



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E  
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO APLICADA NA DIGESTÃO  
ANAERÓBIA**

**ANA CAROLINE DE LIMA**

Foz do Iguaçu  
2023

**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E AVALIAÇÃO  
DA TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO APLICADA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA**

**ANA CAROLINE DE LIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Passarini

Foz do Iguaçu  
2023

ANA CAROLINE DE LIMA

**POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E  
AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO APLICADA NA DIGESTÃO  
ANAERÓBIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Prof. Dr. Michel Rodrigo Passarini

UNILA

---

Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

UNILA

---

Prof. Dra. Andreia Cristina Furtado

UNILA

Foz do Iguaçu, 30 de outubro de 2023.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Ana Caroline de Lima

Curso: Bacharel em Biotecnologia

Tipo de Documento

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo                                    |
| <input type="checkbox"/> especialização       | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado             | <input type="checkbox"/> monografia                                |
| <input type="checkbox"/> doutorado            | <input type="checkbox"/> dissertação                               |
|   | <input type="checkbox"/> tese                                      |
|   | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais               |
|   | <input type="checkbox"/>   |

Título do trabalho acadêmico: Potencial Bioquímico de Metano do bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da técnica de bioaugmentação aplicada na digestão anaeróbia.

Nome do orientador(a): Dr. Michel Rodrigo Passarini

Data da Defesa: 30 de outubro de 2023

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 03 de outubro de 2023.

*Ana C. de Lima*

Assinatura do responsável

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Nardete da Silva e Waldemir de Lima, por não terem soltado da minha mão no momento que eu mais precisei, e por todo o apoio durante todos esses anos. Só vocês sabem o quanto foi difícil chegar até aqui, e sem vocês nada disso seria possível. Agradeço também à minha irmã Jéssica Andreza da Silva, por todo amor, todos os abraços apertados e todos os conselhos reconfortantes.

Agradeço ao meu amor, Guilherme Eduardo Wagner, por toda paciência, todo carinho, cuidado e atenção, não apenas no período da elaboração deste trabalho, mas em todos os âmbitos da vida. Segurar sua mão foi o que me manteve forte, obrigada por ser tão maravilhoso e por estar comigo sempre.

Agradeço aos meus amigos biotecnologistas da turma de 2017, principalmente à Julia Beatriz dos Santos, Matheus Araujo e Vitória Gomes Guerra, que estão comigo desde as primeiras semanas de aula até os dias atuais. Além de colegas de curso, vocês se tornaram minha família. Nossa jornada foi marcada por muitos momentos de alegria e também muitos de tristeza. Mas apesar de tudo, vocês foram capazes de tornar a caminhada mais leve durante todos esses anos, e sempre terão um espaço reservado no meu coração. Agradeço também à Eliane Alves, Patricia Alderete, Alexander Colmenarez, Santiago Marsiglia e Gabriel Neuman, por todos os momentos de afeto e companheirismo.

Agradeço à minha amiga e irmã Milena Silva Braga, por ouvir todos os meus pensamentos incansavelmente, me segurar para que eu não caísse, e me apoiar com tanto carinho e cuidado.

Agradeço ao CIBiogás pela oportunidade de desenvolver meu trabalho de conclusão de curso em sua estrutura. À Juliana Somer por viabilizar a realização deste trabalho e por contribuir tanto na minha trajetória profissional, e especialmente à coordenadora do Laboratório de Biogás, Franciele Natividade, pelo conhecimento compartilhado, por toda a dedicação para ensinar, pela confiança no meu trabalho e por ter prestado tanto apoio e suporte para que tudo isso se tornasse possível. Agradeço também às minhas colegas de trabalho Giovanna Ghellere e Rafaela Meyer por toda paciência e ajuda com a execução desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Michel Passarini, não apenas pelo seu apoio na elaboração deste trabalho, mas também pela orientação durante meu projeto de iniciação científica, que moldou significativamente minha trajetória acadêmica.

Agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), que foi minha casa durante esses anos, pelo acolhimento, pelas memórias, e pela oportunidade de adquirir um diploma em uma instituição multicultural.

Por fim, minha gratidão se estende a todos os professores do curso de Biotecnologia, pois cada um de vocês contribuiu de forma única para a minha formação e para a profissional que estou me tornando.

LIMA, A. C. **Potencial Bioquímico de Metano do bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da técnica de bioaugmentação aplicada na digestão anaeróbia.** 2023. 45 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

## RESUMO

O uso de combustíveis fósseis tem sido uma preocupação crescente nos últimos anos, não apenas devido a questões ambientais, mas também devido aos riscos associados à dependência de fontes externas de energia nas economias nacionais. No contexto de energias renováveis, estudos confirmam que a produção de biogás a partir de resíduos agrícolas e industriais é viável, fornecendo energia e tratando resíduos. O biogás é uma fonte de energia renovável versátil, podendo substituir combustíveis tradicionais e desempenhar um papel importante no futuro energético através do tratamento de resíduos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de geração de energia relacionado à produção de biogás a partir do reaproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto do processamento da cana. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Biogás do Centro Internacional de Energias Renováveis - Biogás (CIBiogás). Para o trabalho, duas abordagens foram analisadas: uma amostra de bagaço de cana foi incubada somente com inóculo do CIBiogás, que é um lodo estável cultivado em um reator anaeróbio de mistura completa, e uma amostra incluiu a adição de uma solução bacteriana (bioaugmentação) juntamente ao bagaço e ao inóculo. As bactérias utilizadas na bioaugmentação foram linhagens do próprio inóculo, sendo estas *Niallia circulans*, *Robertmurraya siralis*, *Rhodococcus* sp., *Lysinbacillus capsici*, *Bacillus* sp. e *Priestia* sp. Os ensaios foram conduzidos em regime de batelada, em triplicatas, para avaliar o potencial de produção de biogás por meio do teste de Potencial Bioquímico de Metano (PBM). Os resultados demonstraram que o bagaço de cana é um resíduo com um bom potencial para a digestão anaeróbia, com um teor de metano de 56%. Além disso, através desses ensaios foi possível observar que a amostra que recebeu bioaugmentação obteve uma produção de biogás 19% superior (em termos de volume) nos testes em batelada realizados, quando comparada com a amostra sem bioaugmentação. Diante desses resultados, é possível visualizar que a técnica de bioaugmentação pode ser uma ferramenta promissora para melhorar a produção de biogás no contexto de degradação de resíduos lignocelulósicos pelas características dos microrganismos.

**Palavras-chave:** biocombustíveis, cana-de-açúcar, microbiologia, lignocelulose.

LIMA, A.C. **Biochemical Methane Potential of Sugarcane Bagasse and Evaluation of the Bioaugmentation Technique in Anaerobic Digestion.** 2023. 45 pages. Bachelor Thesis in Biotechnology - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2023.

## ABSTRACT

The use of fossil fuels has been a growing concern in recent years, not only due to environmental issues but also due to the risks associated with dependence on external sources of energy in national economies. In the context of renewable energies, studies confirm that biogas production from agricultural and industrial waste is feasible, providing energy and waste treatment. Biogas is a versatile renewable energy source that can replace traditional fuels and play a significant role in the future energy landscape through waste treatment. In this context, this study aimed to investigate the energy generation potential related to biogas production from the reuse of sugarcane bagasse, a byproduct of sugarcane processing. The research was conducted at the Biogas Laboratory of the International Center for Renewable Energy - Biogas (CIBiogás). For the study, two approaches were analyzed: one sample of sugarcane bagasse was incubated with only the CIBiogás inoculum, which is stable sludge cultivated in a complete-mix anaerobic reactor, and one sample included the addition of a bacterial solution (bioaugmentation) along with the bagasse and inoculum. The bacteria used in bioaugmentation were strains from the inoculum itself, including *Niallia circulans*, *Robertmurraya siralis*, *Rhodococcus sp.*, *Lysinbacillus capsici*, *Bacillus sp.*, and *Priestia sp.* Batch tests were conducted in triplicates to assess the biogas production potential through the Biochemical Methane Potential (BMP) test. The results demonstrated that sugarcane bagasse is a waste material with good potential for anaerobic digestion, with a methane content of 56%. Furthermore, these tests revealed that the bioaugmented sample achieved a 19% higher biogas production (in terms of volume) in the batch tests when compared to the non-bioaugmented sample. These results suggest that the bioaugmentation technique may be a promising tool to enhance biogas production in the context of lignocellulosic waste degradation due to the characteristics of the microorganisms.

