

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
BIOPROCESSOS

Dissertação de Mestrado



JÚLIA CUNHA DE CASTRO

EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ORIGEM BIOLÓGICA
PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS POR DIGESTÃO ANAERÓBICA

RIO DE JANEIRO

2023

Júlia Cunha de Castro

EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ORIGEM BIOLÓGICA
PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS POR DIGESTÃO ANAERÓBICA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu

Rio de janeiro

2023

Dedico este trabalho ao meu avô João e a minha avó Anna. Minhas primeiras referências de respeito à natureza, bondade e trabalho duro e honesto. Com certeza estão sorrindo assistindo a sua “guriazinha” neste momento.

Agradecimentos

No mundo das artes, é comum fazer uma espécie de “oração” com o elenco antes de entrar no palco. Depois desses ainda poucos anos no mundo da academia, ousou fazer uma breve licença poética:

“Seguro minha mão na sua, para que juntos possamos fazer o que eu não posso e não quero fazer sozinha. Ciência”

Agradeço a Deus por ter colocado cada uma das pessoas a seguir que seguraram a minha mão nesses últimos anos e sem as quais não poderia ter chegado até aqui.

Primeiramente a meus pais, que nunca pouparam esforços para me apoiar das mais diversas formas em todos os projetos que eu me envolvi. Cada conquista e cada vitória que eu tiver nessa vida é resultado de muitas madrugadas acordando para trabalhar, plantões no hospital e na ilha de edição, batalhas e muita coragem para buscar uma vida de qualidade para nós três. Cada conquista é resultado de inúmeros ensaios, apresentações, abraços em meio aos surtos acadêmicos e um apoio incondicional para literalmente todos os sonhos que eu tive. Para sempre nós: três pessoas que se amam.

Agradeço à Professora Fernanda por sua orientação, pelas oportunidades e pela confiança. É o tipo de profissional admirada por todos seus alunos e colegas, e a referência de cientista que eu gostaria de ser um dia.

Às minhas famílias, de sangue e de coração, as quais eu poderia escrever outra dissertação só para citar todos os nomes. Obrigada pelo apoio, independente de qualquer distância ou tempo, vocês me ensinaram que lar é onde nos sentimos amados.

Aos meus amigos, em especial Alice, Luiza, Amanda, Vinicius, Bernardo e Julia. Cada um, ao seu modo, me ajudou a chegar até aqui e me fez lembrar tantas vezes o quanto a vida é boa com alguém para rir, reclamar e até fofocar junto. Incluo aqui também o time de vôlei da Biologia UNIRIO, o Clã da Jabuticaba e o grupinho das Histonas. E ao Pedro, pelo seu apoio, carinho e compreensão infinitos, por me ouvir e me apoiar em cada segundo desses últimos dois anos.

À equipe LaBMax, que fez com que todos os desafios fossem mais fáceis com muita parceria e cooperação. Agradeço em especial meus verdadeiros anjos da guarda Jefferson, Igor e Dirlei que não pouparam ajudas e conselhos em todos os meus momentos de dúvidas (científicas ou não) e junto da Ligia, Juliana e Rogerio por todas as risadas, apoios e conversas na hora do café. “Está muito ocupado?”

Agradeço à Dra. Rose, por ter me ajudado a chegar até aqui sã e saudável com seu trabalho e carinho inigualável comigo.

Agradeço ao Professor Alex Prast, pela sua colaboração sempre com muito entusiasmo com nosso laboratório e que resultou neste projeto com o qual eu me identifico tanto e por todas as oportunidades que vem buscando para fazer esse e outros projetos possíveis.

Agradeço à Helena, pela gentileza e por toda a paciência com minhas inúmeras dúvidas. Junto com a Gabi e a equipe do laboratório do Prof. Alex em Linköping, que foram essenciais para os experimentos realizados nesse trabalho.

Agradeço ao professor Humberto e seus alunos Douglas e Manuela, pela gentileza, dúvidas esclarecidas e pela colaboração que, espero, esteja apenas começando.

Ao seu Edir do LEMM, provavelmente uma das pessoas mais gentis e dispostas a ajudar a todos que o CCS já viu.

Agradeço à UniMicro e ao CENABIO, onde fiz as imagens de microscopia desse trabalho e por serem parte importante da minha formação.

Agradeço a UFRJ e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, onde realizei a iniciação científica, o mestrado e os projetos que resultaram nesta dissertação.

Agradeço às agências de fomento Faperj, Fapesp, Capes e CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa.

Agradeço à banca de avaliação Prof. Andrew Macrae, Prof. Vinicius Peruzzi e Profa. Erika Pinheiro. Agradeço e revisão minuciosa da Profa. Lucy Seldin e a disponibilidade da Profa. Dirlei Nico.

*Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes
Assim em cada lago
a lua toda brilha, porque alta vive.*

-Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

Resumo

de Castro, Júlia Cunha. Emprego de nanopartículas magnéticas de origem biológica para o aumento da produção de biogás por digestão anaeróbica. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2023.

Nas últimas décadas, a demanda para o uso de energias sustentáveis e renováveis vem crescendo. Destaca-se, dentre elas, a produção de biogás a partir de resíduos orgânicos, gerado em um complexo processo denominado digestão anaeróbica (DA). A DA apresenta diversas vantagens econômicas e ambientais, contudo, ainda alguns desafios na eficiência e estabilidade do processo desencorajam o investimento de empresas e governos nessa fonte de energia. São propostas, então, estratégias que permitam contornar tais dificuldades, sendo uma opção promissora, a adição de nanopartículas (NPs) no digestato durante o processo de produção do biogás. O aumento na produção de biogás com a adição de NPs parece estar relacionado ao suprimento de alguns elementos importantes para os microrganismos envolvidos no processo, mas principalmente à melhoria do processo de transferência direta de elétrons interespécies (DIET), atividade importante na produção e qualidade do biogás. Na natureza, um grupo de microrganismos denominados bactérias magnetotáticas (BMs) são capazes de produzir nanoestruturas de magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4) envoltas por membrana e alinhadas em cadeia na célula, conhecidas como magnetossomos. Essas estruturas, denominadas neste trabalho como “nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs)”, despertam grande interesse biotecnológico devido a sua membrana biológica, alta pureza química, perfeição cristalográfica e formatos e tamanhos estritos. Além disso, sua produção é um processo sustentável e economicamente vantajoso, e apresentam potencial de recuperação magnética. Frente a este potencial, o objetivo do trabalho é analisar o impacto de diferentes NPs relatados na literatura e comparar experimentalmente o efeito da adição de NMOBs e NPs sintéticas (NPSs) em diferentes substratos na DA. Os resultados foram divididos em dois eixos: a meta-análise da literatura e os resultados experimentais de adição de NMOBs e NPSs na DA. Através da meta-análise foi demonstrado o impacto de NPs de diferentes composições, tamanhos e concentrações na produção de CH_4 por DA. Foi

observada a superioridade de nanopartículas de cobalto, ferro e magnetita no aumento da produção de CH₄, sendo comparado parâmetros descritos e seus maiores benefícios. As NPs de magnetita foram as mais empregadas e com melhores efeitos para todos os substratos observados. Foi demonstrado também que a adição de algumas composições de NPs, como óxido de zinco e óxido de cobre, estão mais relacionadas a efeitos inibitórios à metanogênese. Foi demonstrado que o aumento na concentração e no tamanho das NPs empregadas não acarreta diretamente em melhores resultados na produção de CH₄. Também foi possível observar faixas ótimas de tamanho e concentração. Foi demonstrado também a importância de se padronizar as informações mínimas necessárias nesse tipo de trabalho. Também foi possível discutir algumas relações entre as condições geopolíticas globais e a origem dos trabalhos analisados. No segundo eixo, experimentos pilotos foram realizados de maneira a explorar a potencial aplicação de NMOBs na DA para o aumento da produção de biogás. Os resultados inéditos indicam possíveis benefícios da adição de NMOBs na produção de biogás e, apesar de ainda pouco conclusivos, estes foram (até onde se sabe) os primeiros experimentos envolvendo NMOBs e biogás. Foi demonstrado, portanto, que BMs e NMOBs possuem grande potencial de inovação biotecnológica na produção de energia verde. Os resultados da meta-análise combinados aos dados experimentais indicam também que os impactos na adição de NPs e NMOBs estão relacionados a características dos substratos, que influenciam diretamente no perfil da comunidade microbiana. Ressaltam, ainda, a importância de análises multifatoriais para o desenvolvimento e evolução dessa fonte de energia. No futuro, novos testes serão realizados de modo a esclarecer mais detalhes, bem como explorar mais aplicações da NMOBs e BMs para a otimização da produção de biogás. Por fim, é possível compreender que a tecnologia para a produção de biogás por DA é uma tecnologia altamente multidisciplinar, sendo imperativo que haja a colaboração entre diferentes áreas de modo a evoluir de maneira mais completa a compreensão a respeito dessa promissora solução de sustentabilidade.

Palavras-chave: energia renovável, biogás, digestão anaeróbica, nanopartículas, magnetossomos

Abstract

de Castro, Júlia Cunha. Emprego de nanopartículas magnéticas de origem biológica para o aumento da produção de biogás por digestão anaeróbica. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2023.

In recent decades, the demand for the use of sustainable and renewable energy has been growing. Among them, the production of biogas from organic waste, generated in a complex process called anaerobic digestion (AD), stands out. AD has several economic and environmental advantages, however, there are still some challenges in the efficiency and stability of the process that discourage investment by companies and governments in this energy source. Strategies are then proposed to overcome such difficulties, with a promising option being the addition of nanoparticles (NPs) to the digestate during the biogas production process. The increase in biogas production with the addition of NPs seems to be related to the supply of some important elements for the microorganisms involved in the process, but mainly to the improvement of the interspecies direct electron transfer (DIET) process, an important activity in the production and quality of the biogas. In nature, a group of microorganisms called magnetotactic bacteria (BMs) are able to produce nanostructures of magnetite (Fe_3O_4) or greigite (Fe_3S_4) surrounded by a membrane and aligned in a chain in the cell, known as magnetosomes. These structures, named in this work as “magnetic nanoparticles of biological origin (NMOBs)”, arouse great biotechnological interest due to their biological membrane, high chemical purity, crystallographic perfection and strict shapes and sizes. In addition, their production is a sustainable and economically advantageous process, and they have potential for magnetic recovery. Faced with this potential, the objective of this work is to analyze the impact of different NPs reported in the literature and experimentally compare the effect of adding NMOBs and synthetic NPs (NPSs) in different substrates on AD. The results were divided into two axes: the meta-analysis of the literature and the experimental results of adding NMOBs and NPSs in AD. Through meta-analysis, the impact of NPs of different compositions, sizes and concentrations on CH_4 production by AD was demonstrated. The superiority of cobalt, iron and magnetite nanoparticles in increasing CH_4 production was observed, comparing described parameters and their greatest benefits.

Magnetite NPs were the most used and with the best effects for all observed substrates. It was also demonstrated that the addition of some NPs compositions, such as zinc oxide and copper oxide, are more related to inhibitory effects on methanogenesis. It was demonstrated that the increase in the concentration and size of the employed NPs does not directly result in better results in the production of CH₄. It was also possible to observe optimal ranges of size and concentration. The importance of standardizing the minimum information required in this type of work was also demonstrated. It was also possible to discuss some relationships between global geopolitical conditions and the origin of the works analyzed. In the second axis, pilot experiments were carried out in order to explore the potential application of NMOBs in AD to increase biogas production. The unpublished results indicate possible benefits of adding NMOBs in the production of biogas and, although not yet conclusive, these were (as far as we know) the first experiments involving NMOBs and biogas. It was demonstrated, therefore, that BMs and NMOBs have great potential for biotechnological innovation in the production of green energy. The results of the meta-analysis combined with experimental data also indicate that the impacts of adding NPs and NMOBs are related to substrate characteristics, which directly influence the profile of the microbial community. They also emphasize the importance of multifactorial analyzes for the development and evolution of this energy source. In the future, new tests will be carried out in order to clarify more details, as well as explore more applications of NMOBs and BMs for the optimization of biogas production. Finally, it is possible to understand that the technology for the production of biogas by AD is a highly multidisciplinary technology, and it is imperative that there is collaboration between different areas in order to evolve in a more complete way the understanding about this promising sustainability solution.

Key words: renewable energy, biogas, anaerobic digestion, nanoparticles, magnetosomes

Lista de abreviaturas

BMs: Bactérias magnetotáticas

C/N: Relação carbono/nitrogênio

DA: Digestão anaeróbica

DIET: Transferência direta de elétrons interespecies (do inglês *direct interspecies electron transfer*)

GEEs: Gases do efeito estufa

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MGC: Agrupamento de genes do magnetossomo (do inglês *magnetosome gene cluster*)

NMOBs: Nanopartículas magnéticas de origem biológica

NPs: Nanopartículas

NPSs: Nanopartículas sintéticas

ONU: Organização das Nações Unidas

PCA: Análise de componentes principais (no inglês *principal components analysis*)

TWh: Terawatts-hora

ZVI: Ferro zero valente ou ferro de valência zero

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Sustentabilidade e os desafios da energia limpa	18
1.2 Biogás	19
1.2.1. A digestão anaeróbica	20
1.2.2. Sintrofia na DA	23
1.2.3. Desafios na produção de biogás por DA	25
1.2.4. Estratégias para otimização da produção de biogás por DA	26
1.2.5. Nanopartículas	27
1.3. Bactérias magnetotáticas e magnetossomos	29
1.3.1 Bactérias magnetotáticas	29
1.3.2. Magnetossomos	31
1.3.3. Aplicações biotecnológicas	32
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Meta-análise de trabalhos envolvendo o uso de NPs no processo de DA	37
4.1.1. Palavras-chave, triagem e preenchimento da tabela:	37
4.1.2. Análises estatísticas	38
4.2. Produção de NMOBs	39
4.2.1. Meio de cultura e cultivo em biorreator	39
4.2.2. Extração de NMOBs	39
4.3. Adição de magnetossomos e NPs sintéticas em digestatos de diferentes digestores anaeróbicos.	40
4.3.1 Obtenção e caracterização de lodo ativado	40
5. RESULTADOS	42
5.1. Meta-análise	42
5.1.1. Análise descritiva	42
5.1.2. Impacto de NPs de diferentes composições na produção de CH ₄ e análises estatísticas	44
5.1.3.1 Análise de componentes principais (PCA) das características de NPs	48

5.1.3.2. Impacto do tamanho das NPs na produção de CH ₄	49
5.1.3.3. Impacto da concentração de adição de NPs na produção de CH ₄	50
5.1.4. Magnetita, Ferro e cobalto	50
5.1.5. Magnetita.....	53
5.1.5.1 Tamanho e concentração da magnetita.....	53
5.1.5.2. Funcionalização de NPs de magnetita.....	55
5.2. Efeito de NMOBs na produção de biogás.....	56
5.2.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de NMOBs e NPSs	56
5.2.2. Adição de NMOBs e NPSs em amostras de digestatos de reatores anaeróbicos	57
6. DISCUSSÃO	62
6.1. Meta-análise e as melhores condições de adição de NPs na DA	62
6.1.1. Publicações, países, e dados das NPs.....	62
6.1.2. Impacto da composição, concentração e tamanhos das NPs na produção de CH ₄	63
6.1.3. Magnetita	67
6.1.3.1. Tamanho e concentração	67
6.1.3.2. Funcionalização.....	69
6.2. Efeito de NPSs e NMOBs na produção de biogás e CH ₄ em digestatos provenientes de digestores anaeróbios	70
6.2.1. NMOBs e NPSs	70
6.2.2. Efeito de NMOBs e NPSs em diferentes digestatos	72
7. CONCLUSÃO	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Lista de Figuras

- Figura 1. Diagrama ilustrativo dos limites planetários em 2015. Status atual das variáveis de controle dos limites planetários. A zona verde é o espaço operacional seguro, o amarelo representa a zona de incerteza (risco crescente) e o vermelho é uma zona de alto risco. O limite planetário está em a interseção das zonas verdes e amarelas. Processos para os quais os limites de nível global ainda não podem ser quantificados são representados por zonas cinza. Imagem traduzida de STEFFEN *et al.* (2015).....19
- Figura 2. Esquema da degradação metanogênica de matéria orgânica em 4 fases. Figura adaptada de DENG *et al.* (2020).....22
- Figura 3. Ilustração representando as formas de transferência de elétrons interespecies de que podem ocorrer através de estruturas celulares (pili condutor) (A), proteínas transportadoras (B) ou material condutor (C). Imagem traduzida de KUMAR *et al.* (2021).....24
- Figura 4. Efeitos de NPs em sistemas de digestão anaeróbica. Figura traduzida de HASSANEIN *et al.* (2021).....28
- Figura 5. Morfologia de BMs. Microscopia eletrônica de transmissão (A-C, E-F) e de varredura (D e G) A-B) cocóide, C) vibrião, D) multicelular esférico, E) espirilo, F) bacilar, G) multicelular elipsoide. A) com barra de escala de 300 nm. B) E) e F) com barras de escala medindo 500 nm. C) com barra de 200 nm. D) e G) Barra de escala medindo 2 μ m. Todas as imagens, exceto F, foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPPG, UFRJ.....30
- Figura 6. Representação esquemática de um magnetossomo funcionalizado de acordo com cada aplicação descrita na literatura (separação de células; hipertermia, liberação de fármaco, contraste de imagem, análise de alimentos, imobilização e biorremediação enzimática e recuperação/detecção de DNA e antígeno). Imagem traduzida de VARGAS *et al.* (2018)....33
- Figura 7. Esquema ilustrativo da produção e extração de NMOBs. Células de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1T são cultivadas anaerobicamente em meio líquido com óxido nitroso (N₂O) como aceptor final de elétrons e FeSO₄ (100 μ M) como fonte de ferro a 28°C, em um

biorreator de bancada e, então, lisadas utilizando diferentes métodos físicos ou químicos. Os magnetossomos são recuperados utilizando concentração e separação magnética. Imagem traduzida de VARGAS *et al.* (2018).....34

