



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL
EM ENERGIA DA BIOMASSA



ELVAN NASCIMENTO DOS SANTOS FILHO

Produção de metano com resíduos de biotério utilizando fluido
ruminal como inóculo

Rio Largo
2015

ELVAN NASCIMENTO DOS SANTOS FILHO

Produção de metano com resíduos de biotério utilizando fluido ruminal como inóculo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia da Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

Rio Largo
2015

ELVAN NASCIMENTO DOS SANTOS FILHO

**Produção de metano com resíduos de biotério utilizando fluido
ruminal como inóculo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Energia da Biomassa, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia da Biomassa.

Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

Banca Examinadora:

Profª Drª Karina Ribeiro Salomon

Profº Drº Antonio Pedro de Oliveira Netto

Profº Drº Guilherme Bastos Lyra

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades já proporcionadas na minha vida, pelo discernimento e sabedoria para conduzir meus passos em todos os momentos de alegria e tristeza.

A minha família que é a base sólida da minha formação e fonte de inspiração para minha vida. Sempre me apoiando em todas as minhas decisões incondicionalmente.

A minha esposa por todo o companheirismo, paciência, compreensão, incentivo e amor. Apoiando-me nas decisões e nos momentos mais difíceis sem titubear.

A minha filha que trouxe mais luz e razão para a minha caminhada, me ensinando que todas as dificuldades podem ser superadas, e que o nosso problema é sempre menor que o do próximo.

A amiga Nadjane Leite dos Santos Telles, pelo incentivo em fazer o mestrado, pelo apoio e esclarecimentos das diversas e constantes dificuldades que encontrei ao longo do curso.

Ao Prof^o Dr^o Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, por aceitar me orientar, e que apesar de todas as dificuldades enfrentadas durante a jornada, sempre se manteve acessível e disponível, buscando soluções de forma paciente e coerente.

A técnica de Laboratório do LSA/CTEC/UFAL Eveline Borges pela paciência e ajuda com as técnicas durante os dias de análises.

Ao técnico de Laboratório Ronaldson Batinga dos Santos pela ajuda na montagem do sistema de aquecimento utilizado no experimento.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Energia da Biomassa e de Pós-graduação em Recursos hídricos pelos ensinamentos passados ao longo das disciplinas.

Ao Prof^o Dr^o Christopher Freire Souza pelos esclarecimentos e ajuda na confecção da parte estatística desta dissertação.

Aos colegas de mestrado que durante todo o período do curso, apoiaram, incentivaram, trocaram informações e experiências. Todos os momentos de convivência foram muitos proveitosos e gratificantes.

Ao Programa de Pós-graduação de Energia da Biomassa – CECA/UFAL por proporcionar a oportunidade em realizar esse mestrado.

A Usina Santa Clotilde pelo fornecimento do bagaço de cana de açúcar para a confecção da cama dos animais de laboratório, utilizada no experimento.

Ao matadouro da prefeitura municipal da cidade de Viçosa/AL, por permitir a coleta do fluido ruminal utilizado como inoculo neste ensaio.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição meio Del Nery (1987).....	32
Tabela 2. Composição dos resíduos de biotério	34
Tabela 3. Caracterização dos resíduos de biotério.....	35
Tabela 4. Soma dos resíduos quadrados dos ajustes não-lineares	41
Tabela 5. Frequência de realização das análises.....	43
Tabela 6. Resultados da avaliação físico- química nos substratos dos reatores no momento de partida reacional e finalização experimental	45
Tabela 7. Produção acumulada total dos gases no biogás produzido, para cada substrato utilizado.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Oferta interna brasileira de energia elétrica por fonte	16
Figura 2. Processo de digestão anaeróbia.....	26
Figura 3. Fluxo das etapas experimentais	29
Figura 4. Bancada Experimental. Vista Anterior.....	30
Figura 5. Bancada Experimental. Vistas Laterais.....	31
Figura 6. Sistema de aquecimento e recirculação de água para a bancada experimental	31
Figura 7. Leito experimental com sensor do termostato e termômetro Incoterm.....	32
Figura 8. Conteúdo gástrico (fluido ruminal) utilizado como inoculo nos ensaios de batelada	33
Figura 9. Resíduos utilizados no processo de digestão anaeróbia. (A) Maravalha de pinus + dejetos de animais de laboratório; (B) Maravalha de sabugo de milho + dejetos de animais de laboratório; (C) Maravalha de bagaço de cana-de-açúcar + dejetos de animais de laboratório.....	34
Figura 10. Resíduo de maravalha de cana-de-açúcar + dejetos de animais de laboratório, após trituração para preparo dos reatores.....	35
Figura 11. Frasco de Duran 2L, utilizados como reatores em batelada.....	36
Figura 12. Desenho experimental dos reatores anaeróbios e seus respectivos substratos.....	37
Figura 13. Evolução do potencial hidrogeniônico (pH) dos reatores anaeróbios.....	44
Figura 14. Concentração da demanda química de oxigênio (DQO) nos reatores anaeróbios durante o experimento.....	46
Figura 15. Concentração de ST e STV no startup e finalização dos reatores, assim como a eficiência de remoção (%). STinicial (-■-), STfinal (-●-), STVinicial (-▲-), STVfinal (-▼-), STEficiência (-■-), STVeficiência (-●-).	47
Figura 16. Concentração dos ácidos orgânicos e alcoóis nos reatores na ocasião da partida e finalização do experimento. (A) ácido acético (B) ácido butírico (C) ácido propiônico (D) Etanol	49
Figura 17. Caracterização do biogás produzido nos quatro reatores em batelada.....	51
Figura 18. Concentração média de CH ₄ (L) ao longo do tempo no reator B com ajuste linear e ponto de inflexão	51
Figura 19. Concentração média de CH ₄ (L) ao longo do tempo no reator R1 com ajuste linear e ponto de inflexão.....	52

Figura 20. Concentração média de CH ₄ (L) ao longo do tempo no reator R2 com ajuste linear e ponto de inflexão.....	53
Figura 21. Concentração média de CH ₄ (L) ao longo do tempo no reator R3 com ajuste linear e ponto de inflexão.....	54
Figura22. Taxa máxima de produção CH ₄ (L) e Tempo máximo para produção CH ₄ (dias) em função aos reatores.....	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de CH ₄	38
Equação 2 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de CO ₂	38
Equação 3 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de H ₂	39
Equação 4 – Equação de conversão do volume da amostra para o headspace.....	39
Equação 5 – Equação geral dos gases.....	40
Equação 6 – Equação do ajuste linear de boltzmann.....	40
Equação 7 – Equação para calculo da concentração dos ST.....	42
Equação 8 - Equação para calculo da concentração dos STV.....	42
Equação 9 - Equação para calculo da concentração dos STF	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANEEL	-	Agência nacional de energia elétrica
B	-	Reator branco (controle)
BEN	-	Balanco energético nacional
Biocen	-	Biotério Central
°C	-	Graus Celsius
CH ₄	-	Metano
cm	-	Centímetro
CO ₂	-	Dióxido de carbono
CONCEA	-	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CTEC	-	Centro de Tecnologia
d	-	Dia
DAL	-	Dejetos de animais de laboratório
DQO	-	Demanda química de oxigênio
g	-	Gramas
h	-	Horas
H ₂	-	Hidrogênio
kg	-	Kilograma
L	-	Litros
LSA	-	Laboratório de Saneamento Ambiental
m ₃	-	Metro cúbico
min	-	Minuto
mmol	-	Milimol
%	-	Porcentagem
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RDC	-	Resolução de diretoria colegiada
R1	-	Reator 1
R2	-	Reator 2
R3	-	Reator 3
SPF	-	free of pathogens specific (livre de patógenos específicos)
ST	-	Sólidos totais
STV	-	Sólidos totais voláteis
STF	-	Sólidos totais fixos
T	-	Temperatura
UFAL	-	Universidade Federal de Alagoas
μ	-	microlitro

RESUMO

Atualmente os recursos energéticos estão cada vez mais escassos, a busca por fontes energéticas que acompanhem o crescimento econômico e proporcionem boa qualidade de vida para a população estão diretamente ligados ao suprimento de energia. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de metano a partir de resíduos de biotérios utilizando fluido ruminal como inóculo em reatores em batelada. Tentando dessa forma, resolver a questão ambiental para a destinação dos resíduos e produzindo energia limpa e renovável, contribuindo assim para a matriz energética brasileira. Para o experimento, foram utilizados frascos de Duran® 2L como reatores em batelada, alimentados com as diferentes biomassas provenientes de biotério sendo inoculadas com fluido ruminal, podendo assim avaliar a quantidade do biogás gerado e a qualidade do metano obtido. A maior produção de metano acumulada foi observada no reator R1, carregado com dejetos dos animais de biotério e maravalha de pinus ($12,56 L_{CH_4}$), apresentou também a maior produção diária de metano $0,0067 L_{CH_4}/gSTV/d$, com rendimento de $0,256 L_{CH_4}/gSTV$. Os reatores R2 e R3 apresentaram uma produção acumulada de $5,24 L_{CH_4}$ e $6,83 L_{CH_4}$, respectivamente, e rendimento de $0,07 L_{CH_4}/gSTV$ e $0,15 L_{CH_4}/gSTV$.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia; Biogás; Bioenergia.

ABSTRACT

Currently energy resources are increasingly scarce, the search for energy sources that accompany economic growth and provide good quality of life for the population are directly linked to energy supply. This study aimed to evaluate the production of methane from animal houses of waste using rumen fluid as inoculum in batch reactors. Thereby attempting to resolve the environmental issue for the disposal of waste and producing clean, renewable energy, thus contributing to the Brazilian energy matrix. For the experiment, they used bottles Duran® 2L as batch reactors, fed different biomass from animal facilities being inoculated with ruminal fluid, thus being able to assess the amount of biogas generated and the quality of the obtained methane. Most of accumulated methane production was observed in R1 reactor, loaded with waste from animal vivarium and pine shavings (12.56 LCH₄) also had the highest daily production of methane 0.0067 LCH₄ / gSTV / d, with income 0.256 LCH₄ / gSTV. R2 and R3 reactors showed a cumulative production of 5.24 and 6.83 LCH₄ LCH₄, respectively, and yield 0.07 LCH₄ / gSTV and 0.15 LCH₄ / gSTV.

Keywords: Anaerobic digestion; Biogas; Bioenergy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Matriz energética nacional.....	16
3.2 Biomassa como fonte de energia	16
3.3 Biomassa da produção animal	17
3.4 Biotérios	18
3.5 Fluido ruminal.....	22
3.6 Digestão anaeróbia.....	23
3.6.1.1 Hidrólise	24
3.6.1.2 Acidogênese.....	25
3.6.1.3 Acetogênese	25
3.6.1.4 Metanogênese.....	25
3.6.1.5 Sulfetogênese	26
3.6.2 Elementos ambientais que interferem na digestão anaeróbia.....	27
3.6.2.1 pH.....	27
3.6.2.2 Temperatura.....	27
3.6.2.3 Nutrientes no substrato	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Bancada experimental	30
4.2 Meio nutricional.....	32
4.3 Fluido ruminal.....	33
4.4 Resíduos de biotério.....	34
4.5 Reatores	35
4.6 Análises	37
4.6.1 Cromatografia gasosa.....	367
4.6.1.1 Determinação do biogás	367
4.6.1.2 Determinação dos ácidos e alcoóis.....	367
4.6.2 Curva de determinação de CH ₄ , CO ₂ e H ₂	368
4.6.3 Calculo para determinação do metano (CH ₄).....	369
4.6.4 Demanda química de oxigênio.....	41
4.6.5 Sólidos totais (ST).....	41
4.6.6 Sólidos totais volatéis (STV)	42
4.6.7 Sólidos totais fixos (STF).....	42
4.6.8 Frequência das análises	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Análises físico-químicas.....	44
5.2 Ácidos orgânicos e Alcoóis	48
5.3 Composição do biogás.....	49
5.4 Produção de metano (CH ₄).....	51
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERÊNCIAS	57
ANEXO 1	656
ANEXO 2	71
ANEXO 3	74

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os recursos energéticos estão sendo bastante discutidos, tendo em vista que o crescimento econômico e a qualidade de vida da população estão diretamente ligados ao suprimento de energia. Visto isso a energia está sendo foco de trabalho científico e sempre permanece nas pautas de discussões governamentais, como um problema de segurança nacional e forma de estabilidade econômica global. (MASIERO E LOPES, 2008)

Nesse sentido, a busca por uma maior eficiência energética na sociedade é cada vez mais constante, contudo a dinâmica de como encaram e utilizam esses recursos energéticos, o grau de bem estar e da condição humana, da consciência ambiental e do desenvolvimento são todos fatores que tornam esta busca cada vez mais complexa (AGUIAR, 2004)

Estrategicamente, falando em eficiência energética, num mundo globalizado, não se resume simplesmente em aplicar medidas de redução ao desperdício, no desenvolvimento e aplicação de tecnologias adequadas, as novas matrizes energéticas devem compensar os danos causados ao meio ambiente ao longo do tempo, e que só crescem junto a essa busca incessante por novas fontes energéticas.

No entanto, grande parte da energia global utilizada é originada por meio do uso de combustíveis fósseis. De acordo com a Agência Internacional de Energia, os combustíveis fósseis são responsáveis por até 81% da oferta de energia primária do mundo em 2007 (IEA, 2010).

Com a demanda crescente em busca de energias limpas e de fontes renováveis, se estimulam o desenvolvimento de tecnologias e sistemas de produção. A bioenergia possui um importante aspecto, que é seu potencial em contribuir na solução de problemas ambientais gerado pelo uso de combustíveis fósseis (Lora & Andrade, 2009)

A inserção de recursos renováveis dentro do planejamento energético é uma forma de mitigar os impactos ambientais provocados pela obtenção de energia elétrica, e alcançar as metas estabelecidas em consenso comum pelos países emergentes (INATOMI E UDAETA, 2000)

Das fontes alternativas promissoras para a geração de energia que causam impacto socioeconômico positivo, diz respeito ao aproveitamento da biomassa, que segundo (SILVA *ET AL*, 2008) é uma fonte de energia renovável e limpa, que pode substituir os combustíveis fósseis e fornecer variadas formas de energia, como: o carvão vegetal, o biodiesel, o etanol e o biogás.

