



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA TORTA DE  
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA TORTA DE  
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de concentração em Biocombustíveis.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa  
Guedes

Coorientadora: Profa. Dra. Diva Souza Andrade

Londrina  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gavilanes, Freddy Eli Zambrano.

Produção de biogás a partir da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) / Freddy Eli Zambrano Gavilanes. - Londrina, 2015.  
74 f. : il.

Orientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Dissertação (Mestrado Profissional em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Biogás - Tese. 2. Biomassa - Tese. 3. Pinhão-manso - Tese. I. Guedes, Carmen Luisa Barbosa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. III. Título.

FREDDY ELI ZAMBRANO GAVILANES

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA TORTA DE  
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas L.*)**

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de concentração em Biocombustíveis.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Luisa Barbosa  
Guedes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Samuel Nelson Melegari de Souza  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE

Londrina, março 27 de 2015.

GAVILANES, Freddy Eli Zambrano. **Produção de biogás a partir da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é considerado uma espécie de relevância para o desenvolvimento da bioenergia, pela percentagem de óleo em suas sementes que pode variar de 40-60%, servindo para a fabricação de biodiesel, porém depois do processo da extração do óleo fica a torta que é um resíduo sólido rico em nutrientes e proteínas mas limitada, pois possui vários fatores anti-nutricionais e tóxicos como os ésteres de forbol. Assim, objetivou-se avaliar a produção de biogás em condições de laboratório, a partir da torta de pinhão manso proveniente da Estación Experimental Portoviejo do Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP de Equador. A torta foi incubada durante dois tempos: 6 meses (T1), e 18 meses (T2) usando três tipos de inóculos provenientes de consórcios de bactérias (obtidos do isolamento e concentração da torta de pinhão manso). Utilizaram-se microbiodigestores com volume de 50 mL onde foram colocados os tratamentos e como gasômetros seringas de 60 mL. Os biodigestores foram operados em condições mesofílicas (30 °C) durante 21 dias. Analisaram-se sólidos, cor e turbidez a fim de determinar a eficiência do processo na remoção da matéria orgânica e seu efeito na produção de biogás. O tratamento conformado pela torta incubada de 18 meses usando água como tratamento controle resultou na maior produção de biogás 83,67 mL após 21 dias. O inóculo formado pelo consórcio 2 (14 bactérias) foi o melhor, teve maior concentração de gás metano (84,33%), usando a torta incubada por 18 meses. A geração de biogás a partir da torta de pinhão manso é uma excelente opção para o seu aproveitamento, sendo um processo aplicável na geração de energia.

**Palavras-chave:** Biodigestão. Sólidos Totais. Metano. Nutrientes.

GAVILANES, Freddy Eli Zambrano. **Biogas production from physic nut seed cake (*Jatropha curcas* L.)**. 2015. 74p. Dissertation (Master in Bioenergy) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.), is considered a specie of relevance to the development of bioenergy. The percentage of oil in its seeds can oscillate from 40-60%, serving for the production of biodiesel, but after the extraction process oil remaining solid cake that is rich in mineral nutrients and proteins but limited because many features and toxic anti-nutritional factors such as phorbol esters. This study aimed to evaluate the production of biogas in laboratory conditions from physic nut seed cake from the Station Experimental Portoviejo from Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP located in Ecuador. The press cake was incubated for two times, 6 months (T1) and 18 months (T2), using 3 inoculum from bacteria consortia (obtained from the isolation and concentration of physic nut seed cake). It was used microdigesters with a volume of 50 mL where were put the treatments and as gasometers syringes of 60 mL. The digester was operated at mesophilic conditions (30 °C) for 21 days. Were analyzed solids, color and turbidity in order to determine the process efficiency in the removal of organic matter and its effect on biogas production. Treatment formed by the cake incubated at 18 months using water as control treatment resulted in increased production of biogas 83.67 mL after 21 days. The inoculum formed by the consortium 2 (14 bacterium) was the best, had higher concentration of methane (84.33%), using the press cake incubated for 18 months. The biogas generation from physic nut seed cake is an excellent choice for utilization in applicable power generation process.

**Keywords:** Biodigestion. Total Solids. Methane. Nutrients.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fontes de Biomassa.....	21
<b>Figura 2</b> – Diferentes componentes do pinhão manso do Equador.....	23
<b>Figura 3</b> – Processo da extração do óleo de pinhão manso no Equador.....	24
<b>Figura 4</b> – Principais fases do processo de digestão anaeróbia da materia orgánica. ....	31
<b>Figura 5</b> – A. Descascadora de pinhão manso INMEGAR 3 HP, 300 kg/hora B. Prensa tipo expeller CompactTropa.....	36
<b>Figura 6</b> – Câmara incubadora com a torta de pinhão manso .....	36
<b>Figura 7</b> – Esquema representativo das etapas realizadas para avaliar a morfologia das bactérias isoladas da torta de pinhão manso.....	42
<b>Figura 8</b> – Esquema do procedimento do preparo dos inóculos .....	43
<b>Figura 9</b> – Microbiodigestor e gasômetro em escala laboratorial .....	44
<b>Figura 10</b> – Obtenção e determinação dos gases.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição (%) da torta de <i>Jatropha curcas</i> L. da Nicarágua .....	27
<b>Tabela 2</b> – Composição da torta de <i>Jatropha curcas</i> L. da Índia .....	27
<b>Tabela 3</b> – Descrição dos tratamentos dos ensaios 1 e 2.....	45
<b>Tabela 4</b> – Teor de óleo, Sólidos Totais, Fixos e voláteis da torta de pinhão manso em dois tempos de incubação .....	48
<b>Tabela 5</b> – Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso em dois tempos de incubação .....	49
<b>Tabela 6</b> – Concentração bacteriana e algumas características dos isolados obtidos da torta de pinhão manso .....	50
<b>Tabela 7</b> – Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico da digestão anaeróbica aos 12 dias na torta de pinhão manso. Medias de três repetições $\pm$ o desvio padrão. ....	51
<b>Tabela 8</b> – Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico da digestão anaeróbica aos 21 dias de incubação na torta de pinhão manso. Medias de três repetições $\pm$ o desvio padrão.....	53
<b>Tabela 9</b> – Valores de pH dos diferentes substratos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Medias de três repetições $\pm$ o desvio padrão. ....	55
<b>Tabela 10</b> – Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso antes (vermelho) e depois (preto) da digestão anaeróbica.....	56
<b>Tabela 11</b> – Sólidos Totais antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Medias de três repetições $\pm$ o desvio padrão. ....	58
<b>Tabela 12</b> – Sólidos Fixos antes e depois da digestão anaeróbica das diferentes misturas da torta de pinhão manso. Medias de três repetições $\pm$ o desvio padrão. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
INIAP	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias ST Sólidos Totais SF Sólidos Fixos SV Sólidos Voláteis
UEL	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1	Energia da biomassa .....	19
3.2	Pinhão manso .....	22
3.3	Extração do óleo .....	24
3.4	Torta de pinhão manso .....	25
3.5	Biodigestores .....	28
3.6	Produção de Biogás .....	29
3.7	Inóculos .....	31
3.8	Fatores que influenciam na produção de biogás .....	32
3.9	Aspectos Ambientais .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	Obtenção da torta de pinhão manso .....	35
4.2	Incubação das tortas de pinhão manso .....	36
4.3	Caracterização físico – química da torta de pinhão manso e do substrato biodigerido .....	37
4.3.1	Teor de óleo da torta de pinhão manso .....	37
4.3.2	Macro e Micronutrientes da torta de pinhão manso e dos substratos .....	37
4.3.3	Sólidos totais, fixos e voláteis da torta de pinhão manso e dos substratos .....	39
4.3.4	pH dos substratos .....	41
4.3.5	Cor antes e depois da biodigestão anaeróbica .....	41
4.3.6	Turbidez antes e depois da biodigestão anaeróbica .....	41
4.4	Caracterização bacteriológica da torta de pinhão manso .....	41
4.5	Preparo dos inóculos .....	42
4.6	Biodigestão Anaeróbica .....	44
4.7	Análise estatística .....	46

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1	Caracterização físico – química da torta de pinhão manso .....	47
5.1.1	Porcentagens de óleo, Sólidos Totais, Fixos e Voláteis da torta de pinhão manso.....	47
5.1.2	Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso.....	48
5.1.3	Caracterização bacteriológica da torta de pinhão manso .....	49
5.2	Biodigestão Anaeróbica.....	50
5.2.1	Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico gerado aos 12 dias a partir da torta de pinhão manso.....	50
5.2.2	Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico gerado aos 21 dias a partir da torta de pinhão manso.....	52
5.3	Análises físico-químicos dos substratos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso .....	54
5.3.1	pH das diferentes misturas antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso.....	54
5.3.2	Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso antes depois da digestão anaeróbica .....	55
5.3.3	Determinação de Sólidos Totais antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso.....	57
5.3.4	Determinação de Sólidos Fixos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso.....	58
5.3.5	Sólidos Voláteis antes e depois da digestão anaeróbica das diferentes misturas na torta de pinhão manso .....	59
5.3.6	Cor antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso .....	61
5.3.7	Turbidez antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso .....	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
	<b>APÊNDICES</b> .....	71
	APÊNDICE A - Isolados bacterianos da torta de pinhão manso do tempo 1 (T1) de incubação .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, o uso de combustíveis fósseis aumentou significativamente a emissão de gases que causam o efeito estufa. Esses problemas têm atraído o interesse na busca por formas de produção mais limpa de energia, para ajudar na conservação do meio ambiente, tornando a produção do biogás a partir de digestão anaeróbica de biomassa (resíduos orgânicos) uma alternativa importante.

A digestão anaeróbica de biomassa (resíduos orgânicos) compreende uma série de processos bioquímicos que acontecem em um ambiente livre de oxigênio (anaeróbio), obtido através da ação combinada de múltiplos grupos de microrganismos e que resultam na decomposição da matéria orgânica (LIU *et al.* 2004).

Como produto final do processo da digestão anaeróbica tem-se uma mistura gasosa conhecida como biogás, que é um gás combustível composto principalmente de metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) obtidos do resultado da fermentação anaeróbica (AHRING, 2003).

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é um membro da família Euphorbiaceae, sendo uma planta resistente à seca, frequentemente encontrada na América do Sul, Sudeste da Ásia Central, na Índia e na África. Tem-se apresentado como uma oleaginosa importante, com aplicações medicinais e industriais (SELANON *et al.* 2014).

O pinhão manso é uma planta relevante para o desenvolvimento da bioenergia, pela elevada concentração de óleo em suas sementes, que pode variar de 40-60% e serve para a fabricação de biodiesel. Como resultado do processo da extração do óleo sobra a torta, e que não é utilizada na alimentação devido aos fatores tóxicos relacionados à sua composição apesar de possuir alto teor nutricional (SAETA E SUNTORNSUK, 2010).

Staubmann e colaboradores (1997) mencionam que a torta de pinhão manso é um bom substrato para a produção de biogás encontrando até 70% de gás metano na sua composição, tendo a vantagem do seu uso direto sem nenhum tratamento, obtendo resultados aplicáveis na geração de energia.

Depois do processo da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso resta um composto aquoso no digestor, que contém macro e micronutrientes,

e que pode ser usado na agricultura como adubo orgânico (HIFJUR e SUBHRAJIT, 2012).

O trabalho aqui apresentado teve como principal objetivo avaliar a produção de biogás a partir da torta de pinhão manso, que foi obtida pela extração de óleo das sementes de *Jatropha curcas* cultivadas na Estación Experimental Portoviejo do Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP localizado na cidade de Portoviejo, Equador (MENDOZA *et al.* 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a produção de biogás à partir da biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas*) em condições de laboratório.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da incubação da torta de pinhão manso na produção de gases.
- Obter inóculos a partir dos consórcios de microrganismos presentes na torta de pinhão manso.
- Determinar a quantidade de biogás produzido na biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso.
- Determinar o teor de gás metano produzido pela biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso.
- Verificar a eficiência do processo na remoção da matéria orgânica e seu efeito na produção de biogás através da análise de sólidos, cor e turbidez, na torta de pinhão manso depois da digestão anaeróbica.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Energia da biomassa

A população mundial está crescendo, e junto cresce o uso de energias derivadas a partir do petróleo e os efeitos negativos relacionados, tais como o aumento da poluição atmosférica e ambiental e emissões de gases de efeito estufa. Especialistas em energia estão à procura de fontes alternativas de energia para substituir o petróleo, sendo uma boa alternativa a energia gerada ao partir de diferentes fontes de biomassa.

No que respeita aos combustíveis, a biomassa é uma mistura heterogênea de matéria orgânica e em menor grau de matéria inorgânica, incluindo várias fases sólidas e líquidas com diferentes conteúdos. A diversidade de combustíveis de biomassa de acordo com sua origem pode ser: resíduos agrícolas, energia das culturas, resíduos florestais e resíduos industriais, etc. (RUIZ et al., 2012).

Para a Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL (2008) Qualquer tipo de matéria-prima orgânica que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica é classificada como biomassa, de acordo com sua origem, pode ser florestal (madeira), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) ou oriunda de rejeitos urbanos ou industriais, sólidos ou líquidos. Os derivados obtidos dependem tanto da matéria-prima utilizada quanto da tecnologia de processamento para obtenção do energético.

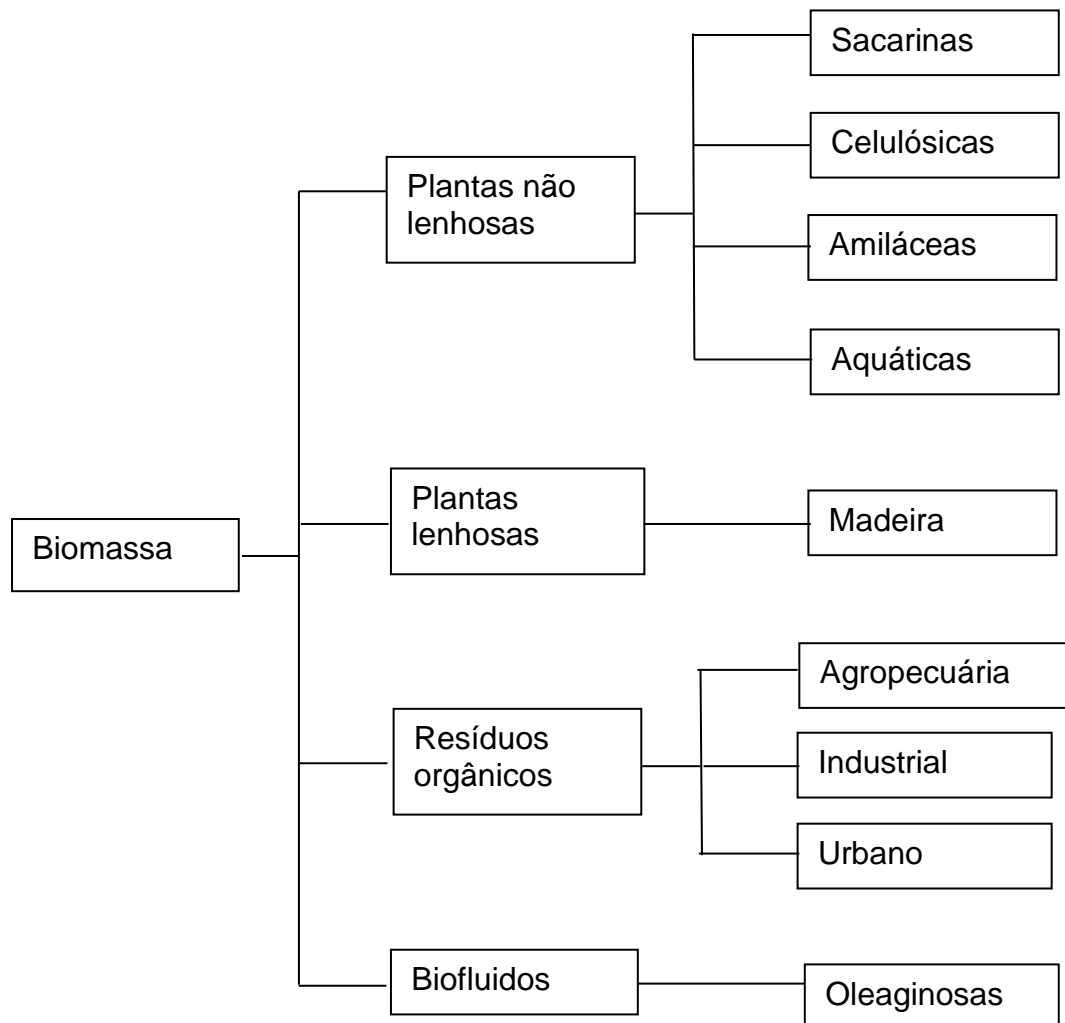
Além do uso direto da energia solar, a biomassa tem a mais longa história de uso humano. A biomassa é a fonte da primeira grande transição energética na história da humanidade o fogo, vários estudiosos têm proposto datas que variam de 1,5 milhão para 150 mil anos atrás, o fogo foi transformador, não só devido a sua capacidade para cozinhar alimentos e fornecer calor, mas também porque permitiu ao homem fundir metais e fazer cerâmica. (CLEVELAND, 2014)

A biomassa foi a origem da primeira "crise energética" da história causados pela escassez. Até o início dos anos 1300, uma grave escassez de madeira começa a ser relatados na Inglaterra e em outros países da Europa Ocidental. Em meados do século 17 na Inglaterra experimentou uma escassez generalizada de lenha. O esgotamento de madeira levou a uma mudança para o

carvão como fonte de energia principal para outros fins industriais e fundição (CLEVELAND, 2014).