**Keywords:** biofuels, sugarcane, microbiology, lignocellulose.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Sequências metabólicas da digestão anaeróbia.....	15
<b>Figura 2</b> – Amostra de bagaço de cana bruto (a); e triturado (b).....	22
<b>Figura 3</b> – Processo de pesagem da amostra para o registro das massas (a); duplicata de cadinhos contendo a amostra no dessecador (b).....	23
<b>Figura 4</b> – Linhagens cultivadas em shaker a 150 rpm.....	25
<b>Figura 5</b> – Reator anaeróbio de mistura completa.....	27
<b>Figura 6</b> – Aparato de fermentação anaeróbia.....	28
<b>Figura 7</b> – Amostra em triplicata no sistema de banho maria.....	29
<b>Figura 8</b> – Volume de gás visualizado na graduação do eudiômetro.....	32

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

%SV – Sólidos Voláteis em base úmida  
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
APHA – American Public Health Association  
BC – Bagaço de cana-de-açúcar  
BCB – Bagaço de Cana-de-açúcar com Bioaumentação  
BMP – *Biochemical Methane Potencial*  
CH<sub>4</sub> – Metano  
CIBiogás – Centro Internacional de Energias Renováveis - Biogás  
CNTP – Condições Normais de Temperatura e Pressão  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
H<sub>2</sub> – Hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico  
IEA – Instituto de Economia Agrícola  
ILACVN – Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza  
ISO/IEC – *International Organization for Standardisation/International Electrotechnical Commission*  
LN.kg SV<sup>-1</sup> – Litros Normalizados por quilograma de Sólidos Voláteis  
NA – Ágar Nutriente  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.10.H<sub>2</sub>O – Sulfato de Sódio Deca Hidratado  
NB – *Nutrient Broth*  
NBR – Norma Técnica  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
PBM – Potencial Bioquímico de Metano  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
SF – Sólidos Fixos  
ST – Sólidos Totais  
SV – Sólidos Voláteis  
UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana  
VDI – *Verein Deutscher Ingenieure*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 BIOGÁS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Hidrólise.....	14
2.2.2 Acidogênese.....	15
2.2.3 Acetogênese.....	15
2.2.4 Metanogênese.....	16
2.2.5 Fatores que interferem na digestão anaeróbia.....	16
<b>2.3 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 COLETA DA AMOSTRA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....</b>	<b>22</b>
4.2.1 Sólidos Totais.....	23
4.2.2 Sólidos Fixos e Voláteis.....	24
<b>4.3 REATIVAÇÃO E PREPARO DA SOLUÇÃO BACTERIANA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 ENSAIO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO – PBM.....</b>	<b>27</b>
4.4.1 Aparato de fermentação anaeróbia.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 LINHAGENS BACTERIANAS.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3 POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO – PBM.....</b>	<b>35</b>
5.3.1 Preparo do inóculo.....	35
5.3.2 Controle positivo.....	37
5.3.3 Avaliação da técnica de bioaumentação na produção de biogás.....	37
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A energia proveniente de combustíveis fósseis é considerada não renovável, pois suas fontes levam milhares de anos para se formar e desaparecem após o esgotamento dos depósitos, ou seja, a taxa de extração pelo uso humano é maior do que a taxa de reposição (PIVA, 2010). Além de limitada, por ser fonte não renovável de energia, a utilização de combustíveis fósseis como principal fonte de energia tem gerado consequências desastrosas para o planeta. Os efeitos nocivos do uso ostensivo desses combustíveis incluem: o aquecimento global, desigualdade econômica de acesso a cadeia produtiva e de abastecimento, impactos negativos na saúde humana e efeitos ambientais desastrosos na exploração dos recursos (RIBEIRO, 2014). A energia fóssil é responsável pela maior parte da emissão de gases poluidores na atmosfera.

A viabilidade de aproveitar a energia dos resíduos provenientes da agricultura e indústria tem sido confirmada por vários estudos que analisaram a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia. Além de gerar energia, essa reação possibilita o tratamento dos resíduos, reduzindo a concentração de matéria orgânica nestes (HASAN 2019). Dentro deste cenário, o biogás derivado de resíduos e detritos pode desempenhar um papel crucial no futuro da energia. O biogás é uma fonte de energia renovável versátil, com a capacidade de substituir os combustíveis tradicionais para gerar calor e eletricidade, bem como servir como combustível gasoso em aplicações automotivas (ACHINAS, 2017).

Entre os resíduos mais comuns gerados na agricultura brasileira, destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar. Esse resíduo pode ser transformado em um recurso valioso quando utilizado como substrato na digestão anaeróbia. A digestão anaeróbia é um processo bioquímico que trata substratos orgânicos, envolvendo a degradação e estabilização da matéria orgânica por meio de microrganismos, resultando na produção de biogás. Esse biogás pode ser empregado como uma alternativa às fontes de energia fóssil, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa (REMOR, 2020).

Entretanto, o bagaço de cana-de-açúcar é um substrato lignocelulósico, predominantemente composto por celulose, hemicelulose e

lignina. Sua estrutura é complexa e de difícil degradação. Nesse contexto, a técnica de bioaugmentação, que consiste na inserção de microrganismos com capacidade de degradar compostos, pode ser uma ferramenta vantajosa na questão de degradabilidade do substrato, visando aumentar a produção de biogás em volume.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 BIOGÁS

O processo de digestão anaeróbia origina uma mistura gasosa chamada de biogás. Sua composição depende do tipo de matéria-prima submetida ao processo de digestão e da forma como esse processo é conduzido. Geralmente, o biogás é composto principalmente por metano (50-75%) e dióxido de carbono (25-45%), e outros componentes em menor escala, como ácido sulfídrico, hidrogênio, monóxido de carbono, nitrogênio, amônia e oxigênio (ALI SHA, 2014).

A composição média da mistura de gases que compõem o biogás pode ser observada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Composição média da mistura de gases

Gases	Composição média (%)
Metano	50 - 75
Dióxido de Carbono	25 - 45
Hidrogênio	1 - 3
Nitrogênio	0,5 - 2,5
Oxigênio	0,1 - 1
Ácido sulfídrico	0,1 - 0,5
Amônia	0,1 - 0,5
Monóxido de Carbono	0 - 0,1

Fonte: Adaptado de Soares, 2017.

Segundo Agostini (2015), o biogás pode ser utilizado de duas maneiras principais: queimado para gerar calor e energia no local ou processado em biometano para ser usado como combustível para veículos. Ele pode ser produzido a partir de uma ampla variedade de materiais biológicos, incluindo

resíduos agrícolas e orgânicos provenientes de setores industriais e domésticos (AGOSTINI, 2015).

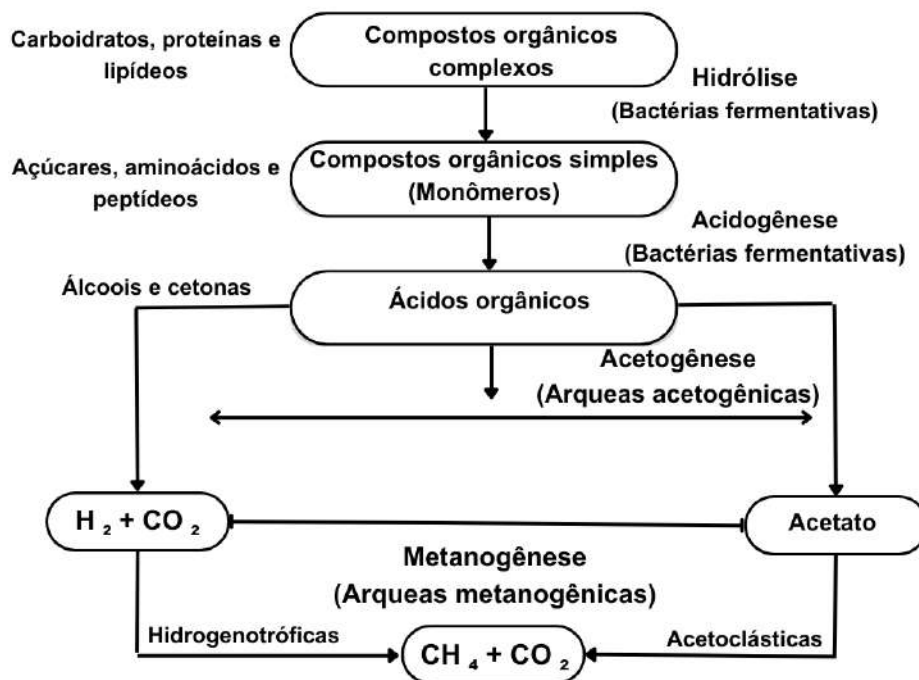
A viabilidade econômica do biogás é influenciada por elementos como a disponibilidade e a logística de resíduos, a eficiência do processo e as características do produto final. Uma ampla gama de resíduos lignocelulósicos de custo acessível e abundantes pode ser processada para a geração de biogás (ACHINAS, 2017). Neste contexto, a digestão anaeróbia de resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar se torna vantajosa em termos de quantidade e disponibilidade.

## 2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo que depende da ação de uma comunidade de microrganismos, tanto anaeróbios quanto facultativos, sob condições de ausência de oxigênio ( $O_2$ ). Em geral, a digestão anaeróbia consiste em um ecossistema onde diversos grupos de microrganismos colaboram de forma interativa para converter a matéria orgânica em vários produtos (LOBATO, 2011). Entre os principais produtos resultantes desse processo, destacam-se o metano ( $CH_4$ ) e o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (SOARES, 2017). Para que os processos metabólicos da digestão anaeróbia ocorram, é necessária a atividade conjunta de pelo menos três grupos distintos de microrganismos: bactérias fermentativas ou acidogênicas, bactérias sintróficas acetogênicas e microrganismos metanogênicos como as arqueas (LOBATO, 2011).