A biomassa, os resíduos urbanos e agroindustriais tem se destacado como fonte promissora de produção de energias renováveis, principalmente devido à geração de energia a partir destas fontes, pois podem ter fornecimento garantido continuamente (CRESPO, 2013).

Das biomassas abundantes disponíveis, os resíduos gerados nas atividades ligadas à produção animal se destacam, no entanto o descarte desses resíduos pode gerar alguns problemas ambientais, devido as suas altas taxas orgânicas e agentes patogênicos.

Segundo Orrico Jr *et al* (2010) as atividades agropecuárias geram quantidade muito grande de resíduos, e se bem manejados, podem se tornar fonte de renda e agregação de valor à atividade, no entanto é necessária a adoção de tecnologias adequadas para bom aproveitamento desses resíduos.

Dentre as formas de aproveitamento de resíduos, a digestão anaeróbia é tecnologia bastante difundida para o tratamento de efluentes agroindustriais com geração de metano e gás carbônico (KOETZ *ET AL*, 1995) A utilização de biodigestores anaeróbios auxilia no reaproveitamento dos resíduos provenientes das criações de animais, que não possuem nenhum valor agregado, os transformando em biogás que pode ser utilizado de diversas maneiras dentro da propriedade (GALBIATTI *ET AL*, 2010)

Devido à versatilidade do processo, o reator anaeróbio pode ser utilizado em grande escala para suprir a demanda agroindustrial, e até em pequenas propriedades diminuindo os custos na agricultura familiar. Assim como descrevem Luste *et al* (2009) que o processo oferece diversas vantagens, como a minimização da carga orgânica dos efluentes lançados no ambiente e da emissão de gases e seus materiais oriundos da degradação incontrolada, além da produção de biogás, onde o teor de metano varia de 50 a 70%, que pode ser usado como eletricidade, fonte de calor, combustível veicular entre outras aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Esse trabalho tem como objetivo principal avaliar a produção de metano a partir de resíduos de biotérios utilizando fluido ruminal como inóculo em reatores de batelada.

2.2 Específicos

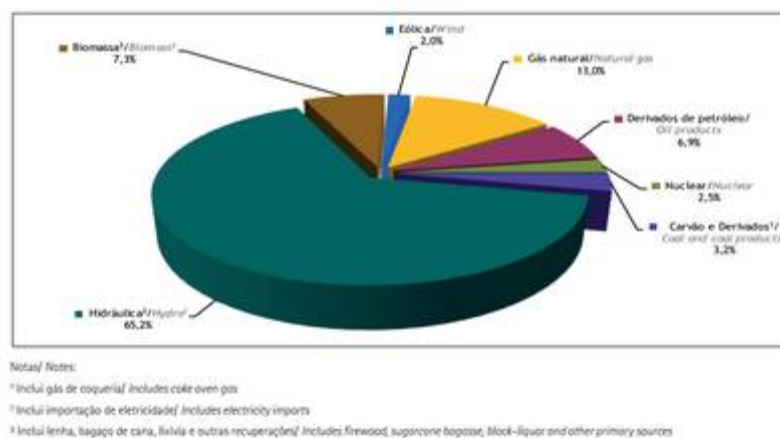
- Avaliar a influência de fluido ruminal como inóculo na produção de metano, nos diferentes resíduos provenientes do biotério central;
- Avaliar o potencial de produção de metano a partir dos resíduos gerados na criação de animais de laboratório do biotério central/UFAL;
- Determinar o resíduo de animais de laboratório com maior capacidade produtiva de biogás;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Matriz Energética Nacional

A matriz energética brasileira é composta basicamente por fontes renováveis, sendo principalmente por hidroelétricas (figura 1), no entanto, ao longo do tempo as gerações energéticas de fontes alternativas estão ganhando mais espaço.

Figura 1. Oferta interna brasileira de energia elétrica por fonte. Fonte: (BEN, 2015)



3.2 Biomassa como fonte de energia

De acordo com o balanço energético nacional brasileiro - BEN (2015), a biomassa contribui em 7,3% para a oferta interna de energia elétrica no Brasil (figura 1), sendo inferior somente ao gás natural (13%) e as fontes hidráulicas (65,2%).

Walker (2009) considera a biomassa como uma fonte renovável para a produção de energia em escala suficiente para desempenhar relativa expressividade em programas de energias renováveis e na criação e desenvolvimento de uma sociedade com maior consciência ecológica. Define-se biomassa como, qualquer matéria orgânica que pode ser convertida em energia mecânica, térmica ou elétrica (ANEEL, 2008).

A energia presente na biomassa pode ser transformada (através de processos de conversão físicos, químicos e biológicos) em combustíveis líquidos, sólidos e gasosos. O objetivo desta conversão é transformar um material carbonáceo de baixa eficiência energética para uma eficiência economicamente viável. (AÇMA, 2003). Desta forma a energia da

biomassa nada mais é, do que a transformação de resíduos de origem animal e/ou vegetal em energia elétrica ou calorífica.

Se comparada com as fontes energéticas de origem fóssil, a biomassa possui um ciclo extremamente curto. Além do pequeno tempo necessário à sua produção, se avaliarmos a biomassa de origem vegetal, durante a fotossíntese, no processo produtivo da biomassa, é captado em geral quantidades superiores às das dos gases emitidos na queima para a formação de mais matéria-prima. (MELLO, 2001) Características que, futuramente devem reverter à tendência de troca de combustíveis, e a biomassa vão ocupar os espaços dos combustíveis não renováveis.

Dependendo da origem, a biomassa pode ser classificada em: florestal (madeira, principalmente), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) e rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como o lixo). Os derivados obtidos dependem tanto da matéria-prima utilizada (cujo potencial energético varia de tipo para tipo) quanto da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos.

Em muitos países o uso de fontes, como carvão vegetal, resíduos agrícolas sazonais, resíduos florestais e esterco de animais, geralmente é ignorado, no entanto, esses resíduos compõem cerca de 30 % a 40 % do fornecimento total de biomassa (WALKER, 2009)

3.3 Biomassa da Produção Animal

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comercial do mundo, sejam esses criados extensivamente ou confinados. Junto a essa grande população, os resíduos de origem animal constituem-se em importante parcela da biomassa, e sua utilização em sistemas de reciclagem mostra-se favorável sob aspectos econômicos e ambientais (JARDIM, 1977).

De acordo com a RDC nº 306/2004 os resíduos como: cadáveres, carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de micro-organismos, bem como suas forrações utilizadas devem sofrer tratamento prévio antes do descarte apropriado (ANVISA, 2004).

Segundo Orrico Jr *et al* (2010) as atividades agropecuárias no Brasil geram uma grande quantidade de resíduos, e se esses forem bem manejados, podem se tornar uma fonte de renda e agregação de valor à atividade, no entanto é necessária a adoção de tecnologias adequadas para um bom aproveitamento desses resíduos.

Os resíduos agropecuários no Brasil resultariam em um potencial de produção de metano de 66,3 milhões de m³/dia e os efluentes industriais em potencial de 12,7 milhões de m³/dia (ZANETTE, 2009). Pois, o acréscimo de resíduos de origem animal ao processo de biodigestão anaeróbia promove aumento na produção de biogás com relação ao uso de resíduos de origem vegetal. No entanto essa potencial ainda está muito longe de ser atingido, apesar das pesquisas que já foram e são realizadas.

Misi & Forster (2001) utilizaram digestores abastecidos com misturas à base de dejetos de caprinos, ovinos e bovinos, resíduos do processamento de frutas e cama de frangos, em diferentes proporções. Quando os dejetos de ovinos e caprinos atingiram o percentual de 70% da mistura, foi obtida uma produção total de 4.189,50 mL de CH₄.

Galbiatti *et al* (2010) observaram em digestores em batelada a produção total de metano, utilizando esterco de aves com cama de capim napier (1328,5 m³), esterco bovino (900,4 m³) e esterno suíno (381,4 m³).

Alvarez *et al.* (2006), que observaram um potencial de produção de metano de 131 L kg/SV adicionado, quando se submeteu dejetos de bovino a um TRH de 50 dias.

Angonese *et al* (2006) obteve uma produção média diária de 31,5 m³, utilizando reator tubular alimentados com dejetos de suínos. Feiden *et al.* (2004) obtiveram 0,298 m³_{biogás} /m³ sem agitação e 0,362 m³_{biogás} /m³ com agitação cinética no interior do reator.

Em estudo realizado para avaliar a digestão anaeróbia de cama de frango e carcaças de frango em biodigestor com três condições de inoculação diferentes, foram obtidas as seguintes produções de metano, 0,52 m³, 0,57 m³ e 0,58 m³ (ORRICO JR. *ET AL*, 2010)

Fukuyama *et al* (2009) em experimento realizado com cama de frango de corte para a produção de biogás obteve 0,325; 0,342; 0,326 e 0,418 m³_{biogás}/kg ST. Costa (2012) observaram durante utilização de cama de frango diluída em água e em biofertilizante de suíno, as seguintes produções 0,61 e 0,87 m³_{biogás}/kg, respectivamente.

3.4 Biotérios

De acordo com, a Resolução Normativa nº 03 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, de 14 de dezembro de 2011, define-se biotério como,

local onde são criados ou mantidos animais para serem usados em ensino ou pesquisa científica, que possua controle das condições ambientais, nutricionais e sanitárias (MCT, 2011).

Estruturalmente os biotérios são projetados para atender as necessidades individuais de cada espécie animal, o que proporciona aos animais condições adequadas de bem estar e permite que as respostas aos experimentos sejam mais fidedignas. Na composição física, deve-se possuir basicamente, área administrativa, depósitos para estocagem de insumos, área de higienização e esterilização, vestiários, banheiros para visitantes, salas de criação, área de quarentena e outras dependências a depender da espécie mantida e da finalidade da unidade de criação (MOLINARO; MAJEROWICZ; VALLE, 2008)

Os biotérios são classificados de acordo com o status sanitário, status genético dos animais criados e a sua finalidade. O padrão sanitário dos animais e o zelo pela boa qualidade da saúde dos indivíduos são essenciais para colônias mantidas em biotérios, assim como a manutenção das condições ambientais que impedem a entrada de agentes patogênicos (MERUSSE; LAPICHIK, 1996)

Segundo (MOLINARO; MAJEROWICZ; VALLE, 2008), o padrão sanitário dos animais em um biotério, podem ser classificados em:

- Convencionais – Quando as condições sanitárias não são adequadas, onde a estrutura física não possui barreiras que impeçam o contato com microorganismos. Nesse tipo de criação não se conhece a flora microbiana dos animais.
- SPF – Os animais livres de germes patogênicos específicos (specific pathogen free – SPF), esses são mantidos em condições que possibilitem a manutenção e controle da microbiota presente nos animais, impedindo que agentes patogênicos a espécie entrem em contato com os indivíduos.
- Gnotobióticos – Os animais com essa classificação devem ser mantidos em equipamentos que impossibilitem qualquer contato com agentes bacterianos, virais, fúngicos e parasitários.

Quanto ao padrão genético, a classificação é realizada em dois grandes grupos: não-consanguíneos e consanguíneos. Os animais não-consanguíneos, heterogênicos ou outbred são aqueles que apresentam constituição genética variada, em estado de heterozigose, o que deve ser conhecido e mantido. Já os animais consanguíneos, isogênicos ou inbred apresentam determinadas características hereditárias, essas devem ser monitoradas rigorosamente, e mantidas por acasalamentos entre irmãos (MOLINARO *ET AL*, 2009).

Uma linhagem isogênica é produzida pelo cruzamento entre irmãos, por 20 ou mais gerações. Exceto pela diferença sexual, os camundongos de uma mesma linhagem isogênica são o mais semelhante geneticamente possível. A vantagem na sua utilização se traduz no fato de que a padronização de linhagens reduz as possíveis variações em resultados experimentais, no que se refere ao padrão genético (ANDERSEN *ET AL.*, 2004)

Os animais heterogênicos são obtidos através de acasalamentos não consanguíneos, que mantêm a variação genética relativamente constante, possibilitando a reprodução de populações naturais (ANDERSEN *ET AL*, 2004; DOS SANTOS, 2006)

Segundo Cardoso (2002), quanto à finalidade dos animais que abrigam o biotério pode ser classificado como biotério de criação, manutenção e experimentação. Biotérios de criação abrigam os reprodutores de cada linhagem de animal, sendo os produtores e fornecedores dos indivíduos para a experimentação. Os biotérios de manutenção realizam a manutenção dos animais para fornecimento de sub-produtos, como os hemoderivados. Biotérios de experimentação abrigam os animais fornecidos pelo biotério de criação para execução das investigações biomédicas.

Qualquer vertebrado não humano pertencente ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, como disposto na Lei nº 11.794, de outubro de 2008, podem ser criados e mantidos nos biotérios das instituições de ensino e pesquisa brasileiras (BRASIL, 2008).

Tendo em vista a necessidade do estabelecimento de modelos animais, como sendo aquele que melhor responde ao experimento e possibilita a sua reprodução, de maneira que qualquer pesquisador possa reproduzir e obter os mesmos resultados.

Apesar de diversas espécies de animais poderem ser mantidas nos centros de criações, a escolha de modelos animais que possuam algumas características específicas em sua

fisiologia, são elas: prolificidade, docilidade, fácil manejo, baixo custo de produção, pequeno porte, ciclo reprodutivo curto. Desta forma, as espécies mais difundidas como modelos animais nas pesquisas em todo o mundo são os ratos (*Rattus rattus*) e camundongos (*Mus musculus*) (ANDRADE, 2002)

Os murinos nos biotérios de criação e experimentação podem ser mantidos em micro-ambientes, estes sendo considerados como o ambiente físico imediatamente ao redor dos animais. As gaiolas são a forma de contenção primária desses roedores, dentro do macro-ambiente (sala de criação ou experimentação) essas gaiolas são dispostas em estantes e/ou rack's ventiladas, a segunda, sendo mais difundida tendo em vista as suas vantagens para a sanidade dos animais, qualidade das pesquisas e diminuição de custos em longo prazo (BAIALARDI, 2003).