O etanol foi preparado pela primeira vez sinteticamente, em 1826, que lançou o uso desse combustível que culminou na atual indústria global de biocombustíveis. Em 1630, o químico e médico Jan Baptista Van Helmont observou que um gás inflamável (metano) foi gerado pela decomposição anaeróbia de matéria orgânica, identificando assim o processo de biodigestão, que vai se tornar uma tecnologia importante para a liberação de energia de biomassa. Por volta de 1890, digestores anaeróbios que produzem gás metano começaram a aparecer nas zonas costeiras do sul da China e na Índia. Por volta de 1940, muitas estações de tratamento de esgoto municipal nos Estados Unidos e na Europa empregam digestão anaeróbia para capturar metano que é usado para gerar eletricidade para a planta. Até 2011, cerca de quatro milhões de unidades de biogás foram instaladas na Índia e mais de 35 milhões de domicílios rurais na China utilizado biogás (CLEVELAND, 2014).

A Figura 1 apresenta uma divisão genérica de biomassa com base em sua origem (Bioquímica, química e termoquímica), em processos industriais como amido, materiais celulósicos e sacarídeos que são fontes de açúcar (glicose); de madeira e resíduos agrícolas, que são fontes de celulose, hemicelulose e lignina (VAZ, 2014).



**Figura 1** – Fontes de Biomassa.

Fonte: VAZ, 2014.

No Brasil a matriz energética está constituída por diferentes tipos de fontes de energia sendo estas a hidráulica, gás natural, biomassa, derivados de petróleo, carvão e derivados, nuclear, e eólica, mencionadas por ordem de participação. A energia Hidráulica no 2013 teve uma participação de 70,6%, devido às condições hidrológicas desfavoráveis observadas ao longo do período, houve redução desta energia tendo um decréscimo de 6,3% em relação ao 2012. O gás natural com 11,3% teve um aumento em relação com o 2012 que foi de 7,9%. A energia da Biomassa sendo a terceira em participação com 7,6% no 2013 maior que no 2012 que foi de 6,8%, demonstrando o interesse nas pesquisas e projetos a partir de fontes renováveis no Brasil (EPE, 2014)

### 3.2 Pinhão manso

Em 1753, Carlos Lineu de acordo com a nomenclatura binomial de "Species Plantarum" válida até hoje, foi o primeiro a nomear o pinhão manso *Jatropha curcas* L. O gênero *Jatropha* deriva da palavra grega jatros (médico) e trophe (alimentos), o que implica seus usos medicinais (DIVAKARA et al., 2010).

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae, gênero *Jatropha* e a espécie *Jatropha curcas* L. A família Euphorbiaceae possui cerca de 8000 espécies, com aproximadamente 320 gêneros, enquanto que o gênero *Jatropha* contém 170 espécies de plantas herbáceas e arbustivas (HELLER, 1996).

Os principais nomes populares do pinhão-manso são: pinhão-de-purga, purgueira, grão-de-maluco, pinhão-do-paraguai, pinhão-decerca, tuba, tartago, medicineira, tapete, siclitê, pinhão-do-inferno, pinhão-bravo, figo-do-inferno, pião, pinhão-das-barbadas, sassi e outros. É conhecido entre os ingleses pelo nome de physic nut. Os franceses designam por pulghera, purgera, pignon de Inde, pagnon de Barbárie, noix americaine. É o zicilte do México. No Egito é conhecido como ab el boluk (PEIXOTO, 1973).

*Jatropha curcas* L. é um arbusto multipropósito de pequeno porte, sendo uma planta com muitos atributos, múltiplos usos e potencial considerável (PANDEY et al. 2012). Ela pode ser utilizada para prevenir ou controlar a erosão, para recuperar solos inférteis. Cresce como cerca viva, delimitando uma área de plantio e para demarcar as áreas onde os animais de exploração pecuária irão permanecer. É nativa da América tropical, mas já está disseminada em muitas partes dos trópicos e sub-trópicos, assim como em África e Ásia (OPENSHAW, 2000).

*Jatropha curcas* é um arbusto de crescimento rápido, atinge de 3-5 m até 8-12 m de altura com um diâmetro de tronco de 20 a 30 cm se as condições ambientais forem favoráveis. O caule é liso e macio, verde ou cinzento-castanho, seu lenho é pouco resistente, brando e sua medula desenvolvida. Normalmente formam-se cinco raízes: uma central e quatro periféricas. (SATURNINO et al. 2005).

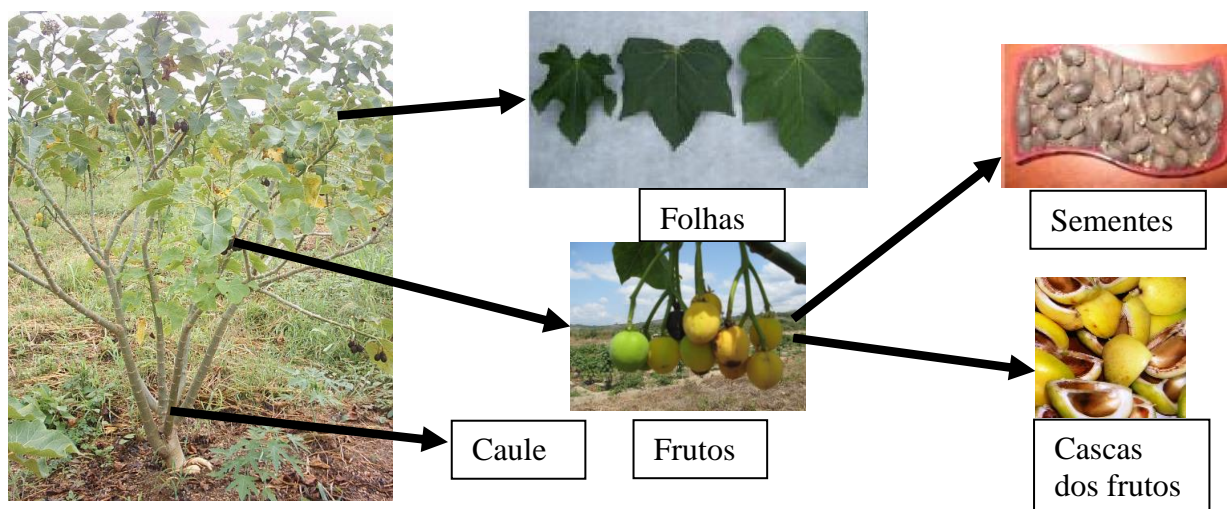
As folhas são decíduas, alternadas subpostas, filotaxia em espiral, cada folha dista 105° da próxima. As folhas novas apresentam-se de coloração vermelho-vinho, cobertas com lanugem branca, e a medida que se expandem tornam-se verdes, pálidas, brilhantes e glabras, com nervuras esbranquiçadas e

salientes em sua face inferior (SATURNINO *et al.* 2005).

As inflorescências são monóicas, com cachos contendo numerosas flores masculinas (verdes) em maior número localizadas nas extremidades dos ramos, enquanto as flores do sexo feminino (amarelo - verdosas) encontram-se posicionadas no meio dos ramos (MENDOZA *et al.* 2008).

Os frutos são cápsulas indeiscentes ovoides com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm contendo 3 sementes, mas podem ter duas ou quatro sementes. Inicialmente, eles são verdes; depois da maturação amarelos passando para marrons ou pretos. Eles contêm 60-70% de sementes e 30-40% de cascas do peso total dos frutos (MENDOZA *et al.* 2008).

Cada semente de pinhão-manso pesa entre 1,53 e 2,85 g e contém entre 25 e 40% de óleo inodoro fácil de extrair por pressão. Um quilograma de sementes contém entre 1000 e 2370 sementes (SATURNINO *et al.* 2005). A figura 2 apresenta os diferentes componentes do pinhão manso.



**Figura 2** – Diferentes componentes do pinhão manso do Equador.  
Fonte: ZAMBRANO, 2010.

Os frutos devem ser colhidos logo que comecem a rachar e postos para secar ao sol. As sementes devem ser retiradas dos frutos e postas a secar à sombra em local bem ventilado e, depois de secas, podem ficar armazenadas antes de serem processadas (SATURNINO *et al.* 2005).

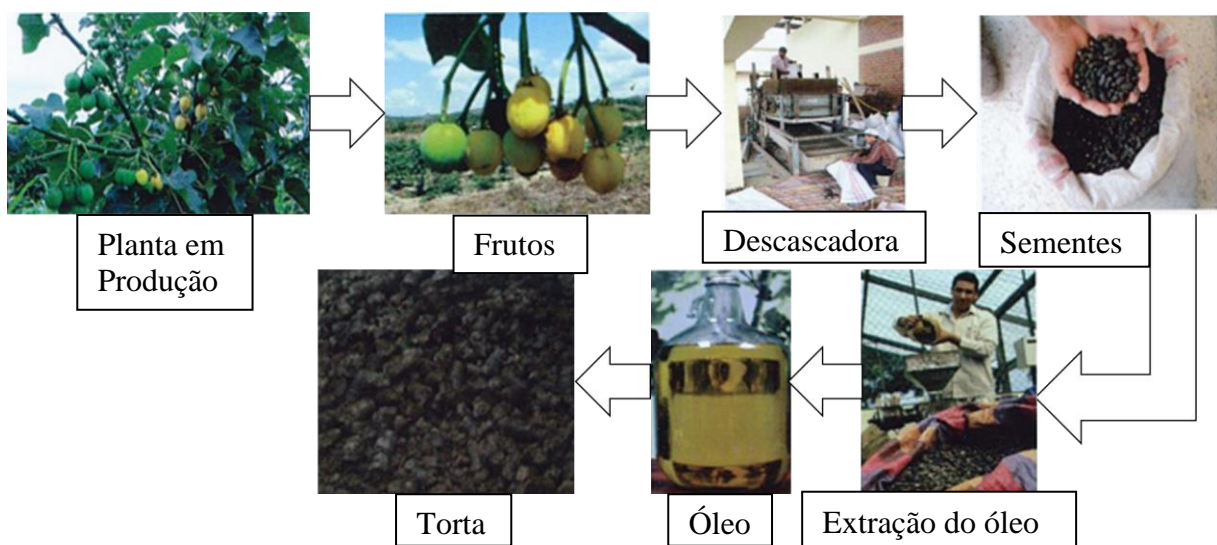
### 3.3 Extração do óleo

O processo de obtenção do óleo das sementes oleaginosas é tão antigo quanto a própria humanidade. A GTZ (Cooperação Técnica Alemã) foi uma das primeiras organizações envolvidas na questão de extrair óleo das sementes de pinhão manso a partir do final das décadas de 80 e 90 (BEERENS, 2009).

Existem dois tipos de extração do óleo das sementes de pinhão manso: extração mecânica e a extração por solventes, estas têm sido as principais tecnologias utilizadas atualmente para extração de óleos vegetais pela maioria das indústrias devido ao seu baixo custo, eficiência e simplicidade em comparação com outras técnicas. A extração mecânica (Figura 3) é a técnica mais antiga e comumente usada, e pode ser operada em lote e processamento contínuo. O processo mais conhecido é o de extração mecânica em lote, que é lento e ineficiente no uso de mão de obra e taxa de rendimento de óleo (BOATENG *et al.* 2012).

Para fazer a extração do óleo das sementes de *J. curcas* por solvente, é necessário triturar as sementes mecanicamente (Almofariz e pilão) removendo-se cuidadosamente a casca e processando-se somente amêndoa.

Diferentes tipos de solventes podem ser usados, como éter de petróleo, hexano e isopropanol, mediante o aparelho mais usado para esta extração, que é o soxhlet (SHIVANI *et al.* 2011).



**Figura 3** – Processo da extração do óleo de pinhão manso no Equador.

Fonte: MENDOZA *et al.* 2010 (modificado).

### 3.4 Torta de pinhão manso

A produção de biodiesel no Brasil cresce consideravelmente, e com isso aumenta a quantidade disponível dos coprodutos, gerados durante o processo, e que podem ser utilizados em outros setores para minimizar os custos. A torta derivada da extração de óleos vegetais pode ser utilizada tanto para nutrição de animais, quanto para adubação de solos (TEIXEIRA *et al.* 2009).

Podem ser utilizados para a fabricação de biodiesel no caso da soja (*Glycine max*), o girassol (*Helianthus annuus*), a mamona (*Ricinus communis*), o dendê (*Elaeis guineensis*), o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), o nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), o algodão (*Gossypium spp.*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a canola (*Brassica napus*), o gergelim (*Sesamum orientale*), o babaçu (*Orrbignya speciosa*) e a macaúba (*Acrocomia aculeata*), (ABDALLA *et al.*, 2008).

Geralmente, a torta ou farelo gerado a partir da extração do óleo não passa por processo de agregação de valor porque são desconhecidas as suas potencialidades nutricionais e econômicas, salvo algumas exceções como soja, algodão e girassol. Associado a esse fato, são também desconhecidas as possibilidades de obtenção de receitas advindas do mercado de crédito de carbono, relativas à redução da emissão de gás metano passíveis de ocorrer quando se utilizam rações contendo essas oleaginosas. Da extração do óleo de pinhão manso se obtém a torta, que é o resíduo remanescente depois de cada extração (ABDALLA *et al.* 2008).

A torta de pinhão manso é rica em proteínas, mas tem uma utilização limitada devido à presença de fatores antinutricionais (inibidores de tripsina, curcina, taninos, saponinas, fitatos) e fatores tóxicos (ésteres de forbol), compostos responsáveis pela toxicidade do pinhão manso ao homem e alguns animais (MAKKAR *et al.* 1997).

A torta de pinhão manso tem um grande potencial para ser utilizada como um meio de alimentação humana ou animal, por ser constituída de proteínas, podendo ser usada depois um processo de detoxificação, além disso, há o seu potencial como adubo orgânico por ter macro e micronutrientes (ABOU-ARAB e ABU-SALEM, 2009).

*Jatropha curcas* L. gera cerca de 1 tonelada de torta das sementes por hectare depois a extração do óleo. Tomando a Índia como um caso, espera-se

que *Jatropha* seja cultivada em mais de 20 milhões de hectares nos próximos anos e espera-se produzir cerca de 20 milhões de toneladas da torta de sementes por ano. Esta é uma proporção significativa de resíduos orgânicos, que demanda uma disposição segura, como por exemplo aplicados em campos de cultivo para repor a fertilidade do solo. No entanto, no momento a torta de sementes é transferida para o campo de cultura para cobertura vegetal (PANDEY *et al.* 2012).

