

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**AIKO MARTINS FUKUMA  
BIANCA APARECIDA RIBEIRO**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS FATORES DE INFLUÊNCIA EM CONTROLES  
POSITIVOS DE TESTES DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO**

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2025**

**AIKO MARTINS FUKUMA  
BIANCA APARECIDA RIBEIRO**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS FATORES DE INFLUÊNCIA EM CONTROLES  
POSITIVOS DE TESTES DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia, pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Piacentini Rodriguez

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Ribeiro, Bianca Aparecida.

Análise comparativa dos fatores de influência em controles positivos de testes de potencial bioquímico de metano / Bianca Aparecida Ribeiro, Aiko Martins Fukuma. - Poços de Caldas, MG, 2025.

23 f. : il. -

Orientador(a): Renata Piacentini Rodriguez.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2025.


Bibliografia.

1. Potencial bioquímico de metano. 2. Controle positivo . 3. Digestão anaeróbia. 4. Produção de metano. 5. Parâmetros experimentais. I. Fukuma, Aiko Martins. II. Rodriguez, Renata Piacentini , orient. III. Título.

**AIKO MARTINS FUKUMA**  
**BIANCA APARECIDA RIBEIRO**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS FATORES DE INFLUÊNCIA EM CONTROLES  
POSITIVOS DE TESTES DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO**

A Presidente da banca  
examinadora abaixo assina a  
aprovação do artigo  
apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de Graduação no  
Bacharelado em Ciência e  
Tecnologia pela  
Universidade Federal de  
Alfenas.  
Área de concentração:  
Engenharia Ambiental.

Documento assinado digitalmente  
 **RENATA PIACENTINI RODRIGUEZ**  
Data: 18/12/2025 16:23:29-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Aprovada em: 01 de dezembro de 2025

(Profª. Dra.) Renata Piacentini Rodriguez (Orientadora)  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura

(Prof. Dr.) Rafael Brito de Moura (Avaliador)  
Universidade Federal de Alfenas

(Prof. Dr.) Gunther Brucha (Avaliador)  
Universidade Federal de Alfenas

Este trabalho é dedicado aos nossos pais, amigos, à professora Renata e, principalmente, àquela que nos apoiou e ensinou desde o primeiro dia no laboratório até hoje: Jessica Jacinta.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos, em primeiro lugar, a Deus, que nos fortaleceu a cada dia durante todo o processo, enchendo nossos corações de fé, coragem e esperança para seguirmos em frente.

Aos nossos pais e familiares, que desde o início nos apoiaram e acreditaram que chegaríamos até aqui, e além, que nos incentivaram todo esse tempo. Não nos deixaram passar por tudo sozinhas, acompanhando-nos em todas as etapas da faculdade durante esses três anos, com muita paciência e confiança de que conseguiríamos.

À Universidade Federal de Alfenas, aos professores e técnicos do Instituto de Ciência e Tecnologia, que nos ensinaram com paciência e dedicação para que nos tornemos profissionais não apenas para nós, mas também para o mundo, contribuindo para torná-lo melhor após nossa formação. A todos os demais servidores que, com certeza, contribuíram para que tudo isso se tornasse possível, o nosso sincero agradecimento.

A todos os nossos amigos e colegas que conhecemos na universidade, vocês, sem dúvida, fizeram com que nossa experiência se tornasse ainda mais memorável e única. Em especial, fazemos menção à nossa amiga desde o primeiro dia de aula, Giovanna Cruz, que sempre nos apoiou, esteve conosco nos bons e maus momentos, trocando experiências e ensinamentos, e acreditou em nós durante todo esse tempo.

À nossa orientadora Renata, não sabemos como descrever nossa gratidão por tudo que nos possibilitou durante esse período. Por acreditar em nós, nos guiar para que nossos objetivos fossem alcançados e, acima de tudo, por sempre nos inspirar com sua força e dedicação. Você nos mostrou, de forma única, que tudo feito com paciência, propósito e coração sempre encontra o seu caminho certo no fim. Nós te admiramos profundamente.

Em especial, à Jessica Jacinta, por ter nos conduzido desde o primeiro dia de iniciação científica, por ter se disponibilizado todos os dias, com muita paciência, para nos ensinar sobre a pesquisa que realizamos. E, principalmente, pela amizade e pelo carinho genuíno que sempre demonstrou. Você tornou nosso sonho possível, você é a nossa sorte.

Ao Laboratório BIÔMEA da UNIFAL, por ter disponibilizado todos os equipamentos para a realização deste trabalho, e a todos os cientistas do laboratório que nos auxiliaram em todas as etapas da pesquisa e aos membros da banca Prof. Dr. Rafael Brito de Moura e Prof. Dr. Gunther Brucha por aceitarem o convite.