Um ponto crucial no cuidado e tratamento de animais de laboratório é oferecer acomodações confortáveis nas áreas pertinentes, no que foi chamado de microambiente. Com este conceito, configura-se a necessidade de uma estadia que permita que os animais cresçam, atinjam a maturidade sexual, reproduzam, comportando-se normalmente e mantendo uma boa saúde (MORENO *ET AL*, 1983)

A temperatura, umidade, ventilação, taxa de troca de ar, luminosidade e ruído são alguns fatores que podem afetar a saúde, o comportamento e o bem-estar dos animais. Além destes, outros fatores como a hidratação, dieta, característica da gaiola e o tipo de “cama” (material colocado no fundo da gaiola para absorção de excretas, formação dos ninhos e proporcionar conforto aos animais) (MAJEROWICZ, 2008)

Os animais são mantidos em gaiolas em que o piso é coberto por uma camada de maravalha (raspa de madeira picada), casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar desidratado (COUTO, 2002) Pó do coco (*Cocus nucifera*) (FARIAS *ET AL*, 2005) Sabugo de milho desidratado (FABRICIO *ET AL*, 2012)

Os biotérios assim como outras criações animais, são grandes geradores de resíduos, onde a cama dos animais que é composta por uma variedade de substrato juntamente com as fezes e urina são descartadas diariamente, possuindo um grande potencial gerador de energia.

Santos *et al* (2012) avaliaram o potencial energético para a produção de biogás com resíduos sólidos de biotério, onde foram utilizados cinco reatores em batelada com os resíduos de coelho, hamster, camundongo, cobaia e a mistura de todos, onde obteve-se os seguintes potenciais de produção: 85,58 L/kg; 70,95 L/kg; 101,51 L/kg; 91,91 L/kg e 70,80L/kg, respectivamente.

3.5 Fluido ruminal

O fluido ruminal ou suco ruminal é o conteúdo gástrico dos animais denominados ruminantes. É empregado o termo ruminante a todos os herbívoros que realizam a ruminação, processo que consiste na regurgitação e remastigação do alimento já ingerido e que se encontra em partículas não digeríveis. As principais espécies domésticas de ruminantes são bovina, ovina e caprina.

A composição do fluido ruminal é extremamente completa, sendo formada por uma variada quantidade de microorganismos como: bactérias, fungos, protozoários, a maioria destes são anaeróbios e ciliados. Esses microorganismos desempenham função essencial na digestão destes animais, pois são responsáveis principalmente pelo processo fermentativo do alimento ingerido (Kolb, 1974; TEXEIRA, 1991).

Através da ruminação os animais realizam a conversão de alimento em energia para suprir as demandas biológicas do organismo, no entanto, ocorre também a produção de alguns gases que são expelidos através da eructação.

Durante o processo de fermentação ruminal os microorganismos presente no fluido ruminal degradam o alimento em compostos mais simples, por sua vez sofrem ação de outros grupos microbianos produzindo alguns gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano. A proporção desses gases está relacionada à espécie animal e ao tipo de alimento consumido e a sua digestibilidade. (MOHAMMED *ET AL.*, 2004; PEDREIRA, 2004 apud RIVERA *ET AL.*, 2010).

A produção de CH₄ é parte do processo digestivo dos herbívoros ruminantes e ocorre no rúmen. A fermentação que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos do material vegetal ingerido é um processo anaeróbio efetuado pela população microbiana ruminal, que converte os carboidratos celulósicos em ácidos graxos de cadeia curta, principalmente ácidos

acético, propiônico e butírico. Nesse processo digestivo, parte do carbono é concomitantemente transformada também em CO₂ (PRIMAVESI *ET AL*, 2004).

Devido às características peculiares que o rúmen apresenta, tornando um ecossistema anaeróbico propício para o desenvolvimento microbiano e produtor de gases principalmente o metano, existem algumas pesquisas voltadas para a utilização da flora ruminal como inoculo de reatores anaeróbios produtores de biogás.

Zeeuw & Lettinga (1983) e por Lucas JR. *et al.* (1987) apud (PRIMAVESI *ET AL*, 2004), concluíram que o uso de inoculo não somente antecipa o pico de produção de biogás como também pode aumentar o potencial efetivo da biomassa.

Ratti *et al* (2013) produziu hidrogênio através da inoculação de fluido ruminal bovino pré-tratado em celulose. Botta *et al* (2011) utilizou resíduos ligno-celulosicos para a produção de hidrogênio, com inoculo de fluido ruminal e meio de cultura, obtendo uma produção máxima de $1,75 \times 10^{-2}$ mmol H₂/L.

Durante experimento utilizando como substrato três concentrações de papel 0,5, 2,0 e 4,0 g/L, e como inoculo fluido ruminal bovino pré-tratado com acido, foi observada um rendimento de 42, 26,6 e 24 mmol H₂/g papel, respectivamente (BOTTA *ET AL*, 2012)

3.6 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo fermentativo, que através de flora bacteriana mista complexa, degrada a matéria orgânica gerando gases como metano, dióxido de carbono, água, amônia além de novas células bacterianas (MASSEY e POHLAND, 1978; CHERNICHARO, 1997)

É um sistema ecologicamente delicado e balanceado, onde cada microrganismo tem função específica (CAMPOS *ET AL*, 2006) Este processo ocorre na ausência de oxigênio molecular, onde se tem consórcios de diferentes tipos de microrganismos interagindo estreitamente para promover a transformação de composto orgânico complexos, em simples (STEIL, 2001).

A biodegradação anaeróbica é um processo complexo, pois envolve trocas recíprocas de substratos e seus produtos, entre as fases solida, liquida e gasosa, sendo por isso

fundamental a existência de uma relação equilibrada e coordenada entre os diversos grupos tróficos bacterianos (ALVES e OLIVEIRA, 2003)

O tratamento de resíduos com digestão anaeróbia se torna específico devido a suas características de diminuição da carga orgânica de seus afluentes, a eliminação de microorganismos patogênicos, o custo relativamente baixo, de fácil implantação e operação e a produção de energia limpa e renovável, o que agrega valor ao processo (LEITE *ET AL.*, 2003; BROJA e BANKS, 1996)

Os digestores anaeróbios têm sido amplamente utilizados para o tratamento de resíduos sólidos, como: culturas agrícolas, dejetos de animais, lodos de ETE's e lixo urbano, assim como em no tratamento de efluentes de agroindústrias. Segundo Crespo (2013) os resíduos como lamas de esgoto, excrementos, resíduos de culturas agrícolas, resíduos de frutas e legumes e resíduos sólidos urbanos são de especial interesse uma vez que estas fontes não competem com as culturas alimentares no uso de terras agrícolas.

As etapas do processo anaeróbio são divididas em quatro fases (Figura 2): hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e/ou Sulfetogênese, onde cada etapa possui grupos de microorganismos com funções específicas que geram produtos através da degradação da matéria orgânica (CHERNICHARO, 1997), esses produtos se acumulam temporariamente, pela relação sinérgica que os microorganismos possuem entre eles, pois o produto de um serve de substrato para outros numa próxima fase, em uma reação em cadeia (BACKES, 2011)

3.6.1.1 Hidrólise

Na primeira etapa do processo de degradação, ocorre a hidrólise de materiais particulados complexos, em materiais dissolvidos mais simples, isso ocorre devido à ação de exo-enzimas secretadas pelas bactérias fermentativas (BRAUNA, 2012). Nesta fase os carboidratos, proteínas e lipídeos, serão convertidos em açúcares, aminoácidos e peptídeos, respectivamente.

As bactérias que hidrolisam a matéria orgânica nessa primeira fase são facultativas e anaeróbias estritas (AIRES, 2009) A velocidade da hidrólise é o fator limitante para o processo de digestão anaeróbia, e consequente a produção do biogás (BARCELOS, 2009).

Segundo Batstone *et al.* (2000) a taxa global de hidrólise do material orgânico depende do tamanho e forma do particulado, concentração da biomassa, superfície de contato e produção de enzimas.

3.6.1.2 Acidogênese

Na fase acidogênica, as bactérias fermentativas absorvem os produtos gerados durante a hidrólise, onde serão produzidas substâncias orgânicas simples como: ácidos orgânicos, (CRESPO, 2013) alcoóis, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio, além de novas células bacterianas (CHERNICHARO, 1997; ANGELIDAKI, 2003).

A maioria dos carboidratos é degradada rapidamente, servindo de excelente fonte energética para o processo. Essa degradação fácil desses elementos, no entanto pode favorecer ao acúmulo dos produtos da fase acidogênica, diminuindo o pH, e causando assim uma falência do processo (BRAUNA, 2012)

A microbiota que atua nesta etapa é a que mais se beneficia energeticamente, e seus produtos servem de substrato para as bactérias acetogênicas e as arqueas metanogênicas.

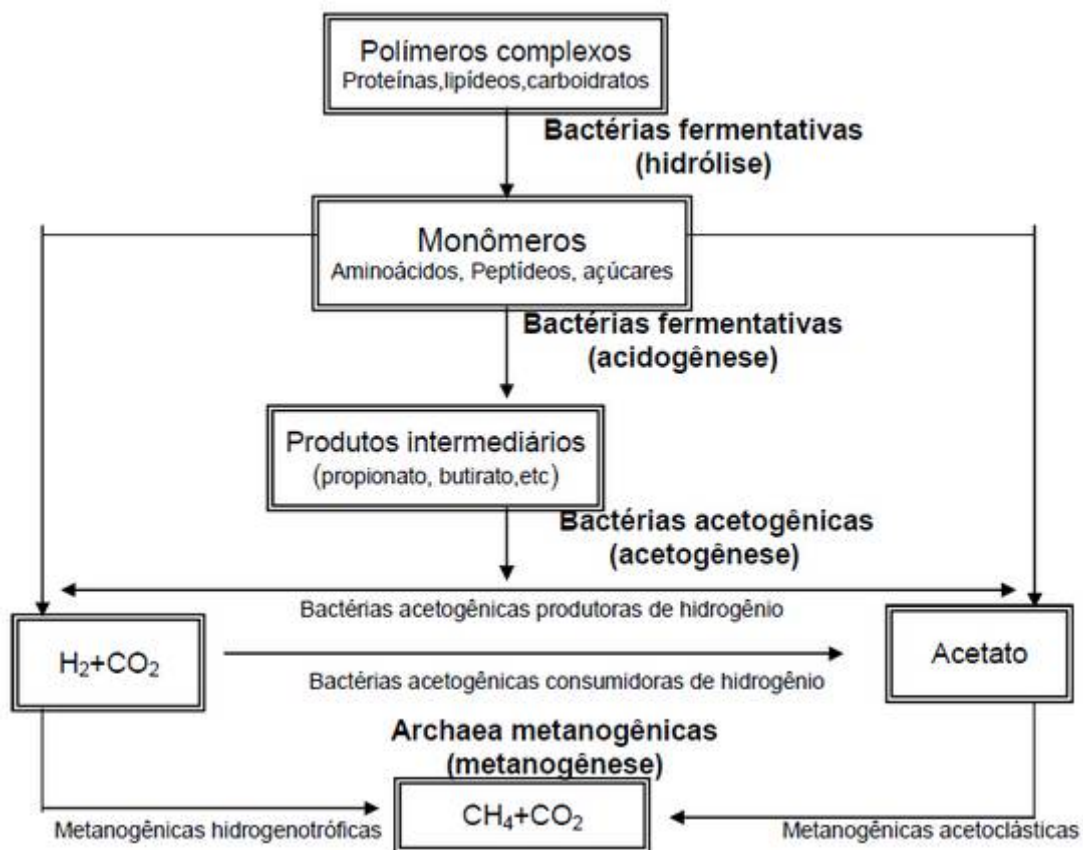
3.6.1.3 Acetogênese

Durante essa etapa, as bactérias sintróficas acetogênicas oxidam os compostos orgânicos intermediários, em substrato apropriado para as arqueas metanogênicas, como: acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. O substrato é 70% destinado a produção de acetato, e 30% para a conversão em hidrogênio.

3.6.1.4 Metanogênese

Os microorganismos produtores de metano são denominados de arqueas metanogênicas, pertencentes ao domínio Archea. São divididos em dois grupos, de acordo com a afinidade de substrato e capacidade de produção de metano; as acetoclásticas que só utilizam o acetato para a produção de metano e monóxido de carbono, sendo responsável por 70% da produção total. Já as hidrogenotróficas convertem hidrogênio e dióxido de carbono, em metano e água (CHERNICHARO, 1997).

Figura 2. Processo de digestão anaeróbia. Fonte: CHERNICHARO (1997)



O processo metanogênico remove acetato, e o hidrogênio do sistema, exercendo, portanto uma forte influência sobre a acidogênese e acetogênese (SCHINK, 2002)

Ecologicamente as arqueas exercem um papel fundamental no ambiente anaeróbio, pois elas removem o hidrogênio e os produtos das bactérias fermentativas das fases anteriores.

3.6.1.5 Sulfetogênese

A existência desta fase está diretamente ligada a composição química do substrato, ou seja, a presença de sulfato no meio. Bactérias que atuam nesta fase são denominadas de sulforedutoras, essas são importantes no processo de digestão anaeróbio principalmente pelo seu principal produto, o sulfeto de hidrogênio composto que é inibidor para as arqueas metanogênicas. Esses microrganismos possuem a capacidade de utilizar muitos substratos, como: ácidos orgânicos, alcoóis, glicerol, açúcares, aminoácidos, hidrogênio e outros, tornando-os competidores por substratos comuns com as arqueas metanogênicas.

3.6.2 Elementos ambientais que interferem na digestão anaeróbia

Diversos fatores afetam o desempenho do reator durante a digestão. Dentre os fatores ambientais se destacam o pH, a temperatura e os nutrientes no meio.