No Equador a espécie *Jatropha curcas* L. tem sido usada como cerca vivas, encontrando-se desde o nível do mar até os 1500 m acima do nível do mar. O Instituto Nacional Autónomo de Investigações Agropecuárias (INIAP) do Equador começou a gerar pesquisas desde 2007, no melhoramento genético e na realização de práticas agronômicas adequadas para a melhor produção do pinhão manso nas cercas vivas, como uma opção diversificada para pequenos produtores. O INIAP vem utilizando a produção de pinhão manso no projeto "Biocombustíveis Galápagos – Substituição de combustíveis fósseis por Biocombustíveis na geração elétrica nas Ilhas Galápagos com óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) procedente da província de Manabí (MENDOZA *et al.* 2009); (MENDOZA *et al.* 2010). Na sistematização das experiências do Projeto Pinhão Manso para Galápagos do Equador, determinou-se que para 2008 em Manabí haviam em torno de 7000 km de cercas vivas de pinhão manso, que servem fundamentalmente para divisão de propriedades. No ano de 2011, foram utilizadas 110.579,85 kg de sementes das cercas vivas para a extração do óleo, resultando em grande quantidade de torta de pinhão manso, (70% de massa das sementes), cuja produção se espera no futuro incrementar (IICA, 2013).

Staubmann e colaboradores (1997) estudaram a composição da torta de *Jatropha curcas*, que foi extraída com casca e sem casca para a produção de biogás, na Universidade Nacional de Engenharia de Nicarágua, os resultados são mostrados na Tabela 1, onde são especificados o peso seco, cinza, material orgânico seco, proteína, gordura, fibra, amido, açúcares, hemicelulose, celulose e lignina, caracterizando a torta de pinhão manso para ser usada no processo da biodigestão anaeróbica.

**Tabela 1** – Composição (%) da torta de *Jatropha curcas* L. extraída em prensa tipo expeller da Nicarágua.

Componentes	Sementes	
	Com casca	Sem casca
	%	
Peso seco	90,86	91,40
Cinza	6,03	6,55
Material Orgânico seco	84,83	84,92
Proteína	24,54	53,11
% de óleo	6,40	6,32
Fibra	32,26	5,60
Amido	0,63	0,68
Açúcares	0,71	9,36
Hemicelulose	5,55	1,94
Celulose	20,30	6,43
Lignina	19,46	0,53

Fonte: STAUBMANN *et al.* 1997.

Na tabela 2 foram mostradas a composição físico-química da torta de *Jatropha curcas* L. da Índia, usada na pesquisa de Hifjur e Subhrajit, 2012 na produção de biogás.

**Tabela 2** – Composição da torta de sementes de *Jatropha curcas* L. da Índia.

Material	Sólidos Totais (%)	Sólidos Voláteis (%)	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	C:N
Torta de <i>Jatropha curcas</i> L.	88,00	72,7	26,00	2,88	9:1

Fonte: HIFJUR e SUBHRAJIT, 2012.

Mediante o processo da pirólise, é possível obter carvão vegetal a partir da torta e cascas do pinhão manso. Como fonte de energia é um substituto dos combustíveis fósseis por seu alto teor de óleo para biodiesel. Para biogás tem potencial por meio da biodigestão da torta resultante da extração de óleo (KUMAR e SHARMA, 2008).

A torta de pinhão manso pode ser usada como adubo orgânico, Hifjur e Subhrajit (2012) descobriram que depois da biodigestão anaeróbica da torta,

o teor de nitrogênio aumentou em 5,9% devido ao consumo de carbono, enquanto as quantidades de fósforo e potássio permaneceram inalterados. O substrato de *Jatropha* que foi gerado não teve efeito tóxico e foi considerado adequado para uso como fertilizante de diferentes culturas como o tomate e milho, nas quais foi usado.

### 3.5 Biodigestores

Os biodigestores são equipamentos que consistem em uma câmara fechada onde é colocado material orgânico para decomposição anaeróbia. Pode ser um tanque revestido e coberto por manta impermeável de PVC, o qual, com exceção dos tubos de entrada e saída, é totalmente vedado, criando um ambiente anaeróbico, sem presença de oxigênio. Quanto à forma de abastecimento, são classificados os biodigestores como: batelada e contínuos. Os biodigestores em batelada recebem o carregamento de matéria orgânica, que somente é substituído depois o período adequado à digestão de todo o lote. Os biodigestores contínuos são construídos de tal forma que podem ser abastecidos diariamente, permitindo que a cada entrada de substrato orgânico a ser processado contemple a saída de material já tratado (MIURA *et al.* 2010).

Os biodigestores são construídos para satisfazer objetivos distintos. Na Índia e na China, eles são usados para produzir combustível criticamente necessário em áreas rurais, e o efluente é utilizada como fertilizante. A maioria das unidades são construídas para uso doméstico. Nos Estados Unidos os biodigestores são destinados para atender a produção de energia e tratamento de resíduos, especialmente no que diz respeito aos animais em fazendas, permitindo a manipulação de um material livre de odores (ORTOLANI *et al.* 1991).

Com a crise do petróleo na década de 70, foi trazida para o Brasil a tecnologia dos biodigestores. Os principais modelos implantados foram o Chinês e o Indiano, que eram quase que exclusivamente orientados para produção do combustível alternativo biogás. Atualmente, o modelo de biodigestor mais difundido no Brasil é aquele feito de manta de PVC, de baixo custo e fácil instalação, se comparado com os modelos antigos, e com a vantagem de poder ser usado tanto para pequenos produtores como para grandes projetos agroindustriais (CASTANHO E ARRUDA, 2008).

Atualmente, no Equador, a tecnologia da biodigestão não é muito

aplicada por desconhecimento e falta de políticas governamentais. Atualmente estão sendo implementados os biodigestores feitos de manta de PVC (TELENCHANO, 2013).

Entre os biodigestores contínuos, os mais conhecidos são o biodigestor modelo indiano e o biodigestor modelo chinês. No biodigestor Indiano a cúpula geralmente é feita de ferro ou fibra, sendo móvel. Movimenta-se de cima para baixo, de acordo com a produção de biogás. Nesse tipo de biodigestor, o processo de fermentação acontece mais rápido pois se aproveita a temperatura do solo, que é pouco variável favorecendo a ação das bactérias, ocupando pouco espaço, e a sua construção é subterrânea, dispensando o uso de reforços tais como cintas de concreto (DEGANUTTI *et al.* 2002).

Biodigestor modelo chinês é formado por uma câmara cilíndrica em alvenaria (tijolo) para a fermentação, com teto abobadado, impermeável, destinado ao armazenamento do biogás. Este biodigestor funciona com base no princípio de prensa hidráulica, de modo que aumentos de pressão em seu interior resultantes do acúmulo de biogás resultarão em deslocamentos do efluente da câmara de fermentação para a caixa de saída, e em sentido contrário quando ocorre decompressão (DEGANUTTI, *et al.* 2002).

O biodigestor modelo batelada trata-se de um sistema bastante simples e de pequena exigência operacional. Sua instalação poderá ser apenas um tanque anaeróbico, ou vários tanques em série. Esse tipo de biodigestor é abastecido única vez, portanto não é um biodigestor contínuo, mantendo-se em fermentação por um período conveniente, e descarregando o material posteriormente ao término do período efetivo de produção de biogás (DEGANUTTI, *et al.* 2002).

### **3.6 Produção de Biogás**

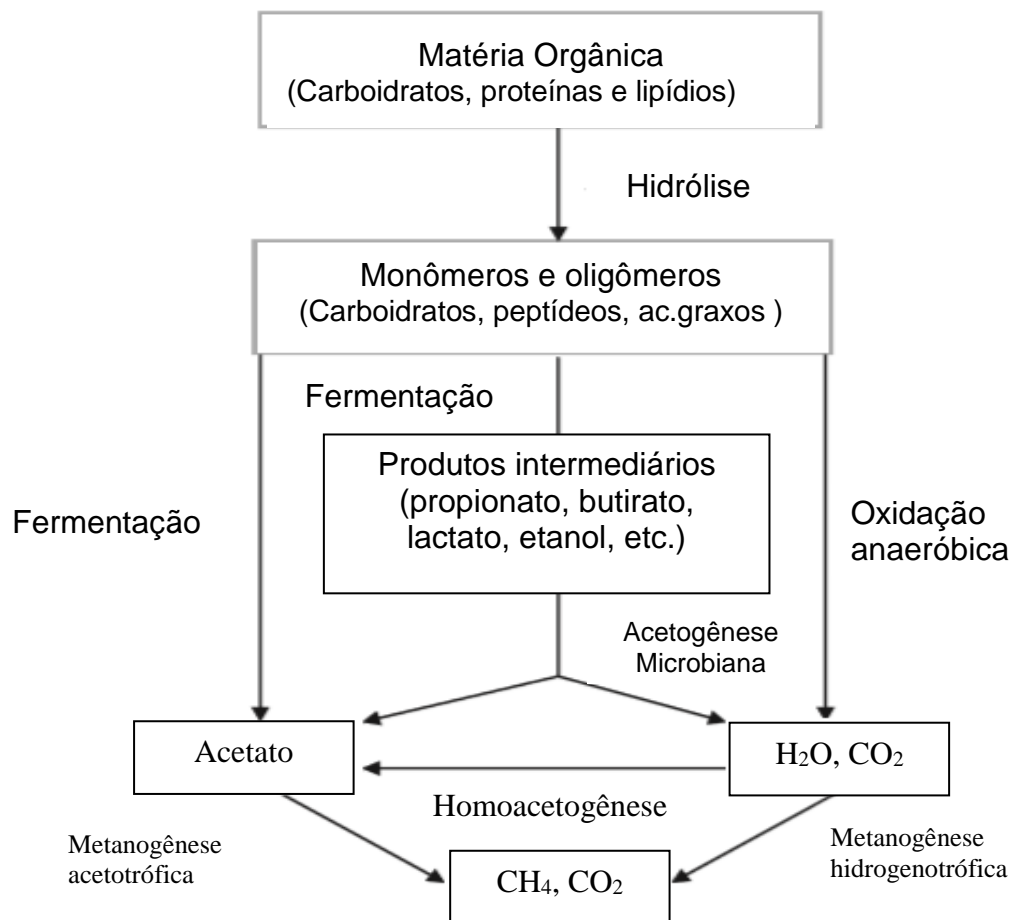
Para o biogás é indispensável o processo bioquímico da biodigestão anaeróbica que ocorre na ausência de oxigênio molecular livre, no qual diversas espécies de microrganismos interagem para converter compostos orgânicos complexos em  $\text{CH}_4$  e compostos inorgânicos como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ . (LEITE *et al.* 2009). A conversão de matéria orgânica em biogás é realizada por um grupo de microrganismos através de uma série de fases metabólicas (ou seja, hidrólise,

acidogênese, acetogênese e metanogênese). No primeiro passo, os compostos orgânicos complexos, tais como lípidos, proteínas e polissacarídeos, são convertidos em monômeros ou oligômeros solúveis (por exemplo, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa, açúcares e glicerol) por meio de hidrólise, também conhecidos como liquefação. Esse processo é facilitado por bactérias hidrolíticas ou fermentativas que liberam enzimas extracelulares. Os compostos são, então, fermentados por bactérias acidogênicas e resultam em uma mistura de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), álcool, e ácidos graxos voláteis e de baixo peso molecular, por exemplo, ácidos propiônico e butírico, processo conhecido como acidogênese (SURENDRA *et al.* 2014).

Durante a acetogênese, as bactérias acetogênicas, incluindo os gêneros *Syntrophomonas* e *Syntrophobacter*, convertem os ácidos graxos em ácido acético e de hidrogênio, que podem ser usados por bactérias metanogênicas (SCHINK, 1997). Acetogênese é uma fase que representa a eficiência da produção de biogás, porque cerca de 70% de metano surgem no processo de redução de acetatos (ZIEMINSKI e FRAC, 2012).

Durante o processo da metanogênese, as bactérias metanogênicas atuam sobre o acetato e o dióxido de carbono, transformando-os em metano ( $\text{CH}_4$ ). Essa fase limita a velocidade da cadeia de reações devido, principalmente, à formação de microbolhas de metano e dióxido de carbono em torno da bactéria metanogênica, isolando-a do contato direto com a mistura em digestão, razão pela qual a agitação da massa contida no digestor é prática sempre recomendável (BLEY *et al.* 2009). Na figura 4 descrevem-se as principais fases do processo de biogás.

A composição de biogás varia com o tipo de matéria-prima e com a condição operacional do digestor. Em geral, o biogás consiste de 50-75% de  $\text{CH}_4$  e de 25-50% de  $\text{CO}_2$  em conjunto com outros traços de componentes, como o vapor de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), e amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) (SURENDRA *et al.* 2014).



**Figura 4** – Principais fases do processo de digestão anaeróbia da matéria orgânica.

Fonte: Surendra *et al.* 2014.

### 3.7 Inóculos

Os inóculos geralmente utilizados no processo da biodigestão anaeróbica para a produção de biogás são lodos de estações de tratamento de esgotos ou alguns materiais de origem animal, como esterco bovino, entre outros. O tratamento anaeróbico de resíduos orgânicos com alta concentração de sólidos é realizado em reatores anaeróbicos em batelada, com substrato contendo em média 20% (percentagem em peso) de sólidos totais; no geral, poderão ser aplicados para bioestabilizar diversos tipos de resíduos, prioritariamente de maneira conjugada, objetivando-se, em alguns casos, o aumento da densidade bacteriana e em outros o ajustamento da relação C/N (LEITE *et al.* 2009).

Experiências demonstraram que o resíduo da extração do óleo de *Jatropha curcas* L. é um bom substrato para a produção de biogás, obtendo-se até

70% de metano usando estrume de porco como inóculo em concentração de 20% (v/v) (STAUBMANN *et al.* 1997).

HIFJUR e SUBHRAJIT, 2012 estudaram a produção potencial de biogás da torta de pinhão manso usando como digestor frascos de dois litros como digestores de batelada durante 40 dias e como inóculo estrume de vaca em suspensão ao 10% v/v, determinaram que o biogás gerado a partir de 970 gramas de substrato da torta de pinhão manso foi 0,170 m<sup>3</sup> sendo os sólidos totais ideais entre 15 e 20% e a relação C: N de 22:01 a 27:1.

### **3.8 Fatores que influenciam na produção de biogás**

Dentro do ambiente anaeróbio, vários parâmetros importantes afectam nas diferentes etapas do processo da digestão anaeróbica na produção de biogás, sendo estes:

#### **- O pH**

Cada grupo de microrganismos relacionados com a capacidade da geração de biogás tem um pH óptimo para o seu desenvolvimento. O ótimo pH para as bactérias metanogénicas é neutro. Tem sido demonstrado que a taxa de produção diminui de metano quando o valor de pH cai abaixo de 6,3 ou torna-se maior do que 7,8 (EL-MASHAD *et al.* 2004).

#### **- A temperatura**

A temperatura tem efeito direto sobre as propriedades físico-químicas de todos componentes no digestor e também afeta a cinética e termodinâmica dos processos biológicos (BOE, 2006).

A faixa considerada ideal para a produção de biogás está entre 30 a 35°C, na qual se desenvolvem as bactérias mesofílicas, ocorrendo nessa faixa de temperatura, combinação das melhores condições para o bom desenvolvimento do processo (NOGUEIRA, 1992).

#### **- Nutrientes**

O bom desempenho do processo de biodigestão anaeróbia está diretamente relacionado com a presença de alguns nutrientes necessários para que

a atividade dos microrganismos seja realizada com sucesso (MORAES, 2005).

#### - Relação C:N

A relação C/N reflete nos níveis de nutrientes de um substrato para digestão, e, assim, sistemas de digestão são sensíveis a relação C/N. A relação C/N elevada induz uma taxa de solubilização de baixo teor de proteína. Assim, a inibição de amoníaco pode ser evitada através da otimização da relação C/N no processo da digestão anaeróbica. No entanto, uma excessivamente elevada relação C/N fornece nitrogênio insuficiente para manter a biomassa celular e leva à degradação rápida de nitrogênio por microrganismos, resultando em menor produção de biogás e vice-versa. Substratos com uma proporção excessivamente baixa relação C/N aumenta o risco de inibição de amoníaco, que é tóxico para os metanogenos e provoca insuficiente utilização de fontes de carbono. A relação C / N ótima para a digestão anaeróbia tem sido mostrado para ser entre 20 e 30 ou entre 20 e 35 (MAO *et al.* 2015).