Por fim, agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

## RESUMO

O Potencial Bioquímico de Metano (PBM) é uma ferramenta fundamental para comparar a capacidade de conversão de substratos orgânicos em biogás, permitindo quantificação precisa do metano produzido via vias microbianas. A celulose microcristalina é amplamente utilizada como controle positivo em ensaios PBM por estimular os quatro estágios da digestão anaeróbia. Estudos prévios demonstram variações de até 30% na produção de metano em ensaios PBM utilizando diferentes inóculos, mesmo sob condições controladas. Normas internacionais como VDI 4630 estabelecem parâmetros de validação para ensaios com celulose, com produção esperada de  $745 \pm 74,5$  mL biogás/g SV. Dois inóculos foram caracterizados: um deles oriundo de UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reator tratando resíduos avícolas e outro de um CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor) reator tratando vinhaça/torta de filtro. Foram testadas variações na razão inóculo-substrato (I:S 1,0-4,0) e concentração de celulose (0,46-0,92 g/ensaio). Os ensaios foram realizados em frascos de 120 mL a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , sem agitação por 70 dias, com monitoramento diário de biogás e análise da composição do biogás por cromatografia gasosa. O inóculo UASB apresentou produção específica de metano (PEM) de  $510,0 \pm 47,7$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV em I:S=2,0, enquanto outras razões variaram entre 821,2-1086,5 NmL CH<sub>4</sub>/g SV. O inóculo CSTR mostrou menor PEM (máximo  $416,5 \pm 10,5$  NmL CH<sub>4</sub>/g VS em I:S=3,0) porém menor variabilidade nos resultados entre as diferentes condições testadas. A discrepância nos volumes de inóculo (50/80 mL vs. 70 mL) sugere influência de fatores físicos na transferência de massa. Os resultados demonstram a sensibilidade dos ensaios PBM às características do inóculo e condições operacionais, reforçando a necessidade de protocolos adaptativos que considerem a origem microbiana e avaliação específica para cada contexto.

Palavras-chave: digestão anaeróbia; celulose; parâmetros operacionais; produção de metano.

## ABSTRACT

The Biochemical Methane Potential (BMP) is a fundamental tool for comparing the capacity of converting organic substrates into biogas, allowing for precise quantification of the methane produced via microbial pathways. Microcrystalline cellulose is widely used as a positive control in BMP assays because it stimulates the four stages of anaerobic digestion. Previous studies demonstrate variations of up to 30% in methane production in BMP assays using different inocula, even under controlled conditions. International standards such as VDI 4630 establish validation parameters for assays with cellulose, with an expected production of  $745 \pm 74.5$  mL biogas/g VS. Two inocula were characterized: one from a UASB (reactor treating poultry waste) and another from a CSTR (reactor treating vinasse/filter cake). Variations in the inoculum-to-substrate ratio (I:S 1.0-4.0) and cellulose concentration (0.46-0.92 g/assay) were tested. The assays were carried out in 120 mL flasks at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , without agitation for 70 days, with daily biogas monitoring and analysis of the biogas composition by gas chromatography. The UASB inoculum showed a specific methane production (SMP) of  $510.0 \pm 47.7$  NmL CH<sub>4</sub>/g VS at I:S=2.0, while other ratios varied between 821.2-1086.5 NmL CH<sub>4</sub>/g VS. The CSTR inoculum showed a lower SMP (maximum  $416.5 \pm 10.5$  NmL CH<sub>4</sub>/g VS at I:S=3.0) but less variability in the results among the different tested conditions. The discrepancy in the inoculum volumes (50/80 mL vs. 70 mL) suggests the influence of physical factors on mass transfer. The results demonstrate the sensitivity of BMP assays to the characteristics of the inoculum and operational conditions, reinforcing the need for adaptive protocols that consider the microbial origin and specific evaluation for each context.

Keywords: anaerobic digestion; cellulose; operational parameters; methane production.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>12</b>
3.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS E SUBSTRATO	13
3.2	ENSAIOS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)	13
3.3	TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE CINÉTICA	14
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>21</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>22</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crise climática contemporânea, impulsionada pela crescente concentração de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera, configura-se como uma das maiores ameaças à sustentabilidade planetária. Evidências recentes demonstram que padrões insustentáveis de produção e consumo, frequentemente amplificados por dinâmicas comerciais globais, correlacionam-se diretamente com o aumento das emissões via fontes antropogênicas (Mejia, 2021). Dessa forma, os ganhos de produtividade, intensificaram-se as discussões acerca dos impactos ambientais associados à atividade. Assim, a crescente demanda por bens de consumo, impulsionada pelo crescimento populacional e por padrões insustentáveis de produção e consumo, gera severos impactos ambientais na saúde do planeta.

A eliminação inadequada desses materiais tem causado sérios impactos ambientais, o que reforça a necessidade de tecnologias de tratamento e aproveitamento. Nesse cenário, a digestão anaeróbia surge como um processo biológico sustentável e eficaz para a conversão desses resíduos complexos em biogás, uma mistura gasosa composta principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), além de traços de outros componentes, como amônia e umidade (Rehman *et al.*, 2019).

Uma das formas de avaliar a conversão de matéria orgânica em biogás é por meio de ensaios de Potencial Bioquímico de Metano (PBM). Este método permite comparar a biodegradabilidade anaeróbia de diversos substratos, quantificando de forma precisa o metano gerado por meio de rotas microbianas (Holliger *et al.*, 2016). A técnica é especialmente útil em estudos comparativos, uma vez que permite o controle de variáveis relevantes, como a origem e composição do inóculo e parâmetros operacionais. Conforme relatado por Holliger *et al.* (2016), ensaios de PBM realizados com inóculos distintos podem apresentar variações de até 30% na produção de metano, mesmo em condições controladas. Tal inconsistência pode ser atribuída a diferenças na atividade metabólica endógena ou na diversidade da comunidade microbiana presente no inóculo.

A celulose é frequentemente empregada como controle positivo em ensaios de PBM, conforme recomendado por protocolos internacionais como os de Angelidaki *et al.* (2009) e Holliger *et al.* (2016), além da norma alemã (VDI 4630 2016). Sua utilização se justifica por demandar todos os estágios sequenciais da digestão anaeróbia: hidrólise, fermentação dos monômeros resultantes (acidogênese), acetanogênese e, por fim, metanogênese por *archaeas*. Como material de referência, a celulose apresenta homogeneidade química, ausência de compostos inibidores e um comportamento de degradação previsível em ambiente anaeróbio.