Figura 8. Evolução do número de publicações e citações de trabalhos envolvendo biogás por digestão anaeróbica e NPs. Figura elaborada a partir dos dados disponíveis na base de dados *Web of Science*.43

Figura 9. Mapa da distribuição da origem dos trabalhos empregados na meta-análise. As cores representam a quantidade de artigos publicados pelo país incluídos na meta-análise.....44

Figura 10. Comparação do impacto de diferentes composições de NPs. As barras indicam o desvio padrão (SD) em relação à média (pontos centrais) das amostras. Dados já filtrados pela identificação de *outliers* ROUT; *n* indica o número de observações.....45

Figura 11. Comparação do impacto de diferentes composições de NPs por categoria de substrato. Agricultura (A); Resíduo animal (B); Biomassa aquática (C); Co-digestão (D); Resíduo industrial (E); Resíduo municipal (F); Sintético (G).....46

Figura 12. Gráficos de distribuição da frequência de emprego de tamanhos e concentrações de NPs nos trabalhos avaliados na meta-análise. Regiões mais estreitas apontam valores menos frequentes no banco de dados enquanto regiões mais largas apontam maior quantidade de observações com respectivos valores. (A) Gráfico de frequência com valores brutos de tamanhos empregados; (B) Gráfico de frequência com valores brutos de concentrações empregadas; (C) Gráfico de frequência com valores de tamanhos tratados pelo método ROUT de identificação de *outliers*; (D) Gráfico de frequência com valores de tamanhos tratados pelo método ROUT de identificação de *outliers*.....47

Figura 13. PCA de parâmetros dos experimentos analisados. Sumário de PC1 (37,745%) e PC2 (32,834%) explicam, em conjunto, 70,58% da variação contida nos dados (B). Tabela de peso e direção (positivo e negativo) dado entre os vetores “tamanho”, “concentração” e “RR” (C).....48

Figura 14. Gráfico de superfície 3D (A) e de contorno (B) gerada a partir da Estimativa de Densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de metano (RR CH₄) em função da variação do tamanho das NPs (nm) empregadas nos experimentos analisados.....49

Figura 15. Gráfico de superfície 3D (A) e de contorno (B) gerada a partir da Estimativa de Densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de metano (RR CH₄) em função da variação de concentração empregada nos experimentos analisados.....50

Figura 16. Gráficos de dispersão do impacto na produção de CH₄ em diferentes substratos testados para NPs de magnetita (A e B), ferro (C e D) e cobalto (E e F) frente a variação de tamanho (A, C e E) e concentração de NPs (B, D e F). As cores de cada ponto indicam a categoria de substrato testada.....51

Figura 17. Gráfico de superfície 3D (A e C) e de contorno (B e D) a partir do estimador de densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de CH₄ (RR CH₄) em função a variação de (A e B) Concentração (mg/L) e (C e D) Tamanho (nm).....52

Figura 18. Distribuição de tamanhos de NPs de magnetita e seu impacto na DA; Impactos entre três faixas de tamanho na produção de CH₄ (A); Gráfico de dispersão de impactos na produção de CH₄ (RR) de NPs menores que 50 nm em função da concentração adicionada (B); Gráfico de dispersão de impactos na produção de CH₄ (RR) de NPs entre 50 e 100 nm em função da concentração adicionada (C).....55

Figura 19. Comparação do aumento na produção de CH₄ (RR) entre NPs de magnetita puras e funcionalizadas. As barras representam o desvio padrão dos dados de cada um dos grupos.....56

Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão (A e B) das NMOBs da cepa *Magnetovibrio blakemorei* MV-1^T; (C e D) NPSs obtidas comercialmente (Sigma-Aldrich. EUA; Ref:1317-61-9). É possível observar a diferença de uniformidade e de perfeição cristalográfica entre as NMOBs, em menor e maior aumento (A e B, respectivamente) e NPSs em maior e menor aumento (C e D respectivamente), além da tendência a formar agregados pelas NPSs (C e D).....57

Figura 21. Produção de CH₄ ao longo do experimento na primeira rodada de experimentos utilizando digestatos provenientes de digestores anaeróbicos de esterco em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está representado pelos pontos de cor verde. A, B, C e D representam diferentes Plantas de digestores anaeróbicos fontes do lodo, nesta rodada de experimentos, todos os lodos empregados eram provenientes de Plantas operando com esterco animal como substrato.....59

Figura 22. Concentração de CH₄ ao longo do período de incubação de lodos anaeróbicos na segunda rodada de experimentos em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está representado pelos pontos de cor verde. (A) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (B) Lodo de digestor operando com esterco animal como substrato; (C) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (D) Lodo de digestor operando com resíduo de esgoto municipal como substrato.....61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sustentabilidade e os desafios da energia limpa

O termo sustentabilidade foi usado oficialmente pela primeira vez em 1979 na Assembleia Geral das Nações Unidas e assumido pelos governos em 1987 com a publicação do documento “*Our Common Future*” sob a coordenação da primeira ministra da Noruega, Gro Brundland. O termo tem como base a ideia de um “desenvolvimento que assegure as necessidades do presente sem prejudicar a capacidade das gerações futuras de terem atendidas suas necessidades imediatas” (BRUNDTLAND, 1987; TOLBA; BISWAS, 1991). Portanto, engloba diferentes esferas que regem a sociedade humana, sendo elas Biosfera, Economia e Sociedade, as quais estão intimamente interligadas.

Partindo do conceito de que o planeta Terra funciona como um “sistema fechado” ou como um “único sistema vivo integrado”, entende-se que seus recursos e a capacidade de recuperação de impactos não são infinitos (LOVELOCK; MARGULIS, 1974). A partir disto, cientistas liderados pelo *Stockholm Resilience Center*, em 2009, propuseram nove “Limites Planetários” que não devem ser ultrapassados, de modo a evitar desastres naturais e danos ambientais irreversíveis. Sendo assim, representam o quanto a humanidade pode explorar o ambiente em prol do seu desenvolvimento sem que os impactos causados sejam irreversíveis (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009). Esses limites são: mudança climática; integridade da biosfera (diversidade genética e diversidade funcional); mudanças no uso da terra; uso da água doce; depleção do ozônio estratosférico; fluxo bioquímico (nitrogênio e fósforo); acidificação do oceano; carga de aerossóis na atmosfera; e novas entidades, definidas como novas substâncias e novas formas de substâncias que podem causar danos no ambiente.

A situação de cada um dos limites propostos é representada no diagrama abaixo (Figura 1), sendo as regiões em verde a zona segura de atividades, as amarelas de risco em crescimento, e a vermelha a zona de alto risco. Os processos cujos limites planetários não foram ainda possíveis de quantificar são representados em cinza. Observa-se que os limites de fósforo (P) e nitrogênio (N) já se encontram em situação de alto risco (STEFFEN *et al.*, 2015).

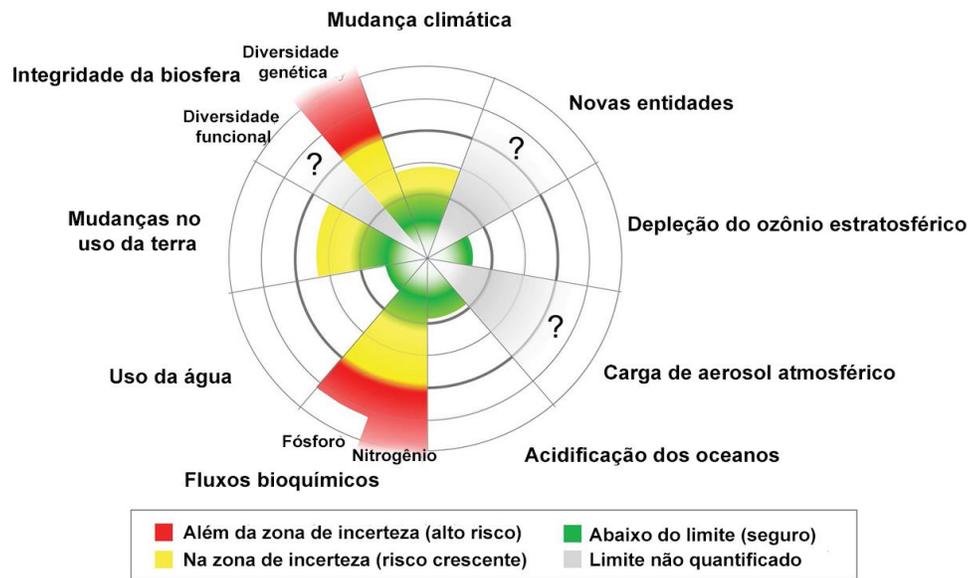


Figura 1. Diagrama ilustrativo dos limites planetários em 2015. Status atual das variáveis de controle dos limites planetários. A zona verde é o espaço operacional seguro, o amarelo representa a zona de incerteza (risco crescente) e o vermelho é uma zona de alto risco. O limite planetário está em a interseção das zonas verdes e amarelas. Processos para os quais os limites de nível global ainda não podem ser quantificados são representados por zonas cinza. Imagem traduzida de STEFFEN *et al.* (2015).

1.2 Biogás

Em relação aos processos promissores para um cenário de desenvolvimento sustentável, destaca-se a produção de biogás, uma fonte de energia renovável obtida a partir de matéria orgânica com potencial para substituir os combustíveis fósseis (SCHNÜRER; JARVIS, 2010). Além de renovável, a produção de biogás se relaciona também com a problemática da destinação dos resíduos urbanos, industriais e agrícolas, uma vez que permite a geração de energia a partir de matéria orgânica que seria descartada no ambiente, gerando altos custos de tratamento e/ou poluição (GOSWAMI *et al.*, 2016).

Dentre as vantagens do processo, o metano (CH_4) produzido, também referido como CH_4 , detém o maior interesse econômico do biogás, uma vez que pode ser usado para a geração de calor, energia elétrica, como combustível para veículos, além de substituir o gás

natural como matéria-prima para a produção de produtos químicos e materiais. São propostos ainda estudos que visam aproveitar o CO₂ e H₂ gerados para outros fins (FEHRENBACH *et al.*, 2008). Além disso, por se tratar de geração de CH₄ proveniente de resíduos orgânicos, o qual seria inevitavelmente produzido e liberado na atmosfera em aterros, lixões ou mesmo na natureza, a produção de biogás também está relacionada à redução das emissões de gases do efeito estufa (GEE). Isto se deve ao fato de que a eletricidade gerada a partir do biogás gera menos CO₂ e não acrescenta na atmosfera novas moléculas de GEEs, como acontece com os combustíveis fósseis (OBAIDEEN *et al.*, 2022).

Ainda, o digestato (resíduo orgânico após a digestão anaeróbia, constituído pela matéria-prima parcialmente degradada, microrganismos e metabólitos microbianos) contem frequentemente quantidades relevantes de nutrientes como potássio (K), nitrogênio (N) e fósforo (P). Tratam-se de importantes macronutrientes para a agricultura, contribuindo para o potencial emprego do digestato como biofertilizante de alta qualidade e como um substituto sustentável aos fertilizantes de origem mineral usados atualmente na agricultura (DENG; LIU; WANG, 2020; WEILAND, 2010).

Um dos eixos cujo limite planetário se encontra na categoria de “alto risco” é o uso de N e P, elementos de suma importância na composição dos sistemas biológicos, presentes nas membranas celulares, DNA, aminoácidos e proteínas, por exemplo. A demanda por esses nutrientes, especialmente na agricultura extensiva, aumenta anualmente, enquanto as reservas destes elementos diminuem a cada ano. Isso ocorre, dentre outras razões, devido ao não reaproveitamento dos mesmos e sua disposição inadequada no ambiente, frequentemente resultando em processos de eutrofização de corpos d’água (ALEXANDRATOS; BRUINSMAJELLE, 2012; LI *et al.*, 2021; SENGUPTA; NAWAZ; BEAUDRY, 2015).

1.2.1. A digestão anaeróbica

O biogás gerado por digestão anaeróbica (DA) é produzido no interior de digestores anaeróbios, estruturas em que são mantidas as condições adequadas de temperatura, pH, umidade, agitação para degradação de matéria orgânica e produção do biogás por microrganismos. A configuração destas estruturas varia de acordo com as necessidades locais de clima e terreno bem como as características dos diferentes substratos. A utilização destes

digestores visa, de modo geral, manter uma boa densidade de microrganismos em relação ao aporte de substratos para a digestão (APPELS *et al.*, 2008; DENG; LIU; WANG, 2020).

A DA pode ocorrer em diferentes faixas de temperatura, sendo elas 50-57°C (termofílica); 30-41°C (mesofílica) ou 15-22°C (psicrofílica) (GOSWAMI *et al.*, 2016). A digestão termofílica apresenta-se como uma opção de produção mais rápida, uma vez que as taxas de reações bioquímicas tendem a aumentar frente à elevação da temperatura, além de otimizar a degradação de sólidos orgânicos e favorecer a destruição de patógenos. Contudo, por exigir maior aporte energético, pode não apresentar-se como a opção mais lucrativa, em especial em países de clima frio (APPELS *et al.*, 2008).

A matéria-prima usada para a produção do biogás, como mencionado anteriormente, são os resíduos orgânicos, chamados de substratos. O tipo de substrato determina a taxa de degradação e a sua influência deve ser considerada na DA e no controle do processo. A proporção de carboidratos, lipídeos, proteínas, minerais e microelementos adequados é essencial para o crescimento e a atividade dos microrganismos envolvidos na DA (DENG; LIU; WANG, 2020). A composição do substrato utilizado para a atividade dos microrganismos nos reatores desempenha, portanto, papel fundamental na eficiência e estabilidade da produção de biogás e na qualidade do digestato. Essa importância tem relação com a presença ou carência de elementos como nitrogênio, níquel, fósforo, ferro, cobalto, zinco, molibdênio e selênio que atendam às necessidades nutricionais dos microrganismos, mas também de contaminantes potencialmente tóxicos e organismos patogênicos presentes em diferentes substratos (SCHNÜRER, 2016). A falta de alguns elementos é um dos principais motivos da baixa eficiência do processo de DA, demandando seu fornecimento de fontes externas ou a partir de um processo de co-digestão (DEMIREL; SCHERER, 2011).

Para a DA podem ser empregados como substratos resíduos municipais (restos de alimentos e esgoto), bem como resíduos de animais (esterco, resíduos de abate), da agricultura e mesmo industriais (produção têxtil ou cervejeira, por exemplo). As características bioquímicas destes substratos serão determinantes para o equilíbrio (ou não) do processo, bem como seu estado de granulação, pH, e presença de contaminantes como antibióticos, patógenos, microplásticos e outra partículas que possam ter efeito inibitório para

a comunidade microbiana da DA (ALKANOK; DEMIREL; ONAY, 2014; GOSWAMI *et al.*, 2016).

A DA se dá por um processo biológico complexo de conversão de matéria orgânica em metano e dióxido de carbono e outros gases por microrganismos, na ausência de oxigênio, sendo composto por 4 fases (Figura 2) (ABBASI; TAUSEEF; ABBASI, 2012).

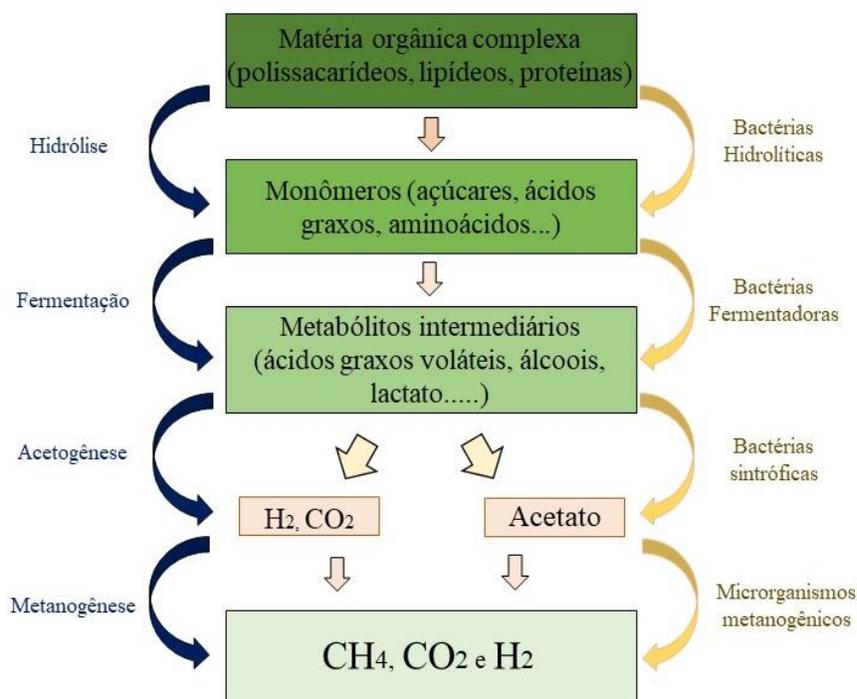


Figura 2. Esquema da degradação metanogênica de matéria orgânica em 4 fases. Figura adaptada de DENG *et al.* (2020).

A primeira fase da DA se dá pela quebra de moléculas grandes/longas como lipídeos, polissacarídeos e proteínas por bactérias hidrolíticas em monômeros (ácidos graxos, açúcares, aminoácidos). Esta etapa, denominada hidrólise, é principalmente realizada por bactérias pertencentes a grupos como *Acetivibrio*, *Bacteriodes* e *Cellulolyticus* (GOSWAMI *et al.*, 2016). Na segunda etapa, também chamada de acidogênese ou fermentação, são formados os ácidos (butírico, acético, propiônico, succínico, lático), álcool, amônia, dióxido de carbono e hidrogênio pelas denominadas bactérias acidogênicas, por meio de diversas reações fermentativas a partir dos monômeros gerados na fase anterior. *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Eubacterium* e *Peptococcus* são os principais gêneros relatados na literatura

para esta etapa (GOSWAMI *et al.*, 2016; SCHNÜRER; JARVIS, 2010). Na acetogênese, os produtos da fermentação resultantes na etapa anterior são oxidados em formas mais simples: acetato, H₂ e CO₂. Estão presentes nesta fase bactérias dos gêneros *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Clostridium* e *Syntrobacter*, a qual requer uma intrínseca cooperação entre estes microrganismos que desempenham a oxidação dos compostos e a atividade das arqueias metanogênicas presentes na próxima e última fase (GOSWAMI *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2021).