#### - Sólidos Totais

A produção de biogás depende em grande medida da concentração total de sólidos iniciais. Se a quantidade do teor de sólidos totais foi mudado, a produção de gás também se altera, A partir dessas perspectivas práticas, várias novas abordagens têm sido testadas para melhorar a eficiência de reactores de fase única, incluindo a co-digestão, operação mesofílica ou termófilas, digestão semi-seco (10-20% de sólidos totais), digestão seca (20-40% ST), e a utilização de bio-reactores anaeróbicos de membrana para separar o tempo de retenção de sólidos (MAAMRI e AMRANI, 2014).

Com o aumento dos sólidos voláteis em um digestor o rendimento de biogás aumenta para um ponto, mas o equilíbrio e produtividade do processo de digestão também pode ser muito perturbado. A adição de um grande volume diariamente do material pode resultar em alterações no ambiente do digestor e inibir a actividade bacteriana temporariamente durante os estágios iniciais da fermentação. Esta inibição bacteriana ocorre devido ao aumento de sólidos voláteis extremamente elevada, resultando em maior atividade a hidrólise/acidogênese bacteriana que da atividade methanogenica bacteriana (MAO *et al.* 2015).

### 3.9 Aspectos Ambientais

Em geral os efluentes de qualquer processo industrial apresentam-se quimicamente inadequados para serem lançados a qualquer corpo hídrico conforme os padrões de lançamento de efluentes estabelecidos pela Resolução Conama nº 357 de 17 de março de 2005 (ZENATTI, 2011).

Os principais parâmetros utilizados para caracterizar os efluentes são a cor, a turbidez. Embora sejam parâmetros físicos, fornecem indicações preliminares importantes para a caracterização da qualidade química da água como, por exemplo, os níveis de sólidos em suspensão associados à turbidez e as concentrações de sólidos dissolvidos, associados à cor (PIVELI e KATO, 2006).

#### - Cor

A cor presente nos efluentes industriais pode ser devida a substâncias orgânicas ou inorgânicas, bem como pode ser devida a misturas de compostos incluindo os produtos dos próprios tratamentos como o substrato biodigerido após a geração de biogás. A remoção de diversos poluentes tem sido objeto dos tratamentos de efluentes convencionais, controlados pelos limites estabelecidos para os parâmetros sanitários nas legislações ambientais. A remoção da Cor tem sido medida de forma subjetiva ou relativa, sendo prejudicada a avaliação dos sistemas de tratamento em relação a este parâmetro (GIORDANO *et al.* 1999).

#### - Turbidez

A turbidez indica a presença de pequenas partículas em suspensão, matérias orgânicas e inorgânicas como plâncton e outros microorganismos, pode ser considerada também sob o ponto de vista sanitário. Diversos efluentes industriais como o substrato biodigerido após a geração de biogás também provocam elevações na turbidez das águas, provocando alterações no meio ambiente (Vaz *et al.* 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

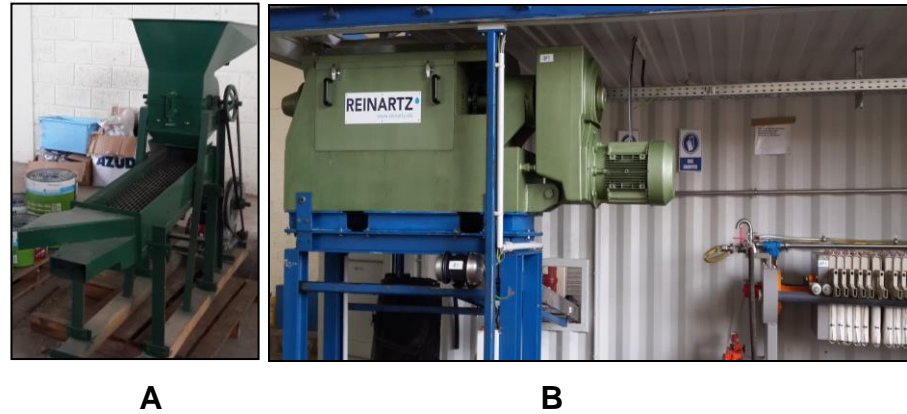
A obtenção da torta de pinhão manso foi no Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, na Estación Experimental Portoviejo de Manabí, Equador.

A parte experimental foi realizada no Instituto Agrônômico do Paraná, particularmente, no laboratório de Microbiologia do Solo e no laboratório de Solos e Tecido Vegetal, onde foram conduzidos os ensaios da caracterização físico-química da torta de pinhão manso e os experimentos de biodigestão, sendo determinados os parâmetros necessários para a avaliação da produção do biogás.

### 4.1 Obtenção da torta de pinhão manso

Para a extração do óleo e obtenção da torta de pinhão manso, foram usados frutos secos coletados durante janeiro de 2013 e janeiro de 2014 no INIAP Portoviejo de Manabí, Equador, os quais foram descascados em uma descascadora de amendoim (INMEGAR 3 HP, 300 kg/hora) adaptada para pinhão manso (Figura 5A). As sementes descascadas apresentaram 6% de umidade. O processo da extração da torta de pinhão manso foi efetuado usando o sistema de prensa tipo expeller, utilizando a máquina desenvolvida pela empresa alemã REINARTZ “CompacTroph®” (Figura 5B). Essa máquina tem capacidade para fazer a prensagem ao frio, com capacidade de processar 189 kg hora<sup>-1</sup> de pinhão, mediante padrão de qualidade de combustível alemão DIN51605 (GRUBER, 2014).

As extrações para o presente trabalho foram realizadas na Estação experimental Portoviejo no INIAP; a primeira extração foi em 20 de fevereiro do 2013 e a segunda extração em 9 de janeiro do 2014. O processo de prensagem consistiu primeiro na limpeza das sementes com uso de uma peneira vibratória, depois foram recolhidos 100 kg de sementes e conduzidos para dentro do funil do expeller, no sentido de um parafuso rotativo, onde depois se ligou o expeller sem presença de calor, obtendo uma produção de 30 kg de óleo e 70 kg de torta de pinhão manso. Da torta produzida em cada processo foram obtidas duas amostras de 5 kg cada uma e embaladas em sacos de polietileno de baixa densidade com espessura de 0,10 mm.



**Figura 5** – Descascadora de pinhão manso INMEGAR 3 HP, 300 kg/hora (A). Prensa tipo expeller CompacTropa® (B).

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.2 Incubação das tortas de pinhão manso

Depois da extração e embalagem a torta de pinhão manso foi acondicionada em caixa de papelão revestida de isopor e filme de plástico e transportada por via aérea para o Brasil. Na chegada da torta foi colocada em estufa incubadora para B.O.D. marca FANEM modelo 347.FG. e mantida em sacos de polietileno lacrados à temperatura de  $25 \pm 2,0$  °C, durante dois tempos de incubação: 200 dias ou aproximadamente 6 meses (T1), e 525 dias a aproximadamente 18 meses (T2). A figura 6 mostra como foi incubada a torta de pinhão manso.



**Figura 6** – Câmara incubadora com a torta de pinhão manso.

**Fonte:** o próprio autor

### **4.3 Caracterização físico-química da torta de pinhão manso e do substrato biodigerido**

#### **4.3.1 Teor de óleo na torta de pinhão manso**

As análises do teor de óleo da torta dos tempos T1 e T2 foram realizadas segundo metodologias descritas pela AOAC (1990), usando o equipamento denominado extrator soxhlet (modelo MA487/6/250), baseado na quantidade do material solubilizado pelo solvente hexano. A torta de pinhão manso foi macerada em almofariz e colocada para dentro de cartuchos aproximadamente 1 g (que foram previamente pesados em balança com precisão 0,0001g), os balões com fundo chato, utilizados na extração, foram pesados previamente, depois permaneceram em estufa marca Fanem a 105 °C durante 12 horas. O aparelho soxhlet foi montado com os cartuchos acrescentando 200 mL de hexano em cada sistema de extração com capacidade de seis amostras por 7 horas. No final do período de extração foi recuperado o hexano e os balões levados à estufa a 105° C até evaporar o hexano, seguidamente foram levados ao dessecador, para resfriarem e proceder a pesagem. O teor de óleo foi calculado por diferença de pesagem.

#### **4.3.2 Macro e Micronutrientes na torta de pinhão manso e dos substratos**

Depois da incubação nos dois tempos (T1 e T2) da torta de pinhão manso e do substrato da biodigestão (torta de pinhão manso + água+ inóculo), foi efetuada a caracterização físico - química.

No laboratório, as amostras da torta de pinhão manso e do substrato foram submetidas a secagem na estufa marca FANEM a 65-70°C com circulação de ar forçada durante um período de 48 horas até atingir o peso constante. Depois de secas, as amostras foram trituradas em moinho mecânico, peneiradas em malha com diâmetro de 1 mm e armazenadas em frascos de vidro de 50 mL com tampa plástica (MIYAZAWA *et al.* 1999).

Para a extração dos elementos Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Na e B, foi usada uma solução de ácido clorídrico (HCl 1N), dispensando-se a digestão total do material vegetal (MIYAZAWA *et al.* 1999).

Foram transferidos 400 mg da amostra da torta de pinhão manso

para um frasco de vidro cilíndrico de 50 mL, adicionando 20 mL da solução de HCL 1N, levando à balança e registrando o peso. A seguir, aqueceu-se durante 15 minutos a 80°C em banho-maria, esfriando à temperatura ambiente e agitando por 45 minutos em agitador horizontal circular a 250 rpm para depois voltar à balança e completar o peso inicial com água destilada para reposição da água evaporada durante o aquecimento; seguidamente, filtrou-se utilizando-se papel de filtro qualitativo de 15 mm de diâmetro (Extrato-A). O Extrato-A foi utilizado para as determinações de B, Mn, Cu e Zn.

Para determinações de K, Na, Ca e Mg, transferiu-se 1 mL do Extrato-A para um frasco e completou-se o volume de 20 mL com água destilada (Extrato-B).

Na digestão sulfúrica, foram transferidos 100 mg da amostra da torta de pinhão manso para um tubo digestor de 90 mL, adicionando 1 g da mistura de  $K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 mL de  $H_2SO_4$  concentrado e 1 mL de  $H_2O_2$  30%, digerindo durante 1 hora a 320-350°C em bloco digestor QUIMIS – Q327B28M, esfriando à temperatura ambiente e completando o volume para 60 mL em água destilada (Solução E). Foi transferido 1 mL da Solução E para um balão volumétrico de 10 mL e completada a marca com água destilada (Solução F).

K foi determinado por espectrofotometria de chama, preparado a partir das soluções padrões de 1000 ppm, nas seguintes concentrações 0, 2, 5, 10, 20, e 40 ppm. As soluções de trabalho foram preparadas em solução de HCl 0,05N.

Usou-se o espectrofotômetro de absorção atômica série iCE 3500 marca Thermo Scientific com as soluções de trabalho, conforme descrito no manual do equipamento, efetuando a leitura no Extrato-B. Cálculo  $\% = \mu \text{ gm}^{-1} \times 0,1$ .

Na determinação de Ca e Mg, transferiu-se 1 mL do Extrato-B para tubo de ensaio de 10 mL, adicionando 4 mL de solução de Lantânio 0,1%, ajustando o espectrofotômetro de absorção atômica com as soluções de trabalho, conforme as instruções no manual do aparelho para efetuar a leitura da amostra. Cálculo: -  $\% \text{ Ca ou Mg} = \mu \text{ gm}^{-1} \times 0,5$

Para Cu, Zn e Mn, prepararam-se as soluções de trabalho em HCl 1N. Foi usado o espectrofotômetro de absorção atômica com as soluções de trabalho conforme instruções no manual do aparelho, efetuando a leitura diretamente no Extrato-A. Cálculo: -  $\text{g.g}^{-1} \text{ Cu, Zn ou Mn} = \mu \text{ gm}^{-1} \times 50$ .

No método para B, foram transferidos 5 mL do Extrato-A para um

tubo de polipropileno de 10 mL, foram adicionados 100 mg de carvão ativado, agitou-se durante 15 minutos e se filtrou utilizando dois papéis-filtro de 15 mm de diâmetro. Depois foi transferido 1 mL do filtrado para um tubo de polipropileno de 10 mL, adicionando 2 mL da solução tampão e 2 mL de solução de azometina e agitou-se. Após uma hora de repouso, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro a 420 nm. Cálculo:  $-g.g^{-1} B = \mu gm^{-1} \times 50$ .

No método para Nitrogênio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), transferiu-se 1 mL de alíquota da Solução F ou da solução de trabalho para um tubo de ensaio de 30 mL e adicionaram-se, em seguida, 7 mL da Solução 1 (3,0 de NaOH para um balão volumétrico de 2000 mL, adicionando 30 mL da solução de Na<sub>2</sub>-EDTA pH10 e completando o volume à marca com água destilada), 1 mL da solução 2 (dissolveram-se 10 g de fenol cristal (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) e 0,05 g de Na<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>5</sub>.2H<sub>2</sub>O e se completou o volume a 1000 mL com água destilada) e 1 mL da Solução 3 (dissolveram-se 5,0 g de NaOH, 9,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 32,8 g de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O e 20 mL de NaOCl em água destilada, completando o volume de 1000 mL). Após duas horas, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro a 640 nm. Cálculo:  $-\% N-NH_4^+ - \mu gml^{-1} \times 0,6$ .

Para o Fósforo (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), foi transferida uma alíquota de 5 mL da Solução E ou solução de trabalho para um tubo de ensaio de 30 mL, adicionando 10 mL da Solução 2, que é 300 mL da Solução 1 (dissolvendo, em um recipiente, 20 g de molibdato de amônio em 200 mL de água destilada e, em outro recipiente, dissolvendo 2 g de subcarbonato de bismuto em 500 mL de água destilada e 150 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado; esfriou-se à temperatura ambiente, misturando as soluções e completando o volume para 1000 mL com água destilada em um balão volumétrico, com 10 mg de ácido ascórbico e agitou-se. Após 30 minutos, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm. Cálculo:  $\%P-PO_4^{3-} = \mu gml^{-1} \times 0,006$ .

Para análise do teor de carbono, foi utilizado o método descrito por Walkley e Black, que se baseia na oxidação por via úmida do carbono orgânico por dicromato de potássio na presença de ácido sulfúrico. A relação C:N foi estimada a partir dos valores obtidos para teores de carbono e de nitrogênio total das amostras.

#### **4.3.3 Sólidos totais, fixos e voláteis na torta de pinhão manso e dos substratos**

A análise de sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis

(SV) foram determinadas segundo metodologia do Método Gravimétrico ABNT/NBR 10664-1989.

Para as análises dos sólidos totais (ST) foi colocada a cápsula vazia na mufla (3720W Q318M24 Quimis) a  $550 \pm 50^\circ\text{C}$  por 1 hora, depois foi levada a amostra a secagem no dessecador marca Glasstec, para depois fazer a pesagem na balança Shimadzu AUW220D (sensibilidade 0,1mg/0,01mg). Transferiu-se para a cápsula 25 g de amostra da torta de pinhão manso. As amostras foram secas em estufa Fanem modelo 315 SE entre  $103$  e  $105^\circ\text{C}$  por 12 horas, esfriou-se em temperatura ambiente no dessecador e se pesou. Os sólidos totais foram dados pela seguinte expressão:

$$\% \text{ de sólidos totais} = \frac{(m_9 - m_8) \times 100}{m_{10}}$$

Onde:

$m_{10}$  = massa do resíduo total em g

$m_9$  = peso da amostra mais cápsula g

$m_8$  = peso da capsula vazia g

Para a determinação dos sólidos fixos, submeteu-se o resíduo obtido conforme o método dos ST à calcinação a  $550 \pm 50^\circ\text{C}$  por 1 hora, esfriando a temperatura ambiente em dessecador e pesado imediatamente na balança analítica, dado pela seguinte expressão:

$$\% \text{ de sólidos fixos} = \frac{m_{11} \cdot 100}{m_{10}}$$

Onde:

$m_{11}$ : massa do resíduo fixo em g

$m_{10}$ : massa do resíduo total em g

A determinação dos sólidos voláteis foi dada pela seguinte expressão:

$$\% \text{ de sólidos voláteis} = \frac{(m_{10} - m_{11}) \cdot 100}{m_{10}}$$

Onde:

$m_{10}$ : massa do resíduo total em g

$m_{11}$ : massa do resíduo fixo em g

#### **4.3.4 pH dos substratos**

Antes e depois da biodigestão anaeróbica, os substratos (torta de pinhão manso + água+ inóculo) foram analisados usando pH-metro marca Metrohm modelo 827 pH lab.