Segundo a norma VDI 4630 (2016), o valor de referência considerado para validação do ensaio com celulose microcristalina é de 745 mL de biogás/g SV, com uma tolerância de  $\pm 10\%$ . Esse valor tem como base o potencial teórico máximo de 829 mL de biogás/g SV, deduzindo-se 10% para considerar a parcela do substrato direcionada ao crescimento e à manutenção microbiana.

Diversos fatores podem afetar a confiabilidade dos resultados de PBM, entre os quais se destacam: a fonte do inóculo, a proporção inóculo-substrato (I:S), a concentração de sólidos voláteis, o volume de inóculo utilizado e as condições de pré-incubação (Holliger *et al.*, 2016; Raposo *et al.*, 2011). Apesar dos esforços de padronização, diferenças inerentes ao inóculo e a heterogeneidade de certos substratos exigem, muitas vezes, a adaptação de metodologias para assegurar repetibilidade e acurácia nos resultados. Diante dessas lacunas, este estudo avança ao investigar parâmetros críticos para controles positivos em ensaios PBM, utilizando celulose microcristalina sob diferentes razões inóculo-substrato (I:S 1.0-4.0), incluindo condições além do padrão 2.0 recomendado pela VDI 4630 (2016), e comparando o desempenho de dois inóculos distintos: lodo granular de reator UASB tratando efluentes avícolas e lodo floculento de reator CSTR tratando vinhaça e torta de filtro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo propõe uma análise comparativa dos fatores que influenciam os ensaios de PBM com um controle positivo, focando em três parâmetros fundamentais: a variabilidade da atividade metabólica do inóculo, considerando diferentes fontes (lodo anaeróbico de reatores UASB e lodo anaeróbico de um reator CSTR); o impacto da razão inóculo-substrato I:S; e a interferência da atividade endógena, corrigida por meio de brancos contendo apenas inóculo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

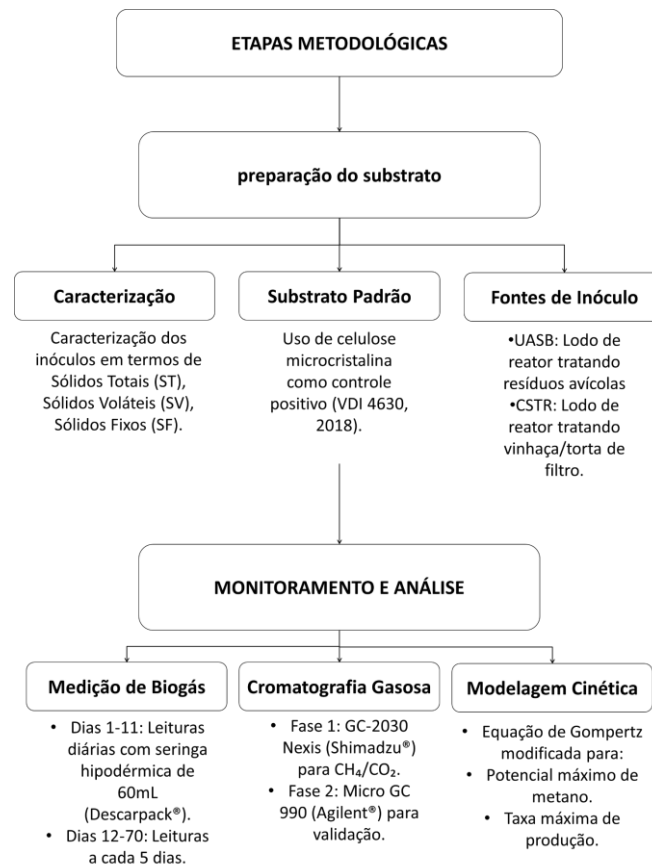
- a) Avaliar a influência de diferentes fontes de inóculo (lodo de reator UASB tratando resíduos de abatedouro avícola e lodo de reator CSTR tratando vinhaça e torta de filtro) na Produção Específica de Metano (PEM) e na resposta aos testes de PBM com celulose microcristalina.
- b) Investigar o impacto da variação da razão Inóculo-Substrato (I:S), com base em sólidos voláteis, em uma faixa de 1,0 a 4,0 sobre o rendimento e a cinética de produção de metano.
- c) Analisar o efeito da variação do volume inicial do inóculo (de 40 mL a 80 mL) mantendo-se uma razão I:S fixa, sobre a produção de metano e a dinâmica do ensaio.
- d) Quantificar e corrigir a interferência da atividade endógena dos inóculos utilizando controles em branco, para determinar a produção líquida de metano atribuível ao substrato.
- e) Modelar cineticamente a produção de metano utilizando a equação de Gompertz modificada para determinar os parâmetros cinéticos (potencial máximo de produção -  $V_{m\acute{a}x}$ , taxa máxima de produção -  $R_{m\acute{a}x}$  e fase de lag -  $\lambda$ ) para cada condição experimental.
- f) Validar o desempenho dos ensaios comparando os resultados de PEM obtidos com o valor de referência estabelecido pela norma VDI 4630 (2016) para celulose microcristalina (entre 352 e 414 NmL CH<sub>4</sub>/g SV).

