regressão, conforme recomendações da norma ISO

13641-1 (ISO, 2003). Em todos os tratamentos foram subtraídos os valores de produção específica de biogás do inóculo, baseado no teor de sólidos voláteis provenientes do inóculo adicionado em cada teste. Todos os ensaios foram efetuados em 3 repetições.

Após a finalização dos ensaios, o material resultante das 3 repetições de cada tratamento foram mesclados e homogeneizados. Uma fração de 10 mL foi encaminhada para determinação de ácidos orgânicos de cadeia curta (ou ácidos voláteis) via cromatografia em fase gasosa.

Figura 11. Desenho da vista lateral (A) e fotografia frontal da estufa contendo o sistema HBT (B). Detalhe do reator de seringa de 100 mL (C).



Legenda - 1: sistema rotor acoplado ao eixo do suporte, 2: seringas, 3: estufa, 4: suporte. Fonte: Adaptado de Mittweg et al. (2012).

Tabela 16. Composição da amostra padrão de ração concentrada

Parâmetro	Concentração % (m/m)
Sólidos totais	86,26
Sólidos voláteis	79,66
Proteína bruta	18,0
Gorduras totais	2,4
Fibra bruta	8,6
Cálcio	0,95
Fósforo	0,65
Sódio	0,30

Fonte: Raiffeisen Kraftfutterwerke, Alemanha

4.3.2.4 Determinação de ácidos orgânicos de cadeia curta

Para avaliação do acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta (acético, propiônico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico, n-valérico e caprótico) foi utilizada metodologia descrita por Krümpel et al. (2016). Em 1 mL de amostra foi adicionado 1 mL de ácido ortofosfórico a 17% (v/v) e 1 mL de ácido n-metilvalérico (como padrão interno). Uma diluição 1:10 (v/v) foi preparada em água, no qual é transferida para os frascos do auto-amostrador acoplado ao cromatógrafo de fase gasosa Varian CP-3800 (Varian, EUA). As análises cromatográficas foram efetuadas com detector por ionização em chama após separação dos analitos de interesse em coluna WCOT (sílica fundida - 50 m, 0,32 mm) em gradiente de temperatura: 60 °C por dois minutos, seguido de aumento de temperatura a 150 °C (30 °C/min) e após 240 °C (8 °C/min). O gás carreador foi Hélio de elevada pureza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ACLIMATAÇÃO DE INÓCULO ANAERÓBIO MESOFÍLICO

5.1.1 Avaliação dos inóculos iniciadores e operação do reator de aclimatação

Na Tabela 17 são apresentadas as características médias das amostras dos inóculos iniciadores A, B e C utilizadas para inoculação e reposição no reator de PVC/PTFE. Na Figura 12 são apresentados dois gráficos que demonstram o monitoramento do reator de PVC/PTFE durante a aclimatação do inóculo mesofílico anaeróbico em laboratório. A Figura 12a refere-se aos resultados da série de sólidos (ST e relação SV/ST) no reator, enquanto que a Figura 12b mostra os resultados de pH e relação entre acidez e alcalinidade do inóculo sob aclimatação.

Avaliando a Tabela 17 é possível visualizar que as amostras do inóculo A (lodo do reator UASB da ETDS) apresentaram baixa concentração de sólidos e valores elevados na relação acidez/alcalinidade. Características possivelmente resultantes de limitações no controle de processo da ETDS e sobrecarga no reator UASB. Segundo informações fornecidas pelo operador da ETDS, ocorrem limitações no passo de separação sólido-líquido (etapa prévia ao reator UASB), o que promove acúmulo de sólidos no reator anaeróbico e força o descarte de lodo do UASB. Os descartes possivelmente reduzem a biomassa microbiana do lodo, verificada pelo baixo teor de ST (2%) e SV (1,1%) nas amostras do inóculo A. Consequentemente, a redução de biomassa no lodo pode ocasionar aumento na relação entre alimento/microrganismos no reator UASB o que por sua vez causa elevação na relação acidez/alcalinidade nas amostras do inóculo A.

Mesmo apresentando essas variações, é possível verificar por meio da Figura 12b que o inóculo A não influenciou na relação acidez/alcalinidade. O baixo teor de sólidos do inóculo A foi compensado pela mistura com os outros inóculos iniciadores, o que manteve a estabilidade na série de sólidos do reator de PVC/PTFE.

A maior contribuição ao teor de SV no reator de PVC/PTFE foi pela adição de dejetos de bovino (inóculo B), o qual apresentou valores superiores a 90 gSV/kg (média 122,4 gSV/kg) e proporção entre SV/ST de 78,7%. O inóculo B também pode ter favorecido a manutenção do pH por apresentar valores mais próximos da neutralidade ($6,60 \pm 0,37$) em comparação aos outros inóculos iniciadores. Além disso, acredita-se que o inóculo iniciador B pode ter contribuído para melhor eficácia da ativi-

dade do inóculo frente a digestão de substratos com alto teor de fibras e celulose (características de substratos de fonte agrícola).

Tabela 17. Características observadas nos inóculos utilizados no estudo.

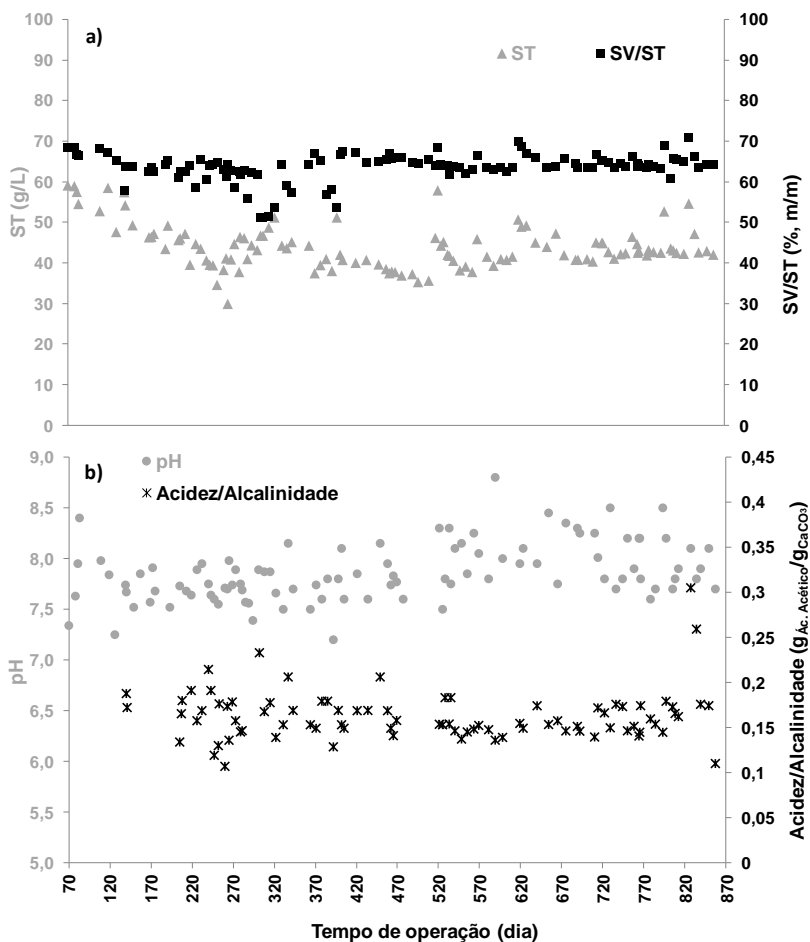
Inóculo	A		B		C		Laboratório Mistura de A, B e C 37
	Lodo UASB dejeito suíno Ambiente	Lodo UASB dejeito bovino fresco Ambiente	Dejeito bovino fresco Ambiente	Lodo UASB indústria de gelatina	Lodo UASB 38 - 42		
T (°C)	7.96 (0.19)	6.60 (0.37)	6.60 (0.37)	7.93 (0.53)	7.20-8.80		
pH	0.48 (0.23)	NA	NA	0.12 (0.02)	0.10 - 0.35		
Acidez/alcalinidade (gÁcido Acético/gCaCO ₃)	20.1 (5.9)	155.1 (23.8)	155.1 (23.8)	64.4 (14.9)	29.9 - 59.1		
TS (g/kg)	11.4 (4.4)	122.4 (22.6)	122.4 (22.6)	40.9 (7.3)	19.2 - 40.4		
VS/TS % (m/m)	56.7	78.9	78.9	63.5	51.3 - 69.9		
AME-acetato g CH ₄ -DQO/(g SV·d)	0.050 (0.003)	0.049 (0.002)	0.049 (0.002)	0.326 (0.029)* 0.176 (0.007)**	0.184 (0.003)		
AME-celulose g CH ₄ -DQO/(g SV·d)	0.013 (0.002)	0.028 (0.003)	0.028 (0.003)	0.020 (0.001)* 0.014 (0.003)**	0.047 (0.004)		

Valores entre parêntese representam o desvio padrão; n = 22 para os inóculos A e B; n = 5 para o inóculo C; n = 2 para os ensaios de AME em todas as amostras.

NA: Não analisado por impossibilidade de extração da fração líquida por centrifugação.

*Inóculo fresco; **Inóculo velho (> 6 meses estocado a temperatura ambiente).

Figura 12. Perfil das variáveis monitorados no reator de aclimação, perado a 37°C, alimentado em regime semi-contínuo, com reinoculações em ciclos de 30 a 45 dias: a) relação de sólidos e b) pH e relação entre acidez e alcalinidade.



Porém, é relevante citar que as amostras de dejetos bovinos geralmente apresentaram resíduos de pastagem não digeridos (folhas inteiras) e pequenas pedras (ingeridas pelos animais ou coletadas acidentalmente no momento da amostragem). Para evitar problemas mecânicos no reator esses materiais eram removidos manualmente antes da mistura com os demais inóculos iniciadores e reinoculação no reator de PVC/PTFE.

O inóculo C (lodo de UASB de indústria de gelatina) foi o único dos inóculos iniciadores proveniente de condições mesofílicas. Em uma avaliação granulométrica preliminar por peneiramento (2, 1,19 e 0,5 mm) do inóculo C demonstrou que mais de 50% dos grânulos tiveram diâmetro superior a 1,19 mm. Porém, as primeiras amostras do inóculo C apresentaram baixa relação SV/ST e que poderia comprometer a qualidade do inóculo sob aclimação em laboratório. Este problema foi contornado por seleção de amostras com melhor relação SV/ST por seleção de outros pontos de amostragem ao longo da altura da manta de lodo do reator UASB da indústria de proteínas.

Em função disso, após o dia de operação 322 de aclimação do inóculo, somente inóculos iniciadores com relação SV/ST superior a 50% (m/m) foram utilizados para reinoculação no reator PVC/PTFE. É possível observar a influência desta decisão pelos valores apresentados na Figura 12a, o que causou a restauração a 60% (m/m) na relação SV/ST após o dia 405 no inóculo sob aclimação no reator PVC/PTFE.

No primeiro período de mistura e ambientação dos inóculos iniciadores (dias 1 a 70) o teor de ST foi de $114,3 \pm 15,9$ gST/L ($> 11\%$), ou seja, muito superior aos teores recomendados na norma VDI 4630 (> 25 g_{SV}/L). Esse fato e os resultados dos ensaios de PBB (que será abordado em seguida) influenciaram na decisão de manter o inóculo sob repouso e sem alimentação até o dia 70, quando foi peneirado (2 mm), diluído, reinoculado e transferido para o reator PVC/PTFE. Isso permitiu a redução do teor de sólidos no inóculo para 59,1 gST/L e 40,1 gSV/L. Em seguida o teor de sólidos reduziu ainda mais, chegando a valores de 30 gST/L no dia 365. A decisão de estabelecer um controle de qualidade aos inóculos iniciadores (relação SV/ST $> 50\%$) após o dia 322 permitiu a manutenção do teor de sólidos próximos a 35 gST/L (com média da relação SV/ST superior a 60%).

De acordo com os dados da Figura 12b, o pH não apresentou variações significativas ao longo dos 857 dias de aclimação e permaneceu na faixa de $7,90 \pm 0,46$. De forma similar, a relação acidez/alcalinidade permaneceu estável ($0,16 \pm 0,04$ g_{Ácido Acético}/gCaCO₃), com excessão do dia 827 o qual apresentou valor 0,31 g_{Ácido Acético}/gCaCO₃ por possível contribuição do inóculo iniciador A. Porém, após poucos dias de aclimação, esse aumento brusco na relação acidez/alcalinidade reduziu a valores inferiores a 0,2 e não representou limitações na atividade do inóculo nos ensaios de digestão anaeróbia (conforme será demonstrado a seguir).

A estabilidade do pH e os valores baixos da relação acidez/alcalinidade indicam que não ocorreu sobrecarga no reator PVC/PTFE. Juntamente com a estabilidade nas demais características (ST e SV), evidencia que o inóculo aclimatado possa apresentar características estáveis e reprodutivas nos ensaios de PBB e PBM de acordo com a norma VDI 4630 (2006).

Os resultados de AME descritos na Tabela 17 demonstram a importância do processo de aclimação do inóculo antes do uso nos ensaios de digestão. A AME com substrato acetato foi muito superior nos inóculos C e após aclimação em laboratório. Estes dois inóculos obtiveram resultados de acordo com o estabelecido por Angelidaki et al. (2009). Segundo estes autores, para serem considerados ativos os lodos anaeróbios não granulares devem apresentar AME ao acetato de $0,1 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$, enquanto que os lodos granulares devem apresentar valores de $0,3 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$. Porém, a atividade do lodo granular C reduz quando é estocado em laboratório. A AME reduziu de $0,326 \pm 0,029 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$ no lodo fresco para $0,176 \pm 0,007 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/(\text{gSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$ no lodo estocado em laboratório a temperatura ambiente durante 6 meses.

A atividade frente ao padrão de celulose foi superior no inóculo aclimatado em laboratório no reator PVC/PTFE, seguido pelos inóculos B e C. Além disso, o inóculo aclimatado em laboratório iniciou a produção de gás após adição de celulose no reator aos 1,2 dias, enquanto os demais inóculos necessitaram tempo superior a 5 dias para apresentar as primeiras medições de gás. Portanto, assume-se que a atividade de microrganismos produtores de enzimas (celulolíticas) se encontram mais adaptados no inóculo condicionado no laboratório no reator de PVC/PTFE.

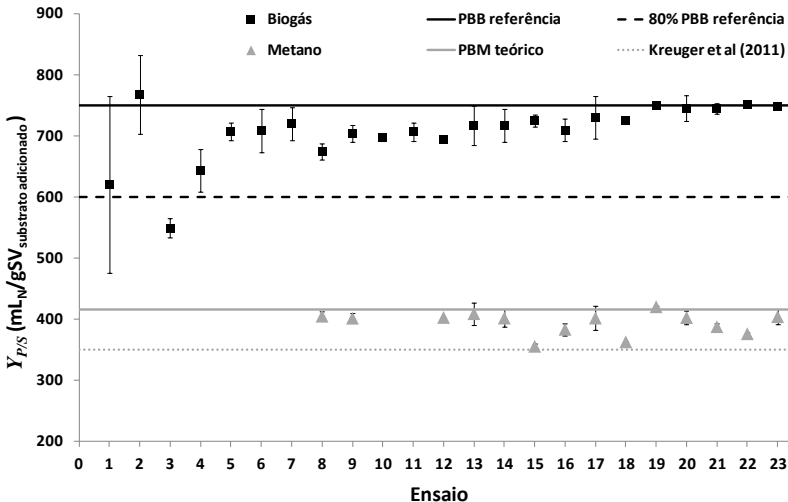
5.1.2 Desempenho do inóculo aclimatado na recuperação de biogás e metano

A Figura 13 apresenta a performance para a PBB e PBM para amostras de celulose microcristalina do inóculo sob aclimação em laboratório. Os valores do gráfico estão expressos como o volume máximo de biogás (ou metano) obtido na digestão da amostra de celulose em cada batelada de ensaios. Os ensaios identificados de 1 a 7 foram realizados com o inóculo sob aclimação durante o ano de 2013. Os ensaios numerados de 8 a 13 foram realizados em 2014 e os demais em 2015.

A linha escura contínua representa a faixa de referência (740-750 $\text{mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato}}$) para a amostra padrão de celulose microcristalina. A linha escura tracejada sinaliza o limite mínimo de recuperação de biogás, equivalente a 80% (600 $\text{mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato}}$). Valores superiores a este limite são indicados pela norma VDI 4630 (2006) como satisfatórios para avaliação da atividade do inóculo no ensaio de digestão anaeróbia.

A linha clara e contínua representa o valor de PBM teórico para a celulose, obtido com base na composição da celulose aplicada a estequiometria da digestão anaeróbia (Equação II), portanto considerada como o potencial máximo teórico de produção de metano (415 mL_N/gSV). A linha clara pontilhada representa o valor médio reportado por Kreuger et al. (2011) para ensaios de digestibilidade anaeróbia em substratos celulósicos ($350 \pm 30 \text{ mL}_N/\text{gSV}$). A determinação de metano passou a ser realizado em 2014 (a partir do ensaio 8) por disponibilidade instrumental.

Figura 13. Resultados de performance do inóculo sob aclimação para ensaios de PBB e PBM de amostra padrão de celulose microcristalina.