Com isso, o processo pode ser dividido em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 1). Cada uma dessas fases é conduzida por um grupo específico de microrganismos em interação sinérgica (KUNZ, 2022).

**Figura 1** – Sequências metabólicas da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Chernicharo, 2007.

### 2.2.1 Hidrólise

Na fase inicial da digestão anaeróbica, conhecida como hidrólise, ocorre a quebra de compostos insolúveis como a celulose, proteínas e gorduras. Esses compostos são quebrados em fragmentos solúveis em água, chamados de monômeros. O processo é realizado por meio de exoenzimas, como as celulasas, proteases, lipases e hidrolases, presentes principalmente em bactérias fermentadoras (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2011).

A influência da etapa de hidrólise na velocidade da degradação depende das características do substrato em questão. Quando a matéria orgânica é complexa e difícil de degradar, a hidrólise desempenha um papel significativo na velocidade geral da degradação, podendo ser considerada como o passo que limita a velocidade da digestão anaeróbica (KUNZ, 2022). A hidrólise de carboidratos ocorre rapidamente, em questão de horas, enquanto a quebra de proteínas e lipídios leva alguns dias (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2011).



A hidrólise, em condições de biodigestão, é realizada por bactérias anaeróbias de gêneros como *Streptococcus* e *Enterobacterium*, entre outros (MIR, 2016).

### 2.2.2 Acidogênese

Após a fase hidrolítica, os monômeros formados na hidrólise (ácidos graxos, aminoácidos e açúcares) são utilizados como substratos por diferentes microrganismos fermentadores primários. Na acidogênese, os substratos são degradados a ácidos orgânicos de cadeia curta, álcoois, óxidos de nitrogênio, sulfeto de hidrogênio, dióxido de carbono, hidrogênio e moléculas com 1 a 5 carbonos (KUNZ, 2022).

A existência de oxigênio e nitratos no meio é considerada tóxica e inibe o processo anaeróbio. As bactérias anaeróbias facultativas da acidogênese usam o oxigênio introduzido acidentalmente no processo, criando condições favoráveis para o desenvolvimento dos anaeróbios obrigatórios (MIR, 2016).

Exemplos de microrganismos envolvidos nessa etapa são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacteroidetes*, *Clostridium*, entre outros gêneros pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* (XU et al, 2018).

### 2.2.3 Acetogênese

Na terceira etapa da digestão anaeróbia, conhecida como acetogênese, os ácidos orgânicos com três ou mais carbonos, álcoois e cetonas gerados na etapa anterior são transformados em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono por bactérias acetogênicas (sintróficas) (ZAMBONI, 2017). As bactérias acetogênicas mantêm uma relação sinérgica com as arqueas metanogênicas e bactérias homoacetogênicas. Durante essa etapa, os ácidos de cadeia longa são convertidos em ácidos com apenas um ou dois átomos de carbono (acético e fórmico), ao mesmo tempo em que ocorre a produção de hidrogênio e dióxido de carbono (KUNZ, 2022). Posteriormente, as bactérias convertem o hidrogênio e o dióxido de carbono em acetato, que será metabolizado pelas arqueas metanogênicas.

Exemplos de microrganismos envolvidos nessa etapa são *Acetobacterium woodii*, *Clostridium aceticum*, *Syntrophomonas* e *Syntrophobacter* (XU et al, 2018).

#### 2.2.4 Metanogênese

A metanogênese consiste na quarta etapa da digestão anaeróbia, onde o acetato, o hidrogênio e o dióxido de carbono formados anteriormente são convertidos em metano pelas arqueas metanogênicas. De acordo com Zamboni (2017), a metanogênese ocorre em duas rotas metabólicas distintas: a hidrogenotrófica, onde as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas convertem dióxido de carbono e hidrogênio em metano e água, e a acetotrófica, onde as arqueas metanogênicas acetoclásticas convertem acetato em metano e dióxido de carbono (ZAMBONI, 2017). Exemplos de microrganismos presentes nessa etapa são *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (MIR, 2016).

#### 2.2.5 Fatores que interferem na digestão anaeróbia

O funcionamento metabólico dos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia depende de vários fatores, como temperatura, presença ou ausência de oxigênio, pH, nutrientes, presença de substâncias inibidoras, composição do substrato, entre outros (ZAMBONI, 2021). Portanto, para garantir um processo de fermentação eficiente, é essencial que esses parâmetros sejam controlados.

De acordo com Kunz (2022), a temperatura desempenha um papel significativo nas propriedades físico-químicas dos componentes presentes em substratos anaeróbios. Além disso, exerce influência sobre a taxa de crescimento e o metabolismo dos microrganismos, afetando assim a dinâmica populacional em um biodigestor (KUNZ, 2022).

A digestão anaeróbia pode ocorrer em três faixas de temperatura, conhecidas como psicrófila (< 20 °C), mesofílica (25-40 °C) e termofílica (50-65 °C). As condições termofílicas possibilitam uma maior carga, um melhor rendimento, maior digestão do substrato, maior produção de metano e a

eliminação de patógenos (MIR, 2016). No entanto, é importante notar que os microrganismos metanogênicos nessa faixa de temperatura são sensíveis a toxinas e a pequenas flutuações nas condições ambientais, o que pode resultar em sua morte (ARSOVA, 2010). As condições mesofílicas, por outro lado, operam com consórcios microbianos mais resistentes que resistem a mudanças ambientais, sendo mais estáveis e mais fáceis de operar e manter (MIR, 2016). Kunz (2022) aponta que a condição ótima de crescimento mesofílico é de  $37 \pm 2$  °C.

Além da temperatura, o pH também deve ser mantido constante. Esse parâmetro está relacionado à alcalinidade e ácidos voláteis, e seu efeito afeta diretamente a atividade de enzimas (BRITO, 2011). A hidrólise e a acetogênese ocorrem em pH entre 5,5 e 6,5, enquanto as arqueas metanogênicas são mais sensíveis a mudanças de pH e requerem um ambiente entre 6,8 e 8,5, com uma faixa ótima de 7,0 a 7,5 (MIR, 2016). Para evitar efeitos inibitórios é ideal que o pH esteja próximo à neutralidade.

Com relação aos nutrientes, alguns macronutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre são essenciais para o desenvolvimento da digestão anaeróbia, particularmente no crescimento das arqueas metanogênicas (ZAMBONI, 2017). Porém, Stéfano (2013) aponta que o nitrogênio, apesar de ser essencial no processo de biodigestão, pode se tornar um agente inibidor quando presente em altas concentrações na forma de amônia, prejudicando os microrganismos metanogênicos.

### 2.3 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

De acordo com o Instituto de Economia Agrícola (IEA) 2021, o Brasil é atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra 2020/21, o país alcançou uma produção de 654,5 milhões de toneladas, destinando-as à produção de 41,2 milhões de toneladas de açúcar e 29,7 bilhões de litros de etanol (IEA 2021).

À medida que a produção de álcool continua a crescer, as usinas têm demonstrado uma preocupação com o reaproveitamento dos

efluentes e resíduos sólidos. É relevante destacar que, além da considerável quantidade gerada, muitos desses resíduos têm um valor energético reconhecido, o que torna sua utilização altamente benéfica para as usinas (BRITO, 2011). Esses subprodutos, como o bagaço da cana-de-açúcar, podem ser reutilizados de forma econômica como fonte de energia, muitas vezes na forma de combustível (SANCHEZ et. al., 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto fibroso lignocelulósico resultante do processo de esmagamento dos colmos de cana-de-açúcar para a extração do caldo de açúcar. Essa fase está relacionada à produção de açúcar e etanol de primeira geração (SANCHEZ et. al., 2010). Atualmente, este material é comumente utilizado como fonte de combustível em caldeiras para a geração de energia elétrica, um processo conhecido como co-geração, que resulta na produção de vapor de baixa pressão (BRITO, 2011). Entretanto, é importante ressaltar que nem todo bagaço produzido é aproveitado, e o excedente não utilizado acarreta desafios tanto ambientais quanto de armazenamento (COSTA et al., 2014).

Estima-se que a quantidade de energia gerada pela queima do bagaço para produzir vapor seja mais do que o dobro da quantidade de energia necessária para a produção de açúcar e álcool (COSTA et al., 2014). Portanto, visto que nem todo bagaço é aproveitado em termos energéticos, a utilização completa desse resíduo é altamente desejável tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, e sua composição química o torna uma matéria-prima de grande importância estratégica, por ser uma fonte natural, de custo acessível e alta disponibilidade (BAÊTA, 2016).