A metanogênese é a etapa chave para a produção de metano. Nesta fase, microrganismos metanogênicos realizam a conversão de compostos orgânicos a metano e CO₂. Espécies pertencentes ao domínio Archaea são as únicas conhecidas até então capazes de realizar o metabolismo denominado metanogênese. Nele ocorre a conversão de acetato, hidrogênio ou componentes metila em CH₄. Esse grupo, encontrado geralmente em ambientes anaeróbicos, é capaz de produzir metano pela conversão de diferentes compostos orgânicos. Estes microrganismos, pertencentes ao domínio Archaea, são divididos metabolicamente em três grupos:

As metilotróficas realizam a descarboxilação de compostos metila (álcoois, amins ou sulfitos) e são representadas pelas ordens *Methanomassiliicoccales*, *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales*. As hidrogenotróficas são capazes de produzir metano a partir da redução do CO₂/H₂. São representadas pelas *Methanomassiliicoccales*. Dentro de plantas de biogás é comum a coexistência desse grupo e um terceiro grupo: as acetotróficas, as quais utilizam a rota de descarboxilação do acetato. A via metabólica desempenhada por este grupo, representado pela ordem *Methanosarcinales*, foi descrita como a principal rota de produção de metano, sendo atribuído aproximadamente 70% do metano total produzido durante a DA de esgotos domésticos (ENZMANN *et al.*, 2018; GOSWAMI *et al.*, 2016).

1.2.2. Sintrofia na DA

Como descrito acima, são observadas relações interespecíficas envolvendo trocas metabólicas e energéticas especialmente entre bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas. Dentre as atividades sintróficas realizadas por estes microrganismos há a denominada sintrófica elétrica: a transmissão direta de elétrons interespecíficas ou através da

produção de metabólitos como hidrogênio, dióxido de carbono e formato produzidos por bactérias quimioheterotróficas, os quais são consumidos por arqueias metanogênicas. Essa simbiose pode, portanto, se dar diretamente (DIET – *direct interspecies electron transfer*) (Figura 3) ou por meio de moléculas intermediárias (MIET – *mediated interspecies electron transfer*) (KATO; HASHIMOTO; WATANABE, 2012; KUMAR *et al.*, 2021).

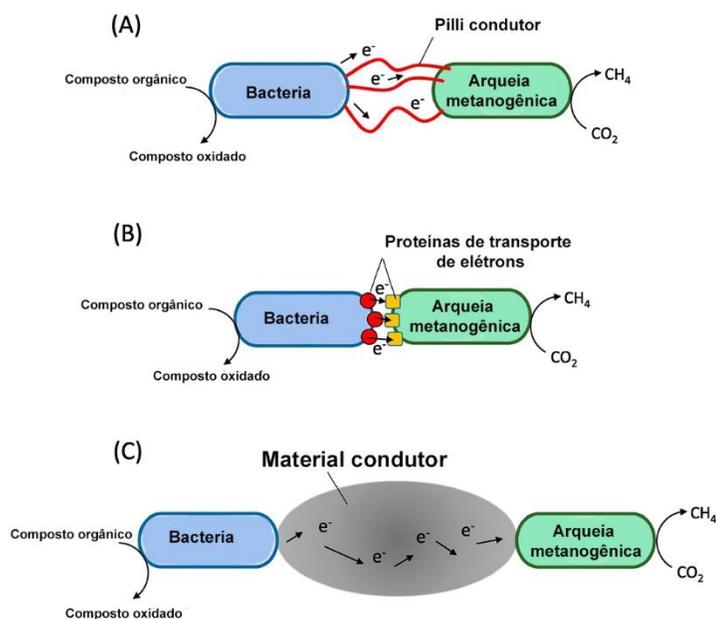


Figura 3. Ilustração representando as formas de transferência direta de elétrons interespecies de que podem ocorrer através de estruturas celulares (pili condutor) (A), proteínas transportadoras (B) ou material condutor (C). Imagem traduzida de PARK *et al.* (2018).

A transferência de elétrons por intermédio de moléculas de hidrogênio foi descrita pela primeira vez por Bryant e colaboradores em 1967. Foi observado por microscopia de contraste de fase que em uma cultura de *Methanobacillus omelianski*, na qual era empregado etanol como substrato oxidável, havia na realidade dois microrganismos com morfologias discretamente diferentes. Após diversos experimentos alterando pressões de H₂ e adição de etanol foi descrita a presença de um microrganismo Gram-negativo capaz de fermentar etanol e produzir H₂ e acetato (mas que era inibido pela alta pressão parcial de H₂) e outro que utilizava H₂ (e não etanol) para seu crescimento e produção de metano. Isso demonstrou que a cultura de *M. omelianskii* mantida em meio de etanol era, na verdade, uma associação

simbiótica entre duas espécies (BRYANT *et al.*, 1967). Este feito, somado à posterior descoberta da transferência direta (DIET), contribuiu para o entendimento da complexidade da produção de metano na DA e também em seu potencial na estabilidade e resiliência do processo (KUMAR *et al.*, 2021).

A DIET, ao contrário da MIET, permite a transferência de elétrons sem a necessidade de uma molécula intermediária, podendo ser realizada por meio de pili e materiais condutores (como *NPs* e nanotubos) e por meio de proteínas (PARK *et al.*, 2018), representando um meio alternativo à transferência mediada. Em estudos em que a DIET foi estimulada pela adição de materiais condutores foi observada o aumento da produção de CH₄ e a estabilização do sistema em condições de estresse de altas taxas de matéria orgânica, acidez e pressão parcial de H₂ elevada (JIN; ZHAO; ZHANG, 2019; ZHAO *et al.*, 2017).

1.2.3. Desafios na produção de biogás por DA

Observa-se que, apesar do potencial energético e vantagens ecológicas, a produção de biogás e biofertilizantes ainda apresenta fatores que podem comprometer a eficiência e viabilidade do processo, tornando o investimento nesse tipo de fonte de energia menos atrativo para governos e empresas (APPELS *et al.*, 2008). Alguns metabólitos gerados durante as fases da DA podem limitar ou inibir o processo. Por exemplo, a diminuição do pH em função do acúmulo de ácidos graxos, a amônia livre e o sulfeto de hidrogênio (H₂S) produzidos a partir da degradação de proteínas (que influenciam a atividade sintrófica e metabolismo microbiano) inibe a metanogênese e diminui a qualidade do biogás produzido (DENG; LIU; WANG, 2020). Além disso, substâncias como o H₂S, produzido na redução do sulfato, se encanado junto ao biogás, pode reduzir a vida útil de tubulações e outras instalações, além de ser tóxico para o ser humano (APPELS *et al.*, 2008).

Alguns destes desafios na produção de biogás por DA são devidos à natureza dos próprios substratos. Resíduos provenientes da agricultura possuem altos índices de celulose e lignina, macromoléculas presentes na estrutura celular de vegetais e de difícil degradação pela maioria dos microrganismos. Resíduos animais, por sua vez, estão relacionados a altas taxas de amônia livre e íons amônio, os quais podem também apresentar papel inibidor na DA (SCHNÜRER, 2016).

1.2.4. Estratégias para otimização da produção de biogás por DA

O desenvolvimento de novas técnicas que garantam maior custo-benefício e competitividade de mercado para este processo tornou-se, portanto, indispensável para o seu investimento e implementação eficiente. Em consequência, a otimização da sua produção é uma constante busca para países e empresas que utilizam e investem nesta fonte de energia renovável. Os avanços incluem diferentes pré-tratamentos do substrato, melhorias na eficiência dos reatores, além de métodos de pós-tratamento do biogás produzido (ANGELIDAKI *et al.*, 2018; MAO *et al.*, 2015; SCHNÜRER, 2016).

A co-digestão, por exemplo, se trata da combinação de diferentes substratos, como resíduos de plantações e resíduo animal, de modo a equilibrar as concentrações de elementos importantes na estabilidade do sistema. O foco está frequentemente no equilíbrio da razão C/N (carbono e nitrogênio) do digestato, a qual é indicada estar em torno de 20:1 (± 10) (SCHNÜRER; JARVIS, 2018). Em casos nos quais os substratos são ricos em proteínas é comum que a razão C/N caia. Também é indicado que esta razão seja maior quando a digestão ocorrer em temperaturas elevadas, de modo a evitar um possível aumento no pH do sistema causado pela alta concentração de amônia, o que leva à inibição dos microrganismos metanogênicos (JINGURA; KAMUSOKO, 2017)

Outra estratégia comumente utilizada é o pré-tratamento do substrato antes do mesmo ser introduzido na digestão propriamente dita. Podem ser mencionados os físicos (mecânico, térmico, ultrassom), químicos (alcalino, ácido, oxidativo), biológicos (enzimáticos e microbiológicos) e os combinados. Dentre os benefícios dos diferentes pré-tratamentos estão a remoção de materiais não passíveis de degradação na DA (como pedaços de plástico de descartáveis), de organismos patogênicos e redução da granulometria do substrato (partículas maiores dificultam a digestão pelos microrganismos). Assim, há a melhora da solubilidade e disponibilidade dos materiais orgânicos para a digestão pelos microrganismos. Bactérias hidrolíticas, presentes na primeira etapa do processo de DA, são particularmente beneficiadas (MAHAJAN *et al.*, 2020; SCHNÜRER; JARVIS, 2018).

Ao fim da DA, os gases produzidos podem passar por mais uma etapa de purificação dos gases ali presentes, conhecida com pós-tratamento ou “*upgrade*”, a qual termina por

agregar valor ao biogás produzido. Filtrando moléculas indesejadas como H_2S , H_2O , e/ou aumentando a concentração de substâncias de interesse, em particular o CH_4 , o tratamento do biogás produzido na DA permite que este seja encanado sem prejuízos às tubulações ou ameaça à saúde humana, bem como otimizar o valor calorimétrico, dado pelo conteúdo de CH_4 (APPELS *et al.*, 2008).

Frente à carência de alguns elementos importantes na atividade sintrófica e enzimática da comunidade microbiana, além do possível desequilíbrio causado pelo acúmulo de substâncias como amônia, H_2S e ácidos graxos voláteis, nos últimos anos, outra estratégia vem sendo explorada: o uso de aditivos orgânicos e inorgânicos em escala nano, micrométrica ou em forma de sais. Estes materiais podem ter efeitos na modulação da comunidade microbiana, na formação de biofilmes que tornam o sistema mais resistente, na adsorção de toxinas, no suprimento de micronutrientes como cobalto (Co), molibdênio (Mo) e ferro (Fe) (essenciais para o funcionamento enzimático microbiano) e, principalmente no estímulo à atividade sintrófica da comunidade microbiana, com especial foco na DIET.

1.2.5. Nanopartículas

A nanotecnologia, estudo e manipulação de materiais geralmente de 1 a 100 nm, vem recebendo cada vez mais atenção da área da biotecnologia. Dentre as razões para tal interesse, estão as vantagens da grande área de superfície de contato e as diversas possibilidades de interações geradas (SATALKAR; ELGER; SHAW, 2016). Nesse trabalho, o termo “nanopartículas” (NPs) serão consideradas também dimensões nanométricas acima de 100 nm (e menores que 1 μm) a fim de incluir alguns dados importantes para discussão do papel do tamanho de tais estruturas.

Dentre as técnicas existentes para aumentar a eficiência na produção de biogás, uma delas é a adição de NPs no digestato durante o processo de DA (Figura 4). São estudadas diferentes composições químicas para tais NPs como prata, ferro, cobalto, níquel, magnetita (Fe_3O_4), entre outras (ABDELSALAM *et al.*, 2017a, 2017b; ABDELWAHAB *et al.*, 2020b; GROSSER *et al.*, 2021; HASSANEIN; KELLER; LANSING, 2021; HASSANEIN; LANSING; TIKEKAR, 2019).

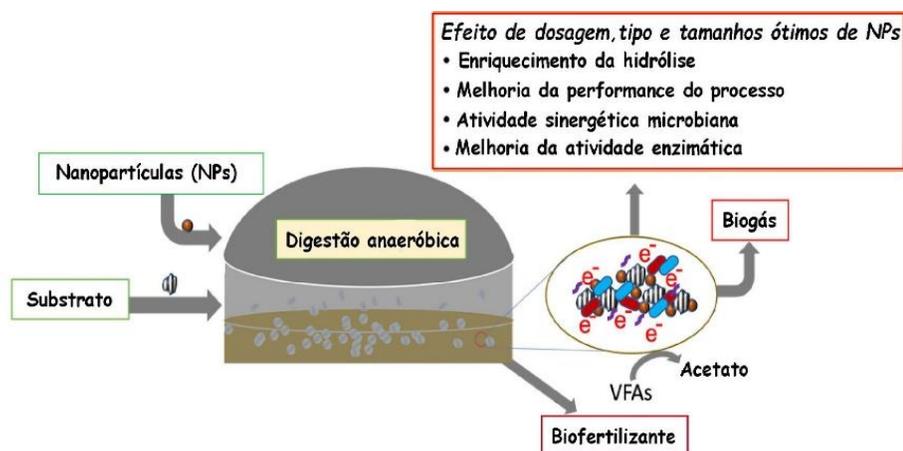


Figura 4. Efeitos de NPs em sistemas de digestão anaeróbica. Figura traduzida de HASSANEIN *et al.* (2021).

O benefício da adição de NPs pode estar relacionado à necessidade de elementos como ferro (Fe), níquel (Ni) e cobalto (Co) e até molibdênio (Mo), importantes no metabolismo energético e atividade enzimática dos diferentes microrganismos da comunidade envolvida na DA (GOSWAMI *et al.*, 2016). Também há registros de atividades mitigadoras de substâncias tóxicas, bem como de estímulo à formação de biofilme e outras estruturas que aumentam a resistência, estabilidade e eficiência da comunidade microbiana (KUMAR *et al.*, 2021). A adição de NPs pode trazer ainda outros benefícios como a redução do acúmulo de ácidos graxos voláteis (que em alta quantidade inibem o processo de DA) e na mitigação do H_2S (ABDELWAHAB *et al.*, 2020a; FARGHALI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018).

Em relação ao estímulo do metabolismo sintrófico presente na DA, é sugerido que NPs condutoras estariam relacionadas com o aumento da eficiência da transferência de elétrons entre arqueias metanogênicas e outras espécies de microrganismos quimioheterotróficos que habitam reatores de biogás, de modo a mediar a DIET, fortalecendo a sintrofia elétrica, e assim, a produção de CH_4 (KATO; HASHIMOTO; WATANABE, 2012).

JIN *et al.* (2019) tiveram sucesso no aumento de 3-10 vezes na produção de biogás usando NPs de magnetita sintetizadas quimicamente. Esse resultado foi atribuído à

propriedade da magnetita de aumentar a eficiência da DIET (JIN; ZHAO; ZHANG, 2019). Anteriormente, em 2014, já havia sido relatado um aumento de 33% na sintrofia dos microrganismos de um sistema de DA após a suplementação de NPs de magnetita (CRUZ VIGGI *et al.*, 2014).

Contudo, observa-se que, em alguns casos, a presença de NPs pode levar ao efeito contrário, causando inibição do processo de DA, seja por toxicidade a altas concentrações, seja pelo desequilíbrio da diversidade microbiana (HE *et al.*, 2017; OTERO-GONZÁLEZ; FIELD; SIERRA-ALVAREZ, 2014; ZHANG *et al.*, 2021). Adicionalmente, ainda é incerto o impacto que tais NPs podem apresentar no ambiente, dependendo de como for realizado seu descarte. Além disso, as possibilidades de reuso e reciclagem das NPs ainda são pouco exploradas (ABDELWAHAB *et al.*, 2020b).

A maioria das NPs magnéticas são produzidas por uma variedade de métodos artificiais como síntese hidrotermal, microemulsão, decomposição térmica e co-precipitação, sendo estes dois últimos os mais empregados (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; REDDY *et al.*, 2012). Há ainda a produção biológica, realizada por macro e microrganismos frente ao estresse à presença de alguns elementos no ambiente (PANTIDOS; HORSFALL, 2014) ou pela formação de estruturas com funções já descritas, como é o caso dos magnetossomos em bactérias magnetotáticas (BMs) (VARGAS *et al.*, 2018).

1.3. Bactérias magnetotáticas e magnetossomos

1.3.1 Bactérias magnetotáticas

Bactérias magnetotáticas (BMs) compreendem um grupo de microrganismos flagelados capazes de sintetizar nanoestruturas magnéticas denominadas magnetossomos. Estas estruturas, envoltas por uma membrana biológica e que se alinham em uma ou múltiplas cadeias dentro da célula, conferem à célula um momento magnético usado para a orientação no ambiente aquático quimicamente estratificado, comportamento denominado de magnetotaxia (BAZYLINSKI; FRANKEL, 2004). BMs compõem um grupo com grande diversidade morfológica (Figura 5), sendo observados em vários morfologias como cocos, ovoides, vibriões, espirilos, bacilos (ABREU *et al.*, 2011; BAZYLINSKI; LEFÈVRE;

SCHÜLER, 2013), além de formas multicelulares, interações interespecíficas e protistas magnetotáticos. BMs são amplamente distribuídas filogeneticamente, sendo identificadas nos filos Proteobacteria (nas classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Lambda-, Eta- e Zetaproteobacteria), Nitrospirae, Latescibacteria (WS3), Omnitrophica (divisão candidata OP3) e Planctomycetes (ABREU *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2015; LEÃO *et al.*, 2020; LEFÈVRE *et al.*, 2013; LEFÈVRE; WU, 2013; LIN *et al.*, 2018; MONTEIL *et al.*, 2019; MORILLO *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2012).