PBB: Potencial bioquímico de biogás; PBM: Potencial bioquímico de metano; Kreuger et al. (2011) = ($350 \pm 30 \text{ mL}_N \text{ CH}_4/\text{gSV}_{\text{adicionado}}$).

Os ensaios sinalizados de 1 a 3 foram realizados ao mesmo tempo, com amostra do inóculo aos 21 dias de aclimação e submetidos a três diferentes pré-tratamentos (1= sem pré-tratamento; 2= após peneiramento; 3= após peneiramento e diluição 10% m/v). O ensaio 1 resul-

tou em valores com elevada dispersão e com valores inferiores ao limite mínimo de recuperação. Já os valores do ensaio 2 apresentaram resultados com menor variância e superiores ao valor de referência. Os resultados do ensaio 3, apesar de serem bastante reprodutíveis (baixo desvio padrão) não apresentaram valores de recuperação satisfatórios.

Com base nestes primeiros resultados foi possível constatar que a redução do teor de sólidos da amostra de inóculo contribuiu para a homogeneidade de resultados de recuperação de biogás. Além disso, o uso de estratégia de diluição do inóculo antes do ensaio de PBB não foi satisfatória. Em função do alto teor de sólidos do inóculo no primeiro período de aclimação e com base nestes resultados de desempenho, optou-se em manter o inóculo sob repouso até o dia 70 e fazer uso da estratégia de peneiramento, diluição e reinoculação no reator de PVC/PTFE. Os demais ensaios (≥ 4) foram resultados de PBB e PBM realizados em períodos sequenciais e respeitando a cronologia dos ciclos de aclimação do inóculo no reator em laboratório.

A partir do ensaio 8, houveram melhorias no ensaio de digestão anaeróbia. No momento da incubação dos ensaios nos sistemas de eudiômetros, o inóculo passou a ser previamente peneirado em malha de 1 mm de diâmetro e o passou a ser utilizado gás nitrogênio para retirada de oxigênio no headspace dos reatores de 250 mL de vidro.

Após o ensaio 14, o número de provas (número de reatores acoplados a eudiômetros) passou de 15 para 30 unidades. Isso fez aumentar de 2,5 para cerca de 6 litros a quantidade de inóculo aclimatado, ou seja, aumentou a quantidade retirada do reator de PVC/PTFE a cada ciclo. Além disso, até o ensaio 13 os ciclos de aclimação eram realizados em períodos de 45 dias. Após o ensaio 14 os ciclos foram reduzidos para 30 dias.

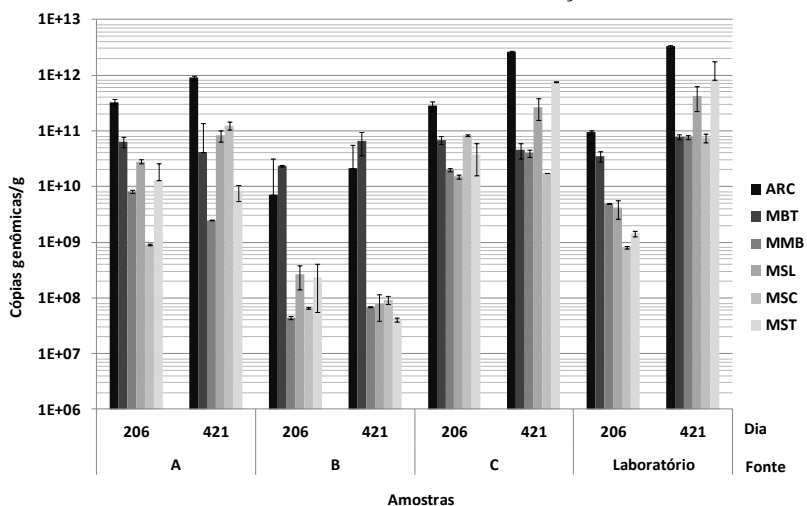
Todos os resultados de PBB, a contar do ensaio 4, apresentaram resultado satisfatório ($> 80\%$ de recuperação). Mesmo com as mudanças ocorridas no volume do reator e nos ciclos de reinoculação, não foram observadas variações negativas no desempenho do inóculo aos ensaios de PBB. Pelo contrário, é possível visualizar uma tendência de pequenos incrementos de desempenho do inóculo com assar do tempo, resultando em recuperação superior a 99% na recuperação de biogás nos ensaios 19 a 23.

Os resultados de PBM (a partir do ensaio 8) também apresentaram coerência com a faixa de valores esperados para a celulose. Exceção aos ensaios 10 e 11, onde ocorreram problemas relacionados a calibração de sensores do analisador de metano. Após manutenção do equipamento os desempenhos nos ensaios de PBM retornaram a normalidade.

5.1.3 Avaliação microbiológica

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos por qPCR e que representam a distribuição de microrganismos nos inóculos iniciadores A, B C e sob aclimação, para amostras coletadas durante os dias 206 (outubro de 2013) e 421 (maio de 2014). As barras representam a observação de cópias genômicas (por g de amostra) para Arqueas totais (ARC), *Methanobacteriales* (MBT), *Methanomicrobiales* (MMB); *Methanosarcinales* (MSL), *Methanosarcinaceae* (MSC) e *Methanosaetaeaceae* (MST).

Figura 14. Concentração de arqueas metanogênicas para amostras dos inóculos iniciadores e aclimatado, referentes aos dias de aclimação 206 e 421.



ARC: Arqueas totais; MBT: *Methanobacteriales*; MMB: *Methanomicrobiales*; MSL: *Methanosarcinales*; MSC: *Methanosarcinaceae*; MST: *Methanosaetaeaceae*

É possível visualizar que as amostras de cada inóculo iniciador apresentaram comportamentos similares quanto a distribuição das espécies metanogênicas. Todos os inóculos iniciadores contribuíram como fonte de arqueas para o inóculo sob aclimação, sendo o inóculo C em maior grau e o inóculo B em menor grau.

Considerando as MBT e MMB pertencentes ao grupo de metanogênicas hidrogenotróficas e as MSL (incluindo MSC e MST) representantes do grupo de metanogênicas acetoclásticas, é possível verificar que os inóculos A e C apresentaram equilíbrio entre estes grupos de metanogê-

nicas, apesar de o inóculo A ter apresentado menor proporção de MMB nas duas amostragens e o inóculo C apresentar cerca de uma ordem de grandeza superior (10^{11} - 10^{12}) na proporção de MSL. Já o inóculo B apresentou a menor incidência de arqueas totais em comparação com os outros inóculos, porém foi o único inóculo que apresentou alta proporção de MBT com relação os demais grupos.

Apesar do número de avaliações ter sido limitado a duas amostras, é possível verificar uma tendência de melhoria no equilíbrio populacional de metanogênicas no inóculo sob aclimação. Essa suposição é baseada nos resultados das amostras do inóculo aclimatado em laboratório (amostra “Laboratório”, Figura 11) entre o dia 206 e dia 421. Em primeiro lugar, pelo aumento da população de arqueas e todos os grupos de metanogênicas; em segundo, pelo aumento proporcional de acetoclásticas entre a primeira e a segunda amostragem. Essa observação pode estar relacionada com a melhoria de desempenho observada nos ensaios de PBB e PBM no mesmo período (ensaios 8 e 15, Figura 10).

5.1.4 Avaliação interlaboratorial

Duas amostras, uma de silagem de milho e outra de resíduo seco de destilaria constituída de grãos e solúveis (DDGS, do inglês dried distilled grain with soluble), foram fornecidas pelo Centro Alemão de Pesquisas em Biomassa (DBFZ). As amostras de referência foram subamostras de substratos do Ensaio Interlaboratorial da Associação Analítica Alemã de Institutos de Pesquisa Agrícola (VDLUFA, 2014). As amostras foram analisadas nos laboratórios da Embrapa e no laboratório do DBFZ, em duas bateladas (uma em 2013 e outra em 2014), no mesmo período e sob condições de ensaio similares conforme recomendações da norma VDI 4630 (2006).

Além disso, outras 4 amostras: celulose, gelatina, cama de aviário e lodo seco de ETE, provenientes do Estudo Interlaboratorial em Digestão Anaeróbia da Rede BiogásFert (STEINMETZ et al., 2015), foram avaliadas no laboratório da Embrapa entre os anos de 2014 e 2015.

Todos os ensaios realizados na Embrapa utilizaram inóculo proveniente do reator PCV/PTFE e os resultados são apresentados na Tabela 18. A maior parte das amostras avaliadas (excessão da amostra lodo seco de ETE) representa uma grande variedade de substratos agropecuários. Após comparação entre os resultados de PBB e PBM da é possível verificar que não ocorreram diferenças significativas, de acordo com o teste T, entre os valores obtidos pelos laboratórios do DBFZ e da Embrapa. Isso demonstra similaridade na performance do inóculo produzi-

do e aclimatado na Embrapa e o inóculo do laboratório do DBFZ, o qual é coletado de uma planta que realiza co-digestão de dejetos de bovino com silagem diversas.

Tampouco foi verificada diferença entre os valores de referência das amostras do interlaboratorial da Rede BiogásFert e os resultados obtidos pelo laboratório da Embrapa. Amostra de celulose representa substratos com alto teor de carboidratos e pode simular condições de amostras provenientes de culturas energéticas ou substratos da silvicultura (ex.: resíduos da extração e processamento de madeira, resíduos de poda ou outros resíduos agrícolas). Amostra de gelatina representa substratos com elevado teor de proteínas e a digestão pode ser comparada com resíduos com elevado teor de nitrogênio (ex.: resíduo de alimentos, dejetos de animais e resíduos de abatedouros). Cama de aviário e lodo seco de ETE são amostras de fonte natural.

Tabela 18. Comparações entre resultados de PBB e PBM para amostras de referência.

Substrato	Referência			
	PBB (mL _N /g _{SV})		PBM (mL _N /g _{SV})	
	Média (DP)	n	Média (DP)	n
DDGS*	647 (16) ^a	6	398 (10) ^b	6
Silagem de milho*	712 (42) ^c	6	370 (22) ^d	6
Celulose[†]	719 (99) ^e	22	316 (74) ^f	33
Gelatina[†]	542 (308) ^g	15	315 (139) ^h	18
Cama de aviário[†]	248 (117) ⁱ	22	153 (33) ^j	34
Lodo ETE seco[†]	413 (143) ^k	17	180 (53) ^l	21
Este estudo				
DDGS	664 (22) ^a	6	414 (13) ^b	6
Silagem de milho	669 (32) ^c	6	375 (12) ^d	6
Celulose	725 (2) ^e	3	341 (13) ^f	3
Gelatina	583 (37) ^g	3	257 (16) ^h	3
Cama de aviário	265 (16) ⁱ	3	164 (10) ^j	3
Lodo ETE seco	408 (8) ^k	3	184 (3) ^l	3

*Resultados obtidos pelo laboratório do Centro Alemão em Pesquisa em Biomassa (DBFZ) seguindo as mesmas condições de ensaio. [†]Valores de referência definidos pela média e DP robustos, dos laboratórios que apresentaram resultados satisfatório no Estudo Interlaboratorial em Digestão Anaeróbia da Rede BiogásFert (Steinmetz et al., 2015); DDGS = amostra de resíduo seco de destilaria (dried distilled grain with soluble); DP = desvio padrão; n = tamanho da amostra; letras iguais representam que não há diferença significativa entre o intervalo de valores de acordo com o teste T (95% de significância).

Baseado nisso, é possível reconhecer a eficiência e a atividade do inóculo anaeróbio aclimatado para realizar ensaios de digestão anaeróbia de diferentes substratos, especialmente os substratos de origem agropecuária.

5.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO COM DROGAS VETERINÁRIAS

Como descrito anteriormente, com a finalidade de investigar a interação das drogas veterinárias no processo de digestão anaeróbia, foram realizados dois experimentos: um avaliou a toxicidade de 5 compostos pertencentes ao grupo das tetraciclinas e utilizados como terapêuticos na produção animal; outro experimento investigou a inibição de 4 substâncias usadas como profiláticos e/ou aditivos na alimentação dos animais.

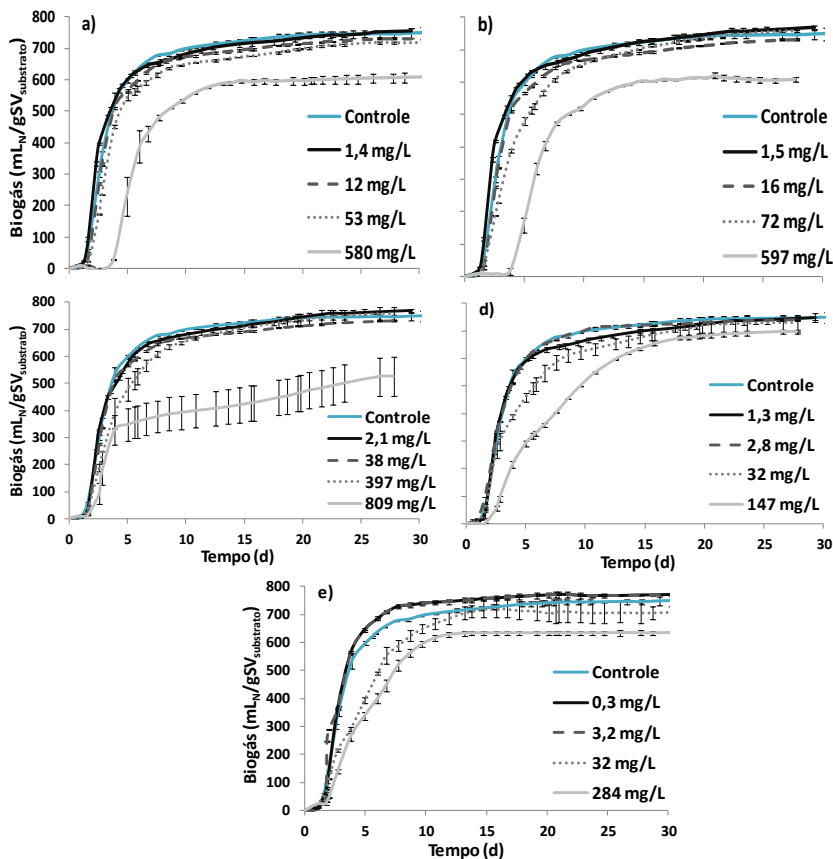
5.2.1 Tetraciclinas

A Figura 15 apresenta o perfil de produção específica cumulativa de biogás, em função do tempo, para os ensaios de digestão anaeróbia da amostra padrão de celulose microcristalina na presença de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, metaciclina e doxiciclina.

Pelos perfis observados, é possível notar que existe uma tendência de redução na quantidade de biogás produzida ao aumentar a concentração dos antibióticos adicionados. Os ensaios com adição de tetraciclina (a) e clortetraciclina (b) apresentaram curvas de produção de biogás com perfil muito semelhante, caracterizadas pelo aumento do tempo da fase de adaptação nos dias iniciais (de aproximadamente 1,5 para cerca de 4 dias nas concentrações mais altas). Supõe-se que estes dois compostos podem ter influenciado a latência de microrganismos produtores de enzimas que hidrolisam a celulose ou mesmo prejudicaram a ação inicial de outros grupos de microrganismos fermentativos (MILLER; WOLIN, 1995; YU et al., 2012).

Nos ensaios com a oxitetraciclina (c) percebe-se que existe pouca influência para as concentrações até 397 mg/L, porém, após o quarto dia de digestão o ensaio com concentração de 809 mg/L sofreu uma grande queda na produção de biogás que se propaga até o final do teste. Já os ensaios com metaciclina (d) e doxiciclina (e) demonstraram perfil similar nos primeiros 12 dias de digestão, diferenciando-se ao final do ensaio. Enquanto a doxiciclina manteve a inibição após o 12º dia, os ensaios com maiores concentração de metaciclina recuperam a produção de biogás aproximando dos resultados dos ensaios com concentrações menores.

Figura 15. Perfil do volume acumulado de biogás em função do tempo de digestão de celulose microcristalina na presença de concentrações crescentes de: a) tetraciclina, b) clortetraciclina, c) oxitetraciclina, d) metaciclina e e) doxiciclina.



O efeito de inibição pode ser observado também pela influência causada nas velocidades de produção de gás. Na Tabela 19 estão demonstradas as médias das velocidades máximas específicas de geração de biogás ($\mu_{Pm\acute{a}x}$), obtidas pela média dos valores máximos após aplicação da Equação X nos ensaios de digestão da celulose com as tetraciclina. Também estão relatados os tempos em que a velocidade máxima é observada. O valor de referência de velocidade máxima específica na degradação do padrão de celulose foi de $65 \pm 7 \text{ mL}_N/(\text{gSV}_{in\acute{o}culo} \cdot \text{d})$ e este máximo ocorre entre os dias 2,1 e 2,5. Com exceção da oxitetraciclina, é possível constatar que existe uma tendência de redução na velocidade

específica máxima a medida que a concentração do antibiótico aumenta. Também é relevante o aumento do tempo em que a velocidade máxima ocorre, especialmente para a tetraciclina e a clortetraciclina que pode ter relação direta com o aumento da fase de adaptação citada anteriormente.