### 3 METODOLOGIA

A determinação do Potencial Bioquímico de Metano (PBM) foi conduzida sob estrita conformidade com o protocolo VDI 4630 (2016), utilizando celulose microcristalina como substrato referencial para validação metodológica. A metodologia segue rigorosamente protocolos padronizados por (Angelidaki *et al.*, 2009), incluindo condições controladas de temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , além de critérios de validação quantitativos de acordo com a norma VDI 4630 (2016), que estabelece um parâmetro de aceitação de  $745 \pm 74,5$  mL de biogás/g SV para celulose microcristalina. Este protocolo integrado visa estabelecer parâmetros confiáveis e reproduzíveis para futuros estudos avaliando o potencial metanogênico de substratos complexos.

A abordagem experimental incorporou análise comparativa de dois inóculos distintos – lodo granular de reator UASB e lodo floculento de reator CSTR – submetidos a variações sistemáticas da razão inóculo-substrato (1.0-4.0 base SV). A metodologia deste trabalho foi delineada conforme o fluxograma metodológico da Figura 1.

Figura 1-Fluxograma do processo metodológico dos ensaios de PBM



Fonte: Autoras (2025)

### 3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS E SUBSTRATO

Para a realização dos ensaios de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), a celulose microcristalina de grau analítico (Synth®) foi utilizada como substrato.

Dois tipos de inóculos anaeróbios foram utilizados nos ensaios – um proveniente de reator UASB, tratando resíduos de abatedouro avícola cedidos pela Avícola Ideal, localizado na cidade de Pereiras – SP. O outro inóculo utilizado foi obtido de um reator de mistura completa CSTR, tratando vinhaça e torta de filtro; fornecidos pela Usina Cocal, localizada em Narandiba-SP.

Os inóculos foram caracterizados, em relação às suas características físico-químicas, de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2022). As amostras foram caracterizadas em termos de Sólidos Totais (ST), Sólidos Voláteis (SV), Sólidos Fixos (SF) e pH. Para a celulose microcristalina, assumiu-se o valor padrão de sólidos voláteis em 1 g/L.

### 3.2 ENSAIOS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

Os ensaios de PBM foram conduzidos conforme a metodologia VDI 4630 (2016), que estabelece uma proporção 2:1 entre sólidos voláteis (SV) do inóculo e do substrato, respectivamente. Foram testadas duas abordagens experimentais: variação da razão inóculo-substrato (I:S) entre 1,0 e 4,0 com base em SV, variação do volume entre 40 a 80 ml, e o da concentração de celulose microcristalina (0,46-0,92 g por ensaio) mantendo razão I:S fixa em 2,0.

Os ensaios foram realizados em frascos de penicilina de 120 mL, vedados com septo butílico e lacre de alumínio. Em cada frasco, foram adicionados volumes líquidos variáveis, composto pela mistura de inóculo e celulose conforme as condições experimentais propostas na Tabela 1. O volume de headspace destinado ao acúmulo de biogás, variou conforme o volume reacional nos frascos. Testes de controle negativo (CN) foram realizados utilizando apenas o inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicatas, com pH ajustado para 7 (corrigido com NaOH 1M), acondicionados em uma estufa, sob condições mesofílicas a 35° C e sem agitação.

Tabela 1- Parâmetros operacionais em termos de % SV para as diferentes proporções (I/S) e diferentes volumes reacionais

	Ensaio	Inóculo (mL)	Celulose (g)	Proporção I:S		Ensaio	Inóculo (mL)	Celulose (g)	Proporção I:S
UASB	U1	70	0,80	2,0	CSTR	C1	70	1,74	2,0
	U2	70	0,40	4,0		C2	70	0,87	4,0
	U3	70	0,54	3,0		C3	70	1,16	3,0
	U4	70	1,07	1,5		C4	70	2,32	1,5
	U5	70	1,61	1,0		C5	70	3,48	1,0
	U6	40	0,46	2		C6	40	1,74	2
	U7	50	0,57	2		C7	50	0,99	2
	U8	60	0,69	2		C8	60	1,24	2
	U9	80	0,92	2		C9	80	1,49	2
	UCN	70	-	-		CCN	70	-	-

Fonte: Autoras (2025)

A determinação do volume de biogás foi realizada utilizando uma seringa hipodérmica de 60mL (Descarpack®), com frequência diária nos primeiros dias de ensaios e quinzenalmente no final do experimento. A composição do biogás (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) foi analisada por cromatografia gasosa, utilizando um Micro GC 990 (Agilent®) equipado com módulos de peneira molecular e PPU. A temperatura da coluna foi de 80 °C, a temperatura do injetor 100 °C e o volume de injeção 1 mL, com argônio como gás de arraste. As pressões operacionais foram de 200 kPa (peneira molecular).

### 3.3 TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE CINÉTICA

Os dados obtidos foram tratados através do cálculo da Produção Específica de Metano (PEM), corrigindo-se os volumes medidos pela produção endógena dos controles e normalizado pela massa de sólidos voláteis do substrato, expressos em NmL CH<sub>4</sub>/g SV. A modelagem cinética foi realizada utilizando a equação de Gompertz modificada (Equação 1), com cálculo dos parâmetros cinéticos da produção cumulativa de metano ao longo do tempo (V<sub>CH<sub>4</sub></sub>(t) (NmL CH<sub>4</sub>)) – potencial máximo de produção de metano (V<sub>máx</sub> (NmL CH<sub>4</sub>/gSV)), taxa máxima de produção (R<sub>máx</sub> (NmL CH<sub>4</sub>/gSV/d)) e fase lag ( $\lambda$ ) (dias) – através de algoritmos de regressão não linear. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi calculado para avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais, garantindo-se a confiabilidade estatística através das triplicatas realizadas.

$$V_{CH_4}(t) = V_{max} * \exp \left\{ -\exp \left[ \left( \frac{R_{max} * e}{V_{max}} \right) * (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de PBM revelaram influência da origem do inóculo e das condições operacionais na produção específica de metano (PEM) da celulose, utilizado como controle positivo (Figura 2).