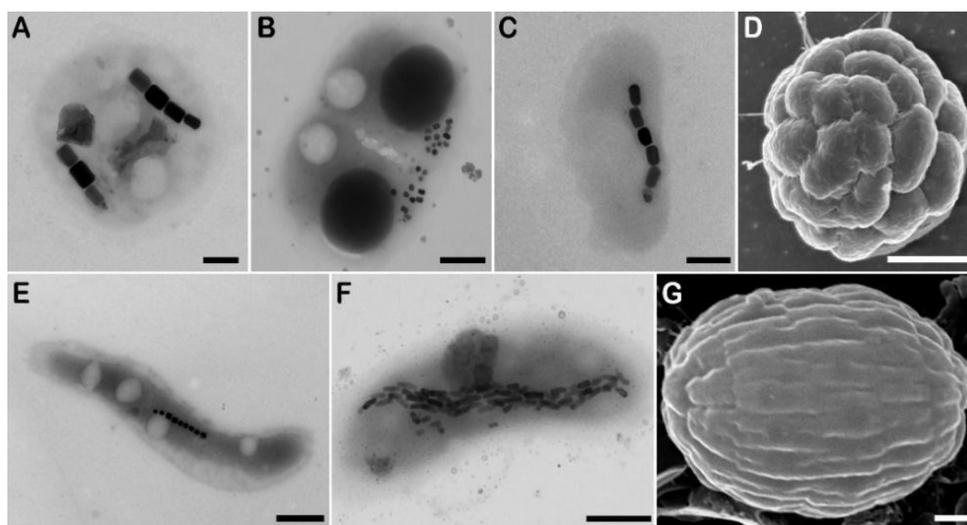


Figura 5. Morfologia de BMs. Microscopia eletrônica de transmissão (A-C, E-F) e de varredura (D e G) A-B) cocóide, C) vibrião, D) multicelular esférico, E) espirilo, F) bacilar, G) multicelular elipsoide. A. com barra de escala de 300 nm. B. E. e F. com barras de escala medindo 500 nm. C. com barra de 200 nm. D. e G. Barra de escala medindo 2 μ m. Todas as imagens, exceto F, foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPPG, UFRJ.

Em relação à biogeografia, BMs são organismos cosmopolitas que habitam os mais variados ambientes aquáticos na Terra. Estão presentes em sedimentos marinhos, de água doce, mangues, em grandes profundidades, em ambientes polares, termais, alcalinos, hipersalinos, bem como em colunas d'água estratificadas, geralmente na zona de transição óxica-anóxica (ZTOA) (ABREU *et al.*, 2016; BAZYLINSKI; FRANKEL, 2004; LEÃO *et al.*, 2016; LEFEVRE; BAZYLINSKI, 2013; LIN *et al.*, 2012, 2013; NASCIMENTO CORREA *et al.*, 2020).

1.3.2. Magnetossomos

Magnetossomos são as estruturas que conferem a orientação magnética utilizada pelas BMs para se posicionarem em sua zona ideal de crescimento/sobrevivência em ambientes com gradiente químico vertical (BAZYLINSKI; LEFÈVRE; SCHÜLER, 2013). São estruturas compostas de magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4), envoltas por membrana e alinhadas em uma ou mais cadeias dentro do citoplasma celular (FAIVRE *et al.*, 2007). Sua biogênese ocorre sob forte controle genético, envolvendo mais de 40 genes, especialmente os genes *mam* (*magnetosome-associated membrane*) e *mms* (*magnetic particle membrane specific*) que estão agrupados na região cromossômica denominada MGC (*magnetosome gene cluster*), que apresenta grande similaridade entre as espécies de BMs. Além destes, também foram descritos os genes *man*, associados ao filo *Nitrospirae* e *mad*, associados aos magnetossomos formados pela classe Deltaproteobacteria. Fora do MGC, o operon *nap* codifica genes para a redução do nitrato, apresentando também impacto nos formatos, tamanhos e/ou cadeias dos magnetossomos em mutantes para tais regiões gênicas (LI *et al.*, 2012; UEBE; SCHÜLER, 2016).

A formação dos magnetossomos é um processo complexo descrito, de modo geral, nas seguintes etapas: 1) invaginação da membrana celular interna da bactéria e formação de vesículas; 2) recrutamento de proteínas na membrana do futuro magnetossomo; 3) sequestro e acúmulo de ferro do meio; 4) nucleação do cristal de magnetita ou greigita e seu crescimento no seu formato e tamanho espécie-específico; e 5) alinhamento em cadeia. Essas etapas não necessariamente ocorrem em momentos distintos (BARBER-ZUCKER; ZARIVACH, 2017; CYPRIANO *et al.*, 2022; FRANKEL; BAZYLINSKI, 2006; LIN *et al.*, 2018; UEBE; SCHÜLER, 2016). O número de magnetossomos por célula varia muito entre espécies de BMs, mas a maioria descrita até o momento possui em torno de 10 a 20 com tamanhos entre 35 e 120 nm. A porção mineral do magnetossomo apresenta alta pureza química, sendo observado que outros elementos além de Fe e O (no caso da magnetita) ou Fe e S (para greigita) estão presentes em concentrações pelo menos 100 vezes inferiores à magnetita (AMOR *et al.*, 2015). Apresentam também formatos e simetria estritos, além da perfeição cristalográfica que confere a essas estruturas a característica de monodomínio magnético, apresentando-se, portanto, permanentemente magnetizados (BUTLER;

BANERJEE, 1975; CHANG *et al.*, 2006).

Ao se alinharem em cadeia, o momento magnético dos magnetossomos é somado, gerando então um momento de dipolo magnético permanente na célula, usado para o alinhamento passivo às linhas do campo geomagnético que é essencial para a magnetotaxia. O alinhamento confere um eixo vertical de orientação em um ambiente que normalmente teria três dimensões (direções) de nado. Este direcionamento ajuda as células a encontrar, de modo mais eficiente, sua concentração ótima de oxigênio em colunas de água ou sedimentos quimicamente estratificados (ABREU *et al.*, 2020; LEFEVRE; BAZYLINSKI, 2013).

1.3.3. Aplicações biotecnológicas

As BMs e seus magnetossomos, em consequência a seus atributos físicos, químicos e biológicos, apresentam características de grande interesse biotecnológico. Em relação aos magnetossomos, sua pureza química, perfeição cristalográfica e a membrana biológica permitem uma ampla gama de aplicações. As BMs, assim como seus nanocristais magnéticos, podem ser concentrados com eficiência aplicando um campo magnético externo, como um ímã (BAZYLINSKI; LEFÈVRE; SCHÜLER, 2013). Nos últimos anos, a avaliação do potencial desse grupo de microrganismos em diversas aplicações da biotecnologia tem aumentado significativamente e, apesar de a maioria desses estudos estar relacionada a aplicações biomédicas (Figura 6), o valor de NPs de magnetita é reconhecido em várias áreas do desenvolvimento industrial (VARGAS *et al.*, 2018).

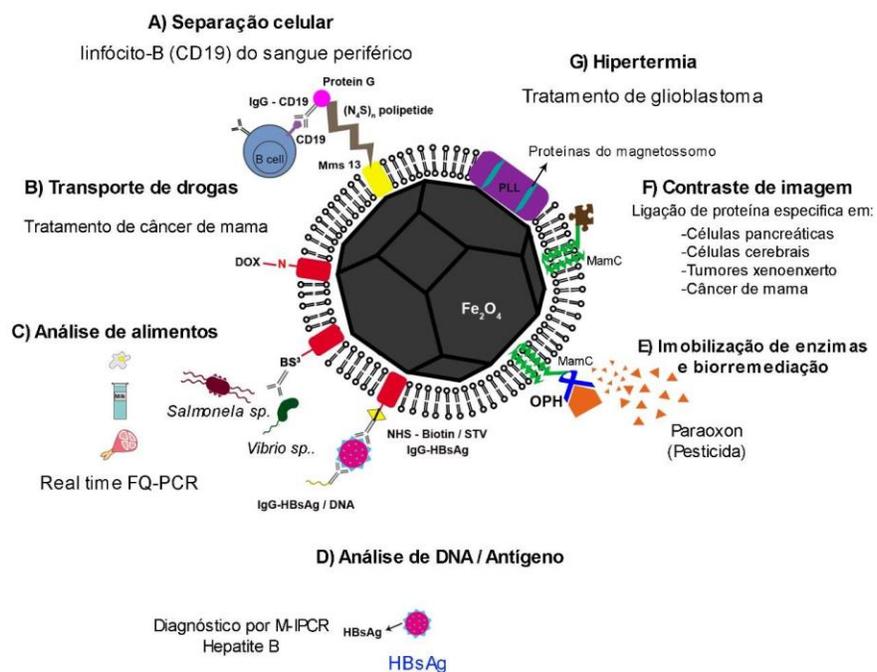


Figura 6. Representação esquemática de um magnetossomo funcionalizado de acordo com cada aplicação descrita na literatura (separação de células; hipertermia, liberação de fármaco, contraste de imagem, análise de alimentos, imobilização e biorremediação enzimática e recuperação/detecção de DNA e antígeno). Imagem traduzida de VARGAS *et al.* (2018).

A produção de nanocristais de magnetita por BMs, os quais serão tratados neste trabalho como nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs) pode ser realizada em biorreatores de pequena escala em laboratório (Figura 7). O processo de produção de NMOBs a partir de BMs de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T, por exemplo, ocorre primeiramente a partir do cultivo destas células em frascos de 20mL e posteriormente inoculadas em frasco de 1L que será utilizado como inóculo para biorreator. Este, com volume útil de 2L, é mantido em anaerobiose e agitação constante de 100 rpm a 28°C e pH 7,2 por cerca de 192 h. São empregados óxido nitroso (N₂O) comoceptor final de elétrons e sulfato ferroso (FeSO₄) (100 μM) como fonte de ferro, como descrito por SILVA *et al.* (2013). Estratégias para o aumento do rendimento na produção de NMOBs em escala vêm sendo exploradas também para outras espécies de BMs como *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 e

Magnetospirillum magnetotacticum cepa MS-1 (BASIT *et al.*, 2020). Após o período de cultivo, as células são submetidas à extração e purificação dos cristais. A obtenção dessas estruturas, após extraídas, apresenta as vantagens de ser um processo totalmente sustentável e de qualidade do mineral equivalente a métodos químicos muito mais caros (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021; SILVA *et al.*, 2013; VARGAS *et al.*, 2018).

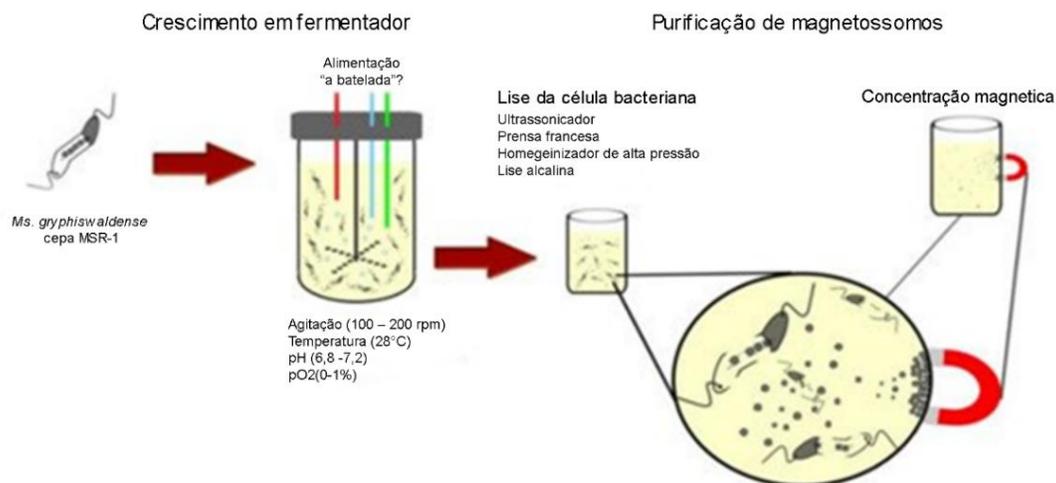


Figura 7. Esquema ilustrativo da produção e extração de NMOBs. Células de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T são cultivadas anaerobicamente em meio líquido com óxido nitroso (N₂O) comoceptor final de elétrons e FeSO₄ (100 μM) como fonte de ferro a 28°C, em um biorreator de bancada e, então, lisadas utilizando diferentes métodos físicos ou químicos. Os magnetossomos são recuperados utilizando concentração e separação magnética. Imagem traduzida de VARGAS *et al.* (2018).

2. JUSTIFICATIVA

Dado que a produção de biogás é uma tecnologia promissora e indispensável para a construção de um futuro sustentável, o investimento nesse tipo de energia é imperativo. Contudo, a produção eficiente e lucrativa em larga escala apresenta diversos desafios que desencorajam governos e empresas a investir na sua implementação. Sendo assim, o desenvolvimento de novos meios de otimizar esse processo, e de maneira ainda ecologicamente correta e sustentável, se torna necessário e urgente para tornar essa tecnologia um investimento mais atrativo e de menos risco.

No âmbito da nanotecnologia, apesar dos avanços no uso de NPs na DA, ainda são observados resultados distintos entre estudos envolvendo a adição de NPs de óxidos de metais, como o caso de FARGHALI *et al.* (2019) que observaram aumentos na produção de biogás e CH₄ inferiores aos observados anteriormente por ABDELSALAM *et al.* (2016). Em sua discussão, FARGHALI *et al.* (2019) sugerem que esta diferença se dá devido a diferentes parâmetros na metodologia entre os estudos, dentre eles o tamanho das NPs, as condições experimentais e os substratos (ABDELSALAM *et al.*, 2016; FARGHALI *et al.*, 2019). Esse tipo de discrepância de resultados ressalta a importância de estudos que permitam elucidar parâmetros e respectivos impactos da adição de NPs para o aumento da produção de biogás por DA.

As BMs têm sido reconhecidas pela sua relação com o ciclo do ferro e tem, como assinatura estrutural do grupo, a formação de NPs magnéticas cujas características apresentam grande diversidade de aplicações biotecnológicas. As NMOBs poderiam atuar como as NPs de óxidos metálicos, otimizando a produção de biogás e melhorando a DIET. Além disso, uma das preocupações a respeito do uso de NPs sintéticas (NPSs) no processo de produção do biogás incluiu o risco ambiental e o desperdício desse material, ressaltando a importância do uso de métodos de recuperação eficientes (ABDELWAHAB *et al.*, 2020b). O momento de dipolo magnético permanente e a característica de monodomínio magnético das NMOBs apresentam-se como vantagens na recuperação e reutilização destas NPs (HIJAZI *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por meio de uma meta-análise o efeito de NPs na DA, de forma a correlacionar características como a composição, o tamanho e a concentração de NPs e seus efeitos na produção de biogás. Utilizar as conclusões sobre eficiência de NPs obtidas na meta-análise em experimento de avaliação do efeito da adição de NMOBs na produção de biogás e CH₄ por DA de modo a comparar com NPSs já empregadas na literatura.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática seguida de uma meta-análise de modo a comparar o efeito relatado na literatura de diferentes NPs e seus parâmetros na produção de CH₄ por DA;
- Avaliar e comparar o impacto de NMOBs e NPSs na DA em pequena escala laboratorial na produção de biogás e CH₄.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados neste trabalho se dividem em dois eixos: uma revisão sistemática seguida de uma meta-análise da literatura a respeito de diferentes NPs na DA; e experimentos envolvendo a produção e caracterização de NMOBs seguidos da avaliação do efeito de sua adição na produção de biogás por DA de forma comparativa em relação à adição de NPSs em amostras de lodo de diferentes digestores anaeróbicos.

4.1. Meta-análise de trabalhos envolvendo o uso de NPs no processo de DA

4.1.1. Palavras-chave, triagem e preenchimento da tabela:

Foi inserido na base de dados *Web of Science* (<https://www.webofknowledge.com>) um código de pesquisa avançada (*TS= ((“anaerobic* digest*” OR biogas OR “*methane production” OR “*methane yield” OR “CH4 production” OR “CH4 content”) AND (nanoparticle\$ OR “ultrafine particle\$” OR “microparticle\$” OR “small particle\$”) NOT (microplastic\$))*) com os filtros para linguagem em inglês e tipo de arquivo artigo com período de 1997 a 2022. Em seguida, foi realizada uma triagem prévia a partir do título e resumo dos artigos retornados pela base de dados, de modo a otimizar o tempo de leitura completa, excluindo da análise trabalhos que: 1. Tratassem de outro processo que não a produção de biogás e/ou CH₄ por DA; 2. Processos de DA nos quais NPs não foram adicionadas intencionalmente na DA; 3. Artigos os quais não são dadas informações sobre características das NPs, sendo o mínimo, a composição, tamanho e quantidade adicionada; 4. Trabalhos nos quais não foram feitos experimentos e sim modelagem, simulação, revisão bibliográfica ou sistemática;

Após a triagem, os artigos selecionados foram analisados e as seguintes informações (quando presentes) foram inseridas em uma tabela de dados Excel, sendo elas:

- **Informações gerais** (Número; 1º autor; Ano de publicação; País de execução do trabalho; Tipo de reator; Volume do reator; Regime de alimentação; Pré-tratamento; HRT; Temperatura; Número de réplicas);

- **Informações do substrato** (Substrato, Classificação do substrato, pH, EC, Umidade, sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), C/N, nitrogênio total (TN), fósforo total (TP), amônia (NH₃), fosfato (PO₄³⁻P), potássio total (TK), enxofre total (Tsulf));
- **Informações sobre as NPs** (Composição, Tamanho, Quantidade adicionada, Método de produção, Recuperação, Método de recuperação, Quantidade recuperada);
- **Efeitos das NPs** (produção/rendimento de CH₄).