De forma geral, o bagaço de cana (BC) é composto principalmente por celulose (30-45%), hemicelulose (25-30%) e lignina (25-30%) (BERTOTI, 2009). Suas características, principalmente sua quantidade considerável de carboidratos na forma de hemicelulose e celulose, têm estimulado estudos em processos de bioconversão desse material para a geração de energia através de bioetanol e biogás (BATALHA et al., 2015). Isso ocorre pois a partir da fermentação anaeróbia a celulose e a hemicelulose podem

ser transformadas em metano por meio da hidrólise enzimática, proporcionando energia e aumentando o potencial energético da indústria (COSTA et al, 2014).

O potencial do bagaço de cana na fermentação anaeróbia está relacionado à degradabilidade das concentrações remanescentes de açúcar e outras substâncias orgânicas solúveis presentes em sua composição (BRITO, 2011).

## 2.4 TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO

A bioaumentação consiste na aplicação de microrganismos selecionados, com alto potencial de degradação de matéria orgânica, que ocorrem naturalmente no ambiente, não são patogênicos e não foram geneticamente modificados, com o objetivo de melhorar a qualidade de um bioprocessamento específico (CHEN et al, 2014). Os microrganismos presentes em um sistema mantêm um equilíbrio, chamado de homeostase.

Quando uma grande população de microrganismos selecionados é adicionada, com a capacidade de degradar compostos orgânicos em alta taxa, a homeostase é interrompida. Isso permite uma degradação mais eficiente dos compostos orgânicos pelos microrganismos introduzidos, bem como pelos microrganismos nativos que, devido ao equilíbrio anterior, não conseguiam atingir seu potencial máximo de degradação (CARDOSO, 2012). Essa técnica tem sido usada para melhorar processos biológicos em várias aplicações, como eliminar poluentes em estações de tratamento e solos contaminados (JONES, 2012).

Dentro de um sistema de biodigestão, vários fatores, como temperatura, condições operacionais e as propriedades dos substratos utilizados têm a capacidade de influenciar o desempenho de populações críticas de microrganismos (ACHINAS, 2017). No contexto do funcionamento interdependente das populações microbianas, esses fatores podem causar grandes impactos na produtividade e desempenho de um sistema (OCHIENG, 2002). Como resultado, muitos sistemas de biodigestão nunca conseguem atingir a combinação ideal de populações microbianas, e, em alguns casos, não

conseguem sequer alcançar um equilíbrio satisfatório, o que leva a uma operação com baixo desempenho.

De acordo com Jones (2012), a biotecnologia abre espaço para o uso de produtos biológicos naturais, como um meio para alcançar melhorias significativas e rápidas para acentuar características desejáveis em um bioprocessos. Nesse contexto, a técnica de bioaugmentação pode ser considerada para sistemas de biodigestão que apresentam dificuldades na eficiência de conversão de matéria orgânica em biogás por falta de uma microbiota bem estabelecida.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade da digestão anaeróbia do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de biogás e avaliar a eficiência da técnica de bioaugmentação bacteriana na digestão anaeróbia visando aumentar a produção de biogás.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar;
- Reativar as linhagens bacterianas de interesse para compor uma solução bacteriana;
- Realizar a montagem de um aparato de fermentação anaeróbia;
- Determinar o Potencial Bioquímico de Metano (PBM) da amostra de bagaço-de-cana com e sem a adição da solução bacteriana;
- Avaliar a técnica de bioaugmentação no sistema de biodigestão anaeróbia visando a produção de biogás.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DA AMOSTRA

A amostra de bagaço de cana-de-açúcar em seu estado natural foi coletada no Município de Foz do Iguaçu, localizado no estado do Paraná. Esta amostra foi fornecida por um estabelecimento regional de produção, especializado na comercialização de suco de cana-de-açúcar. Para a realização dos testes, a amostra foi encaminhada para o Laboratório de Biogás do Centro Internacional de Energias Renováveis - Biogás (CIBiogás). Durante todo o período que antecedeu os ensaios, a amostra foi mantida sob refrigeração para que o material se mantivesse conservado.

O laboratório do CIBiogás é acreditado na ABNT NBR ISO/IEC 17.025 desde o ano de 2016, seu escopo é voltado para análises em substratos dedicados à produção de biogás e metano.

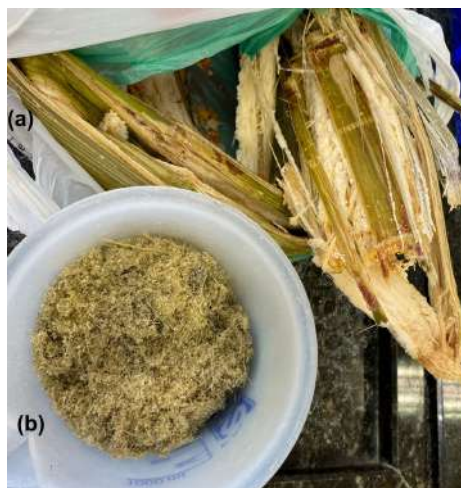
### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No Laboratório de Biogás, foram conduzidas análises de caráter descritivo, incluindo ensaios de sólidos totais, sólidos fixos e sólidos voláteis. Devido à natureza predominantemente sólida da amostra, outras avaliações físico-químicas não puderam ser conduzidas. Os procedimentos realizados estiveram em conformidade com o escopo de atuação do laboratório.

Antes de iniciar os experimentos, o bagaço de cana (BC) foi submetido a um processo de trituração em um moinho de facas, reduzindo-o a partículas menores, conforme ilustrado na Figura 2.

**Figura 2** – Amostra de bagaço de cana bruto (a); e triturado (b)





Fonte: A autora, 2023.

Posteriormente, os ensaios referentes aos sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV) seguiram o procedimento do Laboratório de biogás, adaptado da metodologia descrita no livro "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*" (APHA, 2017), adaptando o método gravimétrico de número 2540-B.

#### 4.2.1 Sólidos Totais

Os ensaios foram conduzidos em duplicata para garantir a precisão dos resultados. Para dar início ao ensaio, foram utilizados cadinhos de porcelana, previamente calcinados em uma mufla a uma temperatura de 550 °C por um período de 1 hora. Os cadinhos foram reservados em um dessecador para evitar a umidade. Após atingirem a temperatura ambiente, a massa dos cadinhos vazios foi pesada em uma balança analítica e o valor foi registrado como P1.

Posteriormente, a amostra de BC foi pesada nos cadinhos e o valor foi registrado como PA (Figura 3a). Em seguida, a amostra foi transferida para uma estufa, onde foi mantida em uma temperatura constante de 104 °C durante 12h, a fim de remover completamente a umidade. Após esse processo, os cadinhos foram reservados em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente (Figura 3b) e foram pesados novamente até a massa constante, que

consistiu em mais uma passagem pela estufa a 104 °C pelo período de 1h, e o valor foi registrado como P2.

**Figura 3** – Processo de pesagem da amostra para o registro das massas (a); duplicata de cadinhos contendo a amostra no dessecador (b)



Fonte: A autora, 2023.

De acordo com APHA (2017), o valor de ST é obtido através da seguinte relação:

$$ST\% = \frac{P2 - P1}{PA - P1} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

P1 = Peso do cadinho vazio (g);

PA = Peso inicial da amostra úmida (g);

P2 = Peso do cadinho após a secagem da amostra (g);

P3 = Peso do cadinho após calcinação da amostra (g).

#### 4.2.2 Sólidos Fixos e Voláteis

A determinação dos sólidos fixos foi realizada utilizando os mesmos cadinhos contendo a amostra após a etapa de determinação da massa

final dos ST. Com o auxílio de uma mufla, os cadinhos foram calcinados a uma temperatura de 550 °C por 4 horas. Após a calcinação, foram reservados em um dessecador, e ao atingir a temperatura ambiente foi realizada a terceira pesagem das massas, até a massa constante, que consistiu em mais uma passagem pela mufla a 550 °C pelo período de 1h registrada como P3.

Os teores de SV foram calculados com base no conteúdo volatilizado durante a calcinação dos SF. Os valores de SV e SF foram calculados seguindo as equações (2) e (3) respectivamente:

$$SF\% = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

$$SV\% = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Além disso, os valores obtidos para ST e SV permitem determinar o percentual de sólidos voláteis em massa úmida (%SV), através da seguinte relação:

$$\%SV = \left( \frac{ST\% \times SV\%}{100} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

#### 4.3 REATIVAÇÃO E PREPARO DA SOLUÇÃO BACTERIANA

Os ensaios de reativação e preparo dos microrganismos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental, nas dependências da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Para o preparo da solução bacteriana, foram empregadas linhagens originadas de microrganismos nativos presentes no próprio inóculo do CIBiogás. As seis bactérias selecionadas pertencem às seguintes espécies: *Niallia circulans*, *Robertmurraya siralis*, *Rhodococcus* sp., *Lysinbacillus capsici*, *Bacillus* sp. e *Priestia* sp. A autenticidade das espécies destas bactérias isoladas foi estabelecida através de análises de sequenciamento do gene rRNA 16S, em um estudo realizado por Ottoni et al.

(2022). As culturas foram isoladas e mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  no acervo de microrganismos da UNILA para usos futuros.