3.6.2.1 pH

Tanto a acidez quanto a alcalinidade são fatores importantes para a digestão anaeróbia. A alcalinidade deve estar sempre em equilíbrio com os ácidos orgânicos no sistema, pois normalmente a inibição do sistema por esses ácidos está vinculada ao pH (CAMPOS *ET AL*, 2009)

As bactérias que realizam as quatro fases da digestão, possuem exigências individuais quanto ao pH. O pH ideal para as hidrolíticas e fermentativas varia de 4,5 – 6,3. Por outro lado as arqueas metanogênicas necessitam de um pH entre 6,5 – 8,0 (BACKES, 2011) No entanto o pH pode sofrer alterações durante o processo de digestão, devido aos metabolitos que se acumulam no sistema fazendo com que o meio fique mais ácido ou alcalino (CAMPOS *ET AL*, 2006)

Porém a alcalinidade deve ser suficiente para regular o pH entre 6,6 e 7,6. Pois valores baixos de pH indicam o acúmulo de ácidos graxos voláteis, o que inibe a metanogênese. Já os valores superiores a 8,0 podem favorecer a formação de amônia, que é tóxica a comunidade microbiana nas concentrações acima de 150 mg de NH_3/L (CHERNICHARO, 1997)

3.6.2.2 Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam o processo de digestão anaeróbia, uma vez que afeta os processos biológicos de diferentes maneiras. (CHERNICHARO *ET AL*, 1999) As bactérias envolvidas podem ser divididas de acordo com a faixa ótima de temperatura: bactérias criofílicas, que atuam a temperaturas inferiores a 20°C, bactérias mesofílicas, a temperaturas entre 30 e 40°C e bactérias termofílicas, entre 45 e 60°C (CASTRO e CORTEZ, 1998)

Os microorganismos metanogênicos são inativados a altas e baixas temperaturas. Quando o ambiente está com temperatura abaixo de 10°C, a produção de gás fica bastante

reduzida. Duas temperaturas fornecem ótima condição de digestão: mesofílica: 30 a 40 °C e termofílica: 50-60°C (PICANÇO, 2004).

Chae *et al* (2008) relata que a melhor faixa de produção para metano é entre 25 – 35°C, quanto maior a temperatura melhor é o rendimento de metano, no entanto esse aumento na produção não acompanha o aumento da temperatura de forma linear.

Dependendo da eficiência do processo, alguns fatores como pressão e temperatura durante a operação do reator, afetará a composição do biogás que pode variar entre 40% e 80% de metano (COSTA, 2012).

3.6.2.3 Nutrientes no substrato

A produção de metano a partir substratos orgânicos depende principalmente do conteúdo de nutrientes (proteína crua, gordura crua, fibra crua, extratos livres de N), que podem ser degradados a CH₄ e CO₂. O conteúdo desses nutrientes determina a degradabilidade e, por isso, o ganho de metano que pode ser produzido por digestão anaeróbia (AMON *et al.*, 2007)

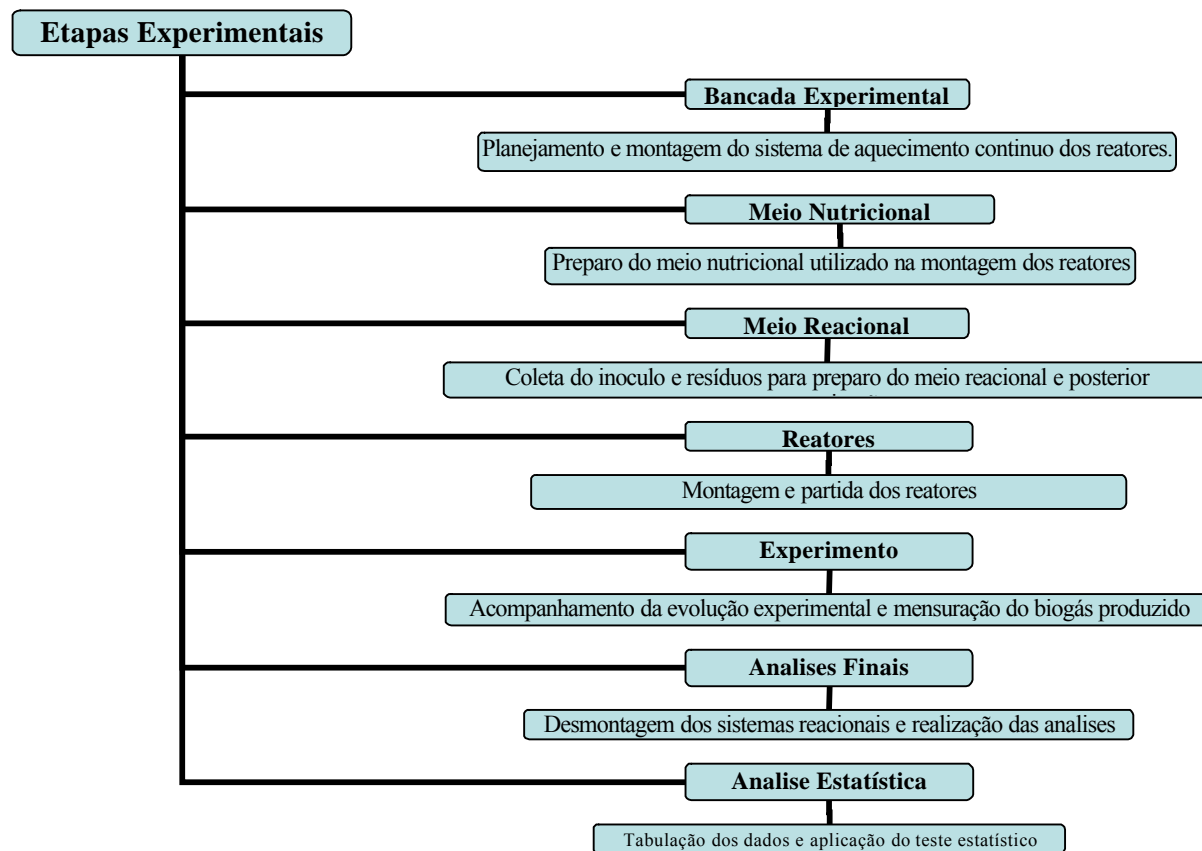
Na co-digestão de vegetais e esterco animal, os dejetos executam o tamponamento e fornecem uma grande variedade de nutrientes, e o material vegetal contribui com o alto conteúdo de carbono balanceando a relação carbono/nitrogênio (C/N) do substrato, assim diminuindo o risco de inibição por geração de amônia (Angelidaki *et al.*, 1993).

4 METODOLOGIA

O trabalho experimental constituiu na investigação do potencial de aplicação dos resíduos de animais de laboratório inoculados com fluido ruminal para a produção de metano, utilizando-se reatores em escala de bancada. O sistema experimental foi instalado nas dependências do laboratório de hidráulica do centro de tecnologia da Universidade Federal de Alagoas – CTEC/UFAL.

O experimento foi iniciado no dia 17 de outubro de 2014 e finalizando em 17 de dezembro de 2014, perfazendo 60 dias de monitoramento da produção de metano durante a operação reacional, semelhante ao realizado por Sagula (2012); Fukayama *et al* (2009) e El-Mashad *et al* (2003). As etapas do fluxo experimental podem ser observadas na figura 3.

Figura 3. Fluxo das etapas experimentais. Fonte: Dados da pesquisa



4.1 Bancada Experimental

Como forma de controle dos fatores ambientais envolvidos no processo de digestão anaeróbia, desenvolveu-se um sistema de aquecimento para a manutenção dos reatores durante toda execução do experimento. A Figura 4 apresenta a vista frontal da bancada experimental, com o detalhe para o sistema de controle de temperatura.

Figura 4. Bancada Experimental. Vista Anterior. Fonte: Dados da pesquisa



Foi utilizado uma caixa de isopor com capacidade de 120 L, como leito para acomodar os reatores. Nas duas bases das laterais menores da caixa, foi instalado um flange de 25 mm, para servir de entrada e saída da recirculação de água (Figura 5). O interior da caixa foi impermeabilizado com manta líquida de base acrílica para evitar possíveis pontos de vazamento (Figura 7).

Utilizou-se como reservatório de reabastecimento, um tambor de PVC com capacidade de 50L em nível inferior, para que a água retornasse do leito por gravidade. O aquecimento da água foi feito com a instalação do ebulidor mergulhão Ref. LU 1000W e a recirculação da

água do leito foi executada por uma bomba submersa Resun Flow-1000 com vazão de 1000L/h (Figura 6).

A manutenção do nível da água no reservatório devido à evaporação foi realizada através de uma bóia de nível instalada e ligada a rede de abastecimento de água da UFAL (Figura 6).

Figura 5. Bancada Experimental. Vistas Laterais. Fonte: Dados da pesquisa



A resistência foi controlada com a utilização do medidor e controlador de temperatura MT-512Ri da FullGalse, onde se obteve o monitoramento e manutenção da temperatura em $\pm 35^\circ$ através de sensor instalado dentro do leito de manutenção dos reatores, além de um termômetro de mercúrio Incoterm (-5°C a 320°C).

Figura 6. Sistema de aquecimento e recirculação de água para a bancada experimental. Fonte: Dados da pesquisa



Fonte: Dados da Pesquisa

O funcionamento do sistema ocorreu semelhante a um banho-maria laboratorial, ou seja, a água era aquecida no reservatório de PVC e a bomba submersa fazia a recirculação da água no leito da caixa de isopor onde se encontravam os reatores.

Figura 7. Leito experimental com sensor do termostato e termômetro Incoterm.



Fonte: Dados da Pesquisa

4.2 Meio Nutricional

Foi utilizado para o crescimento da biomassa fermentativa o meio de cultura Del Nery (1987), de acordo com o descrito por Maintinguer *et al.* (2011) e Botta *et al.* (2013). A composição detalhada, utilizado para 1L de solução reacional está demonstrada no quadro 1.

Tabela 1. Composição meio Del Nery (1987).

Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)
CH ₄ N ₂ O	40
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,04
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,6
SeO ₂ 0.0108	0,014
KH ₂ PO ₄	5,36
KHPO ₄	1,3
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2,76

Os compostos foram preparados separadamente para minimizar a possibilidade de ocorrências de reações entres os elementos, sendo homogeneizados somente no momento da montagem do reator.

4.3 Fluido Ruminal

O fluido ruminal bovino utilizado como inoculo. O inóculo foi coletado no matadouro municipal da cidade de Viçosa, zona da mata do estado de Alagoas. A coleta foi realizada logo após o abate dos animais, onde se retirou do interior do rúmen bovino, somente a porção líquida (fluido ruminal) do conteúdo (Figura 8), para isso, foi realizada uma filtração com peneira de nylon para reter as frações sólidas presentes na ingesta.

Optou-se por coletar amostras de mais de um animal, para minimizar a probabilidade de fluidos com floras comprometidas. Logo após a coleta, o fluido foi armazenado em garrafas e em caixas térmicas, sendo transportado para o laboratório de saneamento ambiental – LSA/CTEC/UFAL.

Não foi realizado nenhum pré-tratamento no inoculo, a preparação do meio reacional ocorreu logo após a coleta, na tentativa de minimizar as perdas da microbiota contida no inoculo. A concentração do inoculo foi mantida em 8% para o volume reacional total, no momento da montagem.

Figura 8. Conteúdo gástrico (fluido ruminal) utilizado como inoculo nos ensaios de batelada.



4.4 Resíduos de Biotério

Os resíduos utilizados no experimento foram provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas – BIOCEN/UFAL (Figura 9), onde são criados e mantidos animais de laboratório (Ratos e Camundongos) para fins científicos e didáticos. Os três tipos de resíduos produzidos pelo setor de criação animais, durante a rotina de funcionamento do biotério central foram os descritos detalhadamente na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos resíduos de biotério.

Resíduos de biotério			
Composição	A	B	C
	Dejetos de Animais + Maravalha de pinus	Dejetos de Animais + Sabugo de milho	Dejetos de Animais + Bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Dados da pesquisa

Os três resíduos foram coletados em becker's, acondicionados em caixa térmica e transportado para o laboratório de saneamento ambiental – CTEC/UFAL, onde foram caracterizados conforme demonstrado na Tabela 3.

Figura 9. Resíduos utilizados no processo de digestão anaeróbia. (A) Maravalha de pinus + dejetos de animais de laboratório; (B) Maravalha de sabugo de milho + dejetos de animais de laboratório; (C) Maravalha de bagaço de cana-de-açúcar + dejetos de animais de laboratório.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3. Caracterização dos resíduos de biotério.

Resíduos	pH	DQO	ST	STV	SF
Maravalha Pinus + DAL	8,92	14978,1	61222,00	55844,00	5378,00
Sabugo de milho + DAL	8,80	14518,05	39042,00	34586,00	4456,00
Bagaço de cana + DAL	8,70	12677,85	65648,00	57526,00	8122,00

Fonte: Dados da pesquisa

Devido à característica sólida dos resíduos de biotério, foi utilizado triturador para reduzir o tamanho das partículas (Kaparaju *et al*, 2002) mantendo uma concentração de 10% de sólidos totais na solução. O material foi triturado até obter-se a consistência mais homogênea possível (Figura 10).

Figura 10. Resíduo de maravalha de cana-de-açúcar + dejetos de animais de laboratório, após trituração para preparo dos reatores.



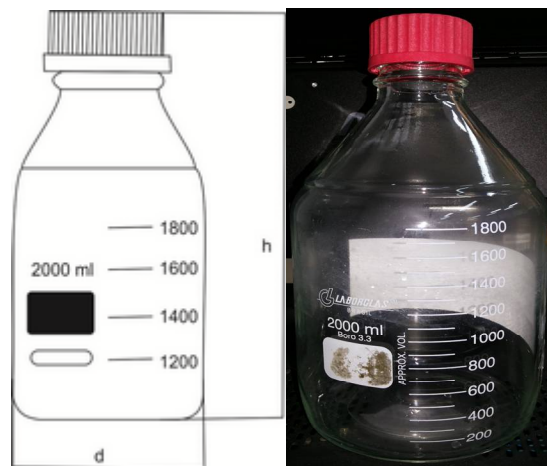
Fonte: Dados da pesquisa

4.5 Reatores

O ensaio experimental foi conduzido em triplicata, em 12 reatores de fluxo hidráulico descontínuo. Um biodigestor de fluxo hidráulico descontínuo, ou tipo batelada, se caracteriza por: alimentação descontínua, isto é, ela é feita apenas uma vez, no início do processo, depois ele ficou sem receber novo substrato até a biodigestão se completar.

Como biodigestores, foram utilizados frascos Duran® com 2000 mL de volume total (Figura 11), sendo 1000 mL reacional, e 1000 mL destinado ao headspace. Os frascos foram hermeticamente fechados rolha de borracha de butila e tampa plástica, o que impossibilita o vazamento dos gases produzidos.

Figura 11. Frasco de Duran 2L, utilizados como reatores em batelada. Fonte: Dados da pesquisa



Todos os reatores foram mantidos imersos em água a $\pm 36^{\circ}\text{C}$ no leito da bancada experimental, na Figura 12, está detalhado o desenho experimental dos reatores. A anaerobiose foi estabelecida pela substituição de todo o ar atmosférico presente no headspace dos frascos, pelo borbulhamento de nitrogênio nos frascos.