As principais informações utilizadas nos resultados deste trabalho estão no Anexo 1.

4.1.2. Análises estatísticas

Após a extração dos dados de interesse mencionados acima na tabela de Excel, estes foram submetidos ao método ROUT de identificação de *outliers* (MOTULSKY; BROWN, 2006), seguidos de testes estatísticos de normalidade de Shapiro-Wilk para a decisão entre testes de variância paramétricos ou não-paramétricos no programa *GraphPad Prism software version 8.02* (GraphPad, EUA). Também foram realizados testes de correlação de Pearson entre as variáveis “tamanho (nm)” e “concentração (mg/L)”, e o aumento da produção de CH₄, dada pelo cálculo da razão de resposta (razão entre a média do grupo experimental e aquele no grupo controle), expresso abaixo por RR (Equação 1) (HEDGES; GUREVITCH; CURTIS, 1999).

$$RR = \ln(X_T/X_C)$$

Equação 1. Razão de resposta entre a produção de CH₄ em grupos tratamento (X_T) e grupos controle (X_C).

Utilizando o software *Past* (HAMMER, 2001) foram realizadas também análises multivariadas de Componentes Principais utilizando o método de pontuações-z (PCA – *Principal components analysis*) e Estimativa de Densidade de Kernel (KDE - *Kernel's density estimator*) que forneceu coordenadas usadas pelo Excel 2013 para a elaboração de gráficos de densidade de modo a analisar o perfil dos dados obtidos (CONLEN, 2022).

4.2. Produção de NMOBs

4.2.1. Meio de cultura e cultivo em biorreator

NMOBs foram extraídas a partir de culturas de *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T em biorreator no Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LaBMax) em regime de batelada alimentada baseada no trabalho de SILVA *et al.* (2013). Nesse processo, as células foram cultivadas por 48 h em anaerobiose em 25 mL de meio líquido descrito por SILVA *et al.* (2013) e escalonada para frasco de 250 mL até a concentração de 10⁸ células/mL e então adicionadas ao biorreator (Minifors, Infors HT – Basel, Switzerland) de 5L e volume de trabalho de 2 L. A densidade celular foi medida por densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, PR), considerando o valor de 1,09 x 10¹⁰ células/mL como equivalente à densidade óptica de 1,0 com base no trabalho de SILVA *et al.* (2013). O processo foi conduzido em batelada alimentada com suplementação de fonte de ferro (10 mM FeSO₄) e N₂O a cada 24 h por aproximadamente 192 h e condições de pH 7,0, agitação de 100 rpm, a 28°C. As condições anaeróbicas foram mantidas com a injeção de N₂ até atingir concentrações indetectáveis de O₂, seguida de purga com N₂O por 15 min.

4.2.2. Extração de NMOBs

Para a extração de NMOBs partir das células magnetotáticas cultivadas, ao fim do período de crescimento de 192 h, o meio de cultivo foi centrifugado a 7000 rcf por 30 min a 5°C em Centrifuga Eppendorf 5430R para concentração das células e o sobrenadante foi substituído por tampão HEPES (10 mM, pH 7.2). O concentrado em seguida foi levado ao sonicador de ponteira (VCX 500, Sonics) com ciclo de 1h, amplitude de 20%, frequência de 20 kHz e intervalos de ativação de 30s com objetivo de promover a lise celular. Em seguida, os magnetossomos foram concentrados magneticamente com ímã de boro-neodímio por 48 h a 4°C para sua separação dos demais detritos, seguida da ressuspensão dos cristais em tampão HEPES (10 mM) com NaCl (200 mM) e 4 ciclos de ultrassom (60 W, Branson 2200), com concentração magnética, descarte do sobrenadante e subsequente adição de novo volume de tampão a cada ciclo (CYPRIANO *et al.*, 2019). A cada lote de produção, uma amostra de 5 uL de NMOBs foi depositada em grades de cobre 300 *mesh* (Electron Microscopy Sciences, EUA) revestida com *formvar* e carbono. Após 5 minutos, a gota de

amostra foi removida com auxílio de papel filtro e a grade foi então seca ao ar. Assim, a amostra foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) FEI Morgagni (FEI Company, Hillsboro, OR) operando a 80 kV equipado com câmera digital CCD MegaView G2 (Olympus) acoplada, para observação das características de formato e tamanho dos cristais como forma de controle de qualidade. As imagens foram enviadas ao software iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions; OLYMPUS) para determinação de tamanho médio e fator de forma dos cristais observados.

Para a comparação do impacto de NMOBs na DA, foram utilizadas NPSs de magnetita (Fe_3O_4) disponíveis para venda comercial (Sigma-Aldrich. EUA; Ref:1317-61-9) as quais possuem dimensões de 50 a 100 nm. Estas também foram preparadas para MET para observação das características de formato e tamanho das NPSs.

4.3. Adição de magnetossomos e NPs sintéticas em lodo ativado de diferentes digestores anaeróbicos.

4.3.1 Obtenção e caracterização de lodo ativado

Diferentes amostras de lodo ativado provenientes de plantas de biodigestores anaeróbicos em funcionamento foram cedidas através da colaboração com o Prof. Alex Enrich Prast. Em função de normas referentes ao projeto responsável pela obtenção de tais amostras, foi solicitado que as informações a respeito da localização de tais plantas fossem mantidas em sigilo. Para a avaliação dos conteúdos de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), uma alíquota de 10 mL foi seca a 105°C por 20h em estufa SLW 75 IG SMART (Pol-Eko, Wodzislaw SL), pesada para a determinação de sólidos totais, e em seguida, esse material foi colocado a 550°C por 2h em estufa Nabertherm GmbH (Nabertherm, Lilienthal/Bremen) e novamente pesado para a determinação de SV. O valor obtido de SV representa qual a parcela de material orgânico passível de digestão de fato compunha o lodo empregado no experimento.

Em frascos de 3 mL com volume útil de 1 mL foram adicionados o lodo ativado e NPs sintéticas (NPSs) ou nanopartículas de origem biológica (NMOBs) a uma concentração de 100 mg/L, mantendo um grupo sem adição de NPs como grupo controle. O lodo ativado

compreende uma mistura de água, microrganismos e matéria orgânica em decomposição, obtido a partir de uma amostragem do digestato presente em digestores anaeróbicos estáveis operando continuamente. Este tipo de amostra é adequado para estudar o impacto de aditivos na DA, sem a necessidade de adicionar uma nova fonte de substrato, se utilizado poucos dias após sua retirada do biodigestor. Ambos os grupos de tratamento e controle foram realizados em triplicata para maior robustez estatística. Após seladas, os frascos foram purgados com N₂ para garantir anaerobiose e em seguida incubadas em temperatura de 40°C com agitação de 135 rpm.

Para análise direta do conteúdo do biogás produzido, ou seja, o quanto do volume de gás de fato era composto por CH₄ ou CO₂, as amostras de gás produzidos foram analisadas no cromatógrafo gasoso Agilent 7697A Headspace AutoSampler (Agilent Technologies, EUA). Após a conversão dos resultados gerados pela cromatografia gasosa, obtida a partir da proporção entre os parâmetros pré-estabelecidos (concentrações conhecidas empregadas para calibração dos resultados - std), e os dados obtidos pelo cromatógrafo em unidade de área (Equação 3), estes foram submetidos a testes estatísticos de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente a testes de variância ANOVA, ambos no programa *GraphPad Prism software version 8.02* (GraphPad, EUA).

Conversão de dados obtidos pelo cromatógrafo

$$[\text{CH}_4] = \frac{(\text{área CH}_4 \text{ amostra} \times \text{média área CH}_4 \text{ std})}{\text{média } [\text{CH}_4] \text{ std}}$$

Equação 2. Conversão de dados em unidade de área, providos pelo equipamento de cromatografia gasosa, para unidade de concentração em %.

5. RESULTADOS

5.1. Análise sistemática e meta-análise

A partir dos dados coletados foi possível observar e analisar diversas relações entre experimentos envolvendo a adição de NPs na DA. Foi observado, durante a triagem, que as NPs também são estudadas em outros processos de pré- e pós-digestão para a melhoria da qualidade do biogás, bem como no controle de substâncias indesejadas. Como o foco deste trabalho estava em avaliar os benefícios das NPs durante a DA, tais trabalhos não foram considerados, mas demonstram a ampla gama de aplicações que tais estruturas apresentam e que ainda devem ser exploradas a fundo.

5.1.1. Descrição do banco de dados

A pesquisa avançada realizada no banco de dados *Web of Science* resultou em 877 artigos. Após a triagem inicial, restaram 377 trabalhos e, por fim, após análise e coleta de dados de acordo com os critérios descritos anteriormente restaram 64 artigos e 290 observações, ou seja, 290 linhas na planilha, cada tratamento de adição de determinada NPs e respectivos resultados.

Foi realizada uma análise descritiva dos trabalhos obtidos e de parâmetros gerais de seus respectivos experimentos. Foram observadas diferentes condições experimentais entre os volumes dos experimentos que variaram desde frascos de 25 mL a reatores de 10 L, o tempo de análise, os modelos de reatores e temperatura utilizada. Em sua maioria, os experimentos analisados foram realizados em escala laboratorial, em regime de batelada mesofílica, ou seja, na faixa entre 30 e 41°C. As concentrações de NPs utilizadas eram expostas em diferentes unidades e só puderam ser mantidas na análise as que fossem passíveis de conversão para mg/L, unidade essa escolhida por ser a que permitia a conversão do maior número de observações. Foi observada também uma grande variação na maneira de expressar as informações relacionadas com a produção de CH₄, a concentração de NPs, o tamanho das NPs empregadas e suas origens ou métodos de produção, quando estavam presentes. Os principais dados já uniformizados e utilizados nas análises deste trabalho podem ser observados no Anexo 1.

Ainda utilizando o mecanismo de busca avançada da plataforma *Web of Science*, foi possível obter dados da evolução das publicações e interesse envolvendo o tema (Figura 8). Fica claro o crescimento exponencial das publicações e citações a respeito do assunto a partir de 2010, evidenciando o aumento do interesse e a importância dada a pesquisas envolvendo a NPs e produção de biogás.

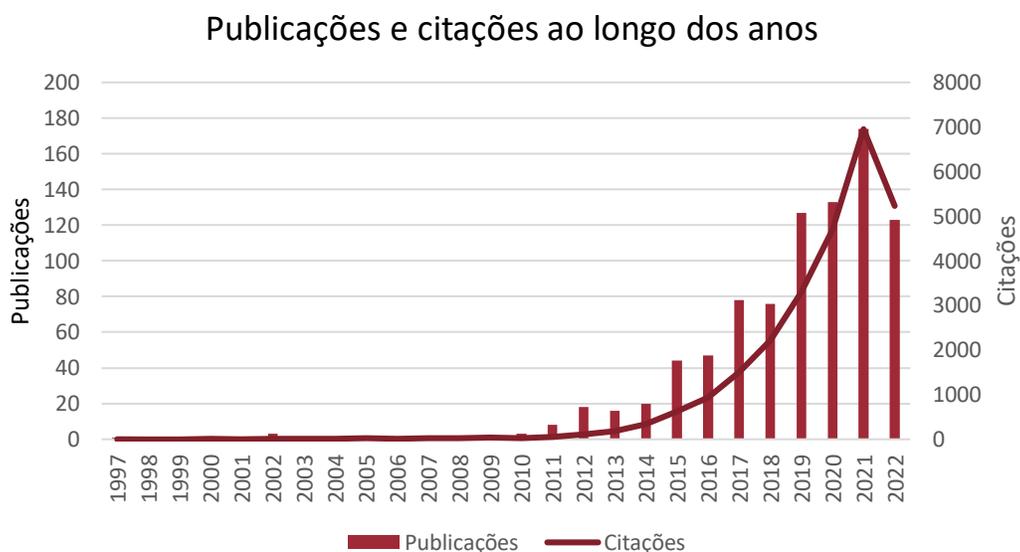


Figura 8. Evolução do número de publicações e citações de trabalhos envolvendo biogás por digestão anaeróbica e NPs. Figura elaborada a partir dos dados disponíveis na base de dados *Web of Science*.

Dentre os países de origem dos trabalhos analisados, destaca-se a China com uma contribuição de 102 artigos, seguida pelos Estados Unidos com 31 artigos e Índia com 27 artigos (Figura 9).

Contribuições por país

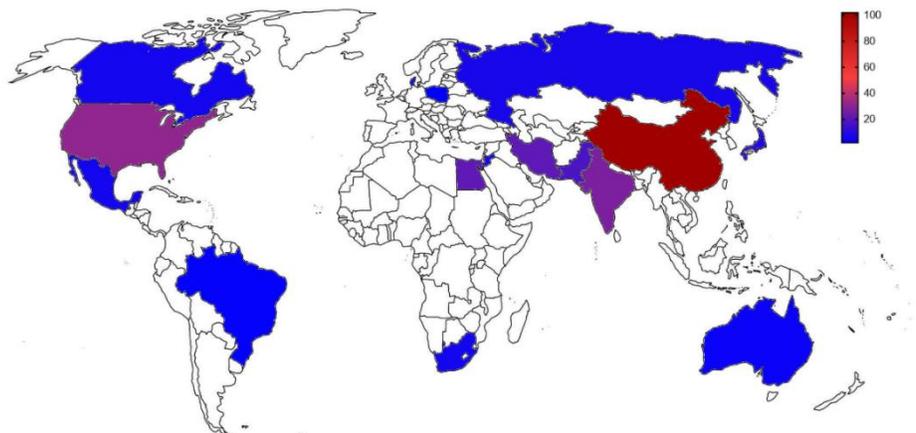


Figura 9. Mapa da distribuição da origem dos trabalhos empregados na meta-análise. As cores representam a quantidade de artigos publicados pelo país incluídos na meta-análise.

5.1.2. Impacto de NPs de diferentes composições na produção de CH_4 e análises estatísticas

Foram observados diferentes efeitos da adição de NPs na produção de CH_4 . Nos experimentos, algumas NPs são estudadas devido também a possíveis efeitos inibitórios. Assim, foi possível observar que determinadas NPs estão mais relacionadas ao aumento da produção de metano, enquanto outras demonstram mais impactos negativos na DA (Figura 10). As NPs com melhores efeitos para o aumento da produção de CH_4 são as compostas por cobalto, ferro zero valente e magnetita. Entretanto, o teste de variância entre estes grupos não apontou diferença significativa ($p > 0,05$). O óxido de zinco apresentou diferença significativa com os demais grupos, bem como o óxido de cobre, indicando maiores efeitos inibitórios relatados do que benéficos.

Impacto da composição de NPs na produção de CH₄

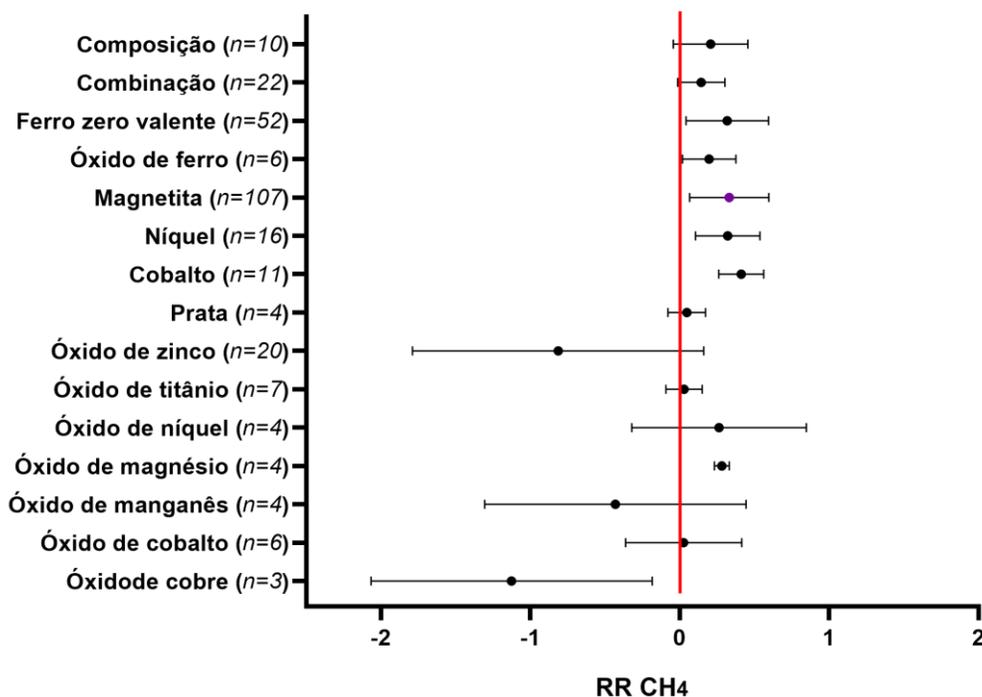


Figura 10. Comparação do impacto de diferentes composições de NPs. As barras indicam o desvio padrão (SD) em relação à média (pontos centrais) das amostras. Dados já filtrados pela identificação de *outliers* ROUT; *n* indica o número de observações.

É possível observar que algumas composições de NPs foram testadas em diversos tipos de substratos, enquanto outras composições se restringiram a poucos substratos específicos. Quando avaliados diferentes tipos de substratos (seccionados por resíduos de agricultura, industrial, municipal animal, co-digestão, biomassa aquática e substrato sintético), é possível observar que apenas a magnetita foi avaliada para todas as categorias de substrato e para todas apresenta, em média, melhores resultados (Figura 11).