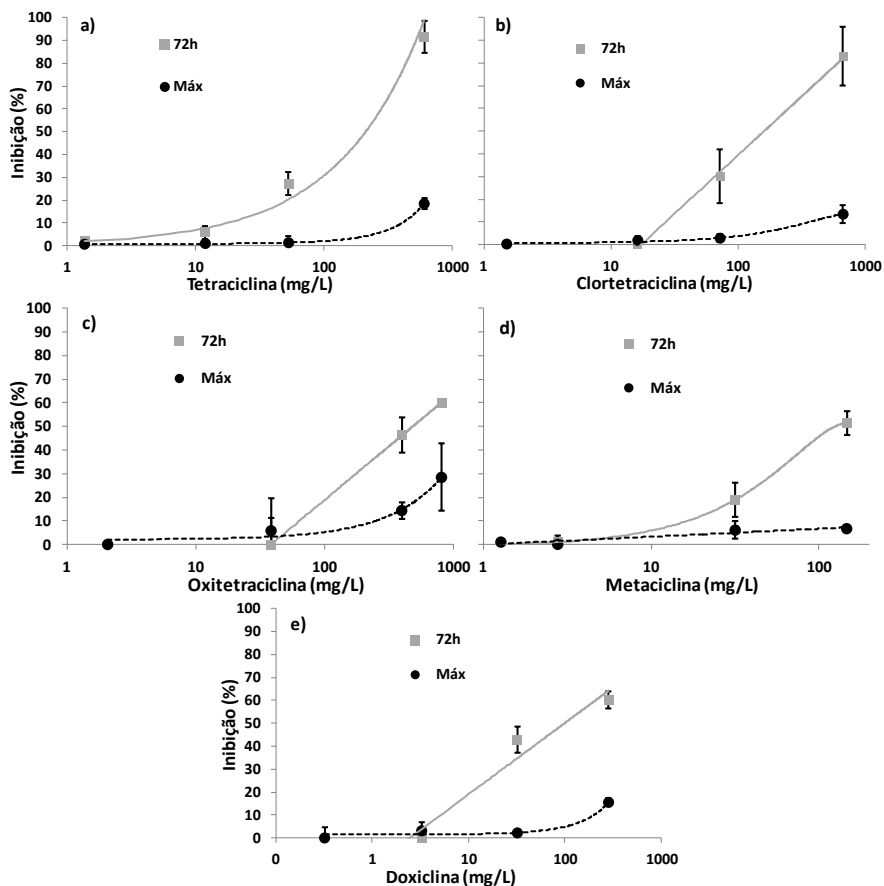
É importante relatar que em nenhum dos tratamentos houve variações significativas de pH. No início dos ensaios o pH nos reatores foi de $7,73 \pm 0,04$ e após 30 dias de digestão foi de $7,54 \pm 0,07$. Isso demonstra que não houve limitações de alcalinidade e que os processos inibitórios não estão vinculados a variações bruscas de pH.

Tabela 19. Média das velocidades máximas específicas de geração de biogás e tempo de ocorrência de máxima para cada concentração das tetraciclinas investigadas.

Tetraciclina				
Concentração (mg/L)	1,4	12	53	580
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} .d)]	71 ± 3	56 ± 6	55 ± 4	35 ± 7
tempo (d)	2,3	2,8	2,8	4,9
Clortetraciclina				
Concentração (mg/L)	1,5	16	72	597
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} .d)]	73 ± 4	56 ± 5	37 ± 6	31 ± 3
tempo (d)	2,3	2,8	2,8	6,0
Oxitetraciclina				
Concentração (mg/L)	2,1	38	397	809
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} .d)]	63 ± 5	63 ± 6	62 ± 6	70 ± 8
tempo (d)	2,5	2,6	2,8	2,8
Metaciclina				
Concentração (mg/L)	1,3	2,8	32	147
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} .d)]	62 ± 4	46 ± 6	47 ± 5	31 ± 10
tempo (d)	2,3	2,6	2,6	2,8
Doxiciclina				
Concentração (mg/L)	0,3	3,2	32	284
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} .d)]	63 ± 6	67 ± 3	40 ± 5	26 ± 9
tempo (d)	2,7	1,8	2,0	2,7

A partir dos volumes de biogás produzido após 72 horas (Biogás_{72h}) e ao final do processo de digestão (Biogás_{máx}), foram calculados os percentuais de inibição por meio da Equação XI. Desta forma, foram obtidos os valores de inibição que permitiram a confecção dos gráficos demonstrados na Tabela 16. Os gráficos representam o perfil dos modelos de regressão para inibição do Biogás_{72h} e do Biogás_{máx} em função das concentrações de tetraciclinas estudadas. As equações referentes aos modelos de regressão que obtiveram melhor ajuste aos resultados experimentais estão apresentadas na Tabela 20.

Figura 16. Perfil dos modelos de regressão de inibição do Biogás_{72h} e do Biogás_{máx} em função das concentrações de tetraciclinas avaliadas.



Biogás_{72h}: inibição no volume de biogás acumulado após 3 dias de incubação;
Biogás_{máx}: inibição no volume máxima de biogás acumulado ao final da digestão.

Torna-se importante citar que a substância inibidora controle 3,5-diclorofenol apresentou inibição do Biogás_{72h} de $28 \pm 6\%$, o que considera os ensaios de inibição válidos ($> 20\%$) de acordo com a norma ISO 13641-1 (ISO, 2003). Porém, de acordo com a própria norma é usual que valores próximos a 50% de inibição quando aplicado a lodos anaeróbios obtidos do tratamento de efluentes sanitários (domésticos e/ou

urbanos). A diferença entre o valor teórico e o obtido neste estudo pode ser um indicativo que o inóculo aclimatado ou obtido de sistemas de codigestão com dejetos de animais possa apresentar maior resistência à ação do inibidor em questão.

Tabela 20. Equações de regressão que apresentaram melhor ajuste aos pontos experimentais de inibição do Biogás_{72h} e do Biogás_{máx} para cada tetraciclina avaliada e estimativa das CI₁₀ e CI₅₀.

Parâmetro	Regressão	R ²	CI ₁₀ mg/L	CI ₅₀ mg/L
Tetraciclina				
Biogás _{72h}	$y=1,5311x^{0,6505}$	0,9803	19	219(207-231)
Biogás _{máx}	$y=0,005x^2+0,0095x+0,7344$	0,9999	414	1370(1339-1401)
Clortetraciclina				
Biogás _{72h}	$y=22,449\ln(x)-63,957$	0,9979	27	193(103-283)
Biogás _{máx}	$y=-0,00002x^2+0,0333x+0,698$	0,9938	372	>> 2000
Oxitetraciclina				
Biogás _{72h}	$y=19,708\ln(x)-71,845$	0,9999	68	495(361-629)
Biogás _{máx}	$y=0,000001x^2+0,0316x+2,0988$	0,9757	287	1908(1354-2446)
Metaciclina				
Biogás _{72h}	$y=-0,0024x^2+0,718x-1,4238$	0,9997	18	142(75-208)
Biogás _{máx}	$y=2,4337\ln(x)-1,0729$	0,9262	127	>> 2000
Doxiciclina				
Biogás _{72h}	$y=13,506\ln(x)-12,099$	0,9498	5,1	110(98-122)
Biogás _{máx}	$y=0,00003x^2+0,0281x+1,4334$	0,9389	268	> 2000

Biogás_{72h}: base no volume de biogás acumulado em 3 dias de incubação; Biogás_{máx}: base no volume máximo de biogás acumulado ao final da digestão; R²: coeficiente de correlação; CI₁₀: estimativa da concentração que promove 10% redução no volume de biogás; CI₅₀: estimativa da concentração que promove 50% de redução no volume de biogás. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95% baseado no erro padrão.

Com base na avaliação da variância do ensaio com o padrão de celulose, foram definidos os limites de detecção (LD=3s) e quantificação (LQ=10s) na inibição na geração de biogás. Portanto faixas de concentração que geraram inibições entre 3,1% (LD) e 10% (LQ) podem ser consideradas com atividade inibidora, mas apenas concentrações superiores a 10% de inibição podem ser consideradas para ser quantificadas (IUPAC, 2009). Para fins práticos, os valores de CI₁₀ expressos na Tabela 20 podem ser considerados como os limites mínimos de concentração em que o antibiótico expressa inibição. Valores inferiores podem ser confundidos com variações do método de análise.

A comparação dos perfis de inibição para $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ e para $\text{Biogás}_{\text{máx}}$, e também por comparação dos valores de CI_{10} e CI_{50} , de um mesmo antibiótico permite confirmar que a inibição é mais acentuada no período inicial de degradação da celulose. Neste caso, por comparação da média da CI_{50} para o parâmetro $\text{Biogás}_{72\text{h}}$, entre os antibióticos, a maior toxicidade foi observada para doxiciclina (110 mg/L), seguida da metaciclina (142 mg/L), da clortetraciclina (193 mg/L), da tetraciclina (219 mg/L) e por fim da oxitetraciclina (495 mg/L). Porém, mesmo que exista uma tendência de inibição decrescente na ordem citada, é necessário levar em consideração o intervalo de confiança gerado para a estimativa de valores. Neste caso é somente possível afirmar que a toxicidade da oxitetraciclina foi inferior às demais para a produção de biogás nos primeiros 3 dias de inoculação.

A inibição do parâmetro $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ foi mais expressiva para tetraciclina e oxitetraciclina em comparação com os outros compostos. Porém os valores de concentração estimados para CI_{50} de $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ foram muito maiores que os estimados para CI_{50} de $\text{Biogás}_{72\text{h}}$, isso demonstra a redução do efeito de inibição ao longo do tempo. Este comportamento também foi identificado com relação a produção de metano ($\text{Biogás}_{\text{máx}}$) que teve perfil de inibição muito similares aos observados para produção de biogás. As concentrações médias de metano encontradas nos ensaios foram de $55 \pm 5\%$ para tetraciclina, $54 \pm 5\%$ para clortetraciclina, $55 \pm 4\%$ para oxitetraciclina, $56 \pm 4\%$ para metaciclina e $57 \pm 2\%$ (v/v) para doxiciclina.

Gartiser et al. (2007) efetuaram a investigação da inibição da produção de biogás por 16 antibióticos, dentre eles tetraciclina e clortetraciclina. Os autores usaram inóculo de reator anaeróbio de estação de tratamento de efluentes sanitário, aplicando método também baseado no protocolo da norma ISO, porém com avaliação da produção de gás após 10 dias de digestão. Os autores reportaram valores de CI_{10} de 2,1 mg/L e CI_{50} de 37,3 mg/L para tetraciclina e CI_{10} de 4,9 mg/L e CI_{50} de 43,9 mg/L para clortetraciclina, o que consideraram como atividade inibitória moderada (CI_{50} entre 24 a 1000 mg/L). Estes valores de inibição foram condizentes aos encontrados anteriormente por Sanz et al. (1996) para clortetraciclina (40 mg/L) em ensaios usando como substrato mistura de ácidos orgânicos (acetato, propionato e butirato) e como inóculo amostra de lodo de reator UASB de indústria de amido.

Em outro estudo descrito por Loftin et al. (2005) foram realizados testes de dose-resposta na digestão de dejetos de suínos, a 22 °C, usando os antibióticos tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina. Para realização dos testes os autores utilizaram como inóculo amostra proveniente

de lagoas anaeróbias de tratamento de dejetos de suínos. Usando uma concentração de 10 mg/L e avaliando a produção de gás após 72 horas, os autores relataram as inibições médias de 7,5 a 12% para tetraciclina, de 10 a 19% para clortetraciclina e de 9,4 a 13% para oxitetraciclina.

Já Álvarez et al. (2010) relataram a inibição de 50% na produção de metano da digestão anaeróbia (a 35 °C) de dejetos de suínos quando presentes concentrações de aproximadamente 9 mg/L de tetraciclina e clortetraciclina.

Apesar das diferenças metodológicas, se comparado com os valores de toxicidade (Biogás_{72h}) obtidos na Tabela 20 com os reportados na literatura, é possível confirmar que existe um potencial de inibição atribuído as tetraciclinas na digestão anaeróbia. É conhecido que as tetraciclinas são consideradas antibióticos de amplo espectro, ativas tanto contra diversos microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos e sua ação consiste na inibição da síntese de proteínas, impedindo assim a replicação celular de bactérias patogênicas. Porém em função da baixa seletividade das tetraciclinas, esta ação também pode ocorrer nos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia (PRADO; OCHOA; AMRANE, 2009).

Após os ensaios de digestão, amostras do material digerido foram analisadas por LC-MS/MS para avaliar a concentração residual de cada antibiótico. A Tabela 21 demonstra os teores de antibióticos adicionados no início do ensaio, analisados após o final da digestão e expectativas de concentrações ao final do ensaio com base nas concentrações iniciais e tempos de meia vida descritos na literatura.

É possível perceber que existe a redução da concentração após o ensaio de digestão anaeróbia para todas as concentrações e todos os compostos avaliados. A redução da concentração está atribuída a degradação e consequentemente estão vinculados com a redução do efeito inibitório com o passar do tempo. Mesmo para os tratamentos com as concentrações mais altas de cada antibiótico, a concentração final observada foi menor que a concentração estimada para CI_{10} do parâmetro $\text{Biogás}_{máx}$. Não foi possível determinar a concentração de doxiciclina por problema ocorrido durante a preservação das amostras, o que impossibilitou a análise das mesmas.

Na Tabela 21 estão demonstradas também as estimativas de concentração possíveis de serem encontradas após os 30 dias de digestão anaeróbia, com base na concentração inicial de cada tratamento e nos valores reportados na literatura para o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para decréscimo das concentrações de cada composto. É possível verificar que as concentrações observadas ao final dos ensaios são geralmente

inferiores aos valores estimados. Ou seja, há indícios que a degradação dos compostos nas condições avaliadas neste estudo é mais rápida que outros estudos similares.

Mesmo assim, se avaliarmos os percentuais de redução dos antibióticos é possível verificar que existe concordância com teores de degradação reportados por outros autores. Apesar dos tratamentos com concentrações mais elevadas de tetraciclina e metaciclina terem apresentado redução de 46,04 e 57,13%, respectivamente, todos os demais tratamentos apresentaram reduções de concentração entre 76,63 e 98,75%. Estes valores concordam com os observados por Tong et al. (2012) que encontrou 88,6-91,6% de redução para tetraciclina e entre 97,7-98,2% de redução para clortetraciclina após 45 dias de digestão anaeróbia de dejetos de suínos sob 35 °C.

Já Turker et al. (2013) avaliaram a digestão anaeróbia, a 37 °C, de dejetos de bovinos medicados com oxitetraciclina (0,8 a 3,4 mg/L no dejetos) e verificaram a inibição de 17 a 24% na $Biogás_{máx}$. Estes mesmos autores reportaram 55 a 70% de redução nas concentrações do antibiótico após 30 dias de digestão. Os autores também identificaram a redução de atividade de *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* e *Methanosarcinaceae* e relataram como as principais causas da redução na produção de biogás.

Por fim, apesar de não encontrados resultados de estudos brasileiros sobre a incidência de tetraciclina nos dejetos de suínos, é possível efetuar um paralelo com resultados reportados ao redor do mundo. Neste caso, pode-se considerar as maiores concentrações relatadas nos dejetos para tetraciclina de 98,8 mg/L, oxitetraciclina de 354 mg/L, clortetraciclina de 764,4 mg/L, metaciclina de 5,43 mg/L e doxiciclina de 59,6 mg/L (CHEN et al., 2012b; PAN et al., 2011; ZHAO et al., 2010). Se confrontarmos estes valores de concentração com os valores de CI_{10} da Tabela 20, veremos que é possível que as tetraciclina desempenhem atividade inibidora. Exceção para o antibiótico metaciclina que apresentou concentração de ocorrência menor que o CI_{10} (18 mg/L). Portanto, se dejetos contendo as tetraciclina, nos níveis citados, forem digeridos com substratos agrícolas será provável a interferência na recuperação de biogás nos níveis próximos aos obtidos neste estudo.

Tabela 21. Concentrações das tetraciclinas adicionadas, observadas e expectativas baseadas no tempo de meia vida.