A partir das culturas isoladas, cada bactéria foi descongelada e individualmente inoculada em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Ágar Nutriente (NA), utilizando a técnica de estriamento. Para o experimento foi preparado 1 L de meio NA, composto por extrato de carne (1 g/L), extrato de levedura (2 g/L), peptona (5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e ágar-ágar (15 g/L). Após o procedimento de plaqueamento, as culturas foram incubadas em uma estufa a uma temperatura constante de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ao longo de um período de 48h. O experimento foi realizado em duplicata, em meio estéril e em condições de aerobiose.

Após o desenvolvimento das colônias, estas foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura líquido Nutrient Broth (NB), de mesma composição do meio NA, onde as culturas foram mantidas em um shaker, a 150 rpm, em uma temperatura constante de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ao longo de um período de 48h (Figura 4).

**Figura 4** – Linhagens cultivadas em shaker a 150 rpm



Fonte: A autora, 2023.

A partir da cultura mencionada foi possível realizar a padronização da concentração de células bacterianas por meio de um espectrofotômetro a 600 nm. Para padronizar a densidade óptica de cada bactéria, os cultivos, de forma individual, foram diluídos em uma proporção 1:1 (água destilada/bactéria) dentro de tubos de ensaios antes de passar no espectrofotômetro. As densidades ópticas de cada bactéria, com esse fator de diluição, atingiram valores de aproximadamente 1,0 nm. Essa abordagem permitiu a obtenção de uma concentração padrão de células bacterianas para o preparo da solução de bioaugmentação e análises subsequentes.

Após a padronização, foi realizada a elaboração da solução de bactérias, contendo uma quantidade equitativa de cada linhagem bacteriana. Como o ensaio subsequente de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) ocorreria em triplicata, foram preparados 3 tubos falcons de 20 mL, cada um contendo 1,65 mL de cada bactéria e água destilada esterilizada na mesma proporção. A determinação de frações de 20 mL foi baseada no inóculo utilizado no ensaio de PBM, de forma que o volume de solução bacteriana não interferisse nos teores de sólidos totais.

#### 4.4 ENSAIO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO – PBM

##### 4.4.1 Aparato de fermentação anaeróbia

O ensaio de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) foi realizado seguindo a norma alemã VDI 4630 de 2006 da *Verein Deutscher Ingenieure* - Associação de Engenheiros Alemães, que define o procedimento para biodigestão anaeróbia e os protocolos necessários para caracterização.

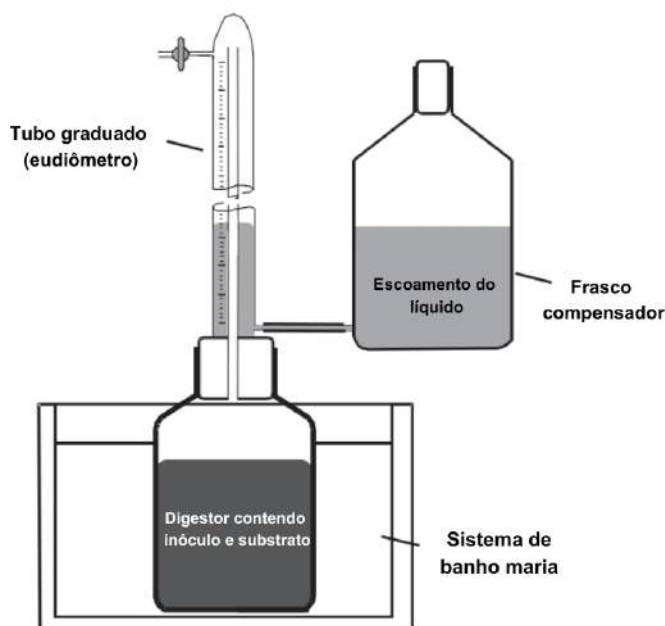
O aparato de fermentação anaeróbia é formado por um digestor de vidro de 250 mL, contendo o inóculo e o substrato, acoplado a um tubo de vidro graduado de 0 a 500 mL denominado eudiômetro, preenchido com um líquido de barreira que serve de indicador (VDI, 2006).

O líquido de barreira é uma solução composta por sulfato de sódio deca hidratado ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) e ácido sulfúrico 99% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), em uma proporção aproximada de 7:1. Nesse contexto, para preencher os seis

eudiômetros necessários para duas triplicatas, a solução foi preparada utilizando 1 kg de sulfato de sódio deca hidratado, 150 mL de ácido sulfúrico e água destilada purificada até completar o volume de um balão volumétrico de 5 L. Além disso, são adicionadas algumas gotas do corante alaranjado de metila, que serve de indicador para visualizar o deslocamento do líquido. O corante é sensível à mudanças de pH, atingindo uma coloração rosa quando em contato com meio ácido.

O eudiômetro é conectado a um frasco compensador, para onde desloca o líquido conforme é empurrado pelo gás produzido no sistema, por um processo de vaso comunicante (Figura 6).

**Figura 6** – Aparato de fermentação anaeróbia



Fonte: Adaptado de VDI 4630, 2016.

Os ensaios foram realizados em regime de batelada, em triplicatas, com temperatura mesofílica ( $37,5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) controlada por um sistema de banho maria (Figura 7). O sistema funciona da seguinte maneira: os digestores contendo as amostras são submersos em água em uma cuba de vidro com um ebulidor. O ebulidor é regulado por um controlador, que mantém a água na temperatura desejada (mesofílica).

**Figura 7** – Amostra em triplicata no sistema de banho maria



Fonte: A autora, 2023

As incubações foram conduzidas da seguinte forma: As massas previstas para o ensaio de Potencial Bioquímico de Metano foram calculadas de acordo com a norma VDI 4630, que recomenda que, para evitar inibições durante a fermentação, é importante manter uma proporção adequada entre o teor de SV do substrato e o SV do inóculo (VDI 4630, 2006). Nesse contexto, aplica-se a equação (5):

$$\frac{SV \text{ do substrato}}{SV \text{ do inóculo}} \leq 0,5 \quad \text{Equação (5)}$$

O bagaço de cana (BC) foi incubado em uma triplicata individual e em uma triplicata contendo a solução de bactérias. Foram adicionados 20 mL de solução de bactérias em cada digester dessa triplicata, após a adição da amostra

de BC e do inóculo. Além disso, o inóculo foi incubado individualmente, desempenhando o papel de um controle de resultado negativo. Para avaliar a eficiência da atividade biológica do inóculo, uma amostra de Celulose Microcristalina, reconhecida como substrato de referência, que possui um potencial de produção de biogás de 740 a 750 LN.kg SV<sup>-1</sup>, também foi incubada, servindo como controle positivo (VDI 4630, 2006).

As massas da amostra e do padrão positivo (celulose microcristalina) foram calculadas em relação à quantidade de inóculo utilizado (200 g), em uma proporção de 1:3 (amostra:inóculo), aplicando a seguinte equação (6):

$$\text{Massa da amostra (g)} = \left( \frac{m}{\%SV} \right) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

m: Massa (g) de SV em base úmida do inóculo (200 g) dividido pela proporção determinada (1:3).

%SV: Percentual de SV em base úmida da amostra.

A pesagem das massas foi realizada em uma balança semi-analítica, diretamente nos digestores. Os valores listados na Tabela 3 correspondem às massas previstas para cada amostra com base na equação (6), e também às massas reais. Dado que as amostras foram incubadas em triplicatas, os valores estão apresentados como médias de cada conjunto, acompanhadas pelo desvio padrão.

**Tabela 2** – Massas utilizadas no PBM

Amostra	Massa prevista para o substrato (g)	Massa real do substrato (g)	Massa do inóculo (g)	Solução bacteriana (mL)
Controle negativo (Inóculo)	-	-	202,91±3,8	-
Controle positivo	1,28	1,34±0,01	202,53±1,4	-



(Celulose Microcristalina)				
Bagaço de cana (BC)	3,17	3,33±0,02	200,8±0,5	-
Bagaço de cana + bactéria (BCB)	3,17	3,33±0,02	200,8±0,5	20

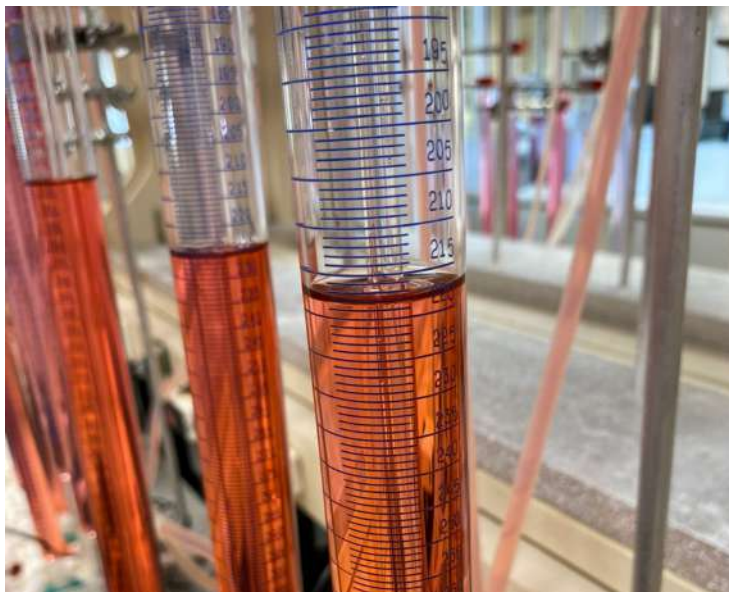
Fonte: A autora, 2023.