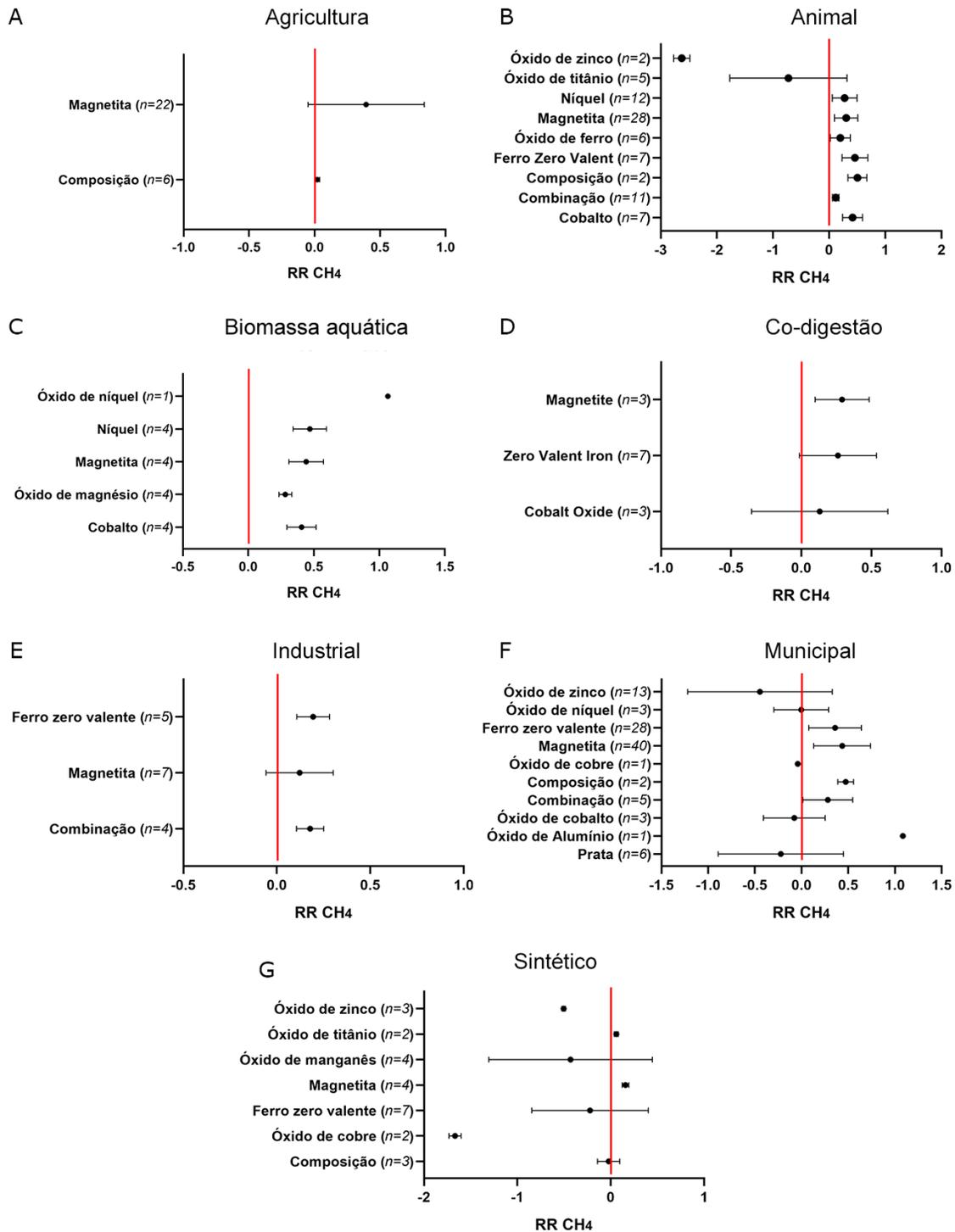


Figura 11. Comparação do impacto de diferentes composições de NPs por categoria de substrato. Agricultura (A); Resíduo animal (B); Biomassa aquática (C); Co-digestão (D); Resíduo industrial (E); Resíduo municipal (F); Sintético (G).

5.1.3. Impacto da variação de concentrações e tamanho das NPs na produção de CH₄

Foram coletados dados das características das NPs utilizadas em cada experimento analisado, bem como os substratos empregados e o aumento da produção de CH₄ em relação ao grupo controle de cada um. As concentrações observadas variaram de 0,03 a 5000 mg/L, se concentrando mais até 200 mg/L, e os tamanhos analisados foram delimitados entre 4 e 500 nm, se mantendo majoritariamente até os 200 nm (Figura 12).

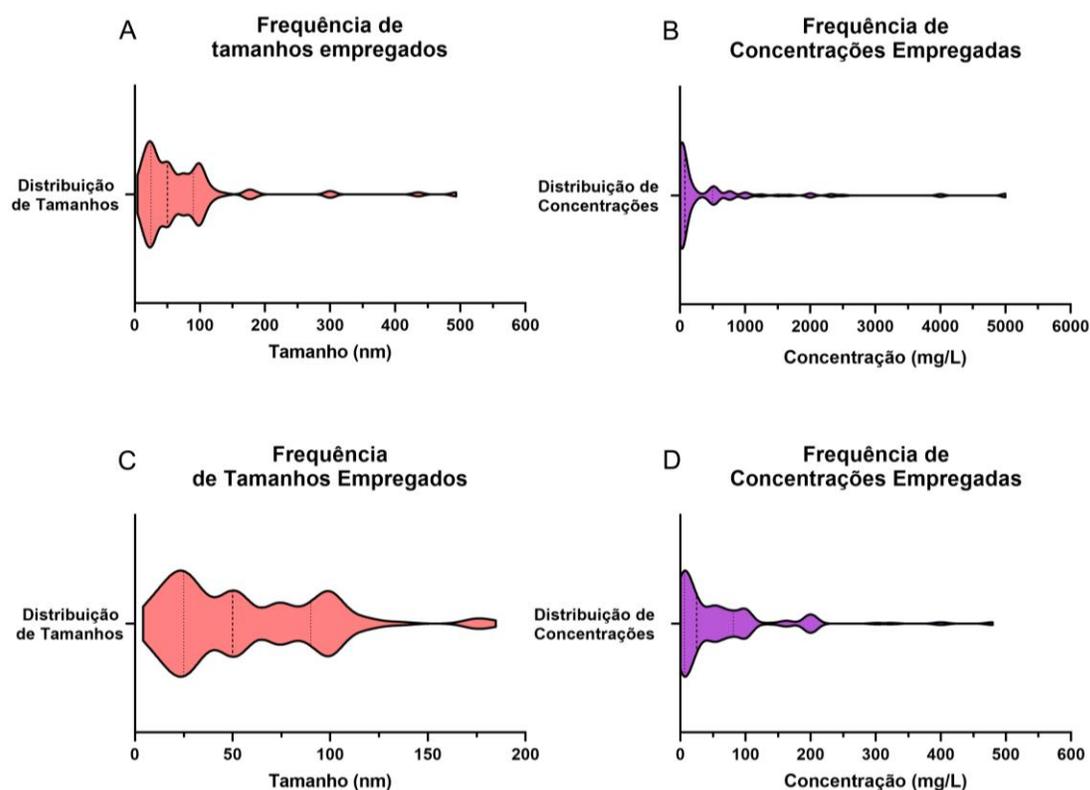


Figura 12. Gráficos de distribuição da frequência de emprego de tamanhos e concentrações de NPs nos trabalhos avaliados na meta-análise. Regiões mais estreitas apontam valores menos frequentes no banco de dados enquanto regiões mais largas apontam maior quantidade de observações com respectivos valores. (A) Gráfico de frequência com valores brutos de tamanhos empregados; (B) Gráfico de frequência com valores brutos de concentrações empregadas; (C) Gráfico de frequência com valores de tamanhos tratados pelo método ROUT de identificação de *outliers*; (D) Gráfico de frequência com valores de tamanhos tratados pelo método ROUT de identificação de *outliers*.

5.1.3.1 Análise de componentes principais (PCA) das características de NPs

Foram obtidos uma ampla gama de dados referentes à variação de tamanho e concentração das NPs empregadas nos experimentos relatados na literatura. Para uma visão integrada de tais fatores, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA - *principal components analysis*) para avaliar o peso que tais variáveis (tamanho e concentração de NPs) desempenham na produção de CH₄ em relação aos respectivos grupos controles (RR) (Figura 13). Os componentes PC1 (37,745%) e PC2 (32,834%) explicam, em conjunto, 70,58% da variação contida nos dados coletados (Figura 13B). É possível observar que, de maneira geral, sem separação de grupos de substratos ou NPs o aumento nos componentes de tamanho e concentração (representado pelos vetores de cada variável), apesar de próximas entre si, não explicam diretamente o aumento na resposta em relação à produção de CH₄, expressa por RR (Figura 13 A e C).

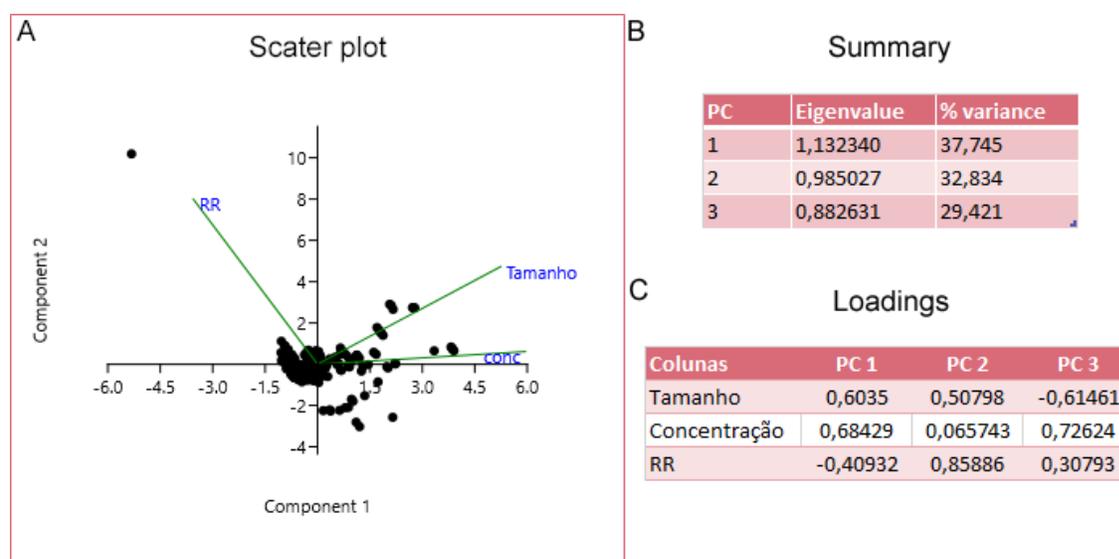


Figura 13. PCA de parâmetros dos experimentos analisados. Sumário de PC1 (37,745%) e PC2 (32,834%) explicam, em conjunto, 70,58% da variação contida nos dados (B). Tabela de peso e direção (positivo e negativo) dado entre os vetores “tamanho”, “concentração” e “RR” (C).

5.1.3.2. Impacto do tamanho das NPs na produção de CH₄

A partir da análise da superfície gerada pelo estimador de densidade de Kernel (KDE – *Kernel's density estimator*), observa-se que o aumento do tamanho da nanopartícula, de maneira geral, não resulta em maiores efeitos benéficos na produção de biogás, ou seja, em um RR maior (Figura 14). O método de KDE permite que se observe o perfil de densidade de distribuição dos dados frente a duas variáveis. Em outras palavras, ele permite que se observe em que pontos referentes às duas variáveis os dados obtidos estão mais concentrados. Dessa forma, também é possível observar que, de maneira geral, são muito mais utilizadas NPs com dimensões entre 4 e 120 nm, como foi também demonstrado previamente na Figura 14.

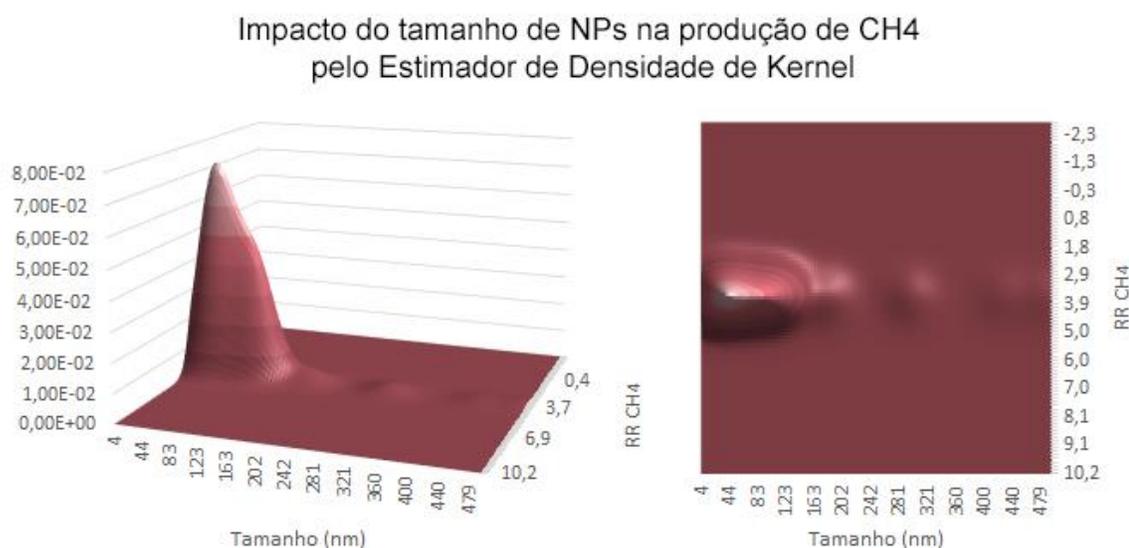


Figura 14. Gráfico de superfície 3D (A) e de contorno (B) gerada a partir da Estimativa de Densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de metano (RR CH₄) em função da variação do tamanho das NPs (nm) empregadas nos experimentos analisados.

5.1.3.3. Impacto da concentração de adição de NPs na produção de CH₄

As superfícies obtidas a partir da estimativa de densidade de Kernel realizadas no programa *Past* (HAMMER, 2001) para diferentes concentrações de NPs demonstraram que, em geral, o aumento na quantidade de NPs adicionadas não resulta necessariamente no aumento da produção de CH₄ (Figura 15). É possível observar pelos picos de densidade que a maioria dos experimentos não emprega concentrações acima de 700 mg/L. Contudo, aqueles que usam concentrações acima de 1000 mg/L não resultam em melhores respostas quanto a produção de CH₄, o que é demonstrado pelas discretas elevações ao longo do eixo x (concentração) alinhadas na mesma faixa do eixo y (RR).

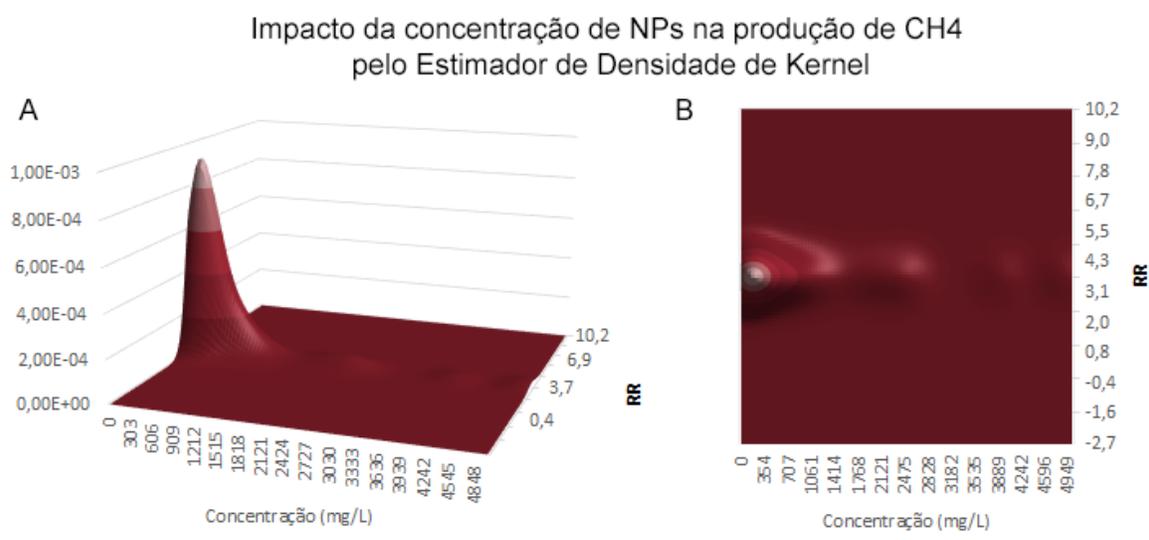


Figura 15. Gráfico de superfície 3D (A) e de contorno (B) gerada a partir da Estimativa de Densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de metano (RR CH₄) em função da variação de concentração empregada nos experimentos analisados.

5.1.4. Magnetita, Ferro e cobalto

A comparação entre o impacto de diferentes composições de NPs na produção de CH₄ demonstrou superioridade das NPs compostas por cobalto, ferro e magnetita. Apesar de apenas as NPs de magnetita estarem presentes em experimentos em todas as categorias de

substratos analisadas, é possível ainda separar os resultados de acordo com o substrato utilizado em cada experimento (Figura 16).

A magnetita foi a única das três melhores composições de NPs testada com resíduo de agricultura. Este substrato apresentou os melhores impactos na produção de CH₄, quando empregadas NPs de 50 nm e concentrações abaixo de 50 mg/L. NPs de magnetita testadas em resíduos municipais, também obtiveram bons resultados em concentrações inferiores a 150 mg/L, mas também entre 600 e 800 mg/L (Figura 16 A e B). As adições de NPs de ferro por sua vez, obtiveram os melhores resultados com substratos de origem municipal com NPs abaixo de 100 nm, mas com concentrações tanto inferiores a 50 mg/L (50 nm) como acima de 500 mg/L (50-100 nm). As adições de NPs de cobalto por fim, apesar de apresentarem a melhor média em resposta na produção de CH₄, foi testado apenas em substratos de origem animal e de biomassa aquáticas. É válido observar que foram empregadas baixas concentrações dessa NP e que as inferiores a 3 mg/L que apresentaram melhores resultados.