Antibiótico	Concentração		Referência		Redução %	
	inicial adicionada mg/L	final observada mg/L	$t_{1/2}$ d ⁻¹	Condições Substrato/T(°C)		Concentração final esperada mg/L
Tetraciclina	1,4 ± 0,3	0,20 ± 0,01	17,2 ^a	Dejeto equino/ambiente	0,31-1,03	85,80
	12,0 ± 0,2	0,41 ± 0,11	69 ^b	Sintético/35	2,72-8,78	96,54
	53,3 ± 2,3	6,07 ± 0,58	14-18 ^c	Dejeto suíno/35	12,07-39,43	88,61
	580,3 ± 40,3	313,14 ± 47,71			131,40-429,31	46,04
Clortetraciclina	1,5 ± 0,7	< 0,25	6,8-13,5 ^a	Dejeto equino/ambiente	0,05-0,32	98,40
	16,3 ± 0,4	0,35 ± 0,03	<6 ^b	Sintético/35	0,51-3,49	97,84
	72,3 ± 7,5	5,11 ± 1,37	10 ^c	Dejeto suíno/35	2,26-15,49	92,93
	597,4 ± 91,9	107,5 ± 34,26			18,67-128,03	82,01
Oxitetraciclina	2,1 ± 0,1	< 0,20	17,7-31,1 ^a	Dejeto equino/ambiente	0,65-1,45	97,23
	38,4 ± 0,2	0,48 ± 0,09	39 ^b	Sintético/35	11,86-26,49	98,75
	397,1 ± 10,5	32,71 ± 5,78	56 ^d	Dejeto bovino/35	122,65-273,92	91,76
	809,3 ± 37,1	189,17 ± 16,57			249,97-558,27	76,63
Metaciclina	1,3 ± 0,1	< 0,10				97,64
	2,8 ± 0,1	< 0,10	NE	NE	NE	96,53
	31,7 ± 7,7	7,40 ± 1,75				76,67
	147,6 ± 3,8	63,28 ± 8,35				57,13
Doxiciclina	0,3 ± 0,1	NA			0,20-0,23	ND
	3,2 ± 0,1	NA	> 77 ^a	Biosólidos/3,4-26,5	2,15-2,44	ND
	32,2 ± 0,6	NA	52,5 ^f	Dejeto suíno/20 ± 3,5	21,67-24,58	ND
	284,4 ± 45,5	NA			191,39-217,09	ND

a-Storteboom et al. (2007); b-Lofth et al. (2008); c-Tong et al. (2012); d-Arkan et al. (2006); e-Chenxi et al. (2008); f-Szatmári et al. (2011); $t_{1/2}$ -tempo de meia vida; NE-valores de referência não encontrados; NA-não analisado.

5.2.2 Profiláticos e/ou promotores de crescimento

O segundo experimento com drogas veterinárias investigou a inibição de 4 substâncias usadas como profiláticos e/ou aditivos na alimentação dos animais. As substâncias utilizadas neste estudo foram: tilosina, tiamulina, lincomicina e gentamicina. Os três primeiros são de uso comum como aditivos na ração de suínos, sendo o último também usado com frequência como profilático e administrado por dissolução na água fornecida aos animais.

Na Figura 17 são demonstrados os perfis de produção específica cumulativa de biogás da amostra, em função do tempo, obtidos pela digestão anaeróbia em batelada de amostra padrão de concentrado para bovinos na presença de concentrações crescentes dos profiláticos avaliados neste experimento. A $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ obtida para os ensaios com a amostra padrão isoladamente (sem adição de antibióticos) foi de $657 \pm 6 \text{ mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato}}$, em acordo com o valor de referência de $660 \pm 12 \text{ mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato}}$.

Entre os tratamentos não houve diferenças significativas entre os teores de metano produzidos. As concentrações médias de metano no biogás foram $53 \pm 1\%$ para os ensaios com tiamulina e também para tilosina, $52 \pm 1\%$ para lincomicina e $52 \pm 2\%$ (v/v) para gentamicina.

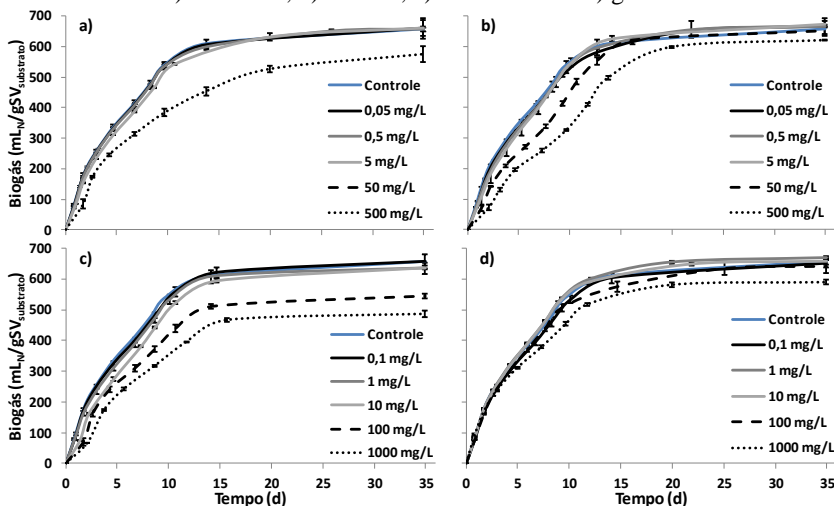
A substância controle 3,5-diclorofenol apresentou inibição da $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ de $26 \pm 4\%$, o que considera os ensaios de inibição válidos ($> 20\%$) de acordo com a norma ISO 13641-1 (ISO, 2003). Porém, da mesma forma que o ocorrido com os ensaios com as tetraciclinas, a diferença entre o valor teórico (50%) e o obtido neste experimento é mais um indicativo que o inóculo obtido de sistemas de codigestão apresenta menor suscetibilidade à ação do inibidor.

Avaliando o perfil de produção de biogás apresentados na Figura 17 é possível identificar que não houve atrasos no início da produção de biogás. Ou seja, não se percebe a ocorrência de uma fase de adaptação, pois todos os ensaios produziram gás logo no primeiro dia incubação, porém houve produção em quantidades diferentes. Durante os 5 primeiros dias é perceptível menor produção de biogás para as concentrações mais elevadas de tiamulina (a), tilosina (b) e lincomicina (c). Nenhuma das concentrações de gentamicina (d) apresentaram inibição superior a 20% nos primeiros 5 dias de ensaio.

Na fase posterior ao 10º dia, os ensaios com concentrações de 500 mg/L de tiamulina, 100 e 1000 mg/L de lincomicina permanecem demonstrando inibições estáveis até o final dos 35 dias (com leve aumento na produção de gás para o ensaio com tiamulina). Já o teste com tilosina

demonstrou outro distúrbio na produção de biogás próximo ao dia 10, mas o sistema retomou a produção de gás e, por consequência, retomando o perfil dos outros tratamentos até o final dos 35 dias. Para a gentamicina ocorreu redução na produção de biogás após o 10º dia para as concentrações mais altas do antibiótico, porém essa diferença é bem menos representativa que os demais compostos avaliados.

Figura 17. Perfil de produção cumulativa de biogás, em função do tempo, da digestão de amostra de concentrado para bovinos na presença de concentrações crescentes de: a) tiamulina, b) tilosina, c) lincomicina e d) gentamicina.



Avaliando com mais detalhes o efeito de inibição com base nas velocidades específicas máximas de produção de biogás ($\mu_{Pm\acute{a}x}$) em cada ensaio, conforme dados apresentados na Tabela 22, é possível identificar que para algumas concentrações ocorre uma breve redução nas velocidades médias e aumento no tempo em que elas ocorrem. A $\mu_{Pm\acute{a}x}$ para o substrato controle (sem adição de antibiótico) foi de 43 ± 1 mL_N/(gSV_{inóculo}·d). O composto que essa redução ocorreu com maior intensidade foi a tilosina. Na concentração de 50 mg/L a tilosina promoveu dois valores de máxima velocidade [30 mL_N/(gSV_{inóculo}·d) aos 2,2 dias e 19 mL_N/(gSV_{inóculo}·d) aos 10,7 dias]. Isso também ocorreu na concentração de 500 mg/L [21 mL_N/(gSV_{inóculo}·d) aos 3,1 dias e 17 mL_N/(gSV_{inóculo}·d) aos 13,7 dias]. Essa alteração na velocidade máxima de produção de biogás ocorreu em menor grau para tiamulina e lincomicina, e bem menos perceptível para os ensaios com gentamicina.

Tabela 22. Médias das velocidades máximas específicas de produção de biogás e do tempo de ocorrência de máxima para cada concentração dos compostos investigados.

Tiamulina					
Concentração (mg/L)	0,05	0,5	5	50	500
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} ·d)]	41 ± 2	42 ± 1	38 ± 1	31 ± 2	37 ± 5
tempo (d)	1,7	1,7	1,7	2,2	2,6
Tilosina					
Concentração (mg/L)	0,05	0,5	5	50	500
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} ·d)]	40 ± 1	35 ± 2	32 ± 8	30 ± 6 (19 ± 4)	21 ± 3 (17 ± 2)
tempo (d)	1,7	1,7	2,2	2,2 (10,7)	3,1 (13,7)
Lincomicina					
Concentração (mg/L)	0,1	1	10	100	1000
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} ·d)]	41 ± 2	37 ± 2	38 ± 1	38 ± 4	25 ± 2
tempo (d)	1,7	1,7	2,2	2,6	3,7
Gentamicina					
Concentração (mg/L)	0,1	1	10	100	1000
$\mu_{Pm\acute{a}x}$ [mL _N /(gSV _{inóculo} ·d)]	39 ± 2	39 ± 1	40 ± 2	36 ± 1	33 ± 1
tempo (d)	1,7	1,7	1,7	1,7	0,8

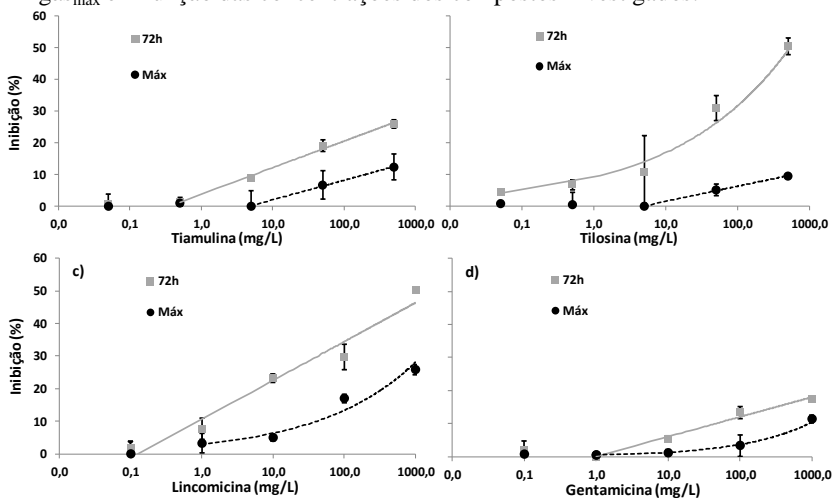
A partir do volume de biogás acumulado no terceiro dia (72 horas, sinalizado por Biogás_{72h}) e ao final do processo de digestão (Biogás_{máx}) foram calculados os percentuais de inibição por meio da Equação XI. Desta forma, foram obtidos os valores de inibição que permitiram a confecção dos gráficos demonstrados na Figura 18. Estes resultados são bastante superiores aos relatados na literatura. Sanz et al. (1996) relataram CI₂₀ para gentamicina de 35 mg/L e para tilosina de 15 mg/L na digestão de dejetos de suínos.

Os gráficos representam o perfil dos modelos de regressão para inibição da Biogás_{72h} e da Biogás_{máx} em função das concentrações dos antibióticos avaliados. As equações referentes aos modelos de regressão que obtiveram melhor ajuste aos resultados experimentais estão apresentadas na Tabela 23, assim como os valores de CI₁₀ e CI₅₀ para cada parâmetro.

A inibição da Biogás_{72h} foi mais acentuada nos ensaios com tilosina e lincomicina, seguida da tiamulina e da gentamicina. Apenas tilosina e lincomicina obtiveram estimativas de CI₅₀ mensuráveis, pois os demais compostos apresentaram valores muito superiores a 2000 mg/L e portanto considerados não possíveis de ocorrer em dejetos de suínos por

comparação com os valores das Tabela 9 e Tabela . Já a inibição do $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ seguiu a seguinte ordem: lincomicina > tiamulina \approx tilosina > gentamicina. Porém, como os valores de estimativa da CI_{50} extrapolaram 2000 mg/L também foi considerada insignificante a comparação com valores de concentração que seriam habitualmente esperados em dejetos de suínos.

Figura 18. Perfil dos modelos de regressão de inibição do $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ e do $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ em função das concentrações dos compostos investigados.



$\text{Biogás}_{72\text{h}}$: obtidos com base no volume de biogás acumulado em 3 dias de incubação; $\text{Biogás}_{\text{máx}}$: obtidos com base no volume máximo de biogás acumulado ao final da digestão;

Estes resultados são superiores aos relatados na literatura. Sanz et al. (1996) relataram CI_{20} para gentamicina de 35 mg/L e para tilosina de 15 mg/L na digestão de dejetos de suínos. Gartiser et al. (2007) obteve CI_{50} para gentamicina na faixa de 57,2-231,8 mg/L em ensaios de toxicidade seguindo a metodologia ISO, aplicados a lodo sanitário e usando como substrato extrato de leveduras. Em outro estudo, Loftin et al. (2005) efetuaram avaliações de inibição de produção de biogás após usando inóculo de lagoas anaeróbias de sistemas de tratamento de dejetos de suínos, onde reportaram que os antibióticos lincomicina e tilosina apresentavam platôs de inibição entre 20 a 45% sob doses de 1 e 25 mg/L.

Estas diferenças de toxicidade entre os valores reportados na literatura e os resultados obtidos neste experimento podem estar relacionadas com duas questões: 1º) menor sensibilidade do inóculo utilizado no experimento (proveniente de digestor que realizava codigestão) em comparação com os inóculos utilizados por outros autores (de dejetos de suínos ou de efluente sanitário); 2º) diferença no teor de sólidos (ou quantidade de biomassa microbiana) presente nos inóculos, já que os trabalhos da literatura utilizaram inóculos com teores entre 1 a 2% (m/m) de ST, enquanto que o inóculo obtido da planta de codigestão usado neste experimento apresentou 4,7% (m/m) de ST.

Tabela 23. Equações de regressão para inibição do $\text{Biogás}_{72\text{h}}$ e do $\text{Biogás}_{\text{máx}}$ para tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina, e estimativas das CI_{10} e CI_{50} para cada parâmetro.

Parâmetro	Regressão	R ²	CI ₁₀ mg/L	CI ₅₀ mg/L
Tiamulina				
Biogás_{72h}	$y=3,6439\ln(x)+3,766$	0,9939	5,2	>> 2000
Biogás_{máx}	$y=2,6798\ln(x)-4,1464$	0,9978	198	>> 2000
Tilosina				
Biogás_{72h}	$y=9,0347x^{0,2727}$	0,9706	1,4	498(462-534)
Biogás_{máx}	$y=2,0654\ln(x)-3,193$	0,9977	502	>> 2000
Lincomicina				
Biogás_{72h}	$y=5,1789\ln(x)+10,611$	0,9615	0,9	1890(1446-2286)
Biogás_{máx}	$y=3,0072x^{0,3237}$	0,9557	41	>2000
Gentamicina				
Biogás_{72h}	$y=2,6001\ln(x)+0,0629$	0,9498	45	>> 2000
Biogás_{máx}	$y=0,4518x^{0,4546}$	0,9389	906	>> 2000

$\text{Biogás}_{72\text{h}}$: base no volume de biogás acumulado em 3 dias de incubação; $\text{Biogás}_{\text{máx}}$: base no volume máximo de biogás acumulado ao final da digestão; R²: coeficiente de correlação; CI₁₀: estimativa da concentração que promove 10% de inibição na produção de biogás; CI₅₀: estimativa da concentração que promove 50% de inibição na produção de biogás. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95% baseado no erro padrão.

Porém, se considerarmos os valores de CI₁₀ da Tabela 23 como os valores mínimos para identificar a ocorrência de inibição, há expectativas de interferência na produção de gás nos primeiros dias de digestão, mesmo em baixas concentrações (0,9 a 5,2 mg/L) de lincomicina, tilosina e tiamulina.

Essa inibição que ocorreu nos primeiros dias da digestão remete a suspeita de que, mesmo nas concentrações de ocorrência nos dejetos de

suínos, existe a possibilidade de interação com outros efeitos de inibição. Por exemplo, Stone et al. (2010) e Dreher et al. (2012) identificaram o aumento do efeito inibitório da clortetraciclina quando na presença de tilosina na digestão anaeróbia de dejetos de suínos. Este fato foi relacionado pelos autores com distúrbios na população de metanogênicas, tanto nas consumidoras de acetato quanto nas que utilizam H_2 e CO_2 como precursoras de metano. Ji et al. (2013) identificaram IC_{50} para lincomicina em níveis de 3,5-5,7 mg/L. Estes autores relataram efeitos sinérgicos, em menor proporção, quando lincomicina foi ministrada em conjunto com antibióticos amoxicilina, kanamicina e ciprofloxacina. Além disso, eles também relataram forte sinergismo de inibição quando presente os metabólitos da digestão anaeróbia como: etanol, acetato, propionato e butirato. Os autores relacionaram estes resultados a possíveis reduções de desempenhos em reatores anaeróbios quando operados em condições de sobrecarga ou outras razões que levam ao acúmulo destes metabólitos.

Se avaliarmos os resultados da ocorrência dos ácidos orgânicos de cadeia curta após os ensaios de digestão obtidos no experimento, podemos efetuar uma inferência quanto aos possíveis mecanismos de interação com outras formas de inibição. A Tabela 24 apresenta as concentrações dos ácidos orgânicos, obtidos por análise cromatográfica, nas amostras após os ensaios de digestão anaeróbia. Foram avaliados a ocorrência de ácidos acético, propiônico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico, n-valérico, metil-valérico e caprótico. Os resultados apresentados na Tabela 24 são referentes amostras dos tratamentos com as maiores concentrações dos antibióticos avaliados, pois ilustra de maneira mais representativa a distribuição dos ácidos acumulados no processo. As amostras dos ensaios com a substância controle (sem adição de antibiótico) e com tiamulina não apresentaram concentrações significativas de nenhum dos ácidos analisados após os 35 dias de digestão.