O carregamento dos substratos nos reatores está descrito na Figura 12.

Figura 12. Desenho experimental da triplicata dos reatores anaeróbios com seus respectivos substratos.

Reatores	Substrato	Inoculo	Meio Nutricional	Água Destilada
B1	-	8% (80 mL)	92 mL	828 mL
B2				
B3				
R1.1	Maravalha de Pinus + DAL*10% (100g)	8% (80 mL)	92 mL	728 mL
R1.2				
R1.3				
R2.1	Maravalha de Sabugo de milho + DAL*10% (100g)	8% (80 mL)	92 mL	728 mL
R2.2				
R2.3				
R3.1	Maravalha de Bagaço de Cana + DAL*10% (100g)	8% (80 mL)	92 mL	728 mL
R3.2				
R3.3				

Fonte: Dados da pesquisa

*DAL – Dejetos de Animais de Laboratório

4.6 Análises

Os gases foram determinados e mensurados através de cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia proposta por Maintinguer *et al.* (2008). Já as amostras da fase líquida serão quantificados os ácidos graxos voláteis por cromatografia gasosa, e a DQO, sólidos totais, sólidos voláteis, pH e alcalinidade pelo Standard Methods (APHA, 1999).

4.6.1 Cromatografia Gasosa (MAINTINGUER ET AL, 2008)

4.6.1.1 Determinação do Biogás

As coletas e mensuração dos gases se iniciaram 24 horas após a montagem e partida dos biodigestores. A determinação da produção de metano e composição do biogás foi efetuada com injeção manual por meio da retirada de 100 μ L de amostra da fase gasosa (headspace), utilizando seringa “gastight” com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010-Plus, equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada será a Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm) e detector de condutividade térmica. As condições cromatográficas foram:

- Gás de arraste: Argônio sob fluxo de 21,9 cm. s⁻¹;
- Temperaturas do forno: 30 °C;
- Temperatura da coluna: 200 °C e
- Temperatura do detector: 230 °C.

4.6.1.2 Determinação de Ácidos e Alcoóis

A determinação de ácidos orgânicos realizada pela extração com éter foi feita com injeção manual por meio da retirada de 1 μ L de amostra da fase etérea, e a extração dos alcoóis foi feita com injeção manual por meio da retirada de 400 μ L de amostra do headspace, utilizando seringa “gastight” com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010-Plus, equipado com detector de ionização de chama. A coluna utilizada foi a HP – INNOWAX (30m de comprimento, diâmetro interno de 0,25mm e 0,25 de espessura de filme). As condições cromatográficas foram:

- Temperatura de injetor: 250 °C, razão do split=1.

- Temperatura do forno: 35 °C (0') 10 °C/min. 75 °C (0') 35 °C/min. 120 °C (1') 10 °C/min. 170 (2'). Gás de arraste: hidrogênio

- Temperatura do detector: 280 °C, gás auxiliar (N₂): 30 mL. min⁻¹; ar sintético: 300 mL. min.⁻¹ e hidrogênio: 30 mL. min.⁻¹

4.6.2 Curvas de determinação do metano, dióxido de carbono e hidrogênio

A curva de calibração do metano foi estabelecida para que as áreas obtidas no cromatograma fossem convertidas para valores de massa de gás (moles CH₄). Para tanto, foram injetados diferentes volumes (0,025 a 0,15 mL) de metano com pureza de 99,9%, e por meio da equação geral dos gases (PV=nRT) encontrou-se a concentração em moles de metano para cada volume injetado.

Desta forma, pôde-se estabelecer uma relação entre área cromatográfica e quantidade de metano. A partir desses dados, traçou-se um gráfico de áreas de metano em função da quantidade de metano em moles. Ajustando-se esses pontos pelo método da regressão linear, obteve-se uma equação da reta (y=ax+b), que foi utilizada para a conversão dos dados.

Para este trabalho determinou-se a reta padrão do metano e do dióxido de carbono (Anexo 3), a partir de 6 volumes fixos onde foram injetados em triplicata e a média dos valores, utilizou-se para compor a reta padrão, dando origem a equação da reta descritas abaixo, conforme demonstradas no anexo 3 para o metano, dióxido de carbono e hidrogênio, respectivamente:

Equação 1 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de CH₄

$$\text{Conc. CH}_4 \text{ (mol)} = 2,2630569 \times 10^{-12} \text{ área cromatográfica} + 2,7372862 \times 10^{-07}$$

$$R^2 = 0,99894783$$

Equação 2 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de CO₂

$$\text{Conc. CO}_2 \text{ (mol)} = 8,2983807 \times 10^{-12} \text{ área cromatográfica} + 2,8420608 \times 10^{-07}$$

$$R^2 = 0,99809042$$

Equação 3 – Equação da reta para concentração x área cromatográfica de H₂

$$\text{Conc. H}_2 \text{ (mol)} = 6,8252295 \times 10^{-13} \text{ área cromatográfica} + 2,4811339 \times 10^{-07}$$

$$R^2 = 0,99496395$$

4.6.3 Calculo para determinação do metano

Para o calculo da determinação da produção de metano foi aplicado o mesmo método que o utilizado por Lapa (2006), Oliveira (1997) e Steil (2007). Sendo obtidos seguindo os passos descritos a seguir:

- a) As áreas do metano foram convertidas utilizando a equação padrão da reta em Mol de CH₄;
- b) Foram acumuladas as concentrações de metano da seguinte forma:
 - No tempo 0, a concentração de metano era aquela obtida no headspace do frasco nesse tempo;
 - No tempo 1, a concentração de metano era aquela obtida no headspace do frasco nesse tempo, mais a concentração de metano obtida no tempo anterior (zero);
 - No tempo 2, a concentração de metano era aquela obtida no headspace do frasco nesse tempo; mais a concentração de metano obtida no tempo 0, e no tempo 1. E assim sucessivamente;
- c) Os valores de metano obtidos na amostra de 0,01 mL sacada dos reatores foram convertidos para o headspace de cada frasco através da seguinte equação:

Equação 4 – Equação de conversão do volume da amostra para o headspace

$$[\text{CH}_4] \text{ no headspace (mol)} = \frac{[\text{CH}_4] \text{ na amostra} * \text{volume do headspace}}{\text{Volume de amostragem (0,001mL)}}$$

Onde:

$[\text{CH}_4]$ no headspace (mmol) = Quantitativo de metano no headspace

$[\text{CH}_4]$ na amostra = Quantidade de metano na amostra injetada no cromatógrafo

Volume do headspace = Volume total do headspace do reator

Volume de amostragem = Volume sacado no reator e injetado no cromatógrafo

- d) Os volumes acumulados de metano nos headspace em mol/L, foram convertidos em L_{CH_4}/L através da equação abaixo:

Equação 5 – Equação geral dos gases

$$PV = nRT$$

Onde:

$P = 696,7 \text{ mmHg}$

$V =$ Volume a ser convertido

$n =$ Número de mol do gás

$R = 62,3 \text{ mmHg}$

$T = 237 + 35^\circ\text{C}$

- e) Para ajuste dos dados experimentais, foram aplicadas às sigmóides de Boltzmann e Gompertz através do Software OriginPro 8. Tomando-se a menor soma dos quadrados dos resíduos como critério de decisão na escolha do melhor ajuste, optou-se pela realização da sigmóide de Boltzmann (Tabela 4), sendo ajustado pela equação abaixo, conforme curva de exemplo:

Equação 6 – Equação do ajuste linear de Boltzmann

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

init value: $A_1=0$ final value: $A_2=1$ center: $x_0=0$ time const: $dx=1$
--

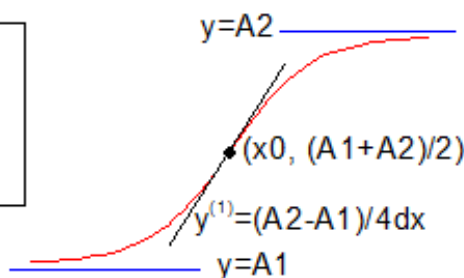


Tabela 4. Soma dos resíduos quadrados dos ajustes não-lineares.

Soma dos Resíduos quadrados			
Reatores	Boltzmann	Gompertz	Desvio Padrão
B	0,6538	1,0156	0,2558
R1	1,2029	1,7080	0,3571
R2	0,0004	0,0006	0,0001
R3	0,5751	0,7061	0,0926

Fonte: Dados da pesquisa

- f) A sigmóide ajustada foi posteriormente derivada, numericamente, com o mesmo software, a fim de se determinar as velocidades máximas de formação do metano.
- g) Utilizou-se como valor da biomassa a média do teor de STV determinado no início do ensaio, a fim de observar o comportamento da produção de metano em função do conteúdo de STV;
- h) A avaliação da AME, em $\text{CH}_4 \text{ L /gSVTd}$, é feita determinando-se a razão entre a taxa máxima de produção de metano, em $\text{CH}_4 \text{ L /d}$, e a quantidade inicial de biomassa, em gSVT, presente no frasco de reação.

4.6.4 Demanda Química de Oxigênio - DQO (APHA, 1999)

A análise foi precedida do preparo da diluição da amostra na concentração de 1:50, em balão volumétrico de 50 mL foi adicionado 1 mL de amostra bruta e completado com água destilada até o menisco. Em um tubo de DQO previamente lavado, foi adicionado com pipeta automática de volume variável 1,5 mL da solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio) e 3,5 mL da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata. Adicionou-se 2 mL da amostra diluída previamente, os tubos foram fechados e agitados.

Com o digestor aquecido a 150°C , os tubos foram incubados por 120 minutos, quando findo esse tempo, resfriaram-se os tubos no escuro. A leitura foi realizada através de espectrofotometria em absorvância com 620 nm de comprimento de onda.

4.6.5 Sólidos Totais - ST (APHA, 1999)

Para determinação dos sólidos totais, foi mensurado o peso (P^0) da cápsula de porcelana após sair da mufla a 550°C por 1 hora, seguida por esfriamento em dessecador e

pesadas. Em seguida, foi Transferida para a cápsula 50 mL da amostra bruta, medidos em proveta de 100 mL e colocado em estufa a temperatura de 103-105°C durante aproximadamente 24 horas. Retirada da estufa foram colocadas em dessecador até esfriarem e a cápsula foi novamente pesada, obteve-se assim o peso seco (P^1), sendo determinados pela equação 7.

Equação 7 – Equação para calculo da concentração dos ST

$$ST \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(P_1 - P_0).10^6}{V_{\text{amostra}}}$$

4.6.6 Sólidos Totais Voláteis - STV (APHA, 1999)

Na determinação dos sólidos totais voláteis a cápsula retirada da estufa e pesada, foi submetida à calcinação em mufla a 550°C por 1 hora, sendo retiradas em seguida da mufla, esfriadas em dessecador e pesadas em balança de precisão, obtendo-se assim o peso (P^2), sendo calculados pela equação 8 abaixo:

Equação 8 – Equação para calculo da concentração dos STV

$$STV \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(P_1 - P_2).10^6}{V_{\text{amostra}}}$$

4.6.7 Sólidos Totais Fixos - STF (APHA, 1999)

Os sólidos totais fixos são a porção do resíduo que resta após a calcinação a 550°C por 1 hora, e foram calculados pela equação 9 abaixo:

Equação 9 – Equação para calculo da concentração dos STF

$$STF \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(P_2 - P_0).10^6}{V_{\text{amostra}}}$$

4.6.8 Frequência das análises

Na tabela 5, estão dispostas as análises realizadas, assim como a frequências e suas respectivas referências.

Tabela 5. Frequência de realização das análises

Análise	Frequência	Referência
pH	Inicial e Final	APHA (1999)
Ácidos orgânicos e Alcoóis	Inicial e Final	Maintinger <i>et al</i> (2008)
Conteúdo do biogás (CH ₄ , CO ₂ , H ₂)	Diária	Maintinger <i>et al</i> (2008)
DQO	Inicial e Final	APHA (1999)
Sólidos Totais (ST), Sólidos voláteis totais (SVT) e Sólidos fixos	Inicial e Final	APHA (1999)

Fonte: Dados da pesquisa

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse item serão apresentados os resultados obtidos durante a execução do presente estudo, os quais estão incluídos as análises físico-químicas do início e final do experimento, a caracterização dos ácidos orgânicos e alcoóis do momento da partida e finalização reacional e a quantificação e qualificação do biogás produzido.

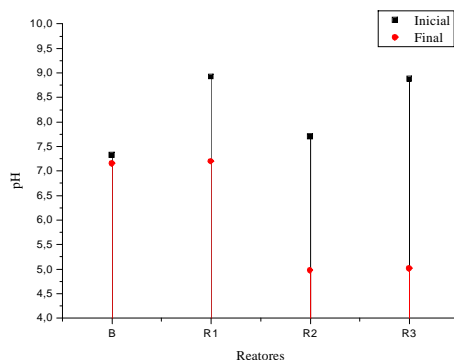
Todos os dados apresentados foram formados a partir da média realizada proveniente da triplicata dos reatores em batelada, no entanto, para minimizar as possibilidades de erros experimentais, descartaram-se durante a confecção das médias aritméticas os reatores que apresentaram qualquer divergência no transcorrer do monitoramento da produção dos gases e das análises físico-químicas.

5.1 Análises físico-químicas

Durante a montagem dos reatores anaeróbios, não foi realizada a padronização do potencial hidrogeniônico dos substratos no momento da partida reacional, pois tendo em vista que todos os valores se mantiveram dentro da faixa ideal para as arqueas metanogênicas (Tabela 6), conforme descrito por Xavier (2009) as bactérias acidogênicas têm crescimento rápido e pH ótimo de 5,2 a 6,5 ao passo que as metanogênicas crescem mais lentamente, como as acetogênicas, e o seu pH ótimo é de 7,5 a 8,5.

Na figura 13, pode-se observar a diferença do pH no momento inicial do experimento e na desmontagem dos reatores. Os reatores R2 e R3 foram os que apresentaram as maiores reduções do potencial, apesar do R3 ser o segundo que possuía o maior valor de pH no início do período experimental.

Figura 13. Evolução do potencial hidrogeniônico (pH) dos reatores anaeróbios.



Fonte: Dados da pesquisa

Distintamente do observado no reator R1, onde houve diminuição no valor, no entanto se mantendo na neutralidade. Diversos fatores podem ter contribuído para a acidificação do meio reacional, esses fatores estão correlacionados posteriormente.