#### **4.3.5 Cor antes e depois da biodigestão anaeróbica**

A cor nos substratos foi determinada de acordo com o método padrão Platinum-Cobalt, que consiste na medida da absorbância da amostra em comparação com solução padrão de platina e cobalto. Foi utilizado um espectrofotômetro UV/visível Thermo scientific, em que foi realizada a leitura direta, usando o método da Standards Methods (2120 B. VISUAL COMPARISON METHOD). Os resultados foram expressos em mg PtCo/L. A diluição em água destilada utilizada para as amostras foi de 1:200 (UENO,2012). As determinações foram realizadas em triplicata, considerado como resultado o valor médio, antes e depois da digestão anaeróbica.

#### **4.3.6 Turbidez antes e depois da biodigestão anaeróbica**

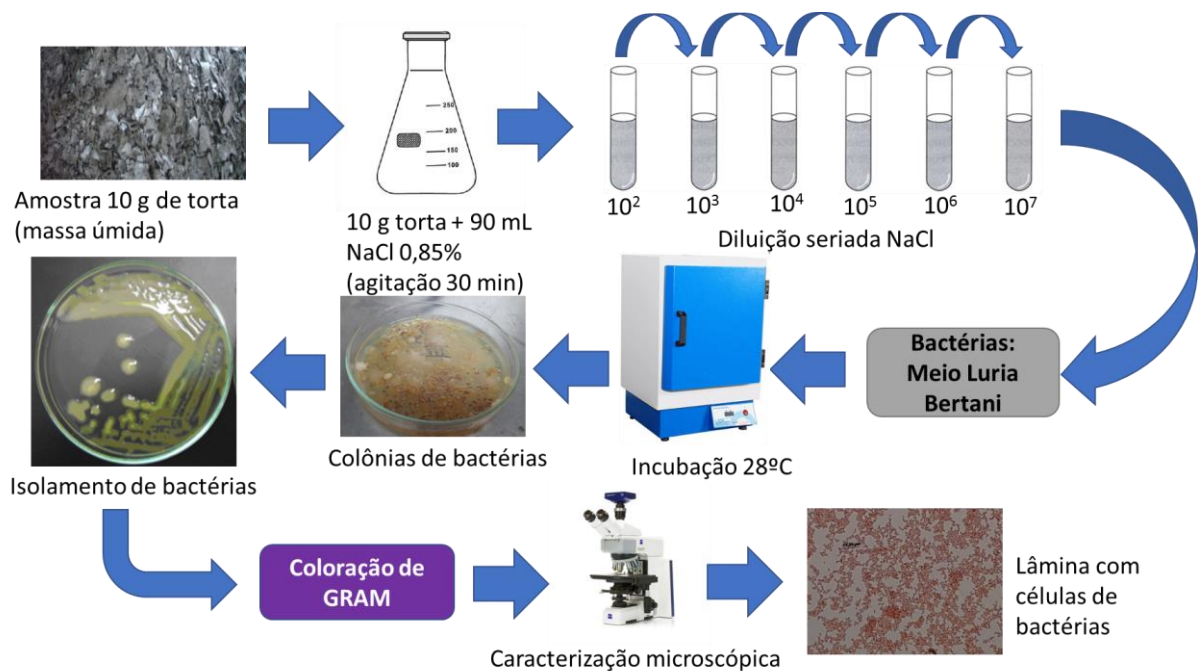
A turbidez dos diferentes substratos (torta de pinhão manso + água+ inóculo) foram determinados antes e depois da digestão anaeróbica, com ajuda de um Turbidímetro Policontrol AP2000; cuja medida é realizada pelo princípio nefelométrico, que consiste na leitura de intensidade de luz desviada pelas partículas num ângulo de 90° em relação à luz incidente. Os resultados foram expressos em NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez). A diluição em água destilada utilizada para as amostras foi de 1:200 (UENO,2012). As determinações foram realizadas em triplicata, considerado como resultado o valor médio.

#### **4.4 Caracterização bacteriológica da torta de pinhão manso**

As avaliações da presença e isolamento de bactérias foram realizadas pela técnica de diluições sucessivas da torta e inoculações em meio de cultura. Foram utilizadas 10 g da torta de pinhão manso suspendida em 90 mL NaCl

0,85%, depois da suspensão foram submetidas sob agitação durante 30 minutos para seguir com as diluições sucessivas,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , seguidamente foi inoculado alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  em meio sólido Luria-Bertani (LB) para bactérias, composto por triptona 10 g  $\text{L}^{-1}$ , NaCl 10 g  $\text{L}^{-1}$ , extrato de levedura 5 g  $\text{L}^{-1}$  e ágar 15 g  $\text{L}^{-1}$  (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

Os ensaios de isolamento foram realizados conforme o esquema representativo da figura 7. As placas inoculadas com as suspensões das diluições da torta foram mantidas em incubação a 28°C até a visualização das colônias. Após cinco dias foi feita a contagem, caracterização morfológica das colônias (tamanho, cor) e a coloração de gram e características das células, com ajuda do microscópio óptico marca Zeiss AXI 0 (Figura 7).



**Figura 7** – Esquema representativo das etapas realizadas para avaliar a morfologia das bactérias isoladas da torta de pinhão manso.

Fonte: o próprio autor

#### 4.5 Preparo dos inóculos

Na figura 8 está apresentado o esquema dos procedimentos do preparo dos inóculos para biodigestão.

Cada isolado bacteriano foi crescido em 100 mL de meio de cultura

esterilizado Luria-Bertani (Tryptona 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, 85 mL de água destilada) com agitação constante de 100 rotações por minuto (rpm) em temperatura 28±2°C, por dez dias.

Depois do crescimento de cada isolado, foi medida a densidade ótica a 580 nm absorvância em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, ajustando com NaCl ao 85% esterilizado para 0,8 a absorvância de cada um.

Da suspensão de cada isolado bacteriano foram pipetadas alíquotas de 10 mL em um frasco em condições estéreis para formar os consórcios.

Os três tipos de inóculo utilizados como tratamentos para a biodigestão foram preparados com consórcios das bactérias isoladas da torta, sendo os seguintes:

- Consórcio 1 (C1) - formado de 9 bactérias isoladas da torta do tempo 1 (200 dias).
- Consórcio 2 (C2) – formado de 14 bactérias isoladas da torta do tempo 2 (525 dias).
- Consórcio 3 (C3) – formado da mistura em igual proporção (1:1) do consórcio 1 + consórcio 2.



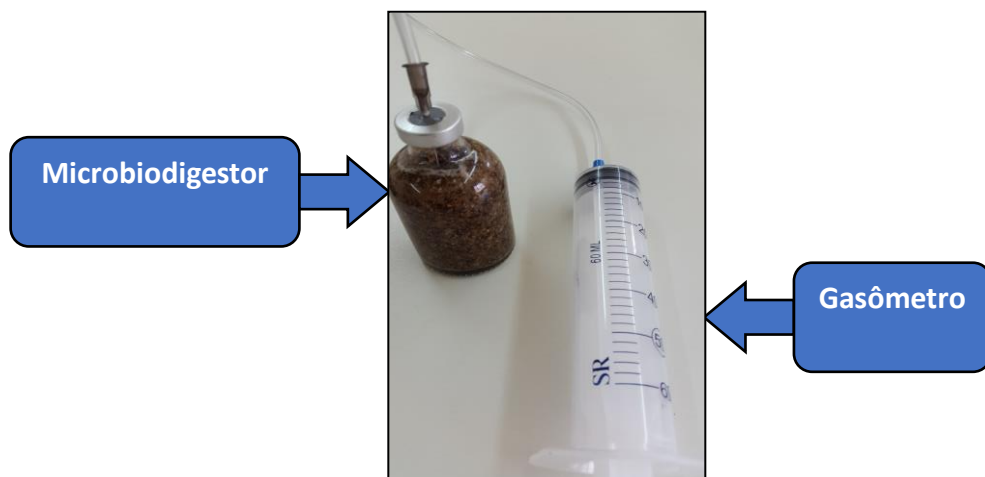
**Figura 8** – Esquema do procedimento do preparo dos inóculos.

Fonte: o próprio autor

#### 4.6 Biodigestão Anaeróbica

Conforme descrito por Azevedo (2010), foram utilizados microbiodigestores feitos com frascos de vidro injetável tipo penicilina com volume de 50 mL, onde foram colocados os tratamentos, para depois ficar hermeticamente fechados com tampa de borracha e lacre metálico usando lacrador.

Como gasômetros, foram usadas seringas de 60 mL, conectadas com uma mangueira e agulha cuja função era medir e armazenar o volume de biogás produzido representado na figura 9.



**Figura 9** – Microbiodigestor e gasômetro em escala laboratorial

Fonte: o próprio autor

O experimento foi dividido em dois ensaios, o primeiro realizado com a torta de pinhão manso com tempo 1 de incubação e o outro com o tempo 2 de incubação, usando três tipos de inóculos (C1, C2 e C3) e como controle a água (C4) para cada ensaio. Cada ensaio foi constituído por quatro tratamentos com três repetições cada um.

Os microbiodigestores foram alimentados com os diferentes tratamentos dos ensaios.

O ensaio 1 foi composto por 6,41 g da torta de pinhão manso do tempo 1 (T1) e adicionando 23,59 mL de água destilada apresentando um volume de 28 mL, atingindo cerca de 20% de sólidos totais da mistura. Nos tratamentos do ensaio 2, usou-se 6,54 g da torta de pinhão manso do tempo 2 (T2) de incubação e 23,46 mL de água destilada, apresentando um volume total de 29 mL (20% de sólidos totais da mistura). Depois de realizadas as misturas, foram adicionados os inóculos, sendo estes equivalentes ao 10% do volume total das misturas dos

substratos, metodologia usada por Hifjur e Subhrajit (2012).

O pH em cada tratamento antes da biodigestão anaeróbica foi ajustado a 7,0. Para neutralizar o pH, usou-se KOH 10N nas misturas. A descrição dos tratamentos dos ensaios se apresentam na Tabela 3:

**Tabela 3** – Descrição dos tratamentos dos ensaios 1 e 2.

<b>Tratamentos</b>	<b>Tipo de Inóculo</b>
<b>Torta do tempo 1 (T1) de incubação</b>	
T1C1	Consórcio 1 (C1)
T1C2	Consórcio 2 (C2)
T1C3	Consórcio 3 (C3)
*T1C4	Água (C4)
<b>Torta do tempo 2 (T2) de incubação</b>	
T2C1	Consórcio 1 (C1)
T2C2	Consórcio 2 (C2)
T2C3	Consórcio 3 (C3)
*T2C4	Água (C4)

\* Testemunha

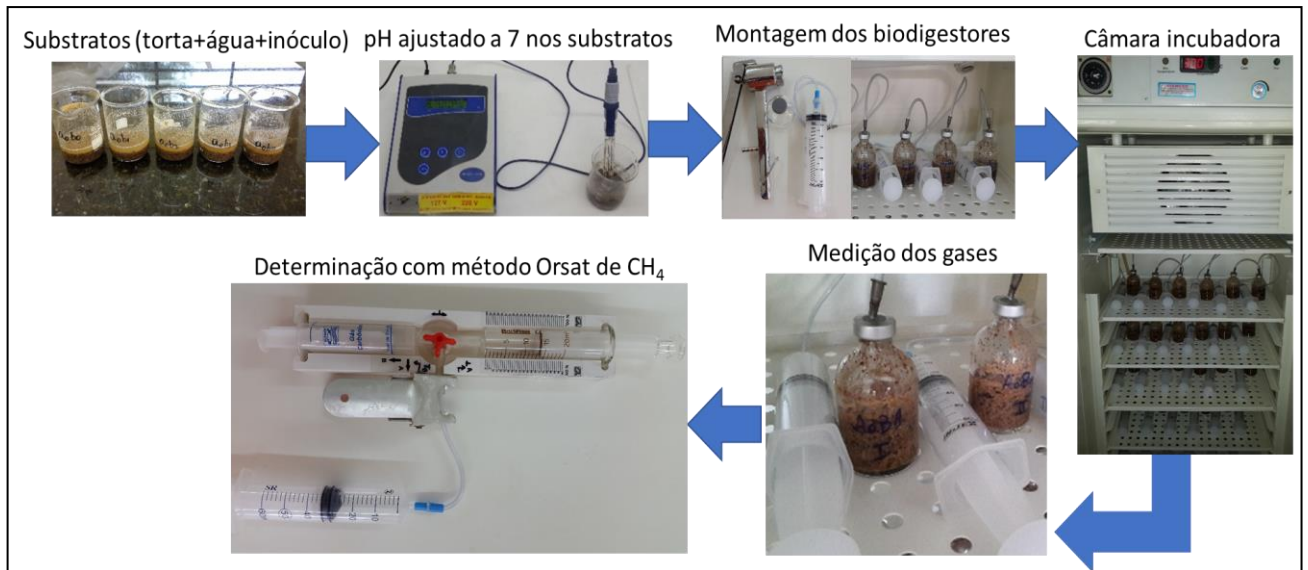
Os biodigestores contendo o substrato da torta, água e inóculos foram totalmente lacrados com tampa de borracha e metálica com ajuda de um lacrador.

Depois os biodigestores foram conectados aos gasômetros (seringas de 60 mL) e introduzidos em câmara incubadora BOD marca FANEM modelo 347.FG, sem luminosidade, a 30°C de temperatura. As amostras de torta foram submetidas a digestão anaeróbica durante 21 dias.

A produção do gás foi avaliada quantitativamente e expressa em mililitros (mL) através do deslocamento do embolo da seringa (Figura 10).

A determinação do gás metano (CH<sub>4</sub>) foi realizado aos 12 e 21 dias através da adaptação do método Orsat desenvolvido por Kunz e Oliveira (2009), que consiste em lavagem do biogás em solução alcalina (16% de hidróxido de potássio

em água destilada), mediante o uso de uma seringa de vidro conectada por meio de um suporte que possui outra seringa plástica contendo a solução alcalina. A solução de NaOH reage com o  $\text{CO}_2$ , absorvendo-o em solução como carbonato e bicarbonato. A diferença entre os volumes iniciais e finais foi utilizada para estimar a concentração de gás metano ( $\text{CH}_4$ ) e gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ).



**Figura 10** – Obtenção e determinação dos gases.

Fonte: o próprio autor

#### 4.7 Análises estatística

O planejamento estatístico usado foi inteiramente casualizado com 3 repetições. Realizaram-se a análise de variância, o desvio padrão e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para verificar a diferença entre os tratamentos, utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Caracterização físico-química da torta de pinhão manso**

#### **5.1.1 Porcentagens de óleo, Sólidos Totais, Fixos e Voláteis na torta de pinhão manso**

Na tabela 4, são apresentados os resultados da composição química em porcentagem de óleo e os sólidos totais, fixos e voláteis. No geral, o tempo de incubação não alterou algumas das características químicas da torta de pinhão manso.

No teor de óleo presente na torta de pinhão manso, foi observado que a torta com 6 meses de incubação (T1) teve 11,35% de óleo e que a torta com 18 meses de incubação (T2) teve 8,40% de óleo. Portanto, a torta de pinhão manso incubada apenas por seis meses (T1), apresentou uma diferença aproximada entre elas de 3% a mais no teor de óleo, o que indica que o maior tempo de incubação da torta de pinhão manso resulta em perda no teor de óleo total na sua composição.

Uma questão na fermentação de tortas é saber se o teor de óleo interfere na eficiência do processo. Torta de pinhão manso com 6,40% de óleo foi utilizada por Staubmann e colaboradores (1997) para geração de biogás, teor menor do que o obtido neste trabalho.

Analisando-se os dados que se encontram na tabela 4, observou-se que a torta de pinhão manso T1 tem 91,01% de sólidos totais, 14,49% de Sólidos Fixos e 76,52% de Sólidos Voláteis.

A torta de pinhão T2 contém 93,10% de Sólidos Totais, 13,32% Sólidos Fixos e 79,78% de Sólidos Voláteis.