Apesar do acúmulo de ácidos, em nenhum dos tratamentos houve variações significativas de pH. No início dos ensaios o pH nos reatores foi de $8,19 \pm 0,03$ e após 35 dias de digestão foi de $8,27 \pm 0,11$. Isso demonstra que não houve limitações de alcalinidade e que os processos inibitórios possivelmente não estão vinculados a variações de pH.

O acúmulo dos ácidos indica que a transformação do substrato em CH_4 e CO_2 possa ter sido prejudicada em função de possível desequilíbrio na atividade dos microrganismos metanogênicos e acetogênicos. Essa suspeita é baseada na elevada concentração de ácido acético e propiônico. Além disso, outros microrganismos responsáveis pela de-

gradação do ácido valérico podem ter sido inibidos nos ensaios com lincomicina e gentamicina.

Tabela 24. Concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta observados nas amostras após os ensaios de digestão anaeróbia, para os tratamentos com a maior concentração dos antibióticos.

Composto	Acético mg/L	Propiônico mg/L	iso-Butírico mg/L	iso-Valérico mg/L
Tiamulina	57 ± 1	240 ± 1	ND	ND
Lincomicina	194 ± 2	111 ± 1	96 ± 1	154 ± 2
Gentamicina	205 ± 1	659 ± 1	10 ± 1	116 ± 1

ND: Não detectado; Nenhum: tratamento controle sem adição de antibiótico; Tiamulina: 500 mg/L; Lincomicina e Gentamicina: 1000 mg/L.

Shimada et al. (2011) em estudos de longa duração (toxicidade crônica) da digestão de dejetos de suínos na presença de antibióticos macrolídeos, também identificaram acúmulo de ácidos, especialmente propiônico. Os autores verificaram que os antibióticos afetaram diretamente a ação de bactérias sintróficas oxidadoras de propionato, em especial do gênero *Syntrophobacter*, e inibiram indiretamente as *Methanosaeta*.

Por fim, apesar de não serem disponíveis dados de concentração de ocorrência de antibióticos em dejetos da produção de suínos no Brasil, porém, baseados na comparação máximas usualmente observadas ao redor do mundo (Tabela 9) e das estimativas de excreção para o uso profilático dos compostos tiamulina, tilosina, lincomicina e gentamicina (Tabela 10), é possível afirmar que pode ocorrer inibição durante a co-digestão dos dejetos com outros substratos agropecuários.

Porém a inibição aguda destes compostos é muito inferior se comparada com a exercida pelas tetraciclina, por exemplo. Mas é cauteloso afirmar que a inibição poderá ser intensificada a longo prazo (toxicidade crônica).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

Produção e manutenção de inóculo anaeróbio

O procedimento proposto para produção e aclimação de inóculo anaeróbio, em escala laboratorial sob condições mesofílicas, a partir de mistura de inóculos iniciadores, foi satisfatório para obter biomassa inoculante aos ensaios de digestão anaeróbia.

Os controles intralaboratoriais demonstraram que o inóculo produzido em laboratório apresentou atividade anaeróbia adequada para atender aos requisitos da norma VDI 4630. Os ensaios interlaboratoriais confirmaram eficácia equiparável deste inóculo, consequentemente dos ensaios de Produção Bioquímica de Biogás (PBB), com o do Laboratório de Centro Alemão de Pesquisa em Biomassa (DBFZ) e outros laboratórios brasileiros participantes do Estudo Interlaboratorial em Digestão Anaeróbia da Rede BiogásFert.

Além disso, o desempenho frente a diversidade de substratos avaliados permite inferir que o inóculo é adequado para uso em ensaios de digestão anaeróbia de substratos agropecuários.

Portanto, o procedimento de produção do inóculo em laboratório serve como referência para o uso em laboratórios de regiões que tenham dificuldade de acesso a coleta de inóculo anaeróbio em condições mesofílicas para aplicação aos ensaios de PBB de substratos agropecuários, especialmente países onde o mercado do biogás encontra-se em desenvolvimento.

Ensaio de toxicidade: tetraciclinas

Considerando as concentrações máximas de ocorrência de tetraciclinas em dejetos de suínos é possível afirmar que a digestão anaeróbia de substratos agropecuários com dejetos de suínos contaminados com estes antibióticos pode sofrer alterações significativas.

As tetraciclinas apresentaram toxicidade aguda (inibição de até 91% na produção de biogás após 72 horas) na faixa de concentrações dos compostos avaliados.

A toxicidade na digestão da celulose seguiu a seguinte ordem: doxiciclina \approx metaciclina > tetraciclina \approx clortetraciclina > oxitetraciclina.

Tetraciclina e clortetraciclina promoveram aumento do tempo da fase de adaptação (fase “lag”).

A digestão anaeróbia promoveu a degradação das tetraciclinas ao final do período de avaliação, com velocidades de degradação similares as reportadas na literatura para outros sistemas anaeróbios. As reduções dos compostos durante os ensaios foi dependente do teor inicial das tetraciclinas, apresentaram valores entre 46,04 e 98,75% de redução. Isso confirma a digestão anaeróbia sob condições mesofílicas como alternativa para redução destas drogas veterinárias nos dejetos.

Ensaio de toxicidade: profiláticos e promotores de crescimento

Os compostos avaliados neste caso foram menos tóxicos ao processo de digestão anaeróbia se comparados com as tetraciclinas. A inibição do Biogás_{72h} foi mais acentuada nos ensaios com tilosina e lincomicina, seguida da tiamulina e da gentamicina. A inibição do Biogás_{máx} seguiu a ordem: lincomicina > tiamulina ≈ tilosina > gentamicina. Porém, como todos os valores de estimativa da CI₅₀ extrapolaram 2000 mg/L também foi considerada imperceptível a comparação com valores de concentração que seriam habitualmente esperados em dejetos de suínos.

Apesar da menor inibição aguda causada pelos profiláticos, o favorecimento do acúmulo de ácidos orgânicos indica que a presença destes compostos pode favorecer outros processos inibitórios paralelos na digestão anaeróbia. Portanto, a concentração destes compostos no dejetos de suínos pode apresentar risco a longo prazo (forma crônica), apesar de ser em menor grau se comparado com os antibióticos utilizados de forma terapêutica. Entende-se que o risco inerente a ação das drogas veterinárias pode ser mitigado de acordo com as boas práticas de produção animal.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Elucidar os mecanismos que causam as interferências na produção de biogás. Em principal na inibição que causou aumento da fase de adaptação nos ensaios com tetraciclina e clortetraciclina e na diferença de perfil ocorrida para as diferentes concentrações (quando houve ou não queda na recuperação final de biogás).
- Estudar a inibição de substâncias representativas de outras classes de drogas veterinárias na digestão anaeróbia.
- Investigar possíveis efeitos de sinergismo que podem ser causados pela combinação das drogas veterinárias avaliadas neste estudo.

- Examinar se existem efeitos adversos ou geração de resistência aos antimicrobianos na digestão anaeróbia sob exposição crônica dos compostos profiláticos estudados.
- A carência de resultados da ocorrência de drogas veterinárias em dejetos de suínos no território brasileiro, causa extrema necessidade da execução de estudos para elucidar as concentrações destes compostos e os possíveis impactos.
- Realizar estudos de causa-efeito e de análise de risco baseados na ocorrência das drogas veterinárias no dejetos e a dispersões que ocorrem no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- ALCOCK, R. E.; SWEETMAN, A.; JONES, K. C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere*, v. 38, n. 10, p. 2247–2262, 1999.
- ÁLVAREZ, J. A. et al. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 22, p. 8581–8586, 2010.
- ANEEL. Resolução Normativa No 482, de 17 de abril de 2012: Estabelece as condições gerais para o acesso de microgeração e minigeração distribuída aos sistemas de distribuição de energia elétrica, o sistema de compensação de energia elétrica, e dá outras providên, 2012a. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/cedoc/ren2012482.pdf>>
- ANEEL. Chamada No 014/2012 Projeto Estratégico: “Arranjos técnicos e comerciais para inserção de geração de energia elétrica a biogás oriundo de resíduos e efluentes líquidos na matriz energética brasileira”Brazil, 2012b. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/PeD-2012-Chamada PE 14_23-07-12.pdf>
- ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, v. 59, n. 5, p. 927, 2009.
- ANP. RESOLUÇÃO ANP No 8, DE 30.1.2015 - Especificação do Biometano para uso residencial, comercial ou veicular. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/janeiro/ranp_8_2015.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=>](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/janeiro/ranp_8_2015.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=>)>.
- APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for Evaluation of Water and Wastewater. 22nd. ed. [s.l.] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 2, p. 192–201, jun. 2007.
- ARIKAN, O. A. et al. The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 7, p. 1637–1643, jul. 2006.

- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E2170-01 Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals Under Methanogenic Conditions, 2001.
- BAUER, C. et al. Methanogens in biogas production from renewable resources - A novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology*, v. 58, n. 7, p. 1433–1439, 2008.
- BELLI FILHO, P. et al. Tecnologias para o tratamento de dejetos de suínos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 5, n. 1, p. 166–170, abr. 2001.
- BELLI FILHO, P.; CASTILHO JUNIOR, A. B.; GOSMANN, H. A. Relatório: Inventário do potencial de geração de metano no Estado de Santa Catarina Florianópolis, 2010.
- BERNS, B. A.; SCHNICKE, H.-P.; BOMBONATTI, P. DESENVOLVIMENTO DE UM ANTEPROJETO PARA A IMPLANTAÇÃO DE UMA USINA MODELO DE PESQUISA E CAPACITAÇÃO DE BIOGÁS NA REGIÃO DE CONCÓRDIA/SC. Brasília/DF, Brasil: [s.n.]. Disponível em: <http://www.cidades.gov.br/images/stories/ArquivosSNSA/probio_gas/caderno2-planta-concordiasc.pdf>.
- BITTON, G. *Wastewater microbiology*. 3rd. ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2005.
- BROWNING, H. (SOIL A. E. coli superbugs on farms and food) The use and misuse of antibiotics in UK agriculture. Bristol, UK: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.soilassociation.org/LinkClick.aspx?fileticket=yCT9su5iViQ=&tabid=313>>.
- BUCHAUER, K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*, v. 24, n. 1, p. 49–56, 1998.
- BUSWELL, A. M.; NEAVE, S. L. BULLETIN NO. 30 - LABORATORY STUDIES OF SLUDGE DIGESTION. 1st. ed. Springfield, Illinois, USA: Jeffersons Printing & Stationery Co, 1930.
- CAMPOS, C. M. M. et al. Avaliação do potencial de produção de biogás e da eficiência de tratamento do reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) alimentado com dejetos de suínos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 4, p. 848–856, ago. 2005.
- CDDEP. *the State of the World ' S Antibiotics. the State of the World ' S Antibiotics*, 2015.
- CESTONARO DO AMARAL, A. et al. Influence of solid–liquid separation strategy on biogas yield from a stratified swine production system. *Journal of Environmental Management*, v. 168, p. 229–235, mar. 2016.

- CHEN, Y. et al. Occurrence and dissipation of veterinary antibiotics in two typical swine wastewater treatment systems in east China. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, n. 4, p. 2205–2217, 2012a.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008.
- CHEN, Y. S. et al. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China. *Chinese Science Bulletin*, v. 57, n. 6, p. 606–614, 2012b.
- CHENXI, W.; SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 73, n. 4, p. 511–518, set. 2008.
- CHERNICHARO, C. A. DE L. *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Reatores Anaeróbios*. 2a. ed. Belo Horizonte: Editora UFG, 2007.
- CHERUBINI, E. et al. Life cycle assessment of swine production in Brazil: a comparison of four manure management systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 87, p. 68–77, jan. 2015.
- DA SILVA, M. L. B. et al. Assessment of Bacterial and Archaeal Community Structure in Swine Wastewater Treatment Processes. *Microbial Ecology*, v. 70, n. 1, p. 77–87, 30 jul. 2015.
- DAL MAGO, A. *Avaliação de biodigestores com o uso de dejetos de suínos, em Braço do Norte e em Concórdia*. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2009.
- DE VRIEZE, J. et al. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microbial Biotechnology*, v. 8, n. 5, p. 776–786, set. 2015.
- DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. [s.l.: s.n.].
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN). DIN 384140-8 German standard method for the examination of water, waste water and sludge. Sludge and sediment (group S). Determination of amenability to anaerobic digestion (S8), 1985.
- DREHER, T. M. et al. Effects of chlortetracycline amended feed on anaerobic sequencing batch reactor performance of swine manure digestion. *Bioresource Technology*, v. 125, p. 65–74, 2012.
- DU, L.; LIU, W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 32, n. 2, p. 309–327, 2012.
- EMBRAPA. Central de Inteligência de Aves e Suínos. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

- EMBRAPA. Rede BiogásFert - Tecnologias para produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/biogasfert/>>. Acesso em: 13 jan. 2016.
- FAO. Status Report on Antimicrobial Resistance. Rome, Italy: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-mm736e.pdf>>.
- FISCHER, J. R.; IANNOTTI, E. L.; SIEVERS, D. M. Anaerobic Digestion of Manure from Swine Fed on Various Diets. *Agricultural Wastes*, v. 3, p. 201–214, 1981.
- FLORENTINO, H. DE O.; BISCARO, A. DE F. V.; PASSOS, J. R. DE S. Funções sigmoidais aplicadas da determinação da atividade metabólica específica - AME. *Revista Brasileira de Biometria*, v. 28, n. 1, p. 141–150, 2010.
- FNR. Guia Prático do Biogás: Geração e Utilização. 5ª Edição ed. Gülzow, Alemanha: Ministério da Nutrição, Agricultura e Defesa do Consumidor da Alemanha (BMLEV), 2010.
- FRANZ, E.; SEMENOV, A V; VAN BRUGGEN, A H. C. Modelling the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 from manure-amended soil and the effect of intervention strategies. *Journal of applied microbiology*, v. 105, n. 5, p. 1569–84, 2008.
- GARCIA, J.-L.; PATEL, B. K. .; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe*, v. 6, n. 4, p. 205–226, ago. 2000.
- GARTISER, S. et al. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere*, v. 66, n. 10, p. 1839–1848, 2007.
- GERBER, P. J. et al. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome, Italy: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- GROTH, L. H. M.; GRESSLER, V.; STEINMETZ, R. L. R. Avaliação de três sistemas de solvente para eluição simultânea de tetraciclina em cartuchos de extração de fase sólida 9ª Jornada de Iniciação Científica (JINC). *Anais...Concórdia/Brasil: Embrapa/UnC*, 2015
- GU, Y. et al. Effect of inoculum sources on the anaerobic digestion of rice straw. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 149–155, abr. 2014.
- GUSMÃO, M. M. F. E. C. D. C. Produção de biogás em diferentes sistemas de criação de suínos em Santa Catarina. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 236–243, 2011.

- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11734 - Water quality - Evaluation of “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measurement of biogas production, 1995.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 13641-1 Water quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria. General test., 2003.
- IUPAC. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2nd. ed. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- Ji, J. Y. et al. Acute toxicity of pharmaceutical wastewaters containing antibiotics to anaerobic digestion treatment. *Chemosphere*, v. 91, n. 8, p. 1094–1098, 2013.
- KABAS, F. et al. Analysis of Family-Farm-Based (FFB) and Pig-Fattening-Based (PFB) biogas production in Brazil and optimisation potentials (F. N. I. of A. Research, Ed.)15th RAMIRAN International Conference. Anais...Versailles, France: 2013Disponível em: <<https://colloque.inra.fr/ramiran2013>>
- KHANAL, S. K. (UNIVERSITY OF H. AT M. OF H. AT M. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. 1. ed. Ames/Iowa/USA: Wiley-Blackwell, 2008.
- KNAPP, C. W. et al. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 2, p. 580–587, 2010.
- KREUGER, E. et al. Bioconversion of industrial hemp to ethanol and methane: The benefits of steam pretreatment and co-production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 3457–3465, fev. 2011.
- KRÜMPPEL, J. et al. Kinetics of biogas production in Anaerobic Filters. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 230–234, 2016.
- KTBL. Online European Feedstock Atlas basis version. Disponível em: <<http://daten.ktbl.de/euagrobiogasbasis/substratemischung.do?selectedSubstrate=Pig+slurry&selectedAction=substrateGruppe>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- KUNZ, A. et al. Comunicado Técnico 452EMBRAPA. Concórdia/Brasil: [s.n.].
- KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 22, p. 5485–5489, 2009.
- KUNZ, A.; OLIVEIRA, P. A. V. DE. Aproveitamento de dejetos de animais para geração de biogás. *Política Agrícola*, v. XV, n. 3, p. 28–35, 2006.
- LABATUT, R. A.; ANGENENT, L. T.; SCOTT, N. R. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 2255–2264, 2011.