Tabela 6. Resultados da avaliação físico-química nos substratos dos reatores no momento de partida reacional e finalização experimental.

		Reatores					
		B	R1	R2	R3		
Inicial	pH	7,32	8,93	7,70	8,88		
	DQO	(mg/L)	5268,65	12948,05	36387,62	15730,83	
	ST	(mg/L)	3928,00	60980,00	96295,00	60394,67	
	STV	(mg/L)	2512,67	49109,00	74829,00	46620,67	
		%	63,97	80,53	77,71	77,19	
	STF	(mg/L)	1415,33	11871,00	21466,00	13774,00	
		%	36,03	19,47	22,29	22,81	
	Final	pH	7,15	7,20	4,97	5,01	
		DQO	(mg/L)	1669,76	11703,82	16988,43	12198,84
		ST	(mg/L)	2724,00	14949,33	20258,00	30330,00
STV		(mg/L)	1283,33	11026,00	16237,33	22410,00	
		%	47,11	73,76	80,15	73,89	
STF		(mg/L)	1369,67	3923,33	4020,67	7920,00	
		%	52,89	26,24	19,85	26,11	
Eficiência		DQO		68,31	9,61	53,31	22,45
		ST	%	30,65	75,48	78,96	49,78
		STV		48,93	77,55	78,30	51,93
	STF	3,23		66,95	81,27	42,50	

Fonte: Dados da pesquisa

Conforme pode ser observado na figura 14 e os dados expressos na tabela 6, o reator R1 apresentou a menor taxa de redução da DQO 9,61%, seguido do reator R3 com redução de 22,45%. Muito inferior ao encontrado por Leite *et al* (2004), que utilizou resíduos sólidos

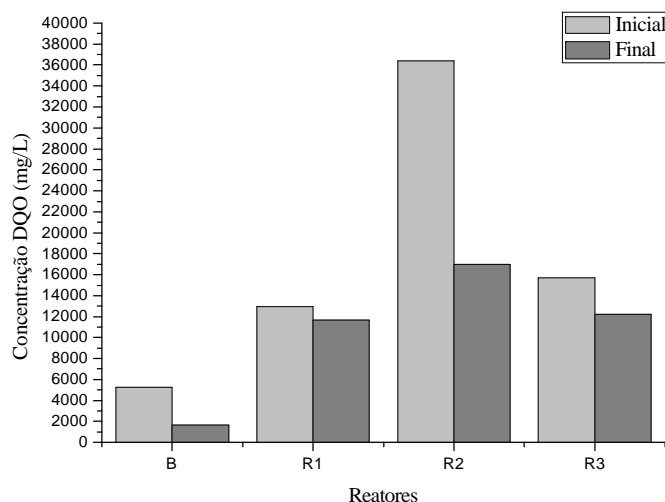
vegetais e esgoto sanitário (80/20%), com a DQO_{inicial} de 32.740 mg/L e DQO_{final} 10.555 mg/L obtendo redução ao final do ensaio com variação de 50 - 94%.

Semelhante ao constatado no reator B e R2, que foram os que reduziram o maior quantitativo de DQO, 68,31 e 53,31%, respectivamente. Proporcionalmente abaixo do ensaio com dejetos bruto de suinocultura, realizado por Angonese *et al* (2006), que observou redução de 77% no valor da demanda química de oxigênio - DQO que iniciou com 49.953 mg/L e foi reduzida para 11.240 mg/L.

Na tabela 6, estão também dispostos os valores dos Sólidos totais (ST), Sólidos totais voláteis (STV), Sólidos totais fixos (STF) para o momento da partida (carga inicial) e finalização dos reatores em massa e porcentagem da redução durante o processo.

Observa-se que o reator R2 carregado com substrato de sabugo de milho + dejetos de animais de laboratório, apresentou a maior redução de sólidos totais (ST) e totais voláteis (STV) com respectivamente, 78,96% e 78,30%. O frasco-reator R1 que recebeu como fonte de carbono a maravalha de madeira + dejetos de animais de laboratório reduziu respectivamente, 75,48% e 77,55% de ST e STV (Figura 15).

Figura 14. Concentração da demanda química de oxigênio (DQO) nos reatores anaeróbios durante o experimento.



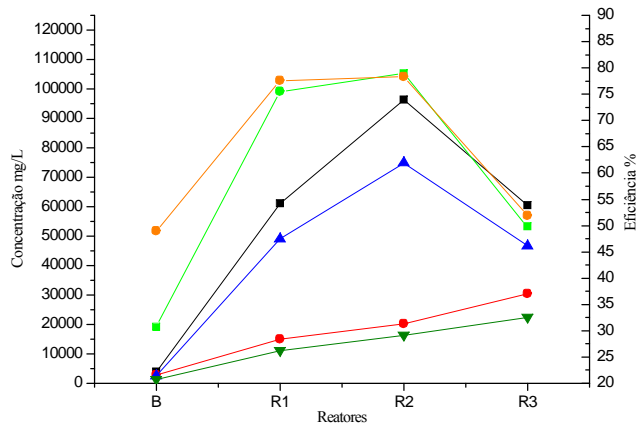
Fonte: Dados da pesquisa

Suzuki (2012), trabalhando com cama de frango e manipueira, observou a redução de 79,31% utilizando somente cama de frango com maravalha de madeira, já com a associação cama de frango e manipueira na proporção (40/60) obteve uma redução de STV 81,94%, semelhante ao obtido nos reatores R1.

Corroborando com o ensaio de co-digestão de cama de frango e caldo de cana em reatores de batelada, Sagula (2012) utilizou dejetos bovinos como inoculo, obtendo uma redução de 61,07 a 74,57%, semelhante ao observado nesse experimento.

Com a menor taxa de redução dos reatores que receberam alguma fonte de carbono, o reator R3 apresentou apenas 49,78% e 51,93% de reduções para ST e STV, respectivamente. Santos (2001), utilizando cama de frango composta por maravalha de madeira, em biodigestores bateladas operados seqüencialmente, obteve valores entre 25 e 46, 39% de redução de STV, valores inferiores aos encontrados nesse trabalho.

Figura 15. Concentração de ST e STV no startup e finalização dos reatores, assim como a eficiência de remoção (%). ST_{inicial} (-■-), ST_{final} (-●-), STV_{inicial} (-▲-), STV_{final} (-▼-), ST_{eficiência} (-■-), STV_{eficiência} (-●-).



Fonte: Dados da pesquisa

A alta eficiência observada na Figura 15 do reator R2, que apresentou a maior redução de sólidos que os demais digestores, podem está vinculada a dificuldade de mensuração do resíduo durante as análises, pois existe uma dificuldade de homogeneização pelas peculiaridades do substrato.

Segundo Santos (2001), espera-se que para um processo de biodigestão ocorra normalmente o teor de redução STV deve ser elevado, uma vez que a redução de sólidos voláteis pode nos dar um indicativo da matéria orgânica que se converterá em biogás.

5.2 Ácidos orgânicos e Alcoóis

Em todos os reatores na amostra inicial foram observados a presença de ácido butírico (Hbu), ácido propiônico (Hpr) e etanol (Etoh) em proporções semelhantes. O ácido acético (Hac) estava presente em todos os digestores, só que em maior concentração no R2 e R3, esse fato pode estar ligado à utilização do fluido ruminal como inoculo. Pois, durante a digestão do mono e polissacarídeos os ruminantes produzem Hac, Hbu e Hpr, em animais alimentados com volumoso a proporção pode chegar a 70:20:10, respectivamente para cada ácido (POSSENTI *et al.*, 2008)

No ensaio do reator branco (B), os quantitativos de todos os ácidos e do etanol declinarão no final do experimento, se comparados ao valor no momento da partida reacional, como se pode observar na figura 15 (A).

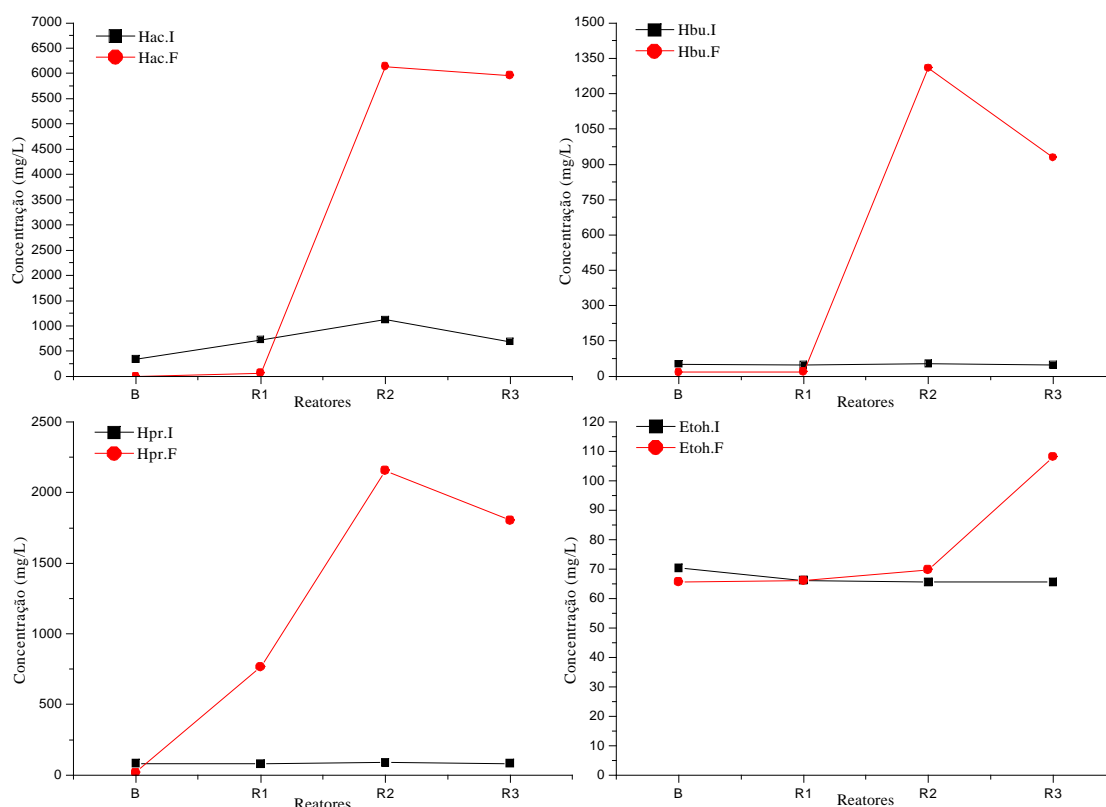
No reator R1 houve aumento somente na produção de ácido propiônico conforme demonstrado nos conjuntos da figura 13, os outros ácidos orgânicos e o etanol se mantiveram abaixo dos valores iniciais. Segundo Ren *et al* (2007), na fermentação pela rota do ácido propiônico pode ocorrer a conversão deste ácido em metano, além de se acumular no sistema reacional.

Os reatores R2 e R3 apresentaram aumento na produção de todos os ácidos orgânicos (figura 15C e 15D), principalmente ácido acético no final do período experimental. Esse fato está intimamente ligado a acentuada acidificação dos meios reacionais identificados com a mensuração do pH desses digestores. Segundo Lapa (2006), a alta concentração principalmente de ácidos carbônicos e ácidos voláteis influenciam no valor do pH.

Observando a figura 15 (D), pode-se perceber que houve um pequeno aumento no quantitativo no reator R2, no entanto, o reator R3 foi que apresentou a produção mais expressiva de etanol.

Devido à base do substrato do reator R3 ser bagaço de cana, este sendo formado principalmente por 70% a 85% de polissacarídeos e 2% a 3% de resíduos de monossacarídeos (GERON *ET AL*, 2010). Além da influência do baixo valor do pH no reator R3 (BARROS, 2012) algumas espécies de microorganismos presentes no processo de digestão anaeróbia degradam o carboidrato dos substratos, gerando ácidos orgânicos e etanol (ZAMPOL, 2012).

Figura 16. Concentração dos ácidos orgânicos e alcoóis nos reatores na ocasião da partida e finalização do experimento. (A) ácido acético (B) ácido butírico (C) ácido propiônico (D) Etanol.



Fonte: dados da pesquisa

5.3 Composição do Biogás

Os dados de produção do biogás descritos são provenientes de média dos reatores (Anexo 1) que apresentaram comportamento semelhante durante o ensaio. Reatores que demonstraram discrepância no comportamento produtivo de metano (CH_4) ou em qualquer análise de monitoramento em relações aos demais do mesmo tratamento, foram descartados na elaboração da média.

A qualidade do biogás produzido durante o ensaio anaeróbio foi caracterizado conforme a quantidade de metano, hidrogênio e gás carbônico presentes. Apesar da

composição do biogás ser formada por diversos gases. Segundo Mafacioli (2012), o metano pode participar em até 70% e o gás carbônico 45% da composição do biogás.

Na Tabela 7 estão expressos os volumes (L) acumulados totais de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e hidrogênio (H₂), para cada substrato utilizado no ensaio experimental, assim como, pode-se observar as concentrações (%) dos respectivos gases no biogás produzido.

Na produção volumétrica de H₂ não houve grande variação, o reator R3 apresentou a maior produção qualitativa (tabela 7). Somente o reator B produziu mais hidrogênio que aqueles que receberam as fontes de carbono, conforme pode ser observado na figura 14.

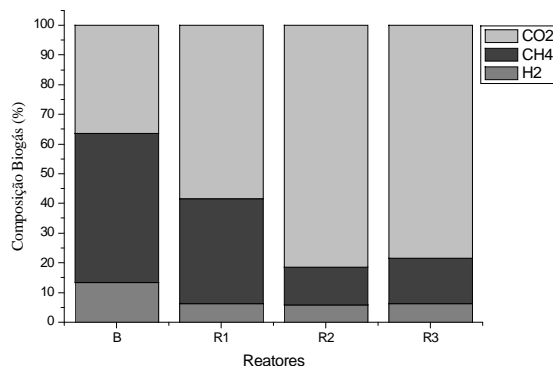
Tabela 7. Produção acumulada total dos gases no biogás produzido, para cada substrato utilizado.