Visto que a concentração de ST da solução bacteriana não apresentou teores significativos, sendo inferiores a 1%, esta variável foi excluída da consideração como um fator interferente no cálculo da massa utilizada para o ensaio de PBM, uma vez que não influencia a concentração de ST e SV do inóculo.

No início da incubação, os eudiômetros foram preenchidos com nitrogênio gasoso a fim de garantir a condição de anaerobiose. Após a comprovação de que não havia nenhum vazamento no sistema, esse gás foi liberado.

O volume de gás gerado pelas amostras foi registrado diariamente, a partir da graduação do eudiômetro (Figura 8) e a composição dos gases foi determinada por meio da utilização de um analisador multigás do modelo GA 5000 da Landtec/Geotech, que contém sensores eletroquímicos e infravermelhos. Este dispositivo permite a avaliação das concentrações dos gases predominantes presentes no biogás, sendo estes metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

**Figura 8** – Volume de gás visualizado na graduação do eudiômetro



Fonte: A autora, 2023.

O cálculo da quantidade de metano produzido levou em consideração os sólidos voláteis presentes nas amostras. Esse cálculo é chamado de "produção específica". Para garantir que os resultados sejam precisos, a umidade do vapor d'água presente nos gases produzidos foi subtraída, deixando apenas o metano seco (VDI 4630, 2006).

Além disso, a quantidade de metano produzido foi normalizada para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). A sala de eudiômetros do laboratório de biogás possui registro de controle de temperatura, pressão e umidade diariamente. Os resultados foram apresentados em termos de litros normalizados por quilograma de sólidos voláteis ( $\text{LN.kg SV}^{-1}$ ), e os valores de produção do inóculo (controle negativo) foram descontados do cálculo de produção das amostras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os Sólidos Totais (ST) constituem a totalidade da fração sólida presente em um substrato. No caso específico do BC, foi identificado um teor de 39% de ST, que diverge de outras literaturas, como Mokomele et al. (2019) que apontam teores de ST de 90% para o mesmo substrato. A diferença nos valores de ST observada em diferentes estudos pode ser atribuída às variações na composição do substrato, à presença de cascas, ao momento da colheita e às condições de transporte e armazenamento. Na Tabela 2 estão expressos as médias dos resultados dos ensaios de ST, SV e SF e seus respectivos desvios padrão.

**Tabela 3:** Caracterização de Sólidos Totais, Fixos e Voláteis

Amostra	ST (%)	SV <sup>1</sup> (%)	SF <sup>1</sup> (%)
Bagaço de cana	39,49±0,06	98,12±0,04	1,88±0,05

<sup>1</sup> Resultados expressos em massa seca; <sup>2</sup> Resultados expressos em massa úmida.

Fonte: A autora, 2023.

Os Sólidos Fixos (SF) são materiais que não se decompõem com facilidade, sendo predominantemente compostos por substâncias não orgânicas e minerais que não são suscetíveis à biodigestão (LINS, 2017). A amostra analisada apresentou uma baixa concentração de SF, cerca de 1,88%, o que indica que a fração de matéria orgânica é significativamente maior.

Os Sólidos Voláteis (SV) representam a fração de matéria orgânica disponível para ser degradada durante a biodigestão, ou seja, a porção desse material que pode ser convertida em biogás (ALENCAR, 2017). No caso da amostra analisada, foi identificado um teor de aproximadamente 98% de SV, o que sinaliza um alto potencial de produção de biogás. Remor (2020) e Mokomele et al. (2019) reportaram teores similares de SV para amostras de BC, de 98,0% e 96,1% respectivamente.

## 5.2 LINHAGENS BACTERIANAS

A escolha das linhagens bacterianas selecionadas para a bioaugmentação se justifica pelo fato de que elas se encontram em um estado de equilíbrio ambiental, em harmonia com a população original, sem gerar possíveis competições ou inibições, pois foram isoladas de amostras do próprio inóculo.

A reativação das bactérias ocorreu sem dificuldades e não houve presença de microrganismos contaminantes em nenhuma das placas de petri. Todas foram cultivadas em meio aeróbio antes do ensaio de PBM, portanto, vale ressaltar que se tratam de microrganismos aeróbios facultativos.

A medida da densidade ótica no espectrofotômetro permitiu que se obtivesse um padrão de concentração celular, para que o potencial de degradação de cada bactéria pudesse ser avaliado de forma conjunta, sem a diferença entre elas. A Tabela 4 exemplifica o potencial de degradação de cada bactéria presente na solução de bioaugmentação, juntamente com o valores de densidade ótica obtidos.

**Tabela 4** – Potencial de degradação das bactérias

Bactéria	Potencial relacionado	Densidade ótica obtida (nm)
<i>Niallia circulans</i>	Hidrólise de carboidratos	0,9
<i>Robertmurraya siralis</i>	Propriedades acetogênicas	0,9
<i>Rhodococcus sp</i>	Degradação de lignina	1,0
<i>Lysinbacillus capsici</i>	Degradação de lignina	1,0
<i>Bacillus sp.</i>	Hidrólise de carboidratos	1,0
<i>Priestia sp</i>	Hidrólise de carboidratos	0,9

Fonte: A autora, 2023

Os grupos taxonômicos identificados nesta pesquisa já foram documentados na literatura, com cepas que desempenham papéis em processos de hidrólise de compostos relacionados ao metabolismo e à produção de biogás

(OTTONI et al. 2022). O gênero *Lysinibacillus* foi previamente observado em um estudo que caracterizou a comunidade microbiana metanogênica em amostras de águas residuais de cervejarias. Além disso, uma cepa desse gênero foi relatada por sua capacidade de degradar a lignina (MURUNGA et al. 2016).

Com relação aos *Bacillus*, várias espécies já foram isoladas em amostras provenientes de processos de digestão anaeróbia para a produção de biogás. O gênero *Bacillus* compreende tanto espécies aeróbias obrigatórias quanto facultativas, sendo que a espécie *B. halodurans*, por exemplo, foi identificada como uma fermentadora de carboidratos (OTTONI et al. 2022). Além disso, de acordo com Gupta et al. (2020), representantes dos novos gêneros *Niallia*, *Priestia* e *Robertmurraya* foram reclassificados a partir de diversas espécies do gênero *Bacillus* com base em evidências de filogenia e análises moleculares que abrangeram várias árvores filogenéticas em escala genômica (GUPTA et al., 2020).

De acordo com Anthony et al. (2019), algumas espécies do gênero *Rhodococcus* tem vias catabólicas e mecanismos de tolerância para compostos aromáticos presentes no material lignocelulósico, incluindo hexoses e pentoses, e pode ser considerada uma boa candidata para a hidrólise de material lignocelulósico (ANTHONY et al. 2019).

## 5.3 POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO – PBM

### 5.3.1 Preparo do inóculo

O inóculo é uma fonte rica em microrganismos, incluindo bactérias e arqueas, que têm a capacidade de produzir metano (MIR, 2016). No contexto dos testes de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), ele desempenha um papel central ao permitir a avaliação do potencial de um determinado substrato em gerar biogás. Os microrganismos presentes no inóculo são os principais agentes responsáveis pela conversão da matéria orgânica presente no substrato em biogás, com destaque para o metano.

O inóculo do Laboratório de Biogás é um lodo composto principalmente por efluentes de suinocultura e dejetos bovinos, que é cultivado em um reator anaeróbio de mistura completa que opera em regime de batelada, e é mantido em condições estáveis de temperatura ( $37,5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), pH (7,5) e agitação constante. O inóculo é alimentado diariamente, com uma dieta composta por carboidratos, proteínas e lipídeos. Periodicamente, o inóculo recebe uma carga orgânica fresca composta por seus materiais de base (70% de efluente suíno e 30% de dejetos bovinos), chamada de incremento. É necessário que o reator receba um incremento uma semana antes do ensaio de PBM, a fim de potencializar a atividade dos microrganismos do inóculo. A Figura 5 ilustra o reator utilizado para o cultivo do inóculo.