- LI, K.; LIU, R.; SUN, C. Comparison of anaerobic digestion characteristics and kinetics of four livestock manures with different substrate concentrations. *Bioresource Technology*, 2015.
- LI, Y. et al. Influence of inoculum source and pre-incubation on biomethane potential of chicken manure and corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 171, n. 1, p. 117–127, 2013.
- LOFTIN, K. A et al. Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 24, n. 4, p. 782–788, 2005.
- LOFTIN, K. A. et al. Effects of Ionic Strength, Temperature, and pH on Degradation of Selected Antibiotics. *Journal of Environment Quality*, v. 37, n. 2, p. 378, 2008.
- MALCHI, T.; MAOR, Y.; CHEFETZ, B. Comments on “Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation”. *Environment International*, v. 82, p. 110–112, 2015.
- MAPA. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- MARTÍNEZ-CARBALLO, E. et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, v. 148, n. 2, p. 570–579, 2007.
- MASSÉ, D.; SAADY, N.; GILBERT, Y. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals*, v. 4, n. 2, p. 146–163, 4 abr. 2014.
- MEZZARI, M. P. et al. Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. *Bioresource Technology*, v. 149, p. 327–332, dez. 2013.
- MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. Bioconversion of Cellulose to Acetate with Pure Cultures of *Ruminococcus albus* and a Hydrogen-Using Acetogen. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 11, p. 3832–5, 1995.
- MITTWEG, G. et al. Repeatability of a laboratory batch method to determine the specific biogas and methane yields. *Engineering in Life Sciences*, v. 12, n. 3, p. 270–278, 2012.
- MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371–394, out. 1949.
- MORÉS, N. É POSSÍVEL PRODUIR SUÍNOS SEM O USO DE ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO? V Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal. Anais...São Pe-

- dro/SP: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal - CBNA, 2014 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122662/1/fin al7575.pdf>>
- OLIVEIRA, P. A. V. DE; HIRAGASHI, M. M. Geração e utilização de biogás em unidades de produção de suínos. Concórdia/Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Gera??o+e+utiliza??o+de+biog?s+em+unidades+de+produ??o+de+su?nos#0>>.
- ORDOÑEZ, R. País tem potencial para gerar 30% da energia de Itaipu a partir do lixo. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia/petroleo-e-energia/pais-tem-potencial-para-gerar-30-da-energia-de-itaipu-partir-do-lixo-18718173>>. Acesso em: 2 mar. 2016.
- PAN, X. et al. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere*, v. 84, n. 5, p. 695–700, 2011.
- PRADO, N.; OCHOA, J.; AMRANE, A. Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor. *Bioresource technology*, v. 100, n. 15, p. 3769–74, 2009.
- PROSSER, R. S.; SIBLEY, P. K. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environment International*, v. 75, p. 223–233, 2015.
- REITSCHULER, C.; LINS, P.; ILLMER, P. Primer evaluation and adaptation for cost-efficient SYBR Green-based qPCR and its applicability for specific quantification of methanogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 293–304, 2014.
- SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimativa do potencial de geração de energia elétrica para diferentes fontes de biogás no Brasil. *Biomassa e Energia*, v. 2, n. 1, p. 57–67, 2005.
- SANTOS, E. L. B. DOS; NARDI JUNIOR, G. DE. Produção de biogás a partir de dejetos de origem animal. *Tekhne e Logos*, v. 4, n. 2, p. 80–90, 2013.
- SANZ, J. L.; RODRÍGUEZ, N.; AMILS, R. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5-6, p. 587–592, 1996.
- SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, v. 65, n. 5, p. 725–759, 2006.

- SCHLÜSENER, M. P.; BESTER, K.; SPITELLER, M. Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, n. 7, p. 942–947, 2003.
- SCHLÜSENER, M. P.; VON ARB, M. A.; BESTER, K. Elimination of macrolides, tiamulin, and salinomycin during manure storage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, n. 1, p. 21–28, 2006.
- SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; HARADA, H. Recent advances in methane fermentation technology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 277–282, jun. 2001.
- SHI, J. C. et al. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure. *Animal Feed Science and Technology*, v. 166-167, p. 457–463, 2011.
- SHIMADA, T. et al. Inhibitory effects of the macrolide antimicrobial tylosin on anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, n. 1, p. 73–82, 2008.
- SHIMADA, T. et al. Effects of the antimicrobial tylosin on the microbial community structure of an anaerobic sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 2, p. 296–305, 2011.
- SOARES, H. M. Tratamento de Efluentes. Material didático da disciplina de Engenharia Ambiental do curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Florianópolis (UFSC). Florianópolis, 2011.
- STALLONES, R. A. et al. The Effects on Human Health of Subtherapeutic Use of Antimicrobials in Animal Feeds. Washington, D.C. (USA): National Academy of Sciences, 1980.
- STEINMETZ, R. L. R. et al. DOC 175 - Estudo Interlaboratorial em Digestão Anaeróbia: Relato de Atividades e Desempenho dos Laboratórios em 2014. Concórdia/Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/biogasfert/resultados-pa4.html>>.
- STONE, J. J.; CLAY, S. A.; SPELLMAN, G. M. Tylosin and chlortetracycline effects during swine manure digestion: Influence of sodium azide. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 24, p. 9515–9520, 2010.
- STORTEBOOM, H. N. et al. Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity Manure Management. *Journal of Environment Quality*, v. 36, n. 6, p. 1695, 2007.
- SZATMÁRI, I.; LACZAY, P.; BORBÉLY, Z. Degradation of doxycycline in aged pig manure. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 59, n. 1, p. 1–10, mar. 2011.
- TAVARES, J. M. R. et al. The water disappearance and manure production at commercial growing-finishing pig farms. *Livestock Science*, v. 169, p. 146–154, nov. 2014.

- TONG, Z.-L. et al. [Anaerobic digestion of animal manure contaminated by tetracyclines]. *Huan jing ke xue*, v. 33, n. 3, p. 1028–1032, mar. 2012.
- TURKER, G. et al. Changes in Performance and Active Microbial Communities Due to Single and Multiple Effects of Mixing and Solid Content in Anaerobic Digestion Process of OTC Medicated Cattle Manure. *INTERNATIONAL JOURNAL of RENEWABLE ENERGY RESEARCH*, v. 3, n. 1, p. 144–148, 2013.
- UNITED NATIONS. Adoption of the Paris Agreement Conference of the Parties on its twenty-first session, 2015. Disponível em: <<http://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/109r01.pdf>>
- VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 1–6, 2015.
- VDI. VDI 4630 - Fermentation of organic materials characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE, , 2006.
- VDLUFA. Auswertung Ringversuch Biogas 2013. VDLUFA Qualitätssicherung NIRS GmbH (Report: Evaluation of interlaboratory test Biogas 2013. VDLUVA Quality assurance NIRS GmbH). [s.l.: s.n.].
- VENGLOVSKY, J.; SASAKOVA, N.; PLACHA, I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 22, p. 5386–5391, 2009.
- WOOLHOUSE, M. E. J.; WARD, M. J. W. Sources of Antimicrobial Resistance. *Science*, v. 1460, n. 2013, p. 1–2, 2013.
- YU, L. et al. Anaerobic degradation of microcrystalline cellulose: Kinetics and micro-scale structure evolution. *Chemosphere*, v. 86, n. 4, p. 348–353, jan. 2012.
- YU, Y.; KIM, J.; HWANG, S. Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 93, n. 3, p. 424–433, 2006.
- ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.
- ZHOU, L.-J. et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1244, p. 123–138, 2012.

ZHOU, L.-J. et al. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *Science of The Total Environment*, v. 444, p. 183–195, 2013.

ANEXO A - Ocorrência de antibióticos em efluentes da suinocultura.

Composto/Amostra	Local	Níveis reportados	Referência
Quinolonas			
<u>Fleroxacina</u>			
Esterco	China	1,08-7,46 mg/kg	Zhao et al., 201
<u>Ciprofloxacina</u>			
Esterco	China	0,64-33,98 mg/kg	Zhao et al., 2010
Fezes			
<u>Enrofloxacina</u>			
Fezes	China	9,08 µg/kg	Zhou et al., 2013
Fezes	China	16,5 µg/kg	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	6,8 µg/kg	Zhou et al., 2013
Esterco	China	0,48-33,26 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto	China	16,5 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Efluente	China	173 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Ofloxacina</u>			
Fezes	China	5,30-2970 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	63 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	24,8 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	15,7 mg/kg	Chen et al., 2012
Dejeto	China	8,15 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Efluente	China	0,008 µg/L	Chang et al., 2010
<u>Norfloxacina</u>			
Esterco	China	0,56-5,50 mg/kg	Zhao et al., 2010
Fezes	China	10,2-47,9 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	110 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	11,5 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	0,56-5,50 mg/kg	Chen et al., 2012
Efluente	China	219 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Lomefloxacina</u>			
Esterco	China	0,77-44,16 mg/kg	Zhao et al., 2010
<u>Danofloxacina</u>			
Esterco	China	0,08-2,92 mg/kg	Zhao et al., 2010
<u>Difloxacina</u>			
Esterco	China	0,51-2,51 mg/kg	Zhao et al., 2010
<u>Ácido Nalidixico</u>			
Efluente	China	71 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Flumequina</u>			
Efluente	China	534 ng/L	Lin et al., 2008
Tetraciclínas			
<u>Tetraciclina</u>			
Fase líquida do efluente	China	0,8-41,2 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	130,6-3617,2 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	1,14-4,62 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto líquido	Áustria	0,36-23 mg/kg	Martínez-Carballo et al., 2007
Dejeto líquido	Alemanha	14,1-41,2 mg/kg	Hamscher et al., 2005
Dejeto líquido	Alemanha	3,2-4,0 mg/kg	Hamscher et al., 2002

Dejeto	China	98,2 mg/kg	Chen et al., 2012
Fezes	China	67,1-9260 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	1190 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	3600 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	821 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Dejeto	China	12,27 mg/kg	Ji et al., 2012
Efluente	China	10,3 µg/L	Wei et al., 2011
Dejeto	EUA	13 ppb	Aga et al., 2003
Efluente	China	1129 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,15-1,1 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Dejeto	EUA	166-214 µg/L	Zilles et al., 2005
Dejeto	Dinamarca	0,09-1,6 mg/kg	Jacobsenet al., 2006
Dejeto	EUA	0,4-8,5 µg/L	Mackie et al., 2006
<u>Epi-tetracyclina</u>			
Dejeto	Dinamarca	0,06-0,99 mg/kg	Jacobsenet al., 2006
<u>Oxitetracyclina</u>			
Esterco	China	0,15-59,06 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto Líquido	República Tcheca	5,88 mg/kg	Tylová et al., 2010
Dejeto	Dinamarca	0,05-1,5 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Fezes	China	235-1700 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	680 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	175 µg/kg	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	365,0-32044,9 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	6,18-25,36 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto Líquido	Áustria	0,21-29 mg/kg	Martínez-Carballo et al., 2007
Dejeto Líquido	Alemanha	0,09-0,1 mg/kg	Hamscher et al., 2002
Dejeto	China	354,0 mg/kg	Chen et al., 2012
Dejeto	Japan	160 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Efluente	Japan	3,9-18 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Dejeto	China	661 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Dejeto	China	18,70 mg/kg	Ji et al., 2012
Efluente	China	72,9 µg/L	Wei et al., 2011
Dejeto	EUA	6100 ppb	Aga et al., 2003
Efluente	China	8318 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,15-1,1 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Dejeto	EUA	2367-4260 µg/L	Zilles et al., 2005
Dejeto	Dinamarca	0,04-1,5 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Dejeto	EUA	0,35-4,6 µg/L	Mackie et al., 2006
<u>Epi-oxitetracyclina</u>			
Dejeto	Dinamarca	0,33-0,45 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
<u>Clortetracyclina</u>			
Esterco	China	0,16-21,06 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto	Dinamarca	1,1-15,7 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Fezes	China	2,36-97,6 mg/kg	Zhou et al., 2013

Água de “flush”	China	2930 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	12000 µg/kg	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	1143,8-36271,3 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	2,65-32,67 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto líquido	Áustria	0,1-46 mg/kg	Martínez-Carballo et al., 2007
Esterqueira	EUA	5-870 µg/L	Meyer et al., 2000
Esterqueira	EUA	11-540 µg/L	Meyer et al., 2000
Dejeto líquido	Alemanha	0,9-1,0 mg/kg	Hamscher et al., 2005
Dejeto	China	139,4 mg/kg	Chen et al., 2012
Dejeto	China	35500 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Efluente	China	1,49 µg/L	Wei et al., 2011
Dejeto	EUA	500 ppb	Aga et al., 2003
Efluente	China	2821 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,5-17 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Esterqueira	EUA	11-540 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Lagoa de armazenamento	EUA	68-1000 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Dejeto	EUA	3482-3941 µg/L	Zilles et al., 2005
Dejeto	Dinamarca	1,1-15,7 mg/kg	Jacobsenet al., 2006
Dejeto	EUA	0,1-130 µg/L	Mackie et al., 2006
<u>Epi-clortetraciclina</u>			
Dejeto	Dinamarca	1,3-14,1 mg/kg	Jacobsenet al., 2006
<u>Iso-clortetraciclina</u>			
Efluente	China	0,157 µg/L	Chang et al., 2010
<u>Methaciclina</u>			
Esterco	China	0,20-5,43 mg/kg	Zhao et al., 2010
Fezes	China	4,02 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	4,02 µg/kg	Zhou et al., 2012
<u>Doxiciclina</u>			
Esterco	China	0,23-13,50 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto líquido	República Tcheca	0,99 mg/kg	Tylová et al., 2010
Dejeto	Dinamarca	0,55-3,1 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Fezes	China	17,7-2240 µg/kg	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	3,45 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	37,2 mg/kg	Chen et al., 2012
Dejeto	China	296 µg/kg	Zhou et al., 2012
Efluente	China	39,5 µg/L	Wei et al., 2011
Dejeto	China	8,6-59,6 mg/kg	Xian-Gang et al., 2008
Dejeto	EUA	40 ppb	Aga et al., 2003
Dejeto	Dinamarca	0,55-3,1 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Sulfonamidas			
<u>Sulfametoxazol</u>			
Esterco	China	0,23-0,84 mg/kg	Zhao et al., 2010
Fase líquida do efluente	China	1,1-20,1 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em sus-	China	83,5-151,5 µg/kg	Pan et al., 2011a

pensão			
Efluente	China	1,01 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto	China	0,23-5,7 mg/kg	Chen et al., 2012
Efluente	China	69 µg/L	Jen et al., 1998
Efluente	Coréia	1,84-17,0 µg/L	Sim et al., 2011
Dejeto	China	7,56 mg/kg	Ji et al., 2012
Efluente	China	63,6 µg/L	Wei et al., 2011
Efluente	China	10 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,2-0,35 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Dejeto líquido	EUA	108-1,470,000 ng/L	Shelver et al., 2010
<u>Sulfadiazina</u>			
Esterco	China	0,09-0,80 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto	Dinamarca	0,63-2,1 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Fezes	China	4,63-254 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	139 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	16,9 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto líquido	Alemanha	3,5-11,3 mg/kg	Hamscher et al., 2005
Dejeto	China	7,1 mg/kg	Chen et al., 2012
Efluente	China	76 µg/L	Jen et al., 1998
Dejeto	China	4,87 mg/kg	Ji et al., 2012
Efluente	China	13,1 µg/L	Wei et al., 2011
Efluente	China	21 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Sulfanilamida</u>			
Esterco	China	0,04-0,04 mg/kg	Zhao et al., 2010
Efluente	China	48 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Sulfamerazina</u>			
Esterco	China	0,14-0,14 mg/kg	Zhao et al., 2010
Efluente	China	77 µg/L	Jen et al., 1998
Efluente	China	831 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Sulfamonometoxina</u>			
Esterco	China	0,07-4,08 mg/kg	Zhao et al., 2010
Fezes	China	9,40-4070 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	40 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
<u>Sulfaclopiridazina</u>			
Esterco	China	0,09-3,51 mg/kg	Zhao et al., 2010
Esterco	China	0,03-1,55 mg/kg	Zhao et al., 2010
<u>Sulfadoxina</u>			
Dejeto	Dinamarca	0,02-0,22 mg/kg	Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006
Efluente	China	0,34 µg/L	Wei et al., 2011
<u>Sulfametiazina ou Sulfadimidina</u>			
Fezes	China	6,75-250 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	13,7 ng/L	Zhou et al., 2013
Fase líquida do efluente	China	2,5-61,7 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	342,4-2505,0 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	7,9-10,1 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto	China	3,3-24,8 mg/kg	Chen et al., 2012
Efluente	Coréia	1,76-189 µg/L	Sim et al., 2011