	H₂(L)	H₂ (%)	CH₄ (L)	CH₄ (%)	CO₂ (L)	CO₂ (%)
B	2,21	13,42	8,26	50,25	5,98	36,33
R1	2,20	6,21	12,56	35,42	20,70	58,37
R2	2,38	5,77	5,24	12,71	33,60	81,52
R3	2,80	6,24	6,83	15,23	35,19	78,53
DP±	0,28	-	3,15	-	13,58	-

Fonte: Dados da pesquisa

O R1 foi o digestor que quantitativamente apresentou o maior volume de metano produzido, quando comparado aos demais reatores que sofreram adição das fontes de carbono. Esse fato deve-se principalmente ao potencial hidrogeniônico (pH), que manteve-se na faixa de benefício as arqueas metanogênicas pH_{final} 7 – 7,24. Pois Segundo Batista (1981) e Costa (2009), as arqueias que produzem metano sobrevivem numa faixa estreita de pH (6,5 e 8,0).

Figura17. Caracterização do biogás produzido nos quatro reatores em batelada.

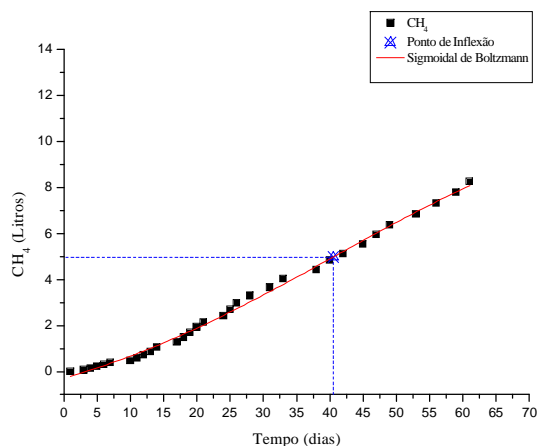


Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Produção de Metano (CH₄)

O monitoramento da produção de metano (CH₄) nos reatores anaeróbios na fase experimental foi realizado diariamente durante o início do ensaio, a partir 26º dia do startup reacional, as aferições foram feitas em dias alternados para a produção de CH₄ (Anexo 1).

Figura18. Concentração média de CH₄ (L) ao longo do tempo no reator B com ajuste linear e ponto de inflexão.



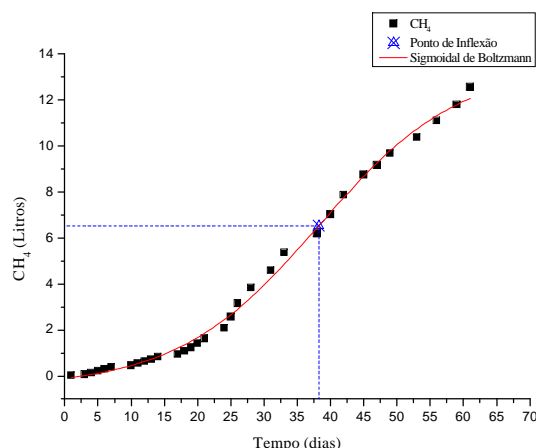
Fonte: Dados da pesquisa

O reator branco foi composto exclusivamente pelo inoculo utilizado no experimento. Desta forma, a produção de metano registrada neste reator equivale à capacidade produtiva unicamente do inoculo. O reator B apresentou a produção cumulativa de 8,26 L/CH₄ como pode ser observado na tabela 7. A máxima produção de metano foi de 4,98L, obtida no dia 40,5 conforme representado na figura 17, através do ponto de inflexão.

Segundo Primavesi (2004), faz parte da natureza fisiológica dos herbívoros ruminantes produzirem metano durante o processo de digestão, onde são transformados em média 6% da energia bruta dos alimentos em metano.

A produção acumulada de metano (CH_4) no reator R1 foi de 12,56 L_{CH_4} , sendo superior ao R3 e R2 que apresentaram 6,83 L_{CH_4} e 5,24 L_{CH_4} , respectivamente (tabela 7). Os valores são inferiores aos encontrados por Costa (2012) e por Fukayama (2008), que obtiveram respectivamente 1,024 m^3 e 0,986 m^3 , utilizando reatores em batelada de 60L.

Figura19. Concentração média de CH_4 (L) ao longo do tempo no reator R1 com ajuste linear e ponto de inflexão.



Fonte: Dados da pesquisa

A variação da produção nos diferentes substratos, assim como o volume total dos reatores utilizados e proporção da matéria orgânica de origem animal presente em ambos os estudos, pode ter contribuído para a diferença no quantitativo produzido.

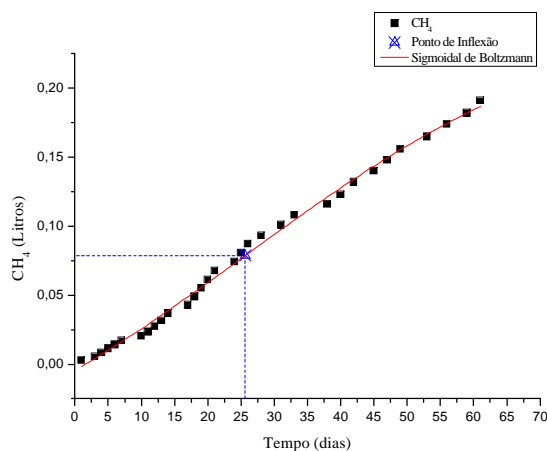
O reator R1 levou mais tempo para atingir a produção máxima de metano, no entanto, foi o que teve a maior taxa de produção segundo o ajuste linear de Boltzmann, 0,33 L_{CH_4} (figura 18). Já o reator R2 foi o que apresentou o menor período, no entanto, teve a menor produção acumulada e a menor taxa de produção de CH_4 0,0035 L_{CH_4} . O reator R3 manteve a taxa de produção em 0,13 L_{CH_4} , porém ainda abaixo que o maior reator R1.

Para Lucas-Júnior (1994), o potencial de produção de metano a partir dos dejetos de ruminantes deve sofrer variações em função da qualidade nutricional da alimentação dos animais. Considerando as diferenças entre os substratos utilizados neste estudo, e que a

origem do fluido ruminal foi proveniente de uma região onde basicamente os ruminantes são criados extensivamente, ou seja, a base de volumoso.

A diferença entre as taxas de produção de metano nos reatores, principalmente no reator R3, pode estar ligada ao substrato composto principalmente por sabugo de milho, além dos dejetos de animais de laboratório.

Figura20. Concentração média de CH₄ (L) ao longo do tempo no reator R2 com ajuste linear e ponto de inflexão.



Fonte: Dados da pesquisa

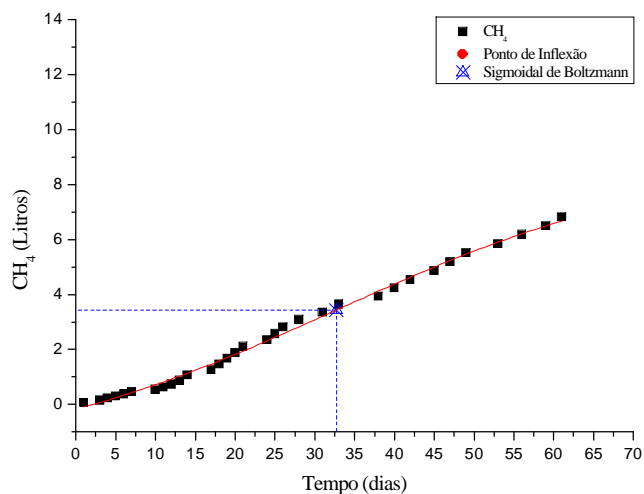
A velocidade de produção do metano (CH₄) foi determinada através da razão entre taxa máxima de produção de metano L_{CH_4}/d , e a concentração inicial de biomassa g/STV. O reator R1 alimentado com maravalha de pinus + dejetos de animais de laboratório, apresentou a maior velocidade de produção 0,0067 $L_{CH_4}/gSTV/d$, com rendimento de 0,256 $L_{CH_4}/gSTV$.

O rendimento observado no reator R1 foi superior ao encontrado por Suzuki (2012), que conduziu ensaio em batelada com cama de frango, obtendo 0,15 $L_{CH_4}/gSTV$ adicionado. Assim como por Alvarez *et al* (2006), que observaram um potencial de produção de metano de 0,131 $L_{CH_4}/kgSTV$ adicionado, quando utilizaram dejetos bovinos no processo de digestão anaeróbia.

Corroborando com a produção cumulativa e a taxa de produção o R3 apresentou a segunda maior velocidade de produção de metano, ficando em 0,0028 $L_{CH_4}/gSTV/d$ e rendimento na produção de metano de 0,146 $L_{CH_4}/gSTV$. Superior a velocidade observada no

reator R2, que apresentou 0,000047 $L_{CH_4}/gSTV/d$ e no rendimento 0,070 $L_{CH_4}/gSTV$, sendo as menores observadas durante todo o experimento.

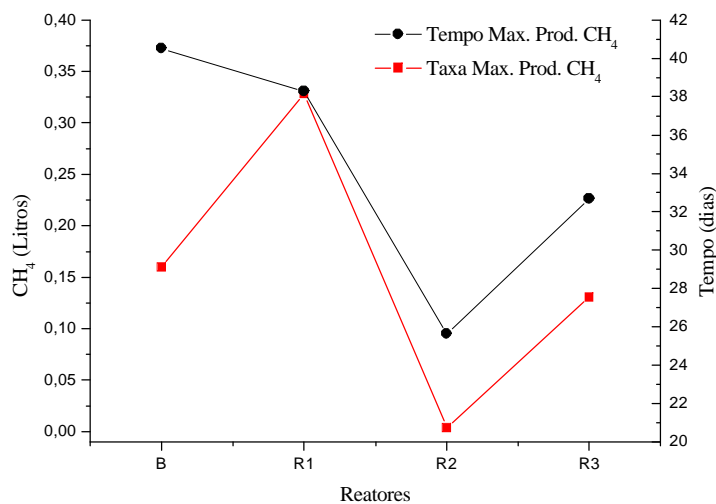
Figura21. Concentração média de CH_4 (L) ao longo do tempo no reator R3 com ajuste linear e ponto de inflexão.



Fonte: Dados da pesquisa

Santos *et al.* (2012), utilizou dejetos de animais de laboratório + maravalha de madeira para ensaio em batelada com reatores de 150 L, obtendo rendimentos que variam de 0,071 a 0,102 L_{CH_4}/gST , semelhante ao encontrado neste ensaio nos reatores R2 e R3.

Figura22. Taxa máxima de produção CH_4 (L) e Tempo máximo para produção CH_4 (dias) em função aos reatores.



Fonte: Dados da pesquisa

Na Figura 22 estão demonstrados a produção máxima de metano CH_4 e o tempo máximo para produção. Como pode ser observado, houve uma grande variação no tempo de início da produção de CH_4 , onde o reator R2 iniciou primeiramente a produção, no entanto, foi o que apresentou a menor produção, conforme já detalhado anteriormente. O reator R1 foi o último digestor que recebeu carga orgânica a iniciar a produção, no entanto, foi o que atingiu a maior produção acumulada.

Observa-se então que, quanto maior o tempo máximo para produção, mais elevado será essa. No entanto, apesar do reator B ter apresentado maior tempo que o reator R1, a produção deste foi inferior, esse fato pode estar ligado à quantidade de sólidos presentes no substrato que servirão de meio para a biomassa metanogênica.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as discussões apresentadas neste trabalho, às seguintes conclusões podem ser destacadas.

Os resíduos provenientes de centros de criação de animais de laboratório possuem potencial de produção de biogás. A concentração de metano a partir destes substratos pode variar conforme as composições e condições de operação do reator.

O substrato que mais produziu metano no experimento foi o reator R1, carregado com maravalha de pinus e dejetos de animais de laboratório e inoculado com fluido ruminal.

O fluido ruminal foi eficiente como inóculo para a produção de metano, enriquecendo ao meio reacional com a biomassa microbiana presente naturalmente nos herbívoros ruminantes. No entanto, a sua aplicação no processo de digestão anaeróbia está intimamente ligada ao tipo de substrato a ser utilizado, assim como a origem do fluido (alimentação dos animais).

Tendo em vista a diversidade bacteriana envolvida no inóculo utilizado, assim como os tipos de substratos utilizados. Sugere-se a realização de outros estudos e ensaios para mapear os microorganismos envolvidos no processo quando aplicado o fluido ruminal como inóculo.

Assim como tentar estabelecer a melhor rota para a produção de metano com resíduos provenientes de biotérios e centros de criação de animais de laboratório.

REFERÊNCIAS

AÇMA, H. H. Combustion characteristics of different biomass materials. *Energy Conversion e Management*. Istambul: pergamon, v. 44, p. 155-162, 2003.

AGUIAR, W.M. O uso de fontes alternativas de energia como fator de desenvolvimento social para segmentos marginalizados da sociedade. Tese do programa de pós-graduação de engenharia da universidade federal do rio de janeiro, 2004.

AIRES, A. M. A. Biodigestão anaeróbia da cama de aviários de corte com ou sem separação das frações sólida e líquida. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.

ALVAREZ, R. S. ET AL. Biogas production from llama and cow manure at high altitude *Biomass and Bioenergy*, 30, p. 66–75, 2006.

AMON, T. AMON, B. KRYVORUCHKO, V. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresource Technology*. V. 98, P:3204-3212, 2007

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.K.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.; TUFIK, S. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: Crossete Gráfica e Editora, 2004. 167p.

ANGELIDAKI, I. Applications of the digestion process. *Biochemical Engineering/Biotechnology*. V.82, 1-33, 2003.

ANGELIDAKI, I. ET AL. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:560-564, 1993.

ANGONESE, A. R.; CAMPOS, A. T.; ZACARKIM, C. E.; MATSUO, M. S.; CUNHA, F. Eficiência energética de sistema de produção de suínos com tratamento dos resíduos em biodigestor. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 10, p. 745-750, 2006.

APHA (1999). *Standart Methods for the examination of water and wastewater*. 19 Thedtion. New York American public health association.

Atlas de energia elétrica do Brasil. Agência Nacional de Energia Elétrica. 3ª Ed. Brasília:ANEEL, 2008

BAIALARDI, C. E. G. Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em diferentes sistemas de ventilação. Dissertação de Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

BARROS, A.R. Produção de hidrogênio e Etanol em reator anaeróbio de leito fluidizado: Avaliação do desempenho de três materiais de suporte em diferentes condições operacionais. Tese de doutorado do Centro de Ciências exatas e de tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, 2003.