**Figura 5** – Reator anaeróbio de mistura completa

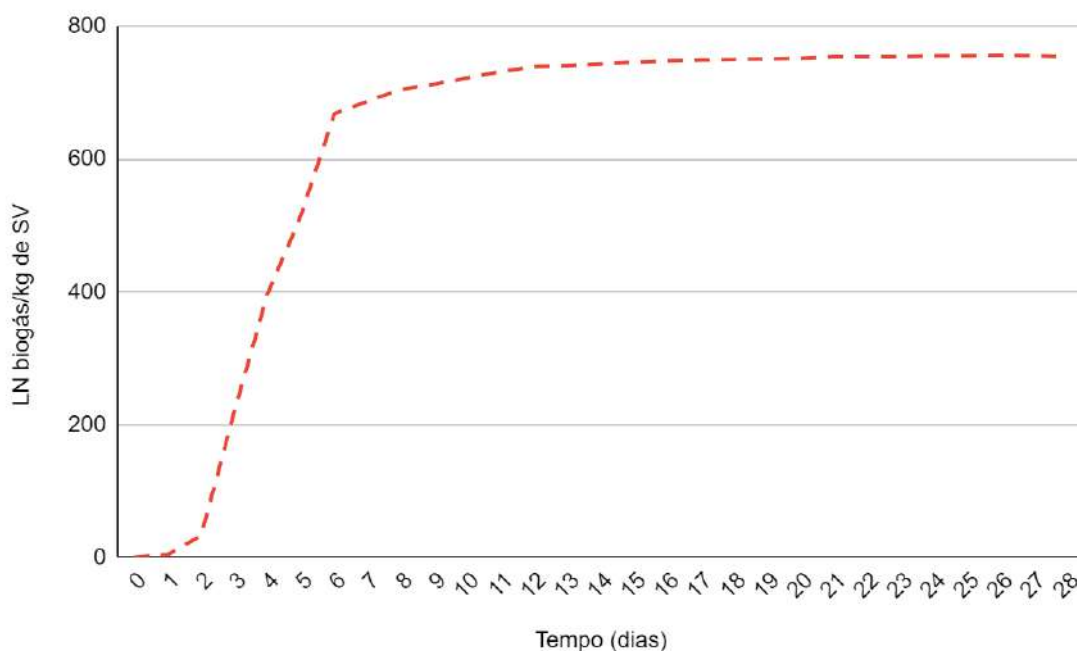


Fonte: A autora, 2023.

### 5.3.2 Controle positivo

A amostra de celulose microcristalina como controle positivo tem como objetivo assegurar que a atividade biológica do inóculo esteja ocorrendo de forma adequada. Como o potencial conhecido de produção estimada de biogás para esse substrato é de 740 a 750 LN.kg SV<sup>-1</sup>, a norma VDI 4630 aponta que, para que os resultados sejam significativos, a amostra testada deve produzir no mínimo 80% desse valor. O volume mínimo de produção acumulada de biogás para a análise em questão atingiu 700 LN.kg SV<sup>-1</sup>. Esses dados confirmam o potencial biológico do inóculo para a digestão anaeróbia. Através do Gráfico 1 é possível observar a curva cinética de produção de biogás da celulose microcristalina.

**Gráfico 1** – Média da produção acumulada de biogás do controle positivo



Fonte: A autora, 2023.

### 5.3.3 Avaliação da técnica de bioaugmentação na produção de biogás

Para os testes com o bagaço de cana, ao analisar o efeito da adição da solução bacteriana, foi observado um aumento considerável na produção de biogás, com um acréscimo de 19% (em volume). A produção de biogás inicial foi de 509 LN.kg SV<sup>-1</sup> para a amostra contendo apenas bagaço de cana e aumentou para 607 LN.kg-SV<sup>-1</sup> quando a solução de bactérias foi introduzida, conforme ilustrado na Tabela 4. Com relação ao teor de metano, Remor (2020), reportou um teor de 306 LN.kg SV<sup>-1</sup> para bagaço de cana bruto, equivalente a 54% do biogás, enquanto Janke et al. (2015) encontraram valores entre 236 e 326 LN.kg SV<sup>-1</sup>. Quando comparadas entre si, ambas as amostras (BC e BCB) apresentaram teores de metano similares, equivalentes a 56% do biogás. De acordo com Lins (2022), concentrações de metano acima de 50% permitem um bom aproveitamento energético do biogás gerado, com um bom rendimento no processo. Na Tabela 5 estão expressas as médias dos resultados juntamente com seus respectivos desvios padrão.

**Tabela 5** – Resultados obtidos para o ensaio de Potencial Bioquímico de Metano

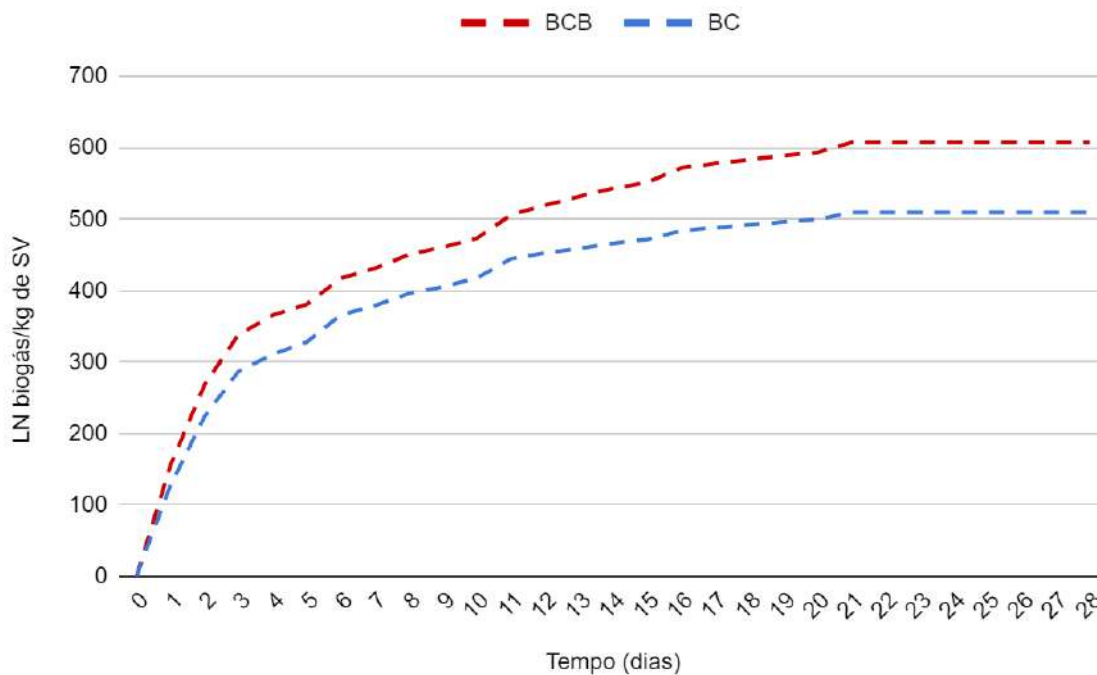
<b>Amostra</b>	<b>Biogás (L<sub>N</sub>.kg<sub>sv</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Metano CH<sub>4</sub> (L<sub>N</sub>.kg<sub>sv</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Metano CH<sub>4</sub> (%)</b>
BC	509±29,8	287±4,5	56
BCB	607±15,7	338±5,2	56

Fonte: A autora, 2023.

Os testes de PBM foram encerrados após 28 dias, quando o volume diário produzido era menor que 0,5% do total acumulado, como indica a guia VDI 4630 (VDI 4630, 2006). Conforme o Gráfico 2, observa-se que a produção crescente de biogás para ambas as amostras ocorreu até o 21º dia, o que indica que a maioria dos componentes orgânicos foram degradados até este momento.

**Gráfico 2** – Média da produção acumulada de biogás no ensaio de PBM, onde: BC: Bagaço de cana-de-açúcar; BCB: Bagaço de cana-de-açúcar + bactérias.





Fonte: A autora, 2023.

O início da produção de biogás foi imediato para ambas as amostras. Diante dos resultados, tem-se que a técnica de bioaugmentação não resultou em aumentos no teor de metano, porém acarretou em bons rendimentos de volume de biogás.

Apesar do bagaço de cana-de-açúcar ser um substrato altamente promissor para a produção de biogás, devido à sua significativa produtividade de biomassa, que pode superar 10 toneladas por hectare por ano (REMOR, 2020), a conversão da lignocelulose representa um desafio na biodigestão de materiais vegetais. Conforme destacado por Pugliese et al. (2015), a presença de lignina, que desempenha um papel na proteção da celulose contra a ação enzimática, pode resultar em uma taxa de biodegradação reduzida..

No contexto de digestão de substratos lignocelulósicos, a utilização de linhagens de microrganismos selecionados com potencial conhecido pode tornar a técnica de bioaugmentação uma ferramenta promissora no processo de produção de biogás.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio de PBM demonstrou que o bagaço de cana-de-açúcar é um substrato que possui um bom potencial para produção de biogás. No entanto, vale ressaltar que, devido à sua natureza lignocelulósica, ainda existem desafios tecnológicos a serem superados. Nesse contexto, a biotecnologia se destaca quando comparada a outros tipos de tratamentos, como os pré-tratamentos químicos, por exemplo, que geram resíduos.

A técnica de bioaugmentação é comumente utilizada no tratamento de efluentes e recuperação de áreas contaminadas, e não há estudos aprofundados do uso dessa técnica aplicada para digestão anaeróbia. No presente trabalho foi possível observar que a adição da solução de bactérias na amostra teve um potencial de 19% em volume de biogás produzido, porém, ainda há que se analisar a viabilidade econômica e outros ensaios bioquímicos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação desses microrganismos na digestão anaeróbia, pois é importante compreender os papéis individuais de cada microrganismo para identificar quais componentes estão sendo degradados.