Os teores de sólidos totais das tortas de pinhão manso utilizadas neste trabalho se assemelham aos obtidos por Raheman e Mondal (2012), cuja biomassa usada na biodigestão anaeróbica, apresentava 88% de sólidos totais.

**Tabela 4** – Teores de Óleo, Sólidos Totais, Fixos e voláteis da torta de pinhão manso em dois tempos de incubação.

Torta de pinhão manso (Tempo de incubação)	Teor de óleo	Sólidos		
		totais	fixos	voláteis
		%		
Tempo 1 (6 meses)	11,35	91,01	14,49	76,52
Tempo 2 (18 meses)	8,40	93,1	13,32	79,78

### 5.1.2 Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso

Na Tabela 5, encontram-se os valores médios obtidos das análises de macro e micronutrientes da torta de pinhão manso do tempo 1 e tempo 2 de incubação.

Na caracterização química efetuada por Souza e colaboradores (2009), na torta de pinhão manso proveniente da extração de sementes da Fazenda Paraíso, em Itaum, no Município de Dourados, MS, Brasil, encontram-se valores superiores em Ca ( $4,95 \text{ g kg}^{-1}$ ), Mg ( $5,02 \text{ g kg}^{-1}$ ), Cu ( $8,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $21,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), B ( $53,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) que os obtidos na torta de pinhão manso obtida das sementes do INIAP – Portoviejo de Manabí, Equador, enquanto os valores de K ( $5,26 \text{ g kg}^{-1}$ ) e Mn ( $12, 13 \text{ mg kg}^{-1}$ ) resultaram menores aos obtidos do material equatoriano.

Hifjur e Subhrajit (2012) usaram torta de pinhão manso que possuía 2,88% de conteúdo de Nitrogênio e 9:1 da relação C:N para a digestão anaeróbica, valores semelhantes aos obtidos na presente pesquisa.

Encontrou-se que na torta de pinhão manso de seis meses de incubada teve maior concentração de carbono (C) sendo de  $347,26 \text{ mg kg}^{-1}$  que a de 18 meses que foi de  $326,74 \text{ mg kg}^{-1}$ , podendo ter influenciado o teor de óleo a mais presente na torta de seis meses.

**Tabela 5** – Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso em dois tempos de incubação.

Nutrientes e relação C:N	Torta tempo 1	Torta tempo 2
	g kg <sup>-1</sup>	
N	35,15	34,12
P	5,18	5,64
K	11,91	10,80
Ca	3,44	3,32
Mg	3,48	3,61
	mg kg <sup>-1</sup>	
Cu	7,89	8,02
Zn	13,46	12,05
B	16,42	15,38
Mn	22,36	34,03
C	347,26	326,74
C:N	9,9: 1	9,6: 1

### 5.1.3 Caracterização bacteriológica da torta de pinhão manso

Foi observado crescimento bacteriano na torta de pinhão manso do tempo 1 de incubação entre as diluições  $10^{-2}$  até  $10^{-5}$ , nas quais foram isolados 9 microrganismos fenotipicamente diferentes cujo tamanho celular varia entre 1 e 17  $\mu\text{m}$ , apresentando características celulares como cocos 67% e bacilos 33%; gram-negativos 60% e gram-positivos 40%.

Na torta de pinhão manso de incubação (T2), observou-se crescimento bacteriano entre as diluições  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$ , indicando uma maior população de bactérias no material, embora vale ressaltar que não foi utilizado procedimento e meio de cultura específico para bactérias fermentativas anaeróbicas.

Em relação às características dessas bactérias, foram obtidos 14 isolados com morfologia de colônias distintas, com tamanho de células variando entre 1 e 18  $\mu\text{m}$ , sendo cocos 56% e bacilos 44%; gram-negativos 55% e positivos 45%. Na tabela 6, descreve-se a caracterização bacteriológica da torta de pinhão manso.

Cerqueira e colaboradores (2014) encontraram microrganismos presentes na torta de pinhão manso com resistência ao aquecimento acima de 120°C, indicando que são potenciais inibidores do crescimento de fungos fermentadores ou detoxicadores desse coproduto em processos fermentativos.

**Tabela 6** – Concentração bacteriana e algumas características dos isolados obtidos da torta de pinhão manso.

Carga bacteriana heterotrófica e características das bactérias isoladas	Torta	
	Tempo 1	Tempo 2
Crescimento	Até 10 <sup>-5</sup>	Até 10 <sup>-7</sup>
Densidade bactérias	6,66 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	1,50 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
Número de isolados distintos	9	14
Tamanho células	1 e 17 µm	1 e 20,78 µm
Tipo de célula	Cocos 33%, e 67% bacilos	Cocos 57% e bacilos 43%,
Coloração de Gram	Gram-negativos 67% e Gram-positivos 33%	Gram-negativos 55% e Gram-positivos 45%

## 5.2 Biodigestão Anaeróbica

### 5.2.1 Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico gerado aos 12 dias a partir da torta de pinhão manso

Encontra-se na tabela 7 o volume de gás gerado na torta do tempo 1 de incubação, mostrando na análise estatística quatro níveis de significância de 5%, no Teste de Tukey, o que apontou como melhor tratamento o conformado pela torta do tempo 1 usando como inóculo o consórcio 3 (C3), havendo maior geração de gases, sendo de 60,50 mL aos 12 dias, esse mesmo tratamento obteve melhor qualidade de gás metano produzindo 53,67% de CH<sub>4</sub>, e menor porcentagem de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) de 46,33%, apresentando diferenças significativas ( $\alpha=5\%$ ).

Usando a torta do tempo 2 de incubação, a maior quantidade de gás produzido foi no tratamento conformado pelo inóculo do consórcio 1 de bactérias apresentando 59,83 mL de gás metano, encontrando quatro níveis de significância teste de Tukey ao 5% (Tabela 7). Enquanto as porcentagens da concentração de gás metano usando torta do tempo 2 de incubação e o teste de Tukey ao 5%; encontraram-se três níveis de significância, sendo o melhor tratamento aquele em que usou-se o inóculo do consórcio 2 de bactérias, obtendo um resultado de 66,50%, o mesmo tratamento produziu menor porcentagem de CO<sub>2</sub> sendo de 33,50%.

Isso indica que, ao pré-incubar a torta de pinhão manso por mais tempo e aumentar sua carga microbiana com bactérias isoladas no processo da biodigestão anaeróbica, está se gerando gás com maior teor de metano e menor teor de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 7** – Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico da digestão anaeróbica aos 12 dias na torta de pinhão manso. Medias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.

Inóculos	Nº de isol. bact	Volume de biogás (mL)	% de CH <sub>4</sub>	% de CO <sub>2</sub>
<b>Torta do tempo 1 de incubação</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	43,83 $\pm$ 0,58 c	40,33 $\pm$ 0,24 c	59,67 $\pm$ 0,28 b
Consórcio 2 (C2)	14	49,17 $\pm$ 0,29 b	49,17 $\pm$ 1,18 b	50,83 $\pm$ 1,44 c
Consórcio 3 (C3)	23	60,50 $\pm$ 0,50 a	53,67 $\pm$ 0,47 a	46,33 $\pm$ 0,58 d
Água (C4)	-	42,17 $\pm$ 0,29 d	35,33 $\pm$ 0,47 d	64,67 $\pm$ 0,58 a
<b>DMS</b>	-	<b>1,13</b>	<b>2,45</b>	<b>2,10</b>
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,17</b>	<b>0,19</b>	<b>0,15</b>
<b>Torta do tempo 2 de incubação</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	59,83 $\pm$ 0,29 a	62,67 $\pm$ 0,24 b	37,33 $\pm$ 0,29 b
Consórcio 2 (C2)	14	56,17 $\pm$ 0,29 b	66,50 $\pm$ 0,71 a	33,50 $\pm$ 0,87 c
Consórcio 3 (C3)	23	49,83 $\pm$ 0,28 c	60,83 $\pm$ 1,18 b	39,17 $\pm$ 1,44 b
Água (C4)	-	46,50 $\pm$ 0,50 d	55,83 $\pm$ 1,18 c	44,17 $\pm$ 1,44 a
<b>DMS</b>	-	<b>0,92</b>	<b>3,20</b>	<b>2,92</b>
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,11</b>	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### **5.2.2 Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico gerado aos 21 dias a partir da torta de pinhão manso**

Na tabela 8, encontra-se o volume de gás produzido e porcentagens de gás metano gerado na torta do tempo 1 de incubação, encontrando na análise estatística quatro e três níveis de significância ao 5% no Teste de Tukey respectivamente, o que apontou como melhor tratamento o conformado pela torta do tempo 1 usando como inóculo o consórcio 3 (C3), havendo maior geração de gases, sendo de 72,83 mL e 71,67% de gás metano em sua composição aos 21 dias, o mesmo tratamento produziu menor porcentagem de CO<sub>2</sub> 28,33%, indicando que a maior quantidade de gás metano vai existir menor quantidade de CO<sub>2</sub> na composição total do biogás.

A análise estatística encontrou quatro níveis de significância ao nível de significância de 5%, em Teste de Tukey, o que apontou como melhor tratamento em quantidade de biogás gerado o conformado pela torta do tempo 2 de armazenamento, usando água (C4) como controle, havendo mais geração de biogás, sendo 83,67 mL durante os 21 dias.

Em quanto a qualidade do biogás usando torta de pinhão manso do tempo 2 de incubação no teste de Tukey ao 5% com três níveis de significância, encontram-se que, usando como inóculo o consórcio 2 de bactérias, obteve maior concentração de gás metano, sendo 84,33% o melhor de todos os tratamentos e menor porcentagem de CO<sub>2</sub> sendo de 15,67% (Tabela 8). O valor de gás metano produzido é maior do que os demonstrados por Staubmann e colaboradores (1997) na produção de 355 L de biogás a partir da torta de pinhão manso, que teve uma concentração de 70% de metano aos 25 dias. Em um outro trabalho usando torta de pinhão manso e usando biodigestor em batelada na geração de biogás durante 71 dias de incubação, foram observados concentrações de gás metano estabilizado entre 60 e 65% (GRIMSBY *et al.* 2013), sendo esses bem menores do que as concentrações observadas no presente trabalho com 21 dias de biodigestão com torta pré-incubada por 18 meses (T2).

Staubmann e colaboradores (1997), realizando experiências preliminares, mostraram que o resíduo é um bom substrato para a produção de biogás. Efetuaram a biodigestão em um reator semicontínuo com volume de 110 L com uma geração de 355 L de biogás. Hifjur e Subhrajit, (2012) obtiveram um máximo de 0,17 m<sup>3</sup> com 20% de sólidos totais na biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso, durante 40 dias usando um recipiente plástico de dois litros de capacidade.

Chandra e colaboradores (2011), na produção de metano a partir da digestão anaeróbica das tortas de pinhão manso e pongamia aos 30 dias, usando um biodigestor flutuante contínuo de 20 m<sup>3</sup> de capacidade com temperatura entre 26.3 e 34.5 °C, obtiveram uma concentração de gás metano de 66,6%.

**Tabela 8** – Produção de biogás, porcentagem de gás metano e gás carbônico da digestão anaeróbica aos 21 dias de incubação na torta de pinhão manso. Médias de três repetições ± o desvio padrão.

Inóculos	Nº de isol. bact	Volume de biogás (mL)	% de CH <sub>4</sub>	% de CO <sub>2</sub>
<b>Torta do tempo 1 de incubação</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	56,77 ± 0,76 c	61,67 ± 1,18 c	38,33 ± 1,44 a
Consórcio 2 (C2)	14	66,33 ± 0,57 b	66,67 ± 1,18 b	33,33 ± 1,44 b
Consórcio 3 (C3)	23	72,83 ± 0,28 a	71,67 ± 1,18 a	28,33 ± 1,44 c
Água (C4)	-	54,17 ± 0,29 d	59,17 ± 1,18 c	40,83 ± 1,44 a
<b>DMS</b>	-	<b>1,70</b>	<b>3,88</b>	<b>3,77</b>
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,14</b>	<b>0,09</b>	<b>0,16</b>
<b>Torta do tempo 2 de incubação</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	76,83 ± 0,28 c	79,17 ± 2,36 b	20,83 ± 2,89 b
Consórcio 2 (C2)	14	75,33 ± 0,57 d	84,33 ± 0,47 a	15,67 ± 0,58 c
Consórcio 3 (C3)	23	79,03 ± 0,06 b	79,50 ± 0,71 b	20,50 ± 0,87 b
Água (C4)	-	83,67 ± 0,76 a	71,67 ± 1,18 c	28,33 ± 1,44 a
<b>DMS</b>	-	<b>1,30</b>	<b>4,21</b>	<b>4,43</b>
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>	<b>0,25</b>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### **5.3 Análises físico-químicas dos substratos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso**

#### **5.3.1 pH das diferentes misturas antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso**

Na tabela 9, são apresentados os resultados do potencial hidrogeniônico (pH) da torta antes e depois do processo de biodigestão em função dos tratamentos; usando a torta do tempo 1 de incubação com os inóculos das bactérias dos consórcios C1, C2 e C3, houve dois níveis de significância, encontrando no primeiro nível pH de 6,25; 6,23 e 6,25 respectivamente, os quais não tiveram significância no teste de Tukey ao 5%. O pH em todos os tratamentos foi ajustado a 7, antes do processo da biodigestão anaeróbica.

Após os 21 dias da biodigestão anaeróbica da torta do tempo 1, o pH em todos os tratamentos mudou, encontrando três níveis de significância no teste de Tukey ao 5%, sendo os maiores valores de 5,93; 6,05 e 5,91.

Após os 21 dias da biodigestão anaeróbica da torta do tempo 2, o pH em todos os tratamentos mudou, sendo o maior de 6,16 e o menor de 5,61.

Encontra-se uma relação na melhor produção de CH<sub>4</sub> (84,33%) que foi conformado pela torta do tempo 2 usando como inóculo o consórcio 2 de bactérias com o pH do mesmo tratamento após a digestão anaeróbica que foi de 6,16 com um  $\Delta$ pH de 0,59 menor em todos os outros tratamentos, o que indica a estabilidade do pH no substrato, sendo possivelmente um meio propício para a atuação das bactérias geradoras de gás metano.

No processo de biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso, o potencial hidrogênio (pH) do biodigerido em todos os tratamentos ficou entre pH 5,0 a 9,0, sendo esses os valores na faixa estabelecida pela Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Chandra e colaboradores (2011) usaram na digestão anaeróbica da torta de pinhão manso pH de 6,8 até 7,2. Também no estudo da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso, Hifjur e Subhrajit (2012) encontraram nas misturas realizadas valores de pH, variando entre 5,97 e 6,96.

**Tabela 9** – Valores de pH dos diferentes substratos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Médias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.

Inóculos de bactérias	N° de isol. bact.	pH antes da digestão	pH depois da digestão	$\Delta$ pH
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	6,25 $\pm$ 0,01 a	5,93 $\pm$ 0,02 a	0,32
Consórcio 2 (C2)	14	6,23 $\pm$ 0,02 a	6,05 $\pm$ 0,04 a	0,18
Consórcio 3 (C3)	23	6,25 $\pm$ 0,02 a	5,91 $\pm$ 0,06 a	0,34
Água (C4)	-	6,15 $\pm$ 0,02 b	5,73 $\pm$ 0,09 b	0,42
<b>DMS</b>	-	<b>0,06</b>	<b>0,17</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,008</b>	<b>0,02</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	6,76 $\pm$ 0,02 a	6,01 $\pm$ 0,01 c	0,75
Consórcio 2 (C2)	14	6,75 $\pm$ 0,01 ab	6,16 $\pm$ 0,01 a	0,59
Consórcio 3 (C3)	23	6,72 $\pm$ 0,01 ab	6,08 $\pm$ 0,01 b	0,64
Água (C4)	-	6,65 $\pm$ 0,02b	5,61 $\pm$ 0,03 d	1,04
<b>DMS</b>	-	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,31</b>	<b>0,04</b>	-

Dentro de cada tempo de incubação da torta, as médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.3.2 Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso antes e depois da digestão anaeróbica

Na tabela 10, encontram-se as análises químicas dos macro e micronutrientes e a relação C:N da torta depois da digestão anaeróbica do tempo 1 de incubação. Os resultados demonstraram que, usando água como tratamento controle e torta do tempo 1, obteve-se mais disponibilidade de Nitrogênio, obtendo 50,55 g kg<sup>-1</sup>. Na relação C:N, em T1 usando como inóculo o consórcio 3, encontrou-se um valor de 7,6:1, sendo menor em relação ao obtido pela torta antes da digestão, que foi de 9,9: 1, o que indica que existiu uma redução na carga orgânica e possível incremento do CH<sub>4</sub> que no mesmo tratamento foi de 71,67%, enquanto a

inoculação da torta com o consórcio 1 de bactérias promoveu maior disponibilidade nos outros nutrientes.