Dejeto	China	6,17 mg/kg	Ji et al., 2012
Efluente	China	0,007 µg/L	Chang et al., 2010
Efluente	China	211 µg/L	Wei et al., 2011
Efluente	China	77 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,1-0,5 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Lagoa de armazenamento	EUA	2,5-400 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Lagoa de armazenamento	EUA	>20 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Dejeto líquido	EUA	2250-5060 ng/L	Shelver et al., 2010
Dejeto líquido	Alemanha	7,2 mg/kg	Hamscher et al., 2005
Dejeto	Suíça	0,13-8,7 mg/kg	Haller et al., 2002
Esterco	China	0,06-1,73 mg/kg	Zhao et al., 2010
Dejeto líquido		1,0-1,1 mg/kg	Cristian et al., 2003
Dejeto líquido	Áustria	20 mg/kg	Martínez-Carballo et al., 2007
Dejeto líquido	Alemanha	1,0-1,1 mg/kg	Christian et al., 2003
<u>N-acetil-sulfametazina</u>			
Dejeto	Suíça	0,15-2,6 mg/kg	Haller et al., 2002
<u>Sulfaquinoxalina</u>			
Fezes	China	4,86-14,0 µg/kg	Zhou et al., 2013
Efluente	China	0,06 µg/L	Wei et al., 2011
<u>Sulfathiazol</u>			
Fase líquida do efluente	China	6,9 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	88,0 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	9,83 µg/L	Ben et al., 2008
Efluente	Coréia	7,44-403 µg/L	Sim et al., 2011
Efluente	China	4844 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,3 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Dejeto líquido	EUA	785-1702 ng/L	Shelver et al., 2010
Dejeto	Suíça	0,10-12,4 mg/kg	Haller et al., 2002
<u>Sulfametizol</u>			
Fase líquida do efluente	China	9,0 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	214,7 µg/kg	Pan et al., 2011a
Dejeto	China	0,2-1,0 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
<u>Sulfadimetoxina</u>			
Fase líquida do efluente	China	4,0 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	12,4 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	0,62-14,05 µg/L	Ben et al., 2008
Efluente	China	17 ng/L	Lin et al., 2008
Dejeto	China	0,1-1,0 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
Lagoa de armazenamento	EUA	2,5 µg/L	Campagnolo et al., 2002
<u>Sulfaguanidina</u>			
Efluente	China	26 ng/L	Lin et al., 2008

<u>β-lactamas</u>			
<u>Ceftiofur</u>			
Fezes	China	2820 µg/kg	Zhou et al., 2013
<u>Diaminopirimidinas</u>			
<u>Trimetoprim</u>			
Fezes	China	4,44-246 µg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	600 ng/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	3,42 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	6,26 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
Efluente	China	0,008 µg/L	Chang et al., 2010
Efluente	China	32 ng/L	Lin et al., 2008
Lagoa de armazenamento	EUA	2,5 µg/L	Campagnolo et al., 2002
<u>Polipeptídeos</u>			
<u>Bacitracin</u>			
Fezes	China	3,18-51,0 mg/kg	Zhou et al., 2013
<u>Macrolídeos</u>			
<u>Eritromicina</u>			
Lagoa de armazenamento	EUA	2,5-275 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Efluente	Coréia	0,139 µg/L	Sim et al., 2011
Efluente	China	20 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Leucomicina</u>			
Fezes	China	2,96-15,2 µg/kg	Zhou et al., 2013
Dejeto	China	15,2 µg/kg ^a	Zhou et al., 2012
<u>Tiamulina</u>			
Fase líquida do efluente	China	0,1-1,4 µg/L	Pan et al., 2011a
Sólidos em suspensão	China	5,5-21,7 µg/kg	Pan et al., 2011a
Efluente	China	2,14-5,08 µg/L	Ben et al., 2008
Dejeto líquido	Alemanha	43 µg/kg	Schlüsener et al., 2003
Dejeto	China	0,1 mg/kg ^b	Pan et al., 2011b
<u>Tilosina</u>			
Efluente	Coréia	9,97 µg/L	Sim et al., 2011
Efluente	Japão	1,4 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Dejeto	Japão	0,56-42 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Efluente	China	1,00 µg/L	Lin et al., 2008
Efluente			
<u>Roxitromicina</u>			
Efluente	China	0,013 µg/L	Chang et al., 2010
<u>Claritromicina</u>			
Efluente	China	6 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Josamicina</u>			
Efluente	China	432 ng/L	Lin et al., 2008
<u>Lincosamidas</u>			
<u>Lincomicina</u>			
Lagoa de armazenamento	EUA	2,5-240 µg/L	Campagnolo et al., 2002
Fezes	China	0,16-17,0 mg/kg	Zhou et al., 2013
Água de “flush”	China	166 µg/L	Zhou et al., 2013
Sólidos em suspensão	China	1460 µg/kg	Zhou et al., 2013

Dejeto	Canada	93,3-215,5 µg/L	Peru et al., 2006
Dejeto líquido	Canada	2524-9784 µg/L	Kutchka et al., 2009.
Efluente	Coréia	46,2-3005 µg/L	Sim et al., 2011
Dejeto	Japão	400 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Efluente	Japão	2,2-23 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
Efluente	China	0,008 µg/L	Chang et al., 2010
Efluente	China	56,76 µg/L	Lin et al., 2008
Dejeto	EUA	4216-5021 µg/L	Zilles et al., 2005
<u>Spectinomicina</u>			
Dejeto	Canada	64,1-105,4 µg/L	Peru et al., 2006
Dejeto líquido	Canada	173-686 µg/L	Kutchka et al., 2009.
<u>Valnemulina</u>			
Efluente	Japão	0,12 µg/L	Tagiri-Endo et al., 2009
<u>Ionóforos</u>			
<u>Salinomicina</u>			
Dejeto líquido	Alemanha	11 µg/kg	Schlüsener et al., 2003

ANEXO B - Resultados das cinéticas anaeróbias.Quadro 1. Tetraciclina ($\times 10^{-1}$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0,0	0,0	0,0	0,0
0,7	9,8	8,1	9,0
1,3	24,4	24,5	23,2
1,6	94,7	98,3	86,8
2,3	333,0	338,2	324,2
2,5	396,8	398,0	391,4
3,3	482,0	474,2	486,5
3,6	509,3	498,8	511,7
4,3	572,0	559,8	569,5
4,6	586,6	575,4	584,7
5,3	617,7	607,6	616,1
5,6	626,6	613,9	625,1
6,7	653,4	638,2	650,6
7,8	662,8	646,7	660,1
8,3	667,8	652,6	665,6
9,3	681,0	665,0	676,9
10,3	692,8	675,9	689,5
11,3	700,3	683,4	698,1
12,3	707,7	696,7	705,9
14,6	720,6	704,0	719,6
15,7	723,9	707,3	723,4
17,5	729,1	710,7	730,1
18,3	732,6	714,1	733,2
19,3	736,4	719,9	736,9
22,3	749,9	729,5	748,5
23,3	749,1	727,7	748,7
24,3	751,3	732,0	750,7
25,3	753,8	733,5	753,1
26,3	756,0	746,4	754,2
29,3	760,8	747,4	758,7
30,3	762,7	746,3	759,5

Quadro 2. Tetraciclina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	0,2	2,9
0,9	1,8	4,3
1,6	21,4	22,8
2,6	266,4	271,3
2,8	327,2	329,9
3,9	514,0	512,7
5,0	567,7	564,2
5,6	588,6	585,8
5,8	597,9	596,5
6,6	625,1	620,1
7,6	650,7	645,2
8,6	666,2	661,7
9,6	672,6	668,6
10,8	678,9	674,4
12,6	687,6	683,4
13,6	690,9	687,3
14,6	695,4	691,5
15,6	699,9	695,7
15,8	699,6	695,4
17,9	709,7	707,7
18,7	711,6	709,4
19,6	713,6	712,3
19,8	715,1	713,7
20,6	716,1	714,7
21,6	719,8	719,1
22,6	722,4	721,5
23,6	724,3	723,2
26,6	730,3	727,7
27,8	730,8	728,1
30,3	730,8	728,1

Quadro 3. Tetraciclina ($\times 10^1$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado	
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	2,4	1,4
0,9	4,0	1,5
1,6	10,4	9,3
2,6	172,5	174,6
2,8	233,1	233,1
3,9	455,7	448,3
5,0	554,9	538,1
5,6	570,0	555,6
5,8	578,2	564,3
6,6	596,2	586,2
7,6	619,9	611,7
8,6	640,6	635,7
9,6	644,2	646,5
10,8	655,6	654,0
12,6	663,5	657,9
13,6	666,9	666,6
14,6	671,5	671,0
15,6	676,0	676,3
15,8	675,8	675,9
17,9	684,1	690,0
18,7	691,2	693,0
19,6	695,4	698,4
19,8	696,9	700,4
20,6	699,0	703,2
21,6	703,8	708,8
22,6	707,5	711,7
23,6	709,5	714,0
26,6	715,8	721,0
27,8	714,3	719,1
30,3	714,3	719,1

Quadro 4. Tetraciclina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,7	9,7	6,8
1,1	10,9	8,0
1,7	10,9	8,0
1,8	10,9	8,0
2,0	10,9	8,0
2,7	10,9	8,0
3,8	26,8	29,2
4,9	185,5	272,2
6,0	351,1	424,6
6,7	410,3	445,9
7,7	472,2	486,0
8,7	508,5	510,6
9,7	529,5	535,4
10,7	556,0	556,6
11,8	575,3	573,7
13,2	591,0	585,2
13,8	591,7	584,0
14,7	600,4	591,4
15,8	599,1	585,6
16,7	603,4	590,3
17,7	600,4	587,0
19,1	605,7	589,0
20,1	603,0	588,1
20,7	606,2	589,6
20,9	606,2	589,7
21,7	608,3	590,8
22,7	609,9	591,6
23,7	611,5	592,4
24,7	613,1	593,2
26,0	614,7	594,0
27,7	616,2	594,8
28,7	617,8	595,6
30,7	619,4	596,4
30,9	621,0	597,2

Quadro 5. Clortetraciclina ($\times 10^{-1}$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0,0	0,0	0,0	0,0
0,7	5,8	10,5	11,0
1,3	25,9	30,1	30,6
1,6	128,7	114,3	108,3
2,3	369,9	361,3	349,2
2,5	421,0	421,3	410,1
3,3	489,5	494,6	499,0
3,6	513,5	522,3	527,7
4,3	572,6	577,1	586,5
4,6	583,8	590,3	597,4
5,3	614,9	618,8	625,7
5,6	625,4	627,5	634,8
6,7	640,0	651,2	659,0
7,8	649,9	660,4	668,4
8,3	656,4	667,0	675,0
9,3	665,1	679,1	685,7
10,3	680,5	691,6	697,9
11,3	689,7	698,9	705,1
12,3	698,8	705,2	713,5
14,6	718,5	719,8	729,0
15,7	723,9	723,0	732,6
17,5	732,2	730,0	739,5
18,3	736,3	734,3	743,3
19,3	739,2	738,1	747,6
22,3	754,5	752,2	761,5
23,3	753,1	751,4	761,6
24,3	756,0	753,6	764,1
25,3	756,8	756,0	766,8
26,3	758,1	758,1	768,1
29,3	764,3	764,7	775,5
30,3	763,7	765,6	776,5

Quadro 6. Clortetraciclina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	2,2	1,2
0,9	2,8	3,6
1,6	23,2	21,3
2,6	282,5	268,1
2,8	341,6	328,2
3,9	518,8	508,2
5,0	567,8	564,1
5,6	587,4	585,9
5,8	595,6	594,3
6,6	619,2	620,0
7,6	642,4	644,3
8,6	659,8	661,3
9,6	666,2	666,4
10,8	672,4	673,1
12,6	681,1	682,1
13,6	684,3	686,0
14,6	688,8	690,2
15,6	693,3	695,3
15,8	693,0	695,1
17,9	705,2	707,3
18,7	707,0	710,0
19,6	711,1	713,8
19,8	712,6	714,2
20,6	713,6	716,2
21,6	718,3	720,5
22,6	721,9	724,0
23,6	723,8	725,8
26,6	729,9	731,5
27,8	731,4	731,9
30,3	731,4	731,9

Quadro 7. Clortetraciclina ($\times 10^1$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado	
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	1,1	5,4
0,9	1,6	10,1
1,6	8,2	57,7
2,6	126,8	250,0
2,8	182,6	273,2
3,9	412,9	364,4
5,0	535,1	422,4
5,6	562,4	461,9
5,8	568,0	482,9
6,6	583,7	551,5
7,6	602,8	612,3
8,6	627,4	642,0
9,6	643,1	655,0
10,8	660,7	669,6
12,6	676,3	690,5
13,6	681,9	701,4
14,6	688,3	714,2
15,6	694,7	725,2
15,8	693,3	725,8
17,9	703,3	744,3
18,7	705,6	749,7
19,6	709,3	756,9
19,8	709,6	758,3
20,6	713,5	763,0
21,6	717,5	767,3
22,6	721,5	772,4
23,6	723,9	774,9
26,6	730,2	784,0
27,8	730,0	782,0
30,3	730,0	782,0

Quadro 8. Clortetraciclina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0,0	0,0	0,0	0,0
0,7	6,9	6,9	4,8
1,1	8,2	9,4	7,2
1,7	8,2	9,4	11,2
1,8	8,2	9,4	63,5
2,0	8,2	9,4	84,6
2,7	8,2	9,4	177,1
3,8	9,3	24,6	247,5
4,9	143,1	175,7	271,3
6,0	319,4	344,6	280,6
6,7	393,4	412,8	304,6
7,7	468,6	474,9	329,0
8,7	502,1	500,7	359,7
9,7	515,5	521,5	388,3
10,7	549,8	548,2	417,8
11,8	570,0	568,6	451,8
13,2	589,8	586,8	466,6
13,8	592,4	590,7	480,1
14,7	603,8	601,1	494,0
15,8	601,9	600,6	495,3
16,7	610,4	606,3	533,1
17,7	607,4	604,9	548,6
19,1	614,6	611,2	571,2
20,1	613,6	611,6	577,5
20,7	616,8	614,5	595,8
20,9	626,0	614,5	615,0
21,7	626,0	614,5	630,9
22,7	626,0	614,5	641,1
23,7	626,0	614,5	655,1
24,7	626,0	614,5	655,1
30,3	626,0	614,5	658,3

Quadro 9. Oxitetraciclina ($\times 10^{-1}$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0,0	0,0	0,0	0,0
0,7	8,4	8,8	8,6
1,3	14,9	12,2	13,6
1,6	43,4	37,1	40,3
2,3	261,3	236,7	249,0
2,5	339,3	312,9	326,1
3,3	465,7	435,3	450,5
3,6	483,3	457,4	470,3
4,3	525,4	513,0	519,2
4,6	550,5	534,9	542,7
5,3	597,9	587,3	592,6
5,6	611,1	601,5	606,3
6,7	646,2	643,6	644,9
7,8	659,1	657,7	658,4
8,3	664,4	663,7	664,0
9,3	674,4	675,1	674,7
10,3	681,9	683,1	682,5
11,3	688,8	690,6	689,7
12,3	695,6	699,0	697,3
14,6	712,3	706,1	709,2
15,7	715,7	720,6	718,2
17,5	724,3	728,6	726,5
18,3	730,9	734,9	732,9
19,3	739,1	740,8	739,9
22,3	759,4	757,3	758,3
23,3	758,5	756,5	757,5
24,3	760,9	758,5	759,7
25,3	762,5	760,2	761,4
26,3	764,8	762,3	763,5
29,3	770,9	766,3	768,6
30,3	770,9	766,3	768,6

Quadro 10. Oxitetraciclina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	2,6	7,6
0,9	16,3	16,4
1,6	160,5	150,7
2,6	391,7	350,4
2,8	398,9	401,4
3,9	521,9	551,3
5,0	604,9	623,7
5,6	630,2	647,9
5,8	637,7	654,9
6,6	661,2	675,8
7,6	658,5	694,6
8,6	675,8	711,7
9,6	687,0	721,4
10,8	704,1	735,1
12,6	726,8	752,3
13,6	734,8	760,9
14,6	744,6	768,6
15,6	754,5	775,4
15,8	754,2	775,1
17,9	747,5	784,0
18,7	771,5	784,8
19,6	774,4	788,1
19,8	775,6	789,6
20,6	778,5	790,8
21,6	780,6	792,3
22,6	783,6	794,9
23,6	783,3	795,7
26,6	790,6	797,3
27,8	790,6	797,3
30,3	790,6	797,3

Quadro 11. Oxitetraciclina ($\times 10^1$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	7,9	6,4
0,9	9,7	9,1
1,6	13,3	12,9
2,6	88,9	106,9
2,8	150,0	179,6
3,9	309,6	389,5
5,0	358,0	417,1
5,6	379,2	425,7
5,8	386,7	427,8
6,6	407,9	437,9
7,6	428,0	444,0
8,6	445,8	459,9
9,6	455,6	464,7
10,8	467,0	473,3
12,6	479,9	483,9
13,6	487,9	490,7
14,6	497,2	498,3
15,6	510,8	508,3
15,8	512,2	507,9
17,9	548,5	526,3
18,7	560,1	531,7
19,6	573,0	541,1
19,8	576,2	544,4
20,6	586,7	553,4
21,6	597,4	558,7
22,6	608,1	575,0
23,6	617,3	584,7
26,6	645,8	610,0
27,8	645,8	610,0
30,3	645,8	610,0

Quadro 12. Oxitetraciclina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	9,6	6,0
0,9	12,0	8,2
1,6	15,5	10,5
2,6	130,4	55,3
2,8	213,5	124,1
3,9	386,6	269,1
5,0	408,2	286,6
5,6	417,4	294,3
5,8	420,1	296,8
6,6	429,7	305,0
7,6	440,0	314,0
8,6	450,2	322,8
9,6	455,3	327,6
10,8	463,2	334,6
12,6	471,9	342,5
13,6	478,1	348,0
14,6	485,1	354,2
15,6	493,4	361,4
15,8	492,9	361,1
17,9	514,3	379,6
18,7	519,7	384,4
19,6	531,3	394,3
19,8	533,6	396,3
20,6	544,0	403,5
21,6	552,5	410,7
22,6	562,6	419,4
23,6	572,3	427,7
26,6	598,6	450,3
27,8	599,3	451,1
30,3	599,3	451,1