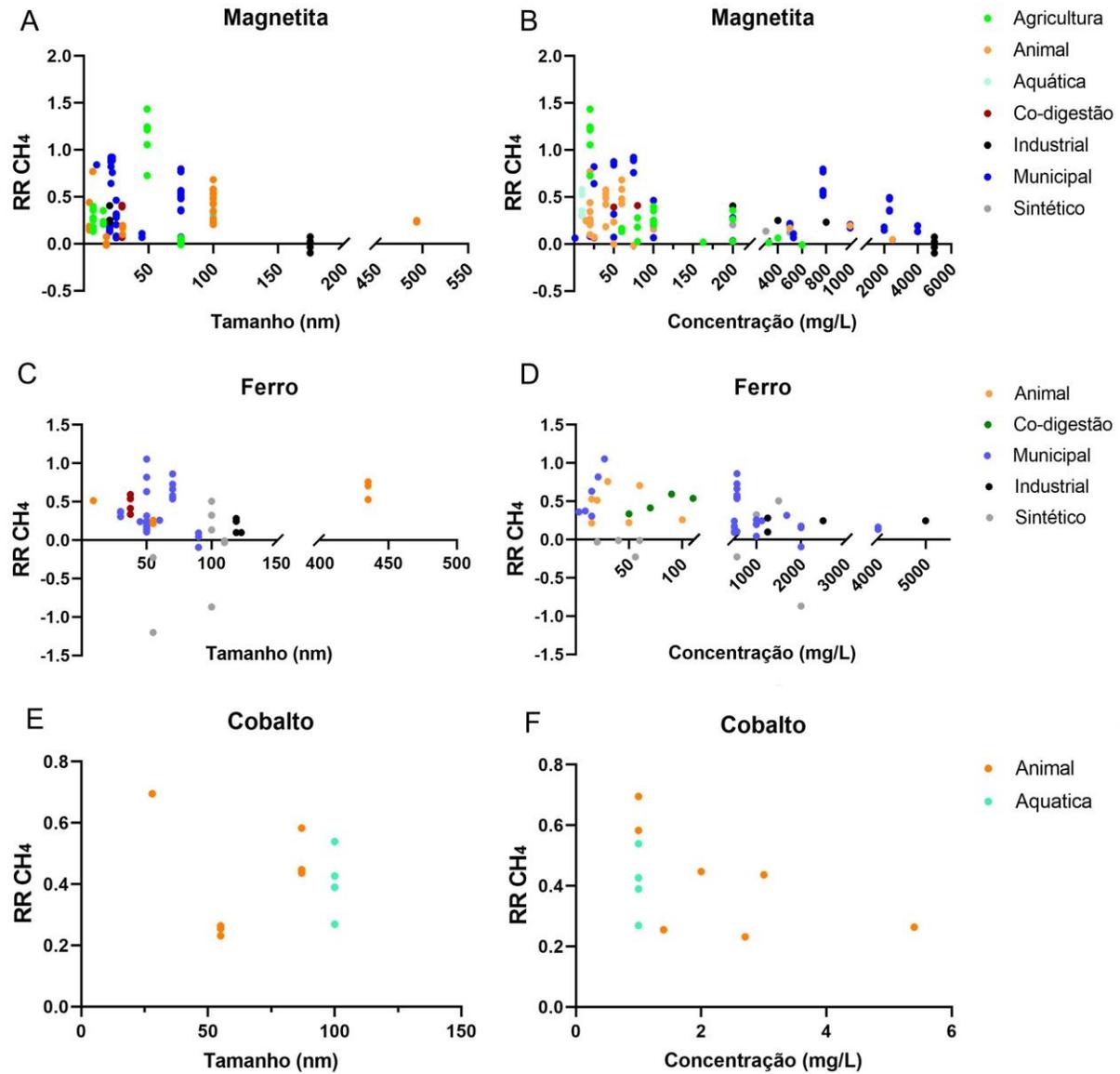


Figura 16. Gráficos de dispersão do impacto na produção de CH₄ em diferentes substratos testados para NPs de magnetita (A e B), ferro (C e D) e cobalto (E e F) frente a variação de tamanho (A, C e E) e concentração de NPs (B, D e F). As cores de cada ponto indicam a categoria de substrato testada. **REGULARIZAR EIXOS**

5.1.5. Magnetita

5.1.5.1 Tamanho e concentração da magnetita

Dado o desempenho e número de observações (n) superiores de experimentos com magnetita, foi possível avaliar individualmente esta composição de NPs em termos mais aprofundados de tamanho e concentração. Para a magnetita, quando avaliado o tamanho e a concentração separadamente pelo estimador de densidade de Kernel, de fato, a concentração não parece influir em maior ou menor impacto na produção de CH_4 (Figura 17).

Impacto da Concentração e Tamanho de NPs de Magnetita na produção de CH_4 pelo Estimador de Densidade de Kernel

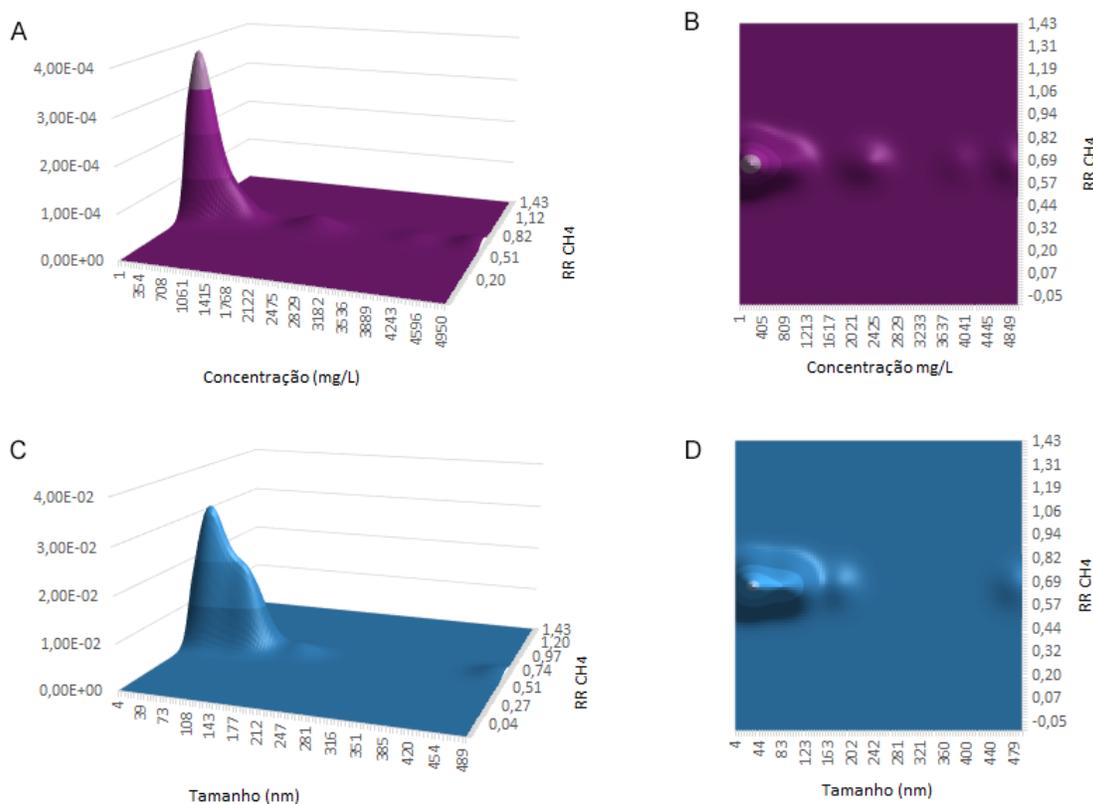


Figura 17. Gráfico de superfície 3D (A e C) e de contorno (B e D) a partir do estimador de densidade de Kernel. A elevação da superfície é proporcional à densidade de dados com os valores referentes às coordenadas dos eixos horizontais. É demonstrada visualmente a distribuição dos dados de aumento da produção de CH_4 (RR CH_4) em função a variação de (A e B) Concentração (mg/L) e (C e D) Tamanho (nm).

Foi possível também separar as observações de NPs de magnetita em 3 faixas de tamanho: NPs menores que 50 nm, NPs de 50 a 100 nm (frequentemente essa faixa é empregada para caracterizar as dimensões das NPs e não o seu tamanho médio, como por exemplo, na Sigma-Aldrich, EUA) e NPs maiores de 100 nm (as quais estão inclusive acima das dimensões tradicionais atribuídas à nanotecnologia) (Figura 18 A). Quando o impacto de NPs de magnetita na produção de CH₄ foi comparado por faixa de tamanho, observa-se que em estudos que empregaram faixas de até 50 nm e entre 50 e 100 foram obtidos melhores resultados, sendo observado resultados inferiores na produção de CH₄ em NPs maiores que 100 nm (Figura 18 A). A análise de variância de Kruskal-Wallis (devido às distribuições não terem passado no teste de normalidade de Shapiro-Wilk), seguida do teste de comparações múltiplas de Dunn, apontou diferença significativa apenas entre o conjunto de NPs >100 nm em comparação ao grupo 50-100 nm ($p= 0,0422$). NPs de até 50 nm e NPs entre 50 e 100 nm não apresentaram diferenças significativas. O gráfico de distribuição de violino (Figura 18A) demonstra que, apesar de NPs de dimensões inferiores a 50 nm apresentarem os resultados mais altos em relação a respostas de CH₄ (RR), a faixa com NPs entre 50 e 100 nm tem maior quantidade de observações com maiores aumentos na produção de CH₄ que as demais faixas.

Foram então avaliadas o impacto das NPs de magnetita na produção de CH₄ em função da concentração adicionada para cada uma das faixas de tamanho. Apenas NPs com dimensões de até 50 nm demonstraram correlação significativa ($p= 0,0433$), apesar de baixo ajuste ($r^2 = 0,06324$), as quais apenas demonstram maiores benefícios quando adicionadas em menos de 100 mg/L (Figura 18B). Para NPs com dimensões entre 50 e 100 nm, impactos semelhantes na produção de CH₄ foram encontrados para concentrações de aproximadamente 50 mg/L e 800 mg/L (Figura 18C).

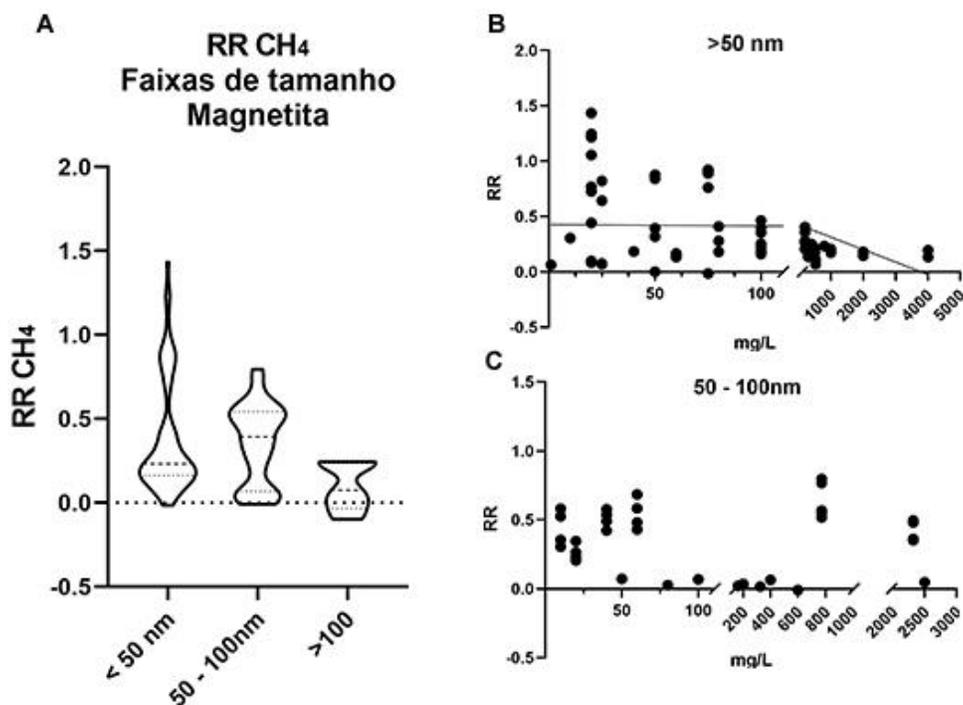


Figura 18. Distribuição de tamanhos de NPs de magnetita e seu impacto na DA; Impactos entre três faixas de tamanho na produção de CH₄ (A); Gráfico de dispersão de impactos na produção de CH₄ (RR) de NPs menores que 50 nm em função da concentração adicionada (B); Gráfico de dispersão de impactos na produção de CH₄ (RR) de NPs entre 50 e 100 nm em função da concentração adicionada (C).

5.1.5.2. Funcionalização de NPs de magnetita

Foi analisada a produção de CH₄ quando NPs de magnetita com algum tipo de funcionalização ou não foram adicionadas ao processo de produção de biogás (Figura 19). Apesar de uma aparente maior média de produção de CH₄ obtido no conjunto de NPs funcionalizadas, o Teste de Mann-Witney de variância não apontou diferença significativa entre os grupos. Vale observar que a quantidade de trabalhos empregando NPs funcionalizadas foi bem inferior ao de NPs sem funcionalização, indicando que este campo ainda está em expansão. As funcionalizações observadas incluem ureia (ALI *et al.*, 2022), carbamida (ALI; MAHAR; SHERAZI, 2020), citrato (BOSCARO *et al.*, 2022), amina (KHALID *et al.*, 2019) e surfactantes (LIU *et al.*, 2021).

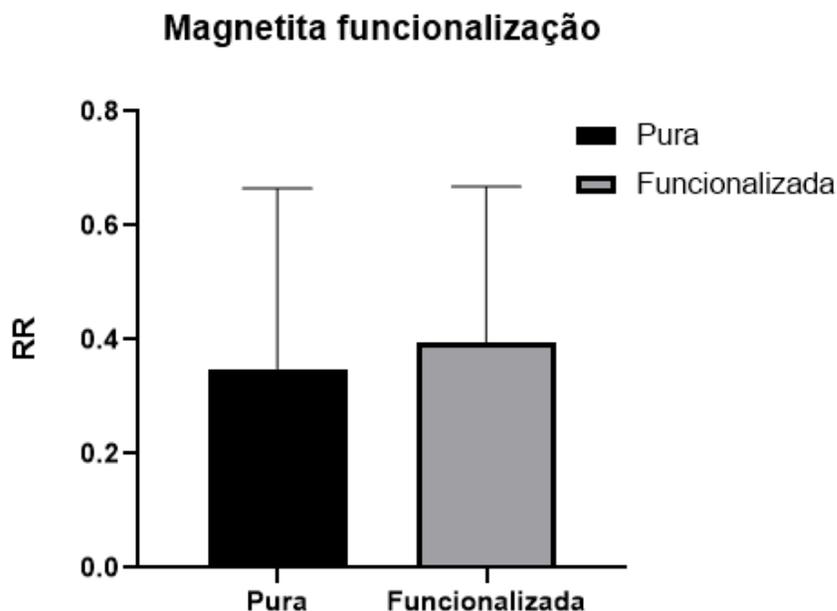


Figura 19. Comparação do aumento na produção de CH₄ (RR) entre NPs de magnetita puras e funcionalizadas. As barras representam o desvio padrão dos dados de cada um dos grupos.

5.2. Efeito de NMOBs na produção de biogás

5.2.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de NMOBs e NPSs

Após a produção de NMOBs em escala laboratorial, estas foram observadas por MET para análise de suas características estruturais. Os cristais provenientes do vibrião magnetotático *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T apresentaram formatos prismáticos e tamanho e fator de forma constantes de $60,0 \pm 4$ nm e $0,69 \pm 0,06$, respectivamente (Figura 20 A e B; $n = 100$). Não foram observados cristais com defeitos em planos cristalinos. Também foi observada a integridade da membrana do magnetossomo preservada durante o processo de extração e purificação eficientes.

As NPSs por sua vez são descritas pelo fabricante com dimensões entre 50 e 100 nm, (Sigma-Aldrich, EUA). Foi observado por MET que, além de formatos e tamanhos irregulares dos cristais, havia a tendência de agregação destas NPSs, o que tornou difícil a caracterização e dimensionamento destas estruturas, as quais apresentaram tamanho médio de 105 ± 40 nm e fator de forma de $0,84 \pm 0,07$ ($n = 100$). O tamanho observado foi também

um pouco acima da faixa apontada pela fabricante, provavelmente devido à agregação das NPs gerando aglomerados grandes e de difícil distinção durante as medidas. Foi possível observar também a ausência de qualquer recobrimento nas NPSs (Figura 20 C e D).