Uma outra opção, visando trabalhos futuros, seria testar o potencial desses microrganismos como uma forma de pré-tratamento biológico, através na pré-inoculação destes diretamente no substrato.

Além disso, ainda é necessário estudar a melhor forma de inserção de bactérias em um sistema de biodigestão em larga escala.

## REFERÊNCIAS

ACHINAS, Spyridon; ACHINAS, Vasileios; EUVERINK, Gerrit Jan Willem. A Technological Overview of Biogas Production from Biowaste. **Engineering**, [S.L.], v. 3, n.3, p.299-307, jun.2017.Elsevier BV. doi.org/10.1016/j.eng.2017.03.002.

AGOSTINI, Alessandro; BATTINI, Ferdinando; GIUNTOLI, Jacopo; TABAGLIO, Vincenzo; PADELLA, Monica; BAXTER, David; MARELLI, Luisa; AMADUCCI, Stefano. Environmentally Sustainable Biogas? The Key Role of Manure Co-Digestion with Energy Crops. **Energies**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 5234-5265, 3 jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/en8065234>.

ALENCAR, Livia Caldas. **Potencial bioquímico da produção de metano da fração biodegradável dos resíduos sólidos urbanos de Campinas-SP**. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2017.

ALI SHA, F. Retracted: microbial ecology of anaerobic digesters. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2017, p. 1-1, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3852369>.

ANTHONY, Winston E.; CARR, Rhiannon R.; DELORENZO, Drew M.; CAMPBELL, Tayte P.; SHANG, Zeyu; FOSTON, Marcus; MOON, Tae Seok; DANTAS, Gautam. Development of *Rhodococcus opacus* as a chassis for lignin valorization and bioproduction of high-value compounds. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 12, 5 ago. 2019 <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-019-1535-3>.

APHA. American Publish Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23st. ed. Washington: **American Water Works Association**, 2017

ARSOVA, L. (2010). **Anaerobic digestion of food waste: Current status, problems and an alternative product** (dissertation). Columbia University, Berlin

BAÊTA, B.E.L.; LIMA, D.R.S. ADARME, O.F.H.; GURGEL, L.V.A.; AQUINO, S.F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v.200, p.137–146, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>

BATALHA, L.A.R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; COLODETTE, J.L.; GOMES, F.J.B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v.180, p.97–105, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060>

BERTOTI, A. R., Luporini, S., & Esperidião, M. C. A. (2009). Effects of acetylation in vapor phase and mercerization on the properties of sugarcane fibers. **Carbohydrate Polymers**, 77, 20–24

BRITO, F. L. S. **Biodigestão anaeróbia em duplo estágio do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de biogás**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2011.

CARDOSO, Manuela Gomes. **BIOAUMENTAÇÃO EM REATORES ANAERÓBIO E AERÓBIO E USO DE REATOR NITRIFICANTE PARA REDUÇÃO DA CARGA ORGÂNICA E NITROGENADA**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CHEN, Honglei *et al.* Enhanced Biodegradability of Aerobic Sludge by Bioaugmentation of Pulping Effluent Treatment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 2143-2153, jan. 2014.

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores Anaeróbios. 2. ed. ver. e ampl. Belo Horizonte: **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG**, v. 5, 2007. 377 p

COSTA, A.G.; PINHEIRO, F.G.C.; PINHEIRO, G.C.; DOS SANTOS, A.B.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, n.194, p.36-51, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/dae.2014.003>

COSTA, Lays Fabiana dos Santos. **Resíduos do setor sucroenergético de Goiás e seu potencial metanogênico e como biofertilizante**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado: Programa de Pós-Graduação em Agronomia), Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. Biogas from Waste and Renewable Resources: an introduction. **Wiley-VCH**, 2011.

GUPTA, Radhey S.; PATEL, Sudip; SAINI, Navneet; CHEN, Shu. Robust demarcation of 17 distinct Bacillus species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the subtilis and cereus clades of species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 1 nov. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.

HASAN, Camila. **PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: ANÁLISE DOS TEORES DE SÓLIDOS TOTAIS, VOLÁTEIS E FIXOS EM AMOSTRAS PRÉ E PÓS DIGESTÃO ANAERÓBIA**. 2019. 17 f. - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Vale do Taquari- Univates, Lajeado, 2019.

IEA - International Energy Agency. Good Practice Guideline. **Bioenergy Project Development & Biomass Supply**. Disponível em: [www.iea.org](http://www.iea.org). Acesso em: 10/2023

JANKE, L.; LEITE, A.; NIKOLAUSZ, M.; et al. Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 20685–20703, 2015.

JONES, Cleveland M. **A UTILIZAÇÃO DA BIOAUMENTAÇÃO PARA COMBATER OS PROBLEMAS DE SANEAMENTO NO BRASIL**. 2012. 15 f. - Curso de Geologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2012.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R.L.R. , R.; AMARAL, A. C. do. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. Concórdia, SC: Sbera; **Embrapa Suínos e Aves**, 2022.

LINS, Leonardo Pereira. **Produção de biogás a partir de resíduos de bovinocultura leiteira por meio da codigestão com macrófitas da espécie *Salvinia***. 2017. 80 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

LINS, Leonardo Pereira. **PRODUÇÃO E POTENCIAL DO BIOGÁS GERADO DO BAGAÇO DE MALTE E EFLUENTES DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**. 2022. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila), Foz do Iguaçu, 2022.

LOBATO, Livia Cristina da Silva. **APROVEITAMENTO ENERGÉTICO DE BIOGÁS GERADO EM REATORES UASB TRATANDO ESGOTO DOMÉSTICO**. 2011. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Sanitária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MIR, Muzaffar Ahmad; HUSSAIN, Athar; VERMA, Chanchal. Design considerations and operational performance of anaerobic digester: a review. **Cogent Engineering**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1181696, 3 jun. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311916.2016.1181696>.

MOKOMELE, T.; DA COSTA SOUSA, L.; BALAN, V.; et al. Incorporating anaerobic codigestion of steam exploded or ammonia fiber expansion pretreated sugarcane residues with manure into a sugarcane-based bioenergy-livestock nexus. **Bioresource Technology**, v. 272, n. October 2018, p. 326–336, 2019. Elsevier.

MURUNGA, Injete; DUNCAN, Onyango Mbugue; AYUB, Njoroge Gitau; URBANUS, Ndungwa. Mutwiwa; INGRID, Namae Wekesa. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from brewery wastewater in Kenya. **African Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 15, n. 47, p. 2687-2697, 23 nov. 2016.

OCHIENG, A. et al (2002). Biological treatment of mixed industrial wastewaters in fluidized bed reactor, **Journal of Hazardous Materials**, v. B96, p. 79-90

OTTONI, Júlia Ronzella *et al.* Cultured and uncultured microbial community associated with biogas production in anaerobic digestion processes. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 204, n. 6, p. 1-13, 19 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-022-02819-8>.

PIVA, Rodrigo Barcellos. Economia ambiental sustentável: os combustíveis fósseis e as alternativas energéticas. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, [S. l.], p. 1-81, 1 ago. 2010

PUGLIESE, A.; BIDINI, G.; FANTOZZI, F. Anaerobic digestion of macrophytes algae for eutrophication mitigation and biogas production. *Energy Procedia*, v. 82, p. 366- 373, 2015.

REMOR, Paula Verônica. **DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS OPERACIONAIS DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO**. 2020. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologias Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2020.

RIBEIRO, Daniel. Combustíveis fósseis. **Revista de ciência elementar**, [S. l.], v. Vol. 2, p. 1-2, 9 mar. 2014.

SANCHEZ, Elisabete M. S. *et al.* Compósito de resina de poliéster insaturado com bagaço de cana-de-açúcar: influência do tratamento das fibras nas propriedades. **Polímeros**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 194-200, 1 out. 2010. UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282010005000034>.

SOARES, Caroline M. T.; FEIDEN, Armin; TAVARES, Sidnei G.. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Nativa**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 1-7, jun. 2017. Nativa. <http://dx.doi.org/10.5935/2318-7670.v05nespa10>.

STÉFANO, Daísa Fagundes de. **MODELOS MATEMÁTICOS NA PREDIÇÃO DE PARÂMETROS DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE SUÍNOS**. 2013. 49 f. - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourado - Ufgd, Dourado, 2013.

VDI 4630. Fermentation of organic materials. Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. [s.l.] Deutscher, Verein Substratcharakterisierung, **Ingenieure**, 2016.

VDI 4630. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. 92 p. Germany: **Verein Deutscher Ingenieure** – VDI, 2006.

XU, R.; ZHANG, K.; LIU, P.; KHAN, A.; XIONG, J.; TIAN, F.; et al. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 1119–27, 1 jan. 2018.

ZAMBONI, Isabella Grando. **Digestão anaeróbia do bagaço da cana-de-açúcar em batelada para produção de biogás**. 2020. 289 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.