Depois da digestão anaeróbica da torta do tempo 2 de incubação (T2), foram realizadas análises químicas dos macro e micronutrientes com a relação C:N a torta de pinhão manso (Tabela 10). Os resultados demonstraram que, usando o inóculo do consórcio 3 de bactérias, houve disponibilidade de N com um valor máximo de 50,49 g kg<sup>-1</sup>. Usando como inóculo o consórcio de bactérias 3, encontrou-se menor relação C:N, sendo de 7,4:1 indicando redução na carga orgânica, relacionando este valor ao CH<sub>4</sub> encontrou-se que foi gerado 79,50% sendo um biogás de excelente qualidade. Para os demais nutrientes, usando o inóculo do consórcio 3 de bactérias, existiu mais disponibilidade.

Hifjur e Subhrajit (2012) determinaram que o teor de nitrogênio (N) depois da biodigestão da torta de pinhão manso foi aumentado em 5,9% devido à decomposição da proteína, enquanto o conteúdo de fósforo e potássio permaneceu inalterado.

**Tabela 10** – Macro e micronutrientes da torta de pinhão manso antes (vermelho) e depois (preto) da digestão anaeróbica.

<b>Tratamentos</b>					
<b>torta</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
g kg <sup>-1</sup>					
<b>TT1</b>	<b>35,15</b>	<b>5,18</b>	<b>11,91</b>	<b>3,44</b>	<b>3,48</b>
<b>TT 2</b>	<b>34,12</b>	<b>5,64</b>	<b>10,8</b>	<b>3,32</b>	<b>3,61</b>
T1C1	47,11	17,37	29,07	11,34	10,03
T2C1	24,99	10,2	17,48	6,69	6,87
T1C2	48,15	16,7	27,76	10,95	9,72
T2C2	40,03	21,95	27,61	11,8	11,75
T1C3	43,67	14,49	28,09	9,94	8,82
T2C3	50,49	23,82	29,17	14,31	12,9
T1C4	50,55	13,33	25,46	10,09	8,1
T2C4	42,85	20,98	26,79	11,41	11,5

	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>B</b>	<b>Mn</b>	<b>C:N</b>
	mg kg <sup>-1</sup>				
TT1	7,89	13,46	16,42	22,36	9,9: 1
TT 2	8,02	12,05	15,38	34,03	9,6: 1
T1C1	27,84	62,89	39,09	59,01	7,5:1
T2C1	24,91	37,12	28,19	60,86	12,2:1
T1C2	26,33	61,31	37,25	54,45	7,1:1
T2C2	30,54	66,19	39,17	111,25	8,9:1
T1C3	22,27	49,91	34,25	46,75	7,6:1
T2C3	38,34	76,23	45,15	134,09	7,4:1
T1C4	23,41	52,27	35,3	48,94	7,3:1
T2C4	30,17	59,64	39,23	106,52	8,1:1

<sup>a</sup> TT1=torta incubada por 6 meses; TT2=torta incubada por 18 meses; C1, C2 e C3=consórcio 1, 2 de bactérias e C1+C2, respectivamente.

### 5.3.3 Determinação de Sólidos Totais antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso

No tratamento da torta do tempo 1 de incubação usando o consórcio 1 de bactérias como inóculo (C1) aquele que teve mais remoção dos sólidos totais depois da digestão anaeróbica, com 42,85% de remoção (Tabela 11)

Para a torta (T2), a biodigestão apenas com água (C4) mostrou maior remoção dos sólidos totais, que foi de 51,97% (Tabela 11).

Analisando-se os dados da Tabela 11, observa-se que, todos os tratamentos mostraram redução na concentração de sólidos totais depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso, a taxa de remoção de Sólidos Totais (ST) decaiu em todos os tratamentos, pode-se verificar que no tratamento da torta de pinhão manso do Tempo 2 usando água como tratamento controle se obteve maior porcentagem de remoção sendo de 51,97%, o mesmo tratamento foi aquele que obteve maior quantidade de biogás (83,67 mL) em todos os tratamentos, indicando que a taxa de remoção refletiu na quantidade de biogás gerado.

**Tabela 11 – Sólidos Totais antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Medias de três repetições e desvio padrão.**

Inóculos	Nº de isol. bact.	g L <sup>-1</sup> antes da digestão	g L <sup>-1</sup> depois da digestão	Remoção em relação ao inicial %
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	201,41 ± 0,39 ab	115,11 ± 0,13 d	42,85
Consórcio 2 (C2)	14	196,74 ± 1,55 b	152,85 ± 0,19 b	22,31
Consórcio 3 (C3)	23	205,18 ± 1,85 a	148,85 ± 0,05 c	27,45
Água (C4)	-	198,91 ± 1,85 ab	159,54 ± 0,63 a	19,79
<b>DMS</b>	-	<b>7,88</b>	<b>2,18</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,018</b>	<b>0,14</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	204,07 ± 1,80 a	184,02 ± 1,46 a	9,83
Consórcio 2 (C2)	14	198,32 ± 0,88 ab	163,98 ± 0,13 b	17,32
Consórcio 3 (C3)	23	196,17 ± 0,64 b	103,25 ± 0,17 c	47,37
Água (C4)	-	199,23 ± 0,16 ab	95,69 ± 0,04 d	51,97
<b>DMS</b>	-	<b>6,89</b>	<b>4,59</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,018</b>	<b>0,32</b>	-

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

#### **5.3.4 Determinação de Sólidos Fixos antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso**

As análises dos sólidos fixos antes e depois da digestão anaeróbica das diferentes misturas da torta do tempo 1 e tempo 2 de incubação (tabela 12) mostram que, no tratamento em que foi usada água como controle (C4), houve mais remoção dos sólidos fixos depois da digestão anaeróbica dos diferentes tratamentos com a torta de pinhão manso sendo de 47 e 45,16 % de remoção respectivamente.

Observa-se que em todos os tratamentos mostraram redução na porcentagem de Sólidos Fixos depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso o que indica que existiu uma redução na carga orgânica, mas não existiu

uma relação entre a remoção dos sólidos fixos com a produção de gás metano nos valores refletidos.

**Tabela 12 – Sólidos Fixos antes e depois da digestão anaeróbica das diferentes misturas da torta de pinhão manso. Médias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.**

Inóculos	Nº de isol. bact.	g L <sup>-1</sup> antes da digestão	g L <sup>-1</sup> depois da digestão	Remoção em relação ao inicial %
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	17,88 $\pm$ 0,03 b	14,04 $\pm$ 0,02 b	21,48
Consórcio 2 (C2)	14	18,32 $\pm$ 0,14 b	14,89 $\pm$ 0,02 a	18,72
Consórcio 3 (C3)	23	18,4 $\pm$ 0,17 b	13,53 $\pm$ 0,004 c	26,47
Água (C4)	-	23,87 $\pm$ 0,05 a	12,65 $\pm$ 0,05 d	47,00
<b>DMS</b>	-	<b>0,76</b>	<b>0,18</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,14</b>	<b>0,07</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	19,75 $\pm$ 0,17 c	14,45 $\pm$ 0,11 c	26,84
Consórcio 2 (C2)	14	21,76 $\pm$ 1,57 b	16,10 $\pm$ 0,01 b	26,01
Consórcio 3 (C3)	23	19,62 $\pm$ 0,06 c	16,72 $\pm$ 0,03 a	14,78
Água (C4)	-	24,18 $\pm$ 0,02 a	13,26 $\pm$ 0,01 d	45,16
<b>DMS</b>	-	<b>0,76</b>	<b>0,37</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	-

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.3.5 Sólidos Voláteis antes e depois da digestão anaeróbica das diferentes misturas na torta de pinhão manso

Na tabela 13, encontram-se os sólidos voláteis obtidos antes e depois da biodigestão anaeróbica dos diferentes tratamentos com torta de pinhão manso do tempo 1 de incubação; a maior remoção foi no tratamento em que usaram-se como inóculo as bactérias do consórcio 1 de bactérias: 44,92% de remoção. As análises estatísticas destes valores se deram usando o teste de Tukey ao 5%, encontrando-se quatro níveis de significância nos tratamentos antes da

digestão e quatros nos tratamentos depois da digestão anaeróbica.

Nos sólidos voláteis obtidos antes e depois da biodigestão anaeróbica dos diferentes tratamentos com torta de pinhão manso do tempo 2 de incubação (tabela 13), encontra-se a que teve maior remoção no tratamento que usou-se água como inóculo (C4). As análises estatísticas destes valores se deram usando o teste de Tukey ao 5%, encontrando-se dois níveis de significância nos tratamentos antes da digestão e três níveis nos tratamentos depois da digestão anaeróbica.

Na tabela 13, encontram-se que em todos os tratamentos existiu redução na porcentagem de Sólidos Voláteis, encontrando que no tratamento da torta de pinhão manso do Tempo 2 usando água como tratamento controle se obteve maior porcentagem de remoção sendo de 52,91%, o mesmo tratamento foi no que se obteve maior quantidade de biogás sendo de 83,67 mL, indicando que a taxa de remoção refletiu na quantidade de biogás gerado.

**Tabela 13** – Sólidos Voláteis antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Médias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.

Inóculos	Nº de isol. bact.	g L <sup>-1</sup> antes da digestão	g L <sup>-1</sup> depois da digestão	Remoção em relação ao inicial %
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	183,53 $\pm$ 0,35 b	101,08 $\pm$ 0,12 d	44,92
Consórcio 2 (C2)	14	178,42 $\pm$ 1,40 bc	137,97 $\pm$ 0,17 b	22,67
Consórcio 3 (C3)	23	186,78 $\pm$ 1,68 a	135,32 $\pm$ 0,05 c	27,55
Água (C4)	-	175,04 $\pm$ 0,36 c	146,89 $\pm$ 0,58 a	16,08
<b>DMS</b>	-	<b>7,13</b>	<b>2,001</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,03</b>	<b>0,15</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	184,32 $\pm$ 1,62 a	169,57 $\pm$ 1,33 a	8,00
Consórcio 2 (C2)	14	175,51 $\pm$ 0,78 b	147,89 $\pm$ 0,12 b	15,74
Consórcio 3 (C3)	23	176,55 $\pm$ 0,56 b	86,53 $\pm$ 0,14 c	50,99
Água (C4)	-	175,05 $\pm$ 0,14 b	82,43 $\pm$ 0,03 c	52,91
<b>DMS</b>	-	<b>6,16</b>	<b>4,22</b>	-

<b>CV (%)</b>	-	<b>0,02</b>	<b>0,36</b>	-
---------------	---	-------------	-------------	---

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.3.6 Cor antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso

A cor dos substratos antes e depois da digestão anaeróbica, usando a torta do tempo 1 de incubação, encontra-se na Tabela 14. No tratamento em que foi usado como inóculo o consórcio 3 de bactérias, houve maior remoção de cor depois da digestão anaeróbica dos diferentes tratamentos da torta de pinhão manso.

A cor das amostras determinada de acordo com o método padrão Platinum-Cobalt, usando a torta do tempo 2 de incubação, encontra-se na tabela 14.

No tratamento em que foi usada água como inóculo, houve maior remoção de cor depois da digestão anaeróbica dos diferentes tratamentos da torta de pinhão manso, com 57,14%.

As análises estatísticas destes valores se deram usando o teste de Tukey ao 5%, encontrando-se três níveis de significância nos tratamentos antes da digestão e três níveis nos tratamentos depois da digestão anaeróbica.

Na tabela 14 pode-se observar que em todos os tratamentos existiu redução na porcentagem da remoção de cor depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso o que indica que existiu uma redução na carga orgânica, mas não existiu uma relação com a quantidade e produção de gás metano nos valores refletidos. Os presentes dados serviram como parâmetro de avaliação das normas ambientais.

**Tabela 14** – Cor antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Médias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.

<b>Inóculos</b>	<b>Nº de isol. bact</b>	<b>Pt Co L<sup>-1</sup>(antes da digestão)</b>	<b>Pt Co L<sup>-1</sup>(depois da digestão)</b>	<b>Remoção em relação ao inicial %</b>
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	0,09 $\pm$ 0,004 c	0,08 $\pm$ 0,002 b	11,11
Consórcio 2 (C2)	14	0,23 $\pm$ 0,002 b	0,09 $\pm$ 0,003 a	60,87
Consórcio 3 (C3)	23	0,27 $\pm$ 0,0008 a	0,09 $\pm$ 0,002 a	66,67

Água (C4)	-	0,1 0 ± 0,003 c	0,09 ± 0,002 a	10,00
<b>DMS</b>	-	<b>0,01</b>	<b>0,001</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,53</b>	<b>0,06</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	0,18 ± 0,01 ab	0,10 ± 0,003 ab	44,44
Consórcio 2 (C2)	14	0,17 ± 0,01 b	0,09 ± 0,0004 b	47,06
Consórcio 3 (C3)	23	0,17 ± 0,003 b	0,13 ± 0,002 a	23,53
Água (C4)	-	0,21 ± 0,002 a	0,09 ± 0,002 b	57,14
<b>DMS</b>	-	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,10</b>	<b>0,19</b>	-

Dentro de cada tempo de incubação da torta, as médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.3.7 Turbidez antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso

A turbidez expressada em NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez) foi realizada antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso do tempo 1 de incubação representado na tabela 15. Determinou-se que existiu maior remoção no tratamento em que usou-se como inóculo o consórcio 3 de bactérias, 55,49% de remoção.

As análises estatísticas destes valores se deram usando o teste de Tukey ao 5%, encontrando-se dois níveis de significância nos tratamentos antes da digestão e quatro níveis nos tratamentos depois da digestão anaeróbica.

Determinou-se que existiu maior remoção, com 59,06%, no tratamento em que usou-se como inóculo o consórcio 1. As análises estatísticas destes valores se deram usando o teste de Tukey ao 5%, encontrando-se três níveis de significância nos tratamentos antes da digestão e dois níveis nos tratamentos depois da digestão anaeróbica.

Na tabela 15, mostra que em todos os tratamentos existiu redução na porcentagem da remoção de turbidez, depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso, o que indica que existiu uma redução na carga orgânica, mas não existiu uma relação com a quantidade e produção de gás metano nos valores mostrados. Os presentes resultados serviram como parâmetro de avaliação das normas ambientais.

**Tabela 15** – Turbidez antes e depois da digestão anaeróbica da torta de pinhão manso. Médias de três repetições  $\pm$  o desvio padrão.

Inóculos	N° de isol. bact	Turbidez NTU (antes da digestão)	Turbidez NTU (depois da digestão)	Remoção em relação ao inicial %
<b>Torta incubada por 6 meses (T1)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	101,27 $\pm$ 3,87 b	57,00 $\pm$ 1,19 c	43,71
Consórcio 2 (C2)	14	136,33 $\pm$ 4,92 a	65,90 $\pm$ 1,35 a	51,66
Consórcio 3 (C3)	23	137,33 $\pm$ 8,26 a	61,13 $\pm$ 0,90 ab	55,49
Água (C4)	-	101,33 $\pm$ 1,25 b	58,63 $\pm$ 4,90 abc	42,14
<b>DMS</b>	-	<b>18,37</b>	<b>8,68</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,17</b>	<b>0,06</b>	-
<b>Torta incubada por 18 meses (T2)</b>				
Consórcio 1 (C1)	9	142,33 $\pm$ 6,13 a	58,27 $\pm$ 1,44 b	59,06
Consórcio 2 (C2)	14	108,67 $\pm$ 4,71 b	65,90 $\pm$ 2,16 a	39,36
Consórcio 3 (C3)	23	136,33 $\pm$ 11,15 a	66,83 $\pm$ 0,87 a	50,98
Água (C4)	-	124,00 $\pm$ 4,32 ab	56,53 $\pm$ 4,27 b	54,41
<b>DMS</b>	-	<b>21,61</b>	<b>7,56</b>	-
<b>CV (%)</b>	-	<b>0,12</b>	<b>0,08</b>	-

Dentro de cada tempo de incubação da torta, as médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O substrato da torta de pinhão manso, independentemente do tempo de incubação, com ou sem inóculo de bactérias, tem capacidade de gerar gás entre 54,17 e 86,67 mL, após 21 dias de digestão anaeróbica.