BEN. Balanço Energético Nacional. Ministério de Minas e Energia, Brasil. (2015) Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/>

BARCELOS, B. R. Avaliação de diversos inoculos na digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos orgânicos domésticos. Dissertação de mestrado da Faculdade de engenharia civil e ambiental da Universidade de Brasília, 2009.

BATSTONE, D. J. ET AL. Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. II: parameter estimation and validation using slaughterhouse effluent. *Bioresource Technology* 75, 75-85, 2000.

BATISTA, L. F. Construção e operação de biodigestores. Brasília, DF: EMBRATER, 1981. 26 p. (Manual técnico).

BOTTA, L. S., ET AL. Addition of cellulase in a batch reactor of hydrogen production from paper fermentation. In 13 World Congress on Anaerobic Digestion - Recovering (bio) Resources for the World, Santiago de Compostela, 2013. Proceedings of 13th World Congress on Anaerobic Digestion., 2013.

BOTTA, L. S. ET AL. Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio. Anais do II Projeto de Seminários da Universidade de São Paulo, 2012.

BOTTA, L. S. ET AL. Aproveitamento de resíduos ligno-celulósicos para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio alimentado com papel. Anais do I Projeto de Seminários da Universidade de São Paulo, 2011.

BORJA, R.; BANKS, C. J. Evaluation of instability and performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating high-strength ice-cream wastewater. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 23, n.1, p.55-61, 1996.

BACKES, G. M. Avaliação no processo de digestão anaeróbia na geração de energia a partir de dejetos suínos e bovinos de leite com suplementação de glicerina residual bruta oriunda da produção de biodiesel. Dissertação de pós graduação da UNIVATES. Porto Alegre/RS. 2011.

BRAUNA, C. H. C. Co-digestão anaeróbia de tortas de oleaginosas visando à produção de metano. Tese de doutorado do programa de pós-graduação em recursos hídricos e saneamento ambiental da Universidade Federal do Ceara, 2012.

CHERNICHARO, C. A. L. (1997). “Princípios do tratamento biológico de águas residuárias”, volume 5, 10 ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG. Belo Horizonte.

CAMPOS, C. M. M.; CARMO, F. R.; BOTELHO, C. G.; COSTA; C. C. Desenvolvimento e operação de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) no tratamento dos efluentes da suinocultura em escala laboratorial. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, n.1, p.140-147, 2006.

- CHERNICHARO, C.A.L.; HAANDEL, A. Van; AISSE, M.M.; CAVALCANTI, P.F.F. Reatores anaeróbios de manta de lodo, In: CAMPOS, J.R. (Coord.) Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: ABES/PROSAB, 1999. p.155-98.
- CARDOSO, C.V.P. Classificação de Biotérios quanto à finalidade. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: Criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. P. 29 - 32.
- CASTRO, L. R.; CORTEZ, L. A. B. Influência da temperatura no desempenho de biodigestores com esterco bovino. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.2, n.1, p.97-102, 1998.
- CAMPOS, C. M. M. ET AL. Efeito do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. Ambi—Água. Vol. 4, N. 3, p. 157-168, 2009.
- CHAE, K.J., JANG, A., YIM, S.K., KIM, I.S. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. Bioresour. Technol. 99, 1–6, 2008.
- COSTA, L. V. C. Produção de biogás utilizando cama de frango diluída em água e em biofertilizante de dejetos de suínos. Tese de doutorado da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP. 2012.
- COSTA, L. V. C. Biodigestão anaeróbia da cama de frango associada ou não ao biofertilizante obtido com dejetos de suínos: produção de biogás e qualidade do biofertilizante. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- CRESPO, E. J. M. Digestão Anaeróbia de resíduos agroalimentares: Reutilização das frações líquidas e sólidas (state-of-art). Dissertação de mestrado da Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de ciências e Tecnologias, Programa de Energia e Bioenergia, 2013.
- COUTO, S.E.R. Equipamentos, Materiais e Insumos. In: ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books .
- DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Dissertação de mestrado da Universidade Federal de São Paulo, 1987.
- DOS SANTOS. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: Criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. P. 127- 138.
- EL-MASHAD, H.M.; ZEEMAN, G.; VAN LOON, W.K.P.; BOT GERARD, P.A. Anaerobic digestion of solid animal waste in an accumulation system at mesophilic and thermophilic conditions, start up. Water Science and Technology, nº 48, pag: 217 – 220, 2003.

FABRICIO, V. L. ET AL. Benefícios sanitários do sabugo de milho enriquecido ou não para roedores e técnicos de laboratório. *Revista Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório - RESBCAL*, São Paulo, v.1 n.2, p. 169-174, 2012

FARIAS, D.F., FERREIRA, P.M.P., CARVALHO, A.F.F.U., CARVALHO, A.F.U. Avaliação preliminar do uso da fibra de coco (*Cocos nucifera*) como cama de animais de laboratório. *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, Rio de Janeiro, v. 24, n. Suplemento, p. 233-236, 2005.

FEIDEN, A. ET AL. Avaliação da eficiência de um biodigestor tubular na produção de biogás a partir de águas residuárias de suinocultura. In: *AGRENER GD 2004 – 5o Encontro de Energia no Meio Rural e Geração Distribuída*. 2004. Anais. Campinas: Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético da UNICAMP/NIPE. 2004

FUKAYAMA, E. H. Características quantitativas e qualitativas da cama de frango sob diferentes reutilizações: efeitos na produção de biogás e biofertilizante. 2008. 99f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FUKAYAMA, E. H. et al. Produção de biogás utilizando cama de frangos de corte. I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais Geração de Energia a partir de Resíduos de Animais, 2009.

GALBIATTI, J. A.; CAMELO, A. D.; SILVA, F. G; GERARDI, E. A. B.; CHICONATO, D. A. Estudo quali-quantitativo do biogás produzido por substratos em biodigestores tipo batelada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.14, n.4, 2010.

GERON, L. J. V. ET AL. Composição química, valor de ph e temperatura do bagaço de cana-de-açúcar in natura e hidrolisado com cal (cao) conservados em mini silos. *Revista de Ciências Agro-Ambientais*, Alta Floresta, v.8, n.1, p.57- 68, 2010.

INATOMI, T. A. H; UDAETA, M. E. M. Análise dos impactos ambientais na produção de energia dentro do planejamento integrado de recursos. Disponível em: http://www.espacosustentavel.com/pdf/INATOMI_TAHI_IMPACTOS_AMBIENTAIS.pdf
Acessado em: 20/04/2014

JARDIM, W. R. Criação de Caprinos. 3ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1977. 239p.

KAPARAJU, P., LUOSTARINEN, S., KALMARI, E., KALMARI, J. & RINTALA, J. Codigestion of energy crops and industrial confectionery by-products with cow manure: Batch scale and farm-scale evaluation. *Water Science Technology*. v 45, 2002.

KOLB, E. Fisiologia Veterinária. 2 ed. Zaragoza, Acribia, V.2, Cap. 16, p. 795-9, 1974.

KOETZ, P.R. ;FARIA, O.L.V. & NUNES, W.A. Tratamento de homogêneos de curtume por digestão anaeróbia em reatores de fluxo ascendente. *Rev. Bras. de Agrociências*,v.1, n.1, p.23-29, 1995.

LAPA, K. L. Avaliação da recirculação da fase líquida e do regime de alimentação no reator anaeróbio, em escala piloto, operado em bateladas seqüenciais contendo biomassa

imobilizada (ASBBR), no tratamento de esgoto sanitário. Tese de doutorado da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

Avaliação da recirculação da fase líquida e do regime de alimentação no reator anaeróbio, em escala piloto, operado em bateladas sequenciais contendo biomassa imobilizada (ASBBR), no tratamento de esgoto sanitário

LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S.; LOPES, W. S.; ATHAYDE JÚNIOR, G. B.; DANTAS, A. M. M. Tratamento de resíduos sólidos de centrais de abastecimento e feiras livres em reator anaeróbio de batelada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, n.2, p.318-322, 2003.

LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S.; LOPES, W. S.; ATHAYDE JÚNIOR, G. B.; DANTAS, A. M. M. Tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos com Baixa concentração de sólidos. *Revista de Engenharia Sanitária Ambiental*, Vol. 9 - Nº 4 - out/dez, 2004.

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. BRASIL, 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm

LORA, E.S.; ANDRADE, R.V. Biomass as energy source in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.13, p.777-788, 2009.

LUSTE, S.; LUOSTARINEN, S.; SILLANPAA, M. Effect of pre-treatments on hydrolysis and methane production potentials of by-products from meat-processing industry. *Journal of Hazardous Materials* 164, 247–255, 2009.

LUCAS JÚNIOR, J. Algumas considerações sobre o uso do estrume de suínos como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios. 1994. 137 f. Tese (Livre-Docência em Construções Rurais) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

MAFACIOLLI, D. Produção de biogas através do processo de digestão anaeróbia utilizando dejetos de aves de postura com suplementação de glicerina bruta. Trabalho de conclusão de curso de Engenharia Ambiental do Centro Universitário UNIVATES, 2012.

MAJEROWICZ, J. Boas Práticas em Biotério e Biossegurança. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

MAINTINGUER, S. I. ET AL. fermentative hydrogen production with xylose by clostridium and klebsiella species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 13508-13517, 2011.

MAINTINGUER, S. I. ET AL. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*. V. 33, P. 4309–4317, 2008.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. *Revista Brasileira de Política Internacional*, v.51, p.60-79, 2008.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic Digestion of organic solid waste. *Bioresource technology*, v. 74, p: 3-16, 2000.

MELLO, M. G. (org.). *Biomassa, energia dos trópicos em Minas Gerais*. Belo Horizonte: LabMídia/ UFMG, 2001.

MERUSSE, J.L.B.; LAPICHIK, V.B.V. Instalações e equipamentos. In: DE LUCA, R.R. ET AL. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2ª e. São Paulo: Winner Graph, p. 15-25, 1996.

MISI, S.N.; FORSTER, C.F. Batch co-digestion of multi-componente agro-wastes. *Bioresource Technology*, Oxford, v.80, n.1, p.19-28, 2001.

MOLINARO, E.M.; MAJEROWICZ, J; VALLE, S. *Biossegurança em biotérios*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H. et al. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. *Animal Feed Science and Technology*, v.116, n.3, p.301-311, 2004.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde*, Fundação Osvaldo Cruz, volume 1, 2009. 156 p

MORENO, L.S.; OSMA, J.L.G. de; FERNANDEZ, C.C. *Animales de laboratorio: Producción, manejo y control sanitario*. Madrid, Instituto Nacional de Investigaciones Agrárias, 1983.

ORRICO JUNIOR, M.A.P.; ORRICO, A.C.A.; LUCAS JUNIOR, J. Influência da relação volumoso: concentrado e do tempo de retenção hidráulica sob a biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos. *Engenharia Agrícola*, v.30, p.386-394, 2010.

OLIVEIRA, R.A. Efeito das concentrações dos sólidos suspensos do efluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura. Tese de doutorado da Escola de Engenharia de São Carlos, 1997.

PEDREIRA, S.M. Estimativa da produção de metano de origem animal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF6). 2004. 136f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal APUD RIVERA, R. A. ET AL. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

PICANÇO, A. P. Influência da recirculação de percolado em sistemas de batelada de uma fase e híbrido na digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

POSSENTI, R. A. ET AL. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *accharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. R. Bras. Zootec., v.37, n.8, p.1509-1516, 2008.

PRIMAVESI ET AL. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.39, n.3, p.277-283, mar. 2004

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 03 DE 14 DE DEZEMBRO DE 2011. Institui o credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa – CIAEP. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Ministério de Ciência e Tecnologia, 2011.

REN, N. Q. ET AL. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. Bioresource Technology nº 98, p. 1774–1780, 2007.

RATTI, R. P. ET AL. Production of H₂ from cellulose by rumen microorganisms: effects of inocula pre-treatment and enzymatic hydrolysis. Biotechnol Lett. Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

SANGULA, A. L. Biodigestão anaeróbia de cama de frango em co-digestão com caldo de cana-de-açúcar. Dissertação do programa de energia da agricultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, 2012.

SANTOS, E. M. S. ET AL. Potencial energético do aproveitamento de resíduos Sólidos provenientes de biotério para a produção de biogás. Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.1, p.35-39, 2012.

SANTOS, T. M. B. Balanço energético e adequação do uso de biodigestores em galpões de frangos de corte. 2001. 167 f. Tese (Doutorado em Produção Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

SCHINK, B. Anaerobic digestion: concepts, limits and perspectives. Water Science and Technology, vol. 45, p. 1-8, 2002.

SILVA, A. C. A.; FRANCISCO, A. C.; SCANDELARI, L. A cogeração de energia a partir do capim brachiaria: um caso de inovação na indústria de bioenergia. XXVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

STEIL, L. Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. 108 f. Tese de doutorado da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

STEIL, L. Avaliação da atividade microbiana metanogênica na lagoa de estabilização anaeróbia da estação de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati, Vale do Ribeira do Iguape, Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2001.

SUZUKI, A. B. P. Geração de Biogás utilizando cama de aviário e manipueira. Dissertação de mestrado do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual do Oeste do Parana, 2012.

TEIXEIRA, J.C. Nutrição dos Ruminante, Lavras, MG: ESAL/ FAEPE, 1991.

XAVIER, Cristiane de Almeida Neves. Caldo de cana-de-açúcar na biodigestão anaeróbia com dejetos de vacas em lactação sob diferentes dietas. 2009. x, 91 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104902>>.

WALKER, E. Estudo da viabilidade econômica na utilização de Biomassa como fonte de energia renovável na Produção de biogás em propriedades rurais. Dissertação de mestrado do Departamento de Física, Estatística e Matemática da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2009.

World Energy Outlook. International Energy Agency. (2010) Disponível em: <https://www.iea.org>. Acessado em: 12/03/2015

ZAMPOL, C. L. Influência da concentração do substrato e da teperatura na produção de hidrogênio a partir da vinhaça da cana-de-açucar. Tese de doutorado do departamento de hidráulica e saneamento da Universidade Federal de São Carlos, 2012.

ZANETTE, A. L. (2009). “Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil”. Dissertação (Mestrado). COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro.

ZEEUW, W., LETTINGA, G. Start-up of UASB-reactors. In: AWWTEUROPEAN SYMPOSIUM, 1983, Wageningen. Proceedings. p. 23-25.