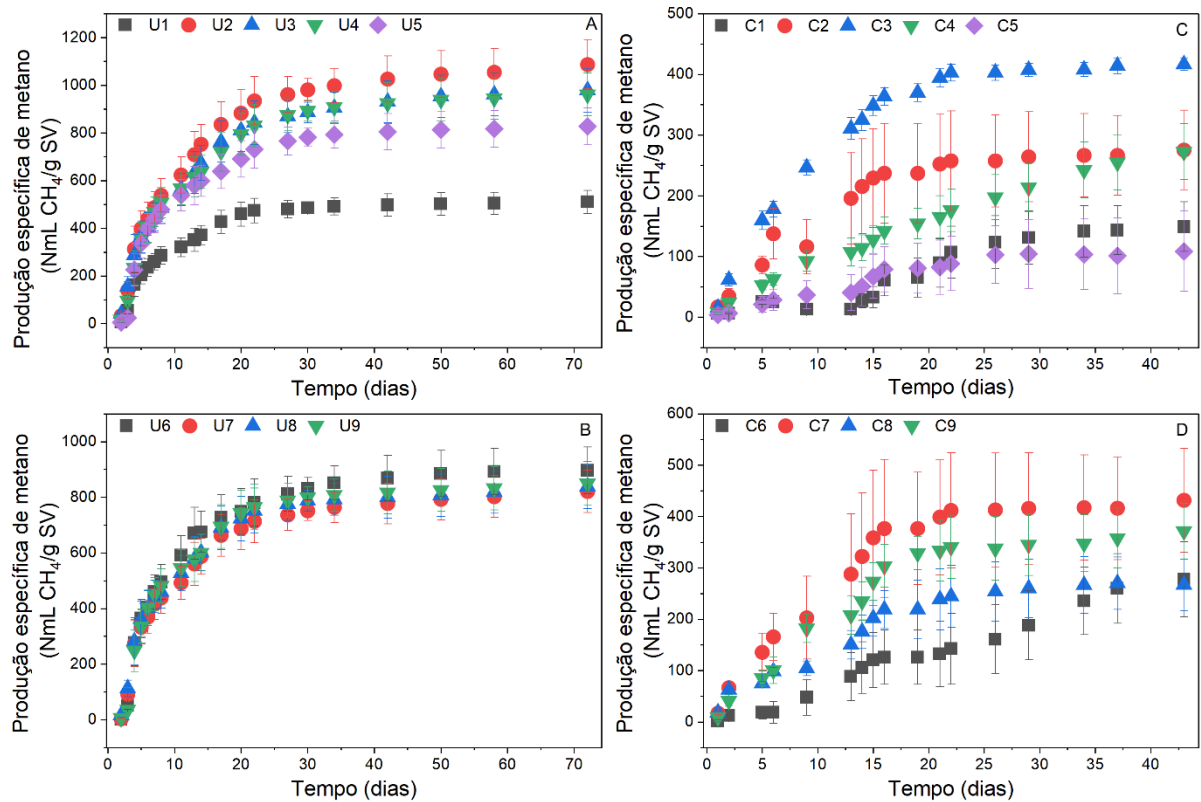
O inóculo proveniente do reator UASB, adaptado ao tratamento de efluentes de abatedouro avícola, demonstrou uma performance metanogênica superior à do inóculo CSTR, oriundo do tratamento de vinhaça e torta de filtro. O teor de sólidos totais (ST) do inóculo UASB foi de  $23,3 \pm 4,7$  g/L, enquanto seu teor de sólidos voláteis (SV) foi de  $19,2 \pm 3,8$  g/L. Para o inóculo derivado do CSTR, ST e SV foram  $41,6 \pm 3,5$  g/L e  $24,8 \pm 1,8$  g/L, respectivamente. Embora os dois inóculos tenham apresentado concentrações de SV comparáveis, o inóculo CSTR exibiu uma proporção maior de sólidos fixos (41,9%) em relação ao inóculo UASB (17,6%).

Os parâmetros recomendados de SV para a produção de metano é de 10-20 g/L (Filer; Ding; Chang, 2019). Os dois inóculos utilizados ficaram acima desse valor, indicando alto potencial energético. Os maiores valores de SV e SF do reator CSTR é decorrente da presença de frações lignocelulósica presente na torta de filtro que aumentam os teores de sólidos desse inóculo e conseqüentemente podem interferir no processo da DA, uma vez que, a recalcitrância desses compostos dificulta a etapa da hidrólise (Janke *et al.*, 2016; Volpi *et al.*, 2022).

Enquanto o inóculo de UASB atingiu PEMs máximas superiores a 1000 NmL CH<sub>4</sub>/g SV (Figura 2A) na maioria das razões Inóculo:Substrato (I:S) testadas, o CSTR não ultrapassou 430 NmL CH<sub>4</sub>/g SV (Figura 2D). Essa disparidade pode ser atribuída diretamente à composição e adaptação dos consórcios microbianos. O inóculo UASB, com seus grânulos bem formados, abriga uma comunidade microbiana diversificada e robusta, otimizada para a degradação de proteínas e gorduras, mas aparentemente também muito eficiente na hidrólise de polissacarídeos como a celulose (Mainardis *et al.*, 2020). Por outro lado, o inóculo CSTR, pode possuir uma comunidade especializada em compostos recalcitrantes, mas com uma população metanogênica menos eficiente para a celulose pura, ou mesmo a presença de inibidores microbianos oriundos da degradação da lignocelulose (Koch *et al.*, 2019).