O tempo 2 (18 meses) de pre-incubação da torta de pinhão manso foi mais adequado que o tempo 1(6 meses) para produzir gás metano.

O inóculo formado pelo consórcio 2 de bactérias isoladas da torta de pinhão manso foi o melhor.

O substrato do Tempo 2 de incubação (18 meses) usando água como tratamento controle teve maior geração de biogás sendo de 83,67 mL durante os 21 dias a 30°C, mas menor produção de CH<sub>4</sub>.

Na torta do Tempo 2 de incubação (18 meses) usando como inóculo o consórcio 3 apresentou maior concentrações de nutrientes no substrato depois da digestão anaeróbica.

O processo de biodigestão anaeróbica da torta de pinhão manso removeu cor, turbidez, sólidos totais, sólidos fixos e sólidos voláteis em todos os tratamentos, indicando redução na carga orgânica.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, A; FILHO, J; GODOI, A; CARMO, C; EDUARDO, J. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, suplemento especial p.260-258, 2008.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 10664. Águas - Determinação de Resíduos Sólidos- método gravimétrico. Rio de Janeiro. 14p. 1989.

ABOU-ARAB, A; ABU-SALEM, F. Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their anti-nutritional factors. Egito. **African Journal of Food Science**, 2009

AHRING, B.K.. Perspectives for anaerobic digestion. Advances in Biochemistry Engineering/Biotechnology. Springer Science & Business Media. - Verlag Berlin, 81:1-30, 2003.

ANEEL (2008). Procedimentos de Distribuição de Energia Elétrica no Sistema Elétrico Nacional. Módulo 3 – Acesso ao Sistema de Distribuição. Brasília, 2008.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Arlington, Virgínia. v. 1.,1990.

AZEVEDO, F. G. Estudo das condições ambientais para produção de Biogás a partir de glicerol co-produto do Biodiesel. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco – Campus de Recife – PE – Área de Concentração Engenharia Química, Recife, PE, 2010.

BEERENS P. *Jatropha* handbook 2d edition. Chapter 4 (of 6) Oil pressing and purification. **FACT Foundation**. Holanda. ISBN 978-90-815219-1-8, 2009.

BLEY, C; LIBÂNIO, J; GALINKIN, M; OLIVEIRA, M. Agroenergia da biomassa residual. Itaipu Binacional, 2. Brasil. 2009.

BOATENG, C; TEONG, L; JITKANG, L. Comparative exergy analyses of *Jatropha curcas* oil extraction methods: Solvent and mechanical extraction processes. Malaysia. **Energy Conversion and Management**, 55, 164-171. 2012.

BOE, K; IRINI, A. Online monitoring and control of the biogas process. **Doctoral dissertation**. Technical University of DenmarkDanmarks

- Tekniske Universitet, Department of Systems Biology Institut for Systembiologi, 2006.
- CASTANHO, D; ARRUDA, H. Biodigestores. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil. ISSN: 1981-366X / v. 02 n. 21, 2008.
- CERQUEIRA, L; PRATES, M; FARIA, R; ALVES, C; NOBRE, S. Microrganismos sobreviventes em coproduto de pinhão manso e atividade antagonista sobre *Trichoderma spp.* e *Clonostachys rósea*. **Forum FEPEG**, 2014.
- CHANDRA, R; VIJAY, V; SUBBARAO, P; KHURA, T. Production of methane from anaerobic digestion of *Jatropha* and pongamia oil cakes. **Applied Energy**. India. 12p, 2011.
- CLEVELAND, C. Handbook of Energy: Chronologies, Top Ten Lists, and Word Clouds. Volume II: Chronologies, Top Ten Lists, and Word Clouds. Section 2 – Biomass. **Elsevier** 15–28, 2014.
- CONAMA, Nº. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** 18.03, 2005.
- DEGANUTTI, R.; PALHACI, M. C. J. P.; ROSSI, M.; TAVARES, R; SANTOS, C. Biodigestores Rurais: modelo indiano, chinês e batelada. An. 4. **Enc. Energ. Meio Rural**, 2002.
- DIVAKARA, B; UPADHYAYA H; WANI S; GOWDA, L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**. 87, 732–742, 2010.
- EL-MASHAD, H, ZEEMAN, G; VAN LOON, W; GERARD, B; LETTINGA, G. Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. **Bioresource Technology**, 95,191, 2004.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA-EPE. Balanço Energético Nacional 2014. Relatório Síntese. Ministério de Minas e Energia, Rio de Janeiro. 2014.
- FERREIRA, D. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais. Apostila de Curso. Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.

GRIMSBY, L; FJORTOFT, K; AUNE, J. Nitrogen mineralization and energy from anaerobic digestion of *Jatropha* press cake. Germany. **Energy for Sustainable Development**. Noruega. 5p, 2013.

GRUBER, G. Pure *Jatropha* Oil for Power Generation on Floreana Island/Galapagos: Four years experience on engine operation and fuel quality. **Journal of Energy and Power Engineering**. 8, 929-938, 2014.

HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1 ed. Roma: IPGRI, 66 p., 1996

HIFJUR R, SUBHRAJIT M. Biogas production potential of *Jatropha* seed cake. India. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 37: 25–30, 2012.

IICA. Sistematización de experiencias del Proyecto Piñón para Galápagos. Ecuador. 87 p. 2013.

KUMAR, A; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. India. **Industrial crops and products**. 28, 1–10, 2008.

KUNZ, A.; OLIVEIRA, L. Sistema e método de análise química qualitativa e quantitativa de gás. P.I. 0706174-9 (Patente). 2009.

LEITE, V. D; LOPES, W; SOUSA, J; PRASAD, S; SILVA, S. Tratamento anaeróbico de resíduos sólidos orgânicos com alta e baixa concentração de sólidos. **Revista Brasileira de engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande – v.13, n.2, p.190–196, 2009.

LIU, J; OLSSON, G; MATTIASSON, B. On-line monitoring of a two-stage anaerobic digestion process using a BOD analyzer. **Journal of Biotechnology** 109, 263–275, 2004.

MAAMRI, S; AMRANI, M. Biogas production from waste activated sludge using cattle dung inoculums: Effect of total solid contents and kinetics study. **ScienceDirect**, Energy Procedia 50, 352 – 359. 2014.

MAKKAR, H; BECKER, K; SPORER, F; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **J Agric Food Chem** 45:3152–3157,1997.

MAO, CH; FENG, Y; WANG, X; REN, R. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 45, 540–555. 2015.

MENDOZA, H; CAÑARTE, E; RODRÍGUEZ, M; LÓPEZ, J. O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) uma alternativa para áreas marginais secas. INIAP E.E. Portoviejo. (Folding informativo # 341). Equador. 6p. 2008

MENDOZA, J; RODRÍGUEZ, M; LÓPEZ, J; MEJÍA, N; ZAMBRANO, F. Tecnologias para o uso do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como fonte de biocombustíveis em terras marginais da costa seca equatoriana. INIAP-EPN-IICA. **Boletim Técnico N° 136**. Equador, 16p. 2009.

MENDOZA, J; LÓPEZ, J; MEJÍA, N; ZAMBRANO, F; GARCÍA, P. Manual de manejo de cercas vivas de Piñón. INIAP. Ecuador. **Manual N° 86**. Equador, 12p. 2010.

MIURA, A; FORMAGGIO, A; SHIMABUKURO, Y; DOS ANJOS, S; LUIZ, A. Avaliação de áreas potenciais ao cultivo de biomassa para produção de energia e uma contribuição de sensoriamento remoto e sistemas de informações geográficas. Brasil. Eng. **Agríc., Jaboticabal**. 2010.

MIYAZAWA, M; PAVAN, M; MURAOKA, T; CARMO, C; MELLO, W. Análises químicas de tecido vegetal. In: Silva, F. C. (org.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA. p.172-223, 1999.

MORAES, L. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lodos de esgoto provenientes de reatores anaeróbios seqüenciais. Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP Faculdade de Engenharia Agrícola–FEAGRI, 2005.

NOGUEIRA, L. A. H., Biodigestão a Alternativa Energética. Nobel. São Paulo 1992.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**.19, 1-15. USA, 2000.

ORTOLANI, A.F.; BENINCASA, M.; JUNIOR, J.L. Biodigestores rurais: Modelos Indiano, Chinês e Batelada. **Jaboticabal**: FCAV, UNESP, 35p, 1991.

PANDEY, V; SINGH, K; SINGH, J; KUMAR, A; SINGH, B; SINGH, R. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. Índia. **Renewable and Sustainable Energy**, 2012

PEIXOTO, A.R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 282p.

PIVELI, R; KATO M. Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos. Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos. ABES, 2006.

RAHEMAN, H; MONDAL, S. Biogas production potential of *Jatropha* seed cake. India. 6p, 2012.

RUIZ, J; JUÁREZ, M;MORALES, M;MUÑOZ, P; MENDÍVIL, M. Biomass gasification for electricity generation: review of current technology barriers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 18, 174-183. 2013.

SAETAE, D; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20, 319–324, 2010.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIKA, J. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) **Informe Agropecuário**, v.26, n.229, p.44-78, 2005.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperations in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 61, 262- 280. 1997.

SELANON, O.; SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Utilization of *Jatropha curcas* seed cake as a plant growth stimulant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 114-120, 2014. ISSN 1878-8181.

SHIVANI, P; KHUSHBU, P, FALDU, N; THAKKAR, B; SHUBRAMANIAN, R. Extraction and analysis of *Jatropha curcas* L. seed oil. India. **Academic Journals**, 2011.

SOUZA, A; FÁVARO, S; ÍTAVO, L; ROSCOE, E. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.10, p.1328-1335, out. 2009.

STAUBMANN, R; FOIDL, G; FOIDL, N; GUBITZ, G; LAFFERTY, R; VALENCIA, V; STEINER, W. Biogas Production from *Jatropha curcas* Press-Cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Nicaragua, 1997.

SURENDRA, K; TAKARA, D; HASHIMOTO, A; KHANAL, S. Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. USA. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 31, 846–859, 2014.

TEIXEIRA, E; YADA, M; POÇAS, E; COSTA, A; BALOTA, E. Efeito da adição de tortas de oleaginosas e ureia no solo sobre a atividade microbiana. **Synergismus scyentifica**. UTFPR. Pato Branco, 04 (1), 2009.

TELENCHANO, F. Diseño de un biodigestor de “bolsa flexible” con desechos de ganadería, en la comunidad Shobol Llin Llin. **Tese de graduação**. Escuela superior politecnica de Chimborazo. Equador. 150 p. 2013.

UENO, C Biodigestão de vinhaça para produção de biogás e reaproveitamento agrícola. **Dissertação programa de pós-graduação em Bioenergia**. Maringá. Brasil. 64p, 2012.

VAZ, L; KLEN, M; VEIT, M; SILVA, E; BARBIERO, T; BERGAMASCO, R. Avaliação da eficiência de diferentes agentes coagulantes na remoção de cor e turbidez em efluente de galvanoplastia. **Eclética Química**, 35(4), 45-54. 2010.

VISUAL COMPARISON METHOD. In: STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, p. 2:6-7 (Method 2120 B). 2012.

WALKLEY, A; BLACK I.A. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Sci.**63:251-263. 1934.

ZAMBRANO, F. Caracterização agrônômica e molecular de coleção de pinhão (*Jatropha curcas* L.) na Estação Experimental Portoviejo de INIAP. **Tese de graduação**. Equador, 113p. 2010.

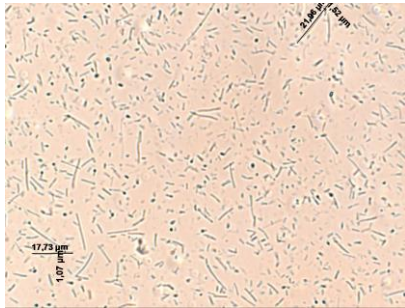
ZENATTI, D. C. Tratamento e aproveitamento de resíduos da produção de biodiesel: água residuária e glicerol. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE, 2011.

ZIEMINSKI, K; FRAC, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: transformations, stages and microorganisms. **Afr J Biotechnol**;11:4127–39, 2012.

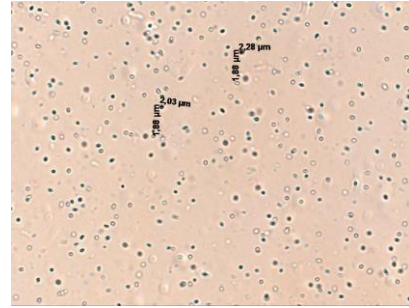
## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

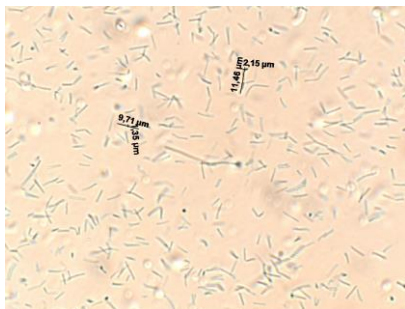
Isolados bacterianos da torta de pinhão manso do tempo 1 (T1) de incubação



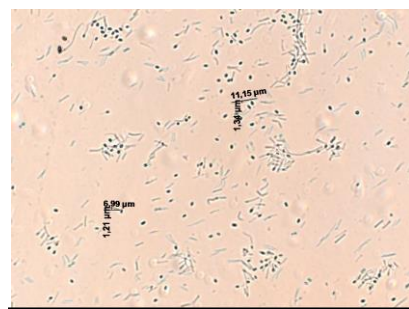
T1-1 (17,7 μm)



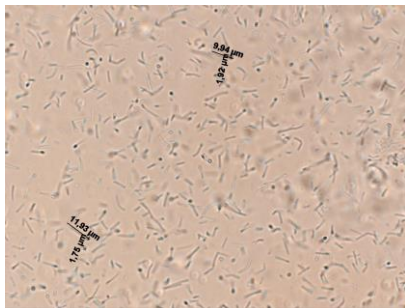
T1-2 (2,2 μm)



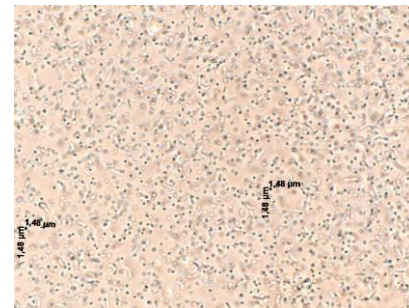
T1-3 (11,4 μm)



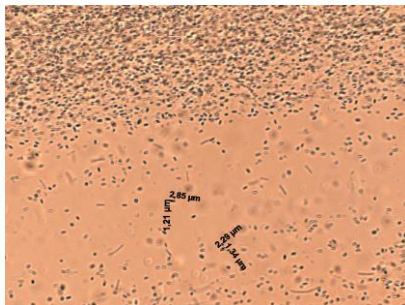
T1-4 (11,1 μm)



T1-5 (11,9 μm)



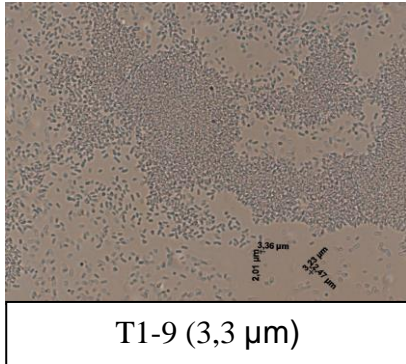
T1-6 (1,4 μm)



T1-7 (2,8 μm)



T1-8 (2,4 μm)



### APÊNDICE B

Isolados bacterianos da torta de pinhão manso do tempo 2 (T2) de incubação