Quadro 13. Metaciclina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0,0	0,0	0,0	0,0
0,7	8,7	5,3	8,2
1,3	16,5	13,8	16,6
1,6	51,1	47,4	50,7
2,3	259,1	256,0	258,5
2,5	332,9	330,7	331,9
3,3	461,4	456,0	457,5
3,6	495,2	489,8	489,8
4,3	556,9	553,9	555,8
4,6	570,5	569,1	570,8
5,3	598,8	598,6	602,9
5,6	606,6	606,2	610,3
6,7	630,9	628,7	635,4
7,8	640,1	638,3	644,1
8,3	644,4	643,4	649,2
9,3	654,7	654,3	659,0
10,3	665,4	665,6	670,2
11,3	672,4	673,3	676,8
12,3	680,4	680,9	684,5
14,6	695,5	697,2	698,8
15,7	700,1	701,5	703,1
17,5	706,8	709,8	710,5
18,3	711,5	713,2	715,0
19,3	714,6	718,1	719,9
22,3	732,2	736,1	737,7
23,3	731,3	734,9	736,7
24,3	733,8	737,2	739,1
25,3	735,3	738,6	740,6
26,3	736,6	741,8	743,8
29,3	741,7	748,5	748,6
30,3	742,7	748,2	749,5

Quadro 14. Metaciclina (2x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	8,3	5,3
0,9	14,9	12,6
1,6	100,5	94,4
2,6	336,9	320,5
2,8	378,5	360,2
3,9	514,5	509,5
5,0	597,9	595,5
5,6	625,2	621,8
5,8	632,0	630,2
6,6	653,1	651,6
7,6	664,1	670,9
8,6	683,4	689,5
9,6	692,0	697,8
10,8	714,1	712,4
12,6	718,0	714,0
13,6	719,9	715,6
14,6	721,9	717,1
15,6	723,8	718,7
15,8	725,8	720,2
17,9	727,7	721,8
18,7	729,7	723,3
19,6	731,6	724,9
19,8	733,6	726,5
20,6	735,5	728,0
21,6	737,5	729,6
22,6	739,4	731,1
23,6	741,4	732,7
26,6	743,3	734,3
27,8	745,3	735,8
30,3	745,3	735,8

Quadro 15. Metaciclina ($\times 10^1$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	11,1	-8,4
0,9	13,9	-6,7
1,6	65,7	27,0
2,6	306,7	250,2
2,8	321,7	276,2
3,9	393,6	381,3
5,0	469,9	447,9
5,6	505,8	475,7
5,8	521,9	487,1
6,6	566,4	524,7
7,6	604,0	566,0
8,6	627,6	594,1
9,6	637,4	606,2
10,8	649,9	620,0
12,6	666,8	637,7
13,6	677,4	648,0
14,6	688,1	659,1
15,6	698,9	670,4
15,8	699,6	671,0
17,9	718,4	688,5
18,7	722,3	691,2
19,6	733,2	697,9
19,8	735,6	699,1
20,6	740,6	702,2
21,6	742,7	703,2
22,6	744,6	704,9
23,6	746,8	705,1
26,6	749,7	707,6
27,8	749,0	705,9
30,3	645,8	610,0

Quadro 16. Metaciclina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,6	0,0	0,0
0,9	0,0	0,0
1,6	0,0	0,0
2,6	62,1	50,2
2,8	98,1	81,7
3,9	222,8	206,4
5,0	299,3	283,9
5,6	325,6	312,2
5,8	335,5	322,1
6,6	363,8	354,3
7,6	403,6	402,7
8,6	454,0	454,0
9,6	499,2	498,5
10,8	549,7	546,2
12,6	599,0	595,3
13,6	615,4	620,1
14,6	631,0	638,1
15,6	647,8	649,9
15,8	649,8	656,2
17,9	668,9	678,0
18,7	669,6	680,2
19,6	674,9	686,2
19,8	676,3	687,4
20,6	678,8	688,9
21,6	682,2	692,9
22,6	684,6	694,9
23,6	686,2	697,2
26,6	692,2	702,2
27,8	692,2	702,5
30,3	692,2	702,5

Quadro 17. Doxíciclina ($\times 10^{-1}$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado	
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,7	2,4	4,3
1,1	9,3	11,9
1,7	68,6	60,4
1,8	93,6	84,5
2,0	146,5	132,0
2,7	388,8	339,2
3,8	583,1	541,2
4,9	674,8	614,3
6,0	716,9	654,6
6,7	736,8	678,5
7,7	754,6	703,8
8,7	760,7	706,7
9,7	765,7	712,9
10,7	769,3	717,3
11,8	771,7	719,6
13,2	776,0	725,4
13,8	777,3	725,0
14,7	782,4	731,6
15,8	784,2	732,6
16,7	787,3	736,1
17,7	789,3	738,7
19,1	793,4	741,7
20,1	795,0	743,0
20,7	797,0	745,1
20,9	796,5	745,0
21,7	795,2	746,9
22,7	795,0	741,0
23,7	793,9	739,0
24,7	794,9	740,7
26,0	795,4	739,1
27,7	797,0	741,5
28,7	797,9	741,3
30,7	799,8	742,9

Quadro 18. Doxiciclina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,7	0,0	0,0
1,1	15,1	19,0
1,7	30,0	37,4
1,8	237,1	257,0
2,0	299,0	280,0
2,7	388,8	339,2
3,8	583,1	541,2
4,9	674,8	614,3
6,0	716,9	654,6
6,7	736,8	678,5
7,7	754,6	703,8
8,7	760,7	706,7
9,7	765,7	712,9
10,7	769,3	717,3
11,8	771,7	719,6
13,2	776,0	725,4
13,8	777,3	725,0
14,7	782,4	731,6
15,8	784,2	732,6
16,7	787,3	736,1
17,7	789,3	738,7
19,1	793,4	741,7
20,1	797,0	745,1
20,7	796,5	745,0
20,9	795,2	746,9
21,7	795,0	741,0
22,7	793,9	739,0
23,7	794,9	740,7
24,7	795,4	739,1
26,0	797,0	741,5
27,7	797,9	741,3
28,7	799,8	742,9
30,7	798,8	742,4

Quadro 19. Doxiciclina ($\times 10^1$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,7	15,5	12,4
1,1	26,4	22,8
1,7	64,1	56,6
1,8	82,6	76,5
2,0	114,4	110,2
2,7	212,0	219,0
3,8	286,7	294,7
4,9	385,1	399,3
6,0	487,8	495,6
6,7	532,0	575,4
7,7	575,3	601,7
8,7	610,7	638,5
9,7	636,7	661,6
10,7	654,3	680,9
11,8	671,6	699,8
13,2	689,7	722,6
13,8	695,7	725,4
14,7	698,7	740,5
15,8	698,8	743,6
16,7	698,8	743,6
17,7	698,8	743,6
19,1	698,8	743,6
20,1	698,8	743,6
20,7	698,8	743,6
20,9	698,8	743,6
21,7	698,8	743,6
22,7	698,8	743,6
23,7	698,8	743,6
24,7	698,8	743,6
26,0	698,8	743,6
27,7	698,8	743,6
28,7	698,8	743,6
30,7	698,8	743,6

Quadro 20. Doxíciclina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado (mL _N /gSV _{substrato adicionado})	
	Rep 1	Rep 2
0,0	0,0	0,0
0,7	16,2	18,8
1,1	21,8	26,5
1,7	19,5	26,8
1,8	29,8	37,2
2,0	44,4	48,0
2,7	133,4	145,2
3,8	253,4	273,4
4,9	327,7	346,5
6,0	388,4	413,6
6,7	430,4	462,1
7,7	505,3	533,1
8,7	552,3	572,9
9,7	586,6	601,6
10,7	606,7	622,4
11,8	620,4	633,9
13,2	626,4	638,3
13,8	627,1	639,1
14,7	627,1	639,1
15,8	627,1	639,1
16,7	627,1	639,1
17,7	627,1	639,1
19,1	627,1	639,1
20,1	627,1	639,1
20,7	627,1	639,1
20,9	627,1	639,1
21,7	627,1	639,1
22,7	627,1	639,1
23,7	627,1	639,1
24,7	627,1	639,1
26,0	627,1	640,9
27,7	627,1	640,9
28,7	627,1	640,9
30,7	627,1	642,9

Quadro 21. Controle: amostra de concentrado bovino

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	85,4	84,2	81,7
1,36	144,7	144,7	140,9
2,09	207,3	209,8	204,8
3,15	265,2	267,7	262,7
4,68	336,2	340,0	335,0
6,73	413,5	417,2	411,0
8,27	477,0	483,2	475,8
9,69	537,2	545,8	538,4
13,72	604,8	612,2	608,4
34,92	651,2	656,2	662,3

Quadro 22. Tiamulina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	79,2	78,8	85,0
1,72	175,4	170,8	185,7
2,96	250,6	245,6	264,2
4,68	329,9	324,6	346,9
6,73	407,2	400,2	424,9
8,27	470,7	465,9	491,9
9,69	530,9	528,2	553,0
13,72	596,0	596,7	626,3
34,92	645,0	649,0	689,8

Quadro 23. Tiamulina (x.10 mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	70,0	78,8	77,5
1,72	169,5	178,2	173,2
2,96	249,2	255,5	249,3
4,68	328,2	335,7	329,5
6,73	403,9	411,3	406,4
8,27	469,6	478,3	472,0
9,69	533,1	541,8	534,4
13,72	595,5	604,2	596,7
26,02	647,6	657,4	647,5
34,92	651,8	665,3	652,9

Quadro 24. Tiamulina (x.10² mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,02	85,0	85,8	86,0
1,72	154,0	156,9	156,1
2,96	232,9	233,0	231,1
4,68	312,3	310,8	310,3
6,73	389,5	386,4	387,3
8,65	468,7	464,0	465,1
10,68	546,5	542,6	539,0
19,95	618,5	631,5	642,9
34,92	629,1	695,0	657,2

Quadro 25. Tiamulina ($\times 10^3$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,36	98,2	101,4	101,9
2,25	168,2	176,0	174,4
3,69	234,3	244,2	240,5
5,63	305,8	319,1	313,3
7,64	367,1	386,2	378,2
9,69	433,9	460,0	452,4
14,68	496,8	532,4	532,6
23,00	558,5	609,7	590,5
34,92	578,9	631,2	628,2

Quadro 26. Tiamulina ($\times 10^4$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,72	100,9	84,0	70,3
2,63	176,6	175,0	170,0
4,26	249,3	246,8	241,8
6,73	315,9	317,4	306,3
9,69	389,9	391,8	372,0
13,72	459,6	464,3	438,4
19,95	536,1	530,0	515,2
34,92	584,8	596,3	545,6

Quadro 27. Tilosina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	72,5	74,1	72,5
1,72	167,0	162,9	165,8
2,63	229,1	225,2	229,1
4,26	307,9	303,2	307,9
5,94	370,6	367,5	373,1
7,64	436,8	434,0	439,3
9,30	506,3	502,6	513,7
12,65	573,4	579,9	591,8
21,90	652,3	653,0	654,7
34,92	662,7	668,3	670,0

Quadro 28. Tilosina (x.10 mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,02	92,5	93,7	93,7
1,72	156,5	156,5	160,2
2,96	241,6	240,3	234,2
4,68	324,7	324,7	311,1
6,73	406,8	408,0	385,9
8,27	476,5	479,0	449,5
9,69	542,4	547,8	508,4
12,65	607,8	615,7	567,6
21,90	674,7	671,4	624,7
34,92	682,7	680,6	638,8

Quadro 29. Tilosina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,36	95,7	89,2	144,3
2,25	171,9	160,3	218,1
3,83	256,4	247,0	298,9
5,31	327,4	314,2	362,5
6,93	397,4	381,5	422,7
8,65	483,0	466,9	502,1
10,13	548,0	533,0	562,1
14,10	632,9	616,5	628,6
34,92	679,8	663,3	679,2

Quadro 30. Tilosina ($\times 10^3$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,36	79,5	60,6	75,7
2,25	143,2	142,8	140,7
3,69	209,3	214,9	205,6
5,63	268,5	277,7	267,3
7,64	334,7	346,2	334,7
9,30	409,5	423,2	410,7
10,68	479,4	495,4	479,4
12,65	544,8	566,8	547,2
16,10	609,5	633,8	616,8
34,92	640,2	666,9	645,1

Quadro 31. Tilosina ($\times 10^4$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado ($\text{mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato adicionado}}$)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
2,09	64,6	83,4	73,3
3,15	124,8	136,4	134,8
4,68	190,7	198,8	200,7
7,31	253,4	262,8	262,1
9,69	324,6	329,2	329,6
11,72	405,5	410,4	414,2
13,72	492,5	497,6	502,4
19,95	601,2	596,7	596,4
34,92	609,5	633,8	616,8

Quadro 32. Lincomicina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado ($\text{mL}_N/\text{gSV}_{\text{substrato adicionado}}$)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	80,4	75,4	80,4
1,72	176,6	169,1	177,9
2,96	251,8	244,3	255,5
4,68	328,7	320,0	332,5
6,73	403,5	393,6	407,2
8,65	486,4	470,3	489,0
10,68	567,9	541,9	569,2
14,68	630,8	601,1	633,3
34,92	672,2	630,1	669,8

Quadro 33. Lincomicina ($\times 10$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,02	98,7	89,5	99,7
1,72	167,7	155,7	168,5
2,96	240,4	225,6	239,8
4,68	317,4	300,9	317,8
6,73	395,8	377,8	397,3
8,65	478,8	456,6	482,5
10,13	538,8	516,3	548,5
14,10	604,0	589,9	629,6
34,92	626,1	621,8	657,8

Quadro 34. Lincomicina ($\times 10^2$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,36	77,0	72,0	75,7
2,25	164,4	160,7	0,0
4,68	278,7	271,3	0,0
7,31	383,1	379,3	0,0
8,65	444,5	439,5	68,2
10,68	527,2	519,7	0,0
14,68	598,7	591,2	72,1
34,92	641,3	632,6	73,8

Quadro 35. Lincomicina ($\times 10^3$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
1,72	63,7	65,3	85,2
2,63	155,5	158,7	175,0
4,26	230,7	240,4	249,3
6,73	302,1	307,4	321,1
8,65	367,5	365,6	383,0
10,68	436,3	431,0	452,2
14,10	503,1	510,5	518,1
34,92	535,0	549,9	548,9

Quadro 36. Lincomicina ($\times 10^4$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
2,09	68,5	67,1	66,0
3,69	171,4	172,2	176,3
5,63	238,0	242,3	246,6
8,65	315,9	321,3	318,3
11,72	397,1	397,3	394,6
15,64	473,4	463,6	464,7
34,92	498,6	483,8	477,6

Quadro 37. Gentamicina (x mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	80,4	77,7	76,5
1,72	171,6	173,7	162,5
2,96	246,8	247,4	235,0
4,68	326,2	325,4	309,3
6,73	402,2	403,7	381,4
8,27	469,5	469,5	443,6
10,13	537,7	543,7	520,3
14,10	611,6	616,2	585,4
34,92	657,3	661,7	635,9

Quadro 38. Gentamicina (x.10 mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	87,7	85,4	87,7
1,72	177,4	177,9	179,9
2,63	238,4	240,2	240,9
4,26	321,1	321,9	323,6
5,94	390,1	388,7	391,4
7,64	462,6	458,9	462,7
9,30	537,2	539,9	541,0
12,09	597,6	602,9	601,4
19,95	650,0	654,2	660,0
34,92	663,0	669,7	674,2

Quadro 39. Gentamicina (x.10² mg/L)

Tempo	Biogás acumulado		
--------------	-------------------------	--	--

(d)	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	86,7	84,0	82,7
1,72	176,6	179,9	178,7
2,96	250,6	257,4	254,9
4,26	315,4	323,3	320,8
5,94	384,6	394,8	391,1
7,64	456,1	467,3	463,6
8,95	517,6	528,6	524,9
11,72	583,1	592,7	590,3
21,90	642,7	653,4	651,0
34,92	646,9	663,9	662,6

Quadro 40. Gentamicina (x.10³ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL _N /gSV _{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	77,9	76,6	77,9
1,72	162,9	157,9	164,9
2,63	226,5	219,0	229,7
4,26	305,7	294,6	306,5
5,94	376,1	362,5	376,9
7,64	443,9	427,8	444,7
9,30	512,5	493,9	514,5
14,68	583,5	556,4	585,6
25,09	646,8	609,8	646,4
34,92	652,3	616,6	654,4

Quadro 41. Gentamicina ($\times 10^4$ mg/L)

Tempo (d)	Biogás acumulado		
	(mL_N/gSV_{substrato adicionado})		
	Rep 1	Rep 2	Rep 2
0	0,0	0,0	0,0
0,83	92,7	95,2	96,7
1,72	172,5	171,0	169,2
2,96	241,3	237,4	235,7
4,96	315,3	308,8	311,1
7,31	384,3	374,3	379,1
9,69	462,9	450,4	454,2
11,72	524,2	512,9	515,7
19,95	589,8	579,7	575,2
34,92	599,1	587,8	583,3