Figura 2-Produção específica de metano (PEM), dos ensaios de controle positivo utilizando o inóculo UASB (A e B) e CSTR (C e D)





Fonte: Autoras (2025)

Legenda: U1-C1 (I:S-2.0); U2-C2 (I:S-4.0); U3-C3 (I:S-3.0); U4-C4 (I:S-1.5); U5-C5 (I:S-1.0); U6-C6 (I:S-2.0; v-40mL); U7-C7 (I:S-2.0; v-50mL); U8-C8 (I:S-2.0; v-60mL); U9-C9 (I:S-2.0; v-80mL).

A produção específica de metano (PEM) foi influenciada tanto pela razão SV inóculo-substrato (I:S) quanto pelo volume de inóculo. Para razões I:S de 4, 3, 2, 1.5, e 1 (U2, U3, U1, U4 e U5, respectivamente) os valores de PEM utilizando o inóculo UASB variaram entre,  $1086 \pm 101$ ,  $978 \pm 91$ ,  $510 \pm 47$ ,  $961 \pm 90$  e  $827 \pm 77$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV. Um dos achados mais notáveis foi o valor na PEM mais baixo para a condição de I:S = 2.0 (Figura 2A) considerada padrão em muitos protocolos (Holliger *et al.*, 2016).

Este comportamento não linear e contraintuitivo sugere que um desequilíbrio metabólico transitório pode ter ocorrido nesta razão específica. É plausível que uma relação I:S de 2.0, em que a PEM caiu para  $510 \pm 47$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV, criando uma condição de carga orgânica inicial que favoreceu uma acidogênese excessivamente rápida, levando a um acúmulo temporário de ácidos graxos voláteis (AGVs) e a uma diminuição do pH, inibindo temporariamente as arqueias metanogênicas (Boe *et al.*, 2010). Razões menores (1.0 e 1.5) podem ter limitado a produção total por escassez de microrganismos, enquanto razões maiores (3.0 e 4.0) forneceram um "efeito-tampão" microbiano suficiente para evitar a inibição,

sustentando altas taxas de metanogênese. Este resultado desafia a noção de uma condição operacional universalmente ótima e ressalta a necessidade de caracterizar a resposta do inóculo a diferentes cargas (Raposo *et al.*, 2011).

Por outro lado, para razões I:S de 2, 4, 1.5, e 1 (C1, C3, C4 e C5, respectivamente) os valores de PEM utilizando o inóculo CSTR variaram entre,  $149\pm 40$ ,  $275\pm 65$ ,  $272\pm 46$  e  $108\pm 66$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV (Figura 2C). Sendo que a condição C3 (razão I:S 3.0) foi a condição que produziu maior produção específica de metano  $416\pm 10$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV. Esses resultados podem estar associados à maior concentração de resíduos lignocelulósicos presente no inóculo que limitam a DA, sugerindo que em maiores concentrações de substrato, o sistema pode ter ficado sobrecarregado devido à sobrecarga orgânica no sistema e limitando o consórcio de microrganismos.

A elevada produção de metano, que em muitos casos superou o valor teórico de referência da norma VDI 4630 (2016) (entre 352 e 414 NmL CH<sub>4</sub>/g SV) pode ser explicada por um fenômeno de priming effect ou estimulação microbiana. A celulose, um substrato de degradação lenta, pode ter estimulado a atividade microbiana endógena, levando à co-metabolização de matéria orgânica residual presente no próprio inóculo, um efeito que não é totalmente contabilizado pelos controles em branco (Hill *et al.*, 2021). Isso enfatiza a importância de um período de pré-incubação adequado para esgotar a matéria orgânica biodegradável residual do inóculo, conforme recomendado por Holliger *et al.*, (2016), prática crucial para se obter resultados de PBM precisos e confiáveis. Embora esta etapa não foi conduzida no presente estudo é plausível que a adoção do período de pré-incubação, conforme sugerido por Holliger (2016), poderia ter conferido maior precisão aos resultados, uma vez que mitigariam a interferência da atividade endógena. Dessa forma, os valores de PEM observados refletiriam de maneira mais fidedigna o potencial metanogênico da celulose, isolando-o do efeito de co-metabolização de substratos residuais.

Em síntese, os resultados demonstram que a eficiência da digestão anaeróbia é um reflexo direto da história e adaptação do inóculo. A busca por protocolos padronizados é válida para comparabilidade, mas deve ser equilibrada com o entendimento de que a otimização do processo é inerentemente específica para cada sistema inóculo-substrato.

A modelagem cinética dada pelo modelo de Gompertz modificado corrobora essas observações (Tabela 2). Os valores de V<sub>máx</sub> e R<sub>máx</sub> foram consistentemente mais elevados para o inóculo UASB, indicando não apenas um maior potencial, mas também uma cinética de degradação mais rápida. A ausência de fase de lag nos ensaios utilizando o inóculo UASB ( $\lambda = 0$ ) em todos os ensaios indica que os consórcios microbianos de ambos os inóculos estavam

prontamente ativos e adaptados para iniciar a degradação da celulose imediatamente. Nos ensaios utilizando o inóculo CSTR, houve a presença de uma fase lag de aproximadamente 11 dias no ensaio C1 (I:S 2). Esse resultado possivelmente pode estar atrelado a uma maior presença de compostos lignocelulósicos no sistema que inibiu as fases iniciais da DA.

Tabela 2- Composição do biogás e parâmetros cinéticos dos ensaios de PBM a partir da modelagem de Gompertz modificada

Ensaio	Composição (CH <sub>4</sub> /CO <sub>2</sub> )	V <sub>máx</sub> NmLCH <sub>4</sub> /g SV	R <sub>Máx</sub> . NmL CH <sub>4</sub> /g SV/dia	Fase Lag λ (dia)	R <sup>2</sup>
UASB					
U1	67/33	494,20±10,48	33,18±1,54	0	0,9687
U2	70/30	1020,64±20,20	62,35±2,55	0	0,9749
U3	70/30	925,12±17,85	56,63±2,26	0	0,9754
U4	61/39	917,00±21,67	55,11±2,67	0	0,9659
U5	70/30	787,42±21,87	53,57±3,28	0	0,9488
U6	60/40	845,10±21,04	64,26±7,72	0	0,9608
U7	66/34	769,76±18,33	52,01±2,72	0	0,9598
U8	69/31	792,56±17,95	55,90±2,85	0	0,9609
U9	71/29	807,44±21,86	57,15±7,19	0	0,9559
CSTR					
C1	81/29	149,38±8,46	9,56±1,45	11,14±1,04	0,9598
C2	83/17	270,43±6,98	17,10±1,58	0	0,9746
C3	79/21	412,00±5,09	28,15±1,36	0	0,9933
C4	62/38	297,20±10,95	8,32±0,18	0	0,9906
C5	71/29	111,06±4,77	4,92±4,77	1,76±1,06	0,9715
C6	77/23	334,32±38,63	8,04±0,63	3,14±1,21	0,9731
C7	82/18	428,15±7,54	26,77±1,63	0	0,9887
C8	80/20	275,01±7,36	13,67±0,53	0	0,9771
C9	80/20	364,08±8,10	21,56±1,49	1,28±0,61	0,9857

Fonte: Autoras (2025)

O coeficiente de correlação linear (R<sup>2</sup>) acima de 95% demonstra o bom ajuste dos dados ao modelo cinético de Gompertz. Em relação à taxa máxima de produção diária (R<sub>máx</sub>), os valores mais altos obtidos para o inóculo UASB indicam uma degradação mais rápida do substrato. Portanto, embora ambos os inóculos tenham demonstrado atividade metanogênica sobre a celulose, os ensaios contendo o inóculo UASB foram mais promissores, enquanto o CSTR mostrou menor capacidade de conversão.

Os resultados dos ensaios usando o inóculo UASB sugerem que o consórcio microbiano tem uma maior capacidade de degradar celulose microcristalina, possivelmente em decorrência a uma maior diversidade microbiana resultante do tratamento de resíduos de abatedouro avícola. O inóculo do reator CSTR pode conter estruturas recalitrantes (originárias da torta de filtro) que limitam seu potencial para biodegradação da celulose.

O agrupamento dos resultados de PEM para diferentes razões I:S em grupos de desempenho distintos enfatiza ainda mais a natureza não linear das respostas microbianas à disponibilidade de substrato. Para o inóculo CSTR, a maior PEM foi alcançada na razão I:S de 3.0 ( $416 \pm 10$  NmL CH<sub>4</sub>/g SV), enquanto rendimentos menores e menos variáveis foram observados nas razões de 1.5 e 4.0. Por outro lado, a PEM foi mínima nas razões de 2.0 e 1.0, indicando que tanto a limitação quanto o excesso de substrato podem levar à produção subótima de metano. Esses achados estão alinhados com observações anteriores de que tanto a subalimentação quanto a superalimentação podem perturbar as parcerias sintróficas necessárias para uma metanogênese efetiva (Boe *et al.*, 2010).

Além disso, a influência do volume inicial do inóculo revelou padrões inesperados: volumes maiores de inóculo (50 e 80 mL) superaram a condição padrão de 70 mL, novamente desafiando os protocolos PBM estabelecidos. Isto sugere que o volume do inóculo não apenas afeta a I:S, mas também impacta a dinâmica da comunidade microbiana e a transferência de massa dentro do reator, variáveis frequentemente negligenciadas em metodologias padronizadas (Raposo *et al.*, 2011). Os resultados da modelagem cinética de Gompertz também reforçam os resultados já discutidos.

De acordo com a VDI 4630 (2016), a celulose microcristalina é usada como controle positivo, e o rendimento máximo teórico de metano está entre 352 e 414 NmL CH<sub>4</sub>/g SV. Curiosamente, todas as condições experimentais utilizando o inóculo UASB, excederam este valor teórico. Esses desvios podem resultar de uma subestimação da produção endógena do inóculo ou de uma atividade microbiana estimulada pela presença da celulose. Além disso, sistemas com volumes de inóculo menores (40-60 mL) e volume de inóculo maior (80 mL) também mostraram PEM maior do que a condição de 70 mL (I:S = 2.0), reforçando a sensibilidade dos resultados PBM à razão I:S e ao volume do inóculo. Esses achados ressaltam a necessidade de uma padronização rigorosa das condições experimentais para garantir a comparabilidade intra e inter-laboratorial (Raposo *et al.*, 2011).

Uma hipótese para explicar os valores de PEM que excedem os rendimentos teóricos é uma atividade endógena inesperadamente alta dos inóculos. Embora controles em branco tenham sido usados para contabilizar a produção de metano basal, é possível que a presença de celulose tenha desencadeado uma atividade microbiana além da observada nos brancos. Holliger *et al.* (2016) recomenda a pré-incubação de inóculos na temperatura do ensaio (ex.: 35°C) por pelo menos uma semana para estabilizar a atividade microbiana. Se a produção endógena permanecer alta, é provável que o inóculo não seja de um digestor em estado estacionário, e uma fonte alternativa deve ser considerada. Além disso, a produção endógena

não deve exceder 20% da produção total de metano; se exceder, uma pré-incubação prolongada pode ser necessária para esgotar os orgânicos facilmente biodegradáveis.

Neste estudo, no entanto, o reator UASB opera há mais de 20 anos sob condições de estado estacionário, tratando o mesmo tipo de resíduo. Uma explicação potencial para a variabilidade observada pode residir em flutuações na composição da alimentação e na taxa de carga orgânica, dependendo do tipo de ave sendo abatida, fatores conhecidos por influenciar a dinâmica da comunidade microbiana. Pesquisas adicionais são necessárias para explorar a relação entre a variabilidade da matéria-prima e a atividade endógena em sistemas de operação de longo prazo. De qualquer forma, esses achados destacam a importância de estender o período de pré-incubação em futuros ensaios PBM, particularmente ao usar inóculos com suspeita de alta atividade residual, para minimizar a produção de metano de fundo e aumentar a confiabilidade do ensaio.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo reforça a complexidade das interações inóculo-substrato em ensaios PBM e apela para uma maior atenção às variáveis microbianas e operacionais. Estes achados destacam várias questões críticas: (i) a importância da atividade endógena e do tempo de pré-incubação; (ii) a sensibilidade das condições padrão, uma vez que a menor PEM em I:S = 2,0 levanta questões sobre a robustez das condições PBM comumente recomendadas e a necessidade de calibração caso a caso dependendo das características do inóculo; (iii) inóculos de reatores de longo prazo podem exibir variabilidade microbiana; (iv) a flexibilidade metodológica deve ser discutida, pois os protocolos PBM devem considerar a incorporação de elementos adaptativos baseados na fonte do inóculo, avaliação da comunidade microbiana e otimização específica do sistema.

Os dados demonstram claramente esta sensibilidade às condições experimentais, particularmente à razão inóculo-substrato (I:S). Uma queda significativa na Produção Específica de Metano (PEM) foi observada em uma I:S = 2,0, questionando a aplicabilidade universal dos protocolos convencionais. Esta variação foi mais evidente no inóculo UASB, que, embora mais ativo, mostrou-se mais sensível. Em contraste, o inóculo CSTR exibiu um comportamento mais estável, ainda que menos eficiente, possivelmente devido à sua adaptação a substratos mais complexos. As diferenças entre os inóculos ressaltam a necessidade de protocolos flexíveis que possam ser adaptados de acordo com a fonte microbiana e o substrato em estudo, apoiando a premissa de que a otimização deve ser caso-específica. A otimização desse processo revela-se fundamental, visando não somente a maximização do aproveitamento energético, mas também a contenção de emissões fugitivas de metano. Dessa forma, consolida-se seu duplo benefício: a conversão de resíduos em energia renovável e a atenuação do agravamento das mudanças climáticas.

## REFERÊNCIAS

- ANDREW MEJIA, Steven. The climate crisis and export intensity: A comparative international study of greenhouse gas emissions in the global south, 1990–2014. **International Journal of Sociology**, v. 51, n. 1, p. 1-22, 2021.
- ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (PBM) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927-934, 2009.
- ANGELIDAKI, I.; ALVIRA, P.; FONOLL, X.; ZAMORANO, M. Defining the biomethane potential (PBM) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927–934, 2009.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 3, n. 2, p. 117–129, 2004.
- APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22. ed. **Washington, D.C.:** APHA, 2012.
- BOE, K. et al. Thermodynamic and kinetic limitations in anaerobic digestion processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 823–836, 2010.
- DEUTSCHER VEREIN DES GAS- UND WASSERFACHS (DVGW). VDI 4630: fermentation of organic materials – characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. **Düsseldorf:** VDI-Verlag, 2016.
- FILER, J.; DING, H. H.; CHANG, S.. Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. **Water**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 921, 2019.
- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515-2522, 2016.
- HOLLIGER, C.; FRUTEAU DE LACLOS, H.; HACK, G. Methane production of full-scale anaerobic digestion plants calculated from substrate's biomethane potentials compares well with the one measured on-site. **Frontiers in Energy Research**, v. 5, p. 12, 2016.
- JANKE, L. et al. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 217, p. 10-20, 2016
- JENSEN, P. D.; GE, H.; BATSTONE, D. J. Assessing the role of biochemical methane potential tests in determining anaerobic degradability rate and extent. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 4, p. 880-886, 2011.
- KOCH, K. et al. Evaluation of anaerobic digestion performance by PBM tests: comparison of different substrates. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121504, 2019.

LAIQ UR REHMAN, Mian et al. Anaerobic digestion. **Water environment research**, v. 91, n. 10, p. 1253-1271, 2019.

MAINARDIS, Matia; BUTTAZZONI, Marco; GOI, Daniele. Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) technology for energy recovery: a review on state-of-the-art and recent technological advances. **Bioengineering**, v. 7, n. 2, p. 43, 2020.

RAPOSO, F. et al. Biochemical methane potential (PBM) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 8, p. 1088-1098, 2011.

TANG, Zengmin; KIM, Woo-Sik; YU, Taekyung. Continuous synthesis of silver plates in a continuous stirring tank reactor (CSTR). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 66, p. 411-418, 2018.

VOLPI, M. P. C. *et al.* Use of lignocellulosic residue from second-generation ethanol production to enhance methane production through co-digestion. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 602-616, 2022.