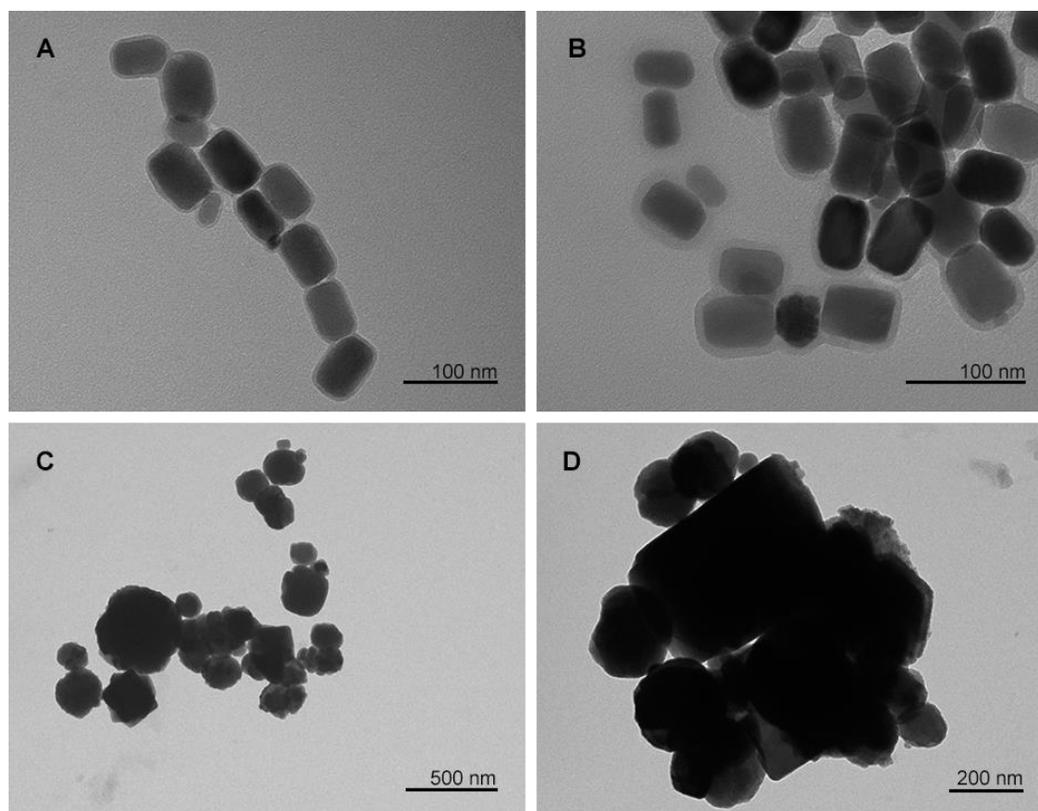


Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão (A e B) das NMOBs da cepa *Magnetovibrio blakemorei* MV-1^T; (C e D) NPSs obtidas comercialmente (Sigma-Aldrich, EUA; Ref:1317-61-9). É possível observar a diferença de uniformidade e de perfeição cristalográfica entre as NMOBs, em menor e maior aumento (A e B, respectivamente) e NPSs em maior e menor aumento (C e D respectivamente), além da tendência a formar agregados pelas NPSs (C e D).

5.2.2. Adição de NMOBs e NPSs em amostras de digestatos de reatores anaeróbicos

Foram realizadas duas rodadas de experimentos para avaliar e comparar o impacto da adição de NPSs e NMOBs na DA. Em cada rodada de experimentos foram empregados quatro digestatos provenientes de diferentes plantas de biogás operando continuamente com diferentes fontes de substratos. Foi realizada a caracterização de ST e SV, já que estes dados

são importantes para a caracterização do conteúdo orgânico presente no lodo avaliado. Os dados das características dos lodos utilizados (temperatura da planta, ST e SV) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Características de sólidos totais e sólidos voláteis dos lodos de digestores anaeróbicos usados nos experimentos.

Rodada	Planta	Substrato	Temperatura (°C)	ST (%)	SV (%)
1	A	Esterco animal (72-86% suíno)	52,5	5,48%	3,60%
1	B	Esterco animal (70-87% gado)	51	7,67%	5,26%
1	C	Esterco animal (70-87% gado)	51	8,37%	5,98%
1	D	Esterco animal (70-87% gado)	50	8,21%	6,05%
2	A	Resíduo de alimentos	41	3,98%	2,95%
2	B	Esterco animal	40	6,55%	4,88%
2	C	Resíduo de alimentos	42	5,36%	4,08%
2	D	Esgoto	38	4,02%	3,12%

Foi possível analisar a composição do gás produzido e sua evolução na produção de CH₄ e CO₂ durante um período de 9 dias. O conteúdo de CH₄ (Figuras 21 e 22), bem como o de CO₂ (Anexo 2) não apresentaram variações importantes entre os tratamentos e a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey, não apontou diferença significativa entre os tratamentos de NPSs e NMOBs e nem em comparação com o grupo controle para nenhum dos substratos. Todavia, é válido ressaltar algumas observações visuais do comportamento das curvas obtidas.

Na primeira rodada de experimentos, todos os digestatos empregados foram provenientes de digestores anaeróbicos de resíduo animal (esterco) (Figura 21) os quais continham em média de 3,6 a 6% de SV, ou seja, de matéria orgânica passível de degradação contida no total da massa de lodo empregado. Não são observadas diferenças claras entre os

tratamentos, porém as curvas de evolução na produção de gás não atingiram período de estabilização da produção de gás (quando a curva atinge seu *platô*), dificultando afirmar se haveria ou não diferenças até a fase estacionária da produção.

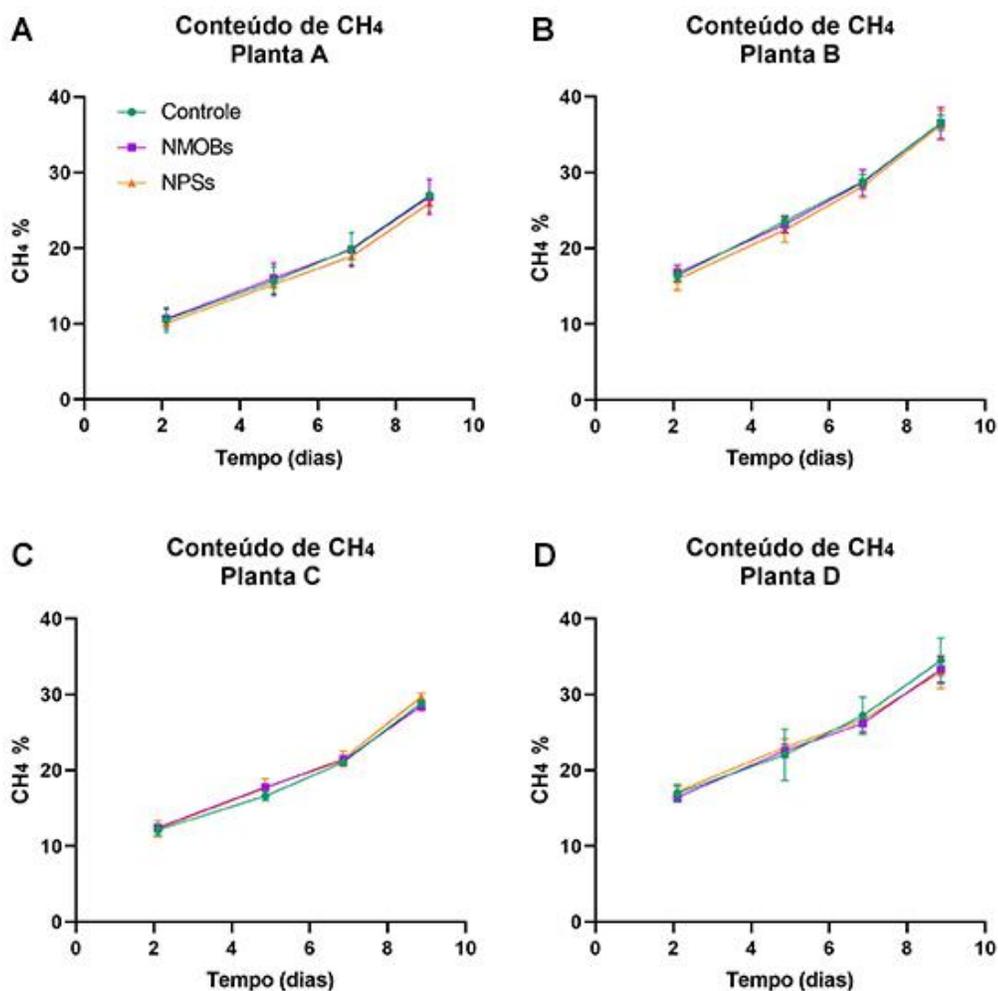


Figura 21. Produção de CH₄ ao longo do experimento na primeira rodada de experimentos utilizando digestatos provenientes de digestores anaeróbicos de esterco em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está representado pelos pontos de cor verde. A, B, C e D representam diferentes Plantas de digestores anaeróbicos fontes do lodo, nesta rodada de experimentos, todos os lodos empregados eram provenientes de Plantas operando com esterco animal composto com diferentes parcelas de esterco suíno e bovino, como substrato.

Durante a segunda rodada foram utilizados digestatos de digestores operando com diferentes substratos, sendo eles: planta A – Resíduo de alimentos; planta B – Esterco animal (não foi possível obter informações do animal de origem); planta C – Resíduo de alimentos; planta D – Esgoto municipal.

Na segunda rodada, da mesma maneira que na anterior, novamente não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos e grupo controle ao longo do experimento. Contudo, visualmente, é possível observar que nos primeiros dias do experimento na planta A há um discreto aumento da produção de CH_4 nos grupos em que foram adicionados NMOBs e nos que foram adicionadas NPSs; enquanto que o conteúdo de CH_4 no grupo controle só se equivale aos tratamentos de NMOBS e NPSs ao fim do experimento (Figura 22 A). Esta amostra continha lodo proveniente de resíduos de alimentos e com o menor conteúdo de SV dentre os lodos analisados. Na planta B, a diferença dentre o grupo de NPSs frente as demais já demonstra ser quase imperceptivelmente menor (Figura 22 B). As plantas C e D, por sua vez, parecem indicar superioridade no impacto do grupo de NPSs na produção de CH_4 (especialmente com a planta D, a qual também apresentava relativamente baixo o conteúdo de SV em relação a B e C) e um menor desempenho das NMOBs após os primeiros dias de experimento (Figura 22 C e D). Tais diferenças sugerem que, frente a diferentes substratos e, portanto, a distintos perfis microbianos, NPSs e NMOBs podem apresentar melhor ou pior impacto na produção de biogás.

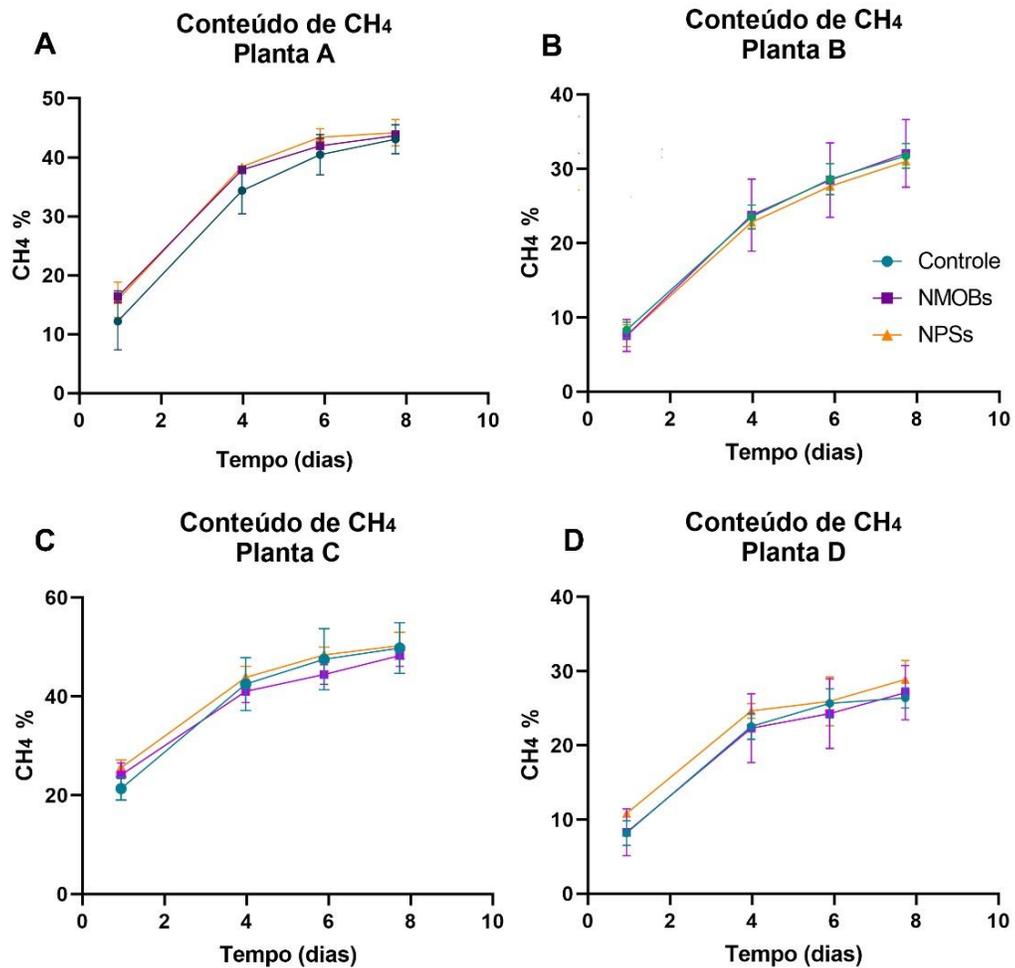


Figura 22. Concentração de CH₄ ao longo do período de incubação de lodos anaeróbicos na segunda rodada de experimentos em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está representado pelos pontos de cor verde (A) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (B) Lodo de digestor operando com esterco animal como substrato; (C) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (D) Lodo de digestor operando com resíduo de esgoto municipal como substrato.

6. DISCUSSÃO

6.1. Meta-análise e as melhores condições de adição de NPs na DA

6.1.1. Publicações, países, e dados das NPs

Com base em dados mundiais gratuitos disponíveis online, é possível analisar dados de fontes de energia, combustíveis fósseis e os seus consumos por diferentes países. Nos níveis atuais de consumo e das reservas dos combustíveis fósseis, a humanidade terá petróleo e gás natural disponíveis por mais apenas 54 e 49 anos, respectivamente. No entanto, muitos países ainda aumentaram seu consumo de combustíveis fósseis nos últimos anos (RITCHIE; ROSADO; ROSER, 2022).

Como descrito no item 5.1.1, China, EUA e Índia foram os países que mais publicaram pesquisas incluídas na meta-análise aqui realizada onde as NPs foram adicionadas na DA. São também países com problemas relacionados à gestão de resíduos, poluição e necessidades energéticas. A China consumiu 43.491 Terawatts-hora (TWh) de energia em 2021, sendo 36,22 TWh dela a partir de combustíveis fósseis. Não muito distante, os EUA foram responsáveis por um consumo de 25.825 TWh de energia primária (21,07 TWh de combustíveis fósseis) no mesmo ano. Apesar do consumo de energia da Índia parecer menor (9.841 TWh em 2021 com 8,81 TWh de combustíveis fósseis), é importante considerar que esses dados não levam em conta as diferenças econômicas entre os países citados (RITCHIE; ROSADO; ROSER, 2022). A Índia também apresenta um histórico de problemas sanitários, especialmente em rios e comunidades ribeirinhas que levam a infecções frequentes devido à contaminação de água e alimentos, o que está intimamente relacionado com as águas residuais não tratadas em muitas partes deste país (GERBA; ROSE, 2003). Dessa forma, é possível traçar uma relação entre as demandas energéticas e ambientais destes países e sua busca por novos meios de produção de energia renovável e sustentável, uma vez que estes consumos exigem recursos os quais não estarão mais disponíveis para a humanidade por muito mais décadas.

Vale ressaltar, ainda, que a relativa baixa quantidade de trabalhos analisados ao fim do processo da meta-análise está relacionada à frequente ausência de informações a respeito

das dimensões das NPs. Dentre os 377 artigos pré-triados a partir dos critérios descritos na metodologia deste trabalho, pode-se constatar que uma parcela significativa deles não foi incluída na análise final. Isto foi resultado, principalmente, da falta de informações mínimas a respeito das NPs (tamanho, concentração e composição). Pouco mais de 100 artigos foram excluídos por falta de dados a respeito do tamanho das NPs empregadas, informação que se provou importante na determinação de concentração ótima da magnetita, no processo de DA, por exemplo (Figura 18). Isto demonstra a necessidade de se padronizar as informações mínimas essenciais para este tipo de trabalho, uma vez que a ausência de dados a respeito da natureza dos materiais utilizados pode, inclusive, limitar sua reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos.

6.1.2. Impacto da composição, concentração e tamanhos das NPs na produção de CH₄

Foi observado na Figura 12 que as principais composições de NPs com melhores impactos médios na produção de CH₄ foram as de cobalto, ferro e magnetita, apesar de os mesmos não apresentarem diferença estatística entre si. Vale observar que o *n* de observações para magnetita é muito superior em relação ao de ferro e cobalto. A popularidade e desempenho da magnetita pode estar relacionada à diversidade de efeitos relatados para esta composição, especialmente seu papel condutor na DIET.

HUANG *et al.* (2020) empregaram 8 mM de magnetita na DA de resíduos de plantação de arroz e observaram que, além do aumento da atividade metanogênica, houve modulação da comunidade microbiana com o enriquecimento dos gêneros *Geobacter* e *Methanosaeta*, os quais também desempenham a DIET e o aumento da degradação do substrato (HUANG *et al.*, 2020). O estímulo à DIET também pode ser aliado à remoção de sulfato, como demonstrado por JIN *et al.* (2019), ao empregar 20 mM de magnetita em água residual artificial com alta concentração de sulfato. Além do aumento na produção de CH₄ e da condutividade do meio, os pesquisadores observaram um aumento do número de gêneros de bactérias relacionadas à redução do sulfato, juntamente com gêneros de arqueias metanogênicas. Esses resultados indicam o estímulo da DIET entre estes microrganismos e, portanto, adiciona “remoção de sulfato” às possíveis vantagens da adição de magnetita na DA (JIN; ZHAO; ZHANG, 2019). Além da modulação da comunidade microbiana pelo estímulo à DIET, a liberação de íons Fe⁺² pode favorecer a formação de sais de sulfeto de

ferro, auxiliando na mitigação da formação do H_2S , o qual é tóxico para uma série de microrganismos. O H_2S pode também causar a diminuição do pH do sistema e, se encanado, é altamente corrosivo para tubulações e outras instalações, além de apresentar riscos importantes para a saúde humana quando inalado (APPELS *et al.*, 2008; TRUONG *et al.*, 2006). Por fim, CASALS *et al.* (2014), ao adicionar magnetita de 7 nm (10-20 mg/L) em DA de resíduo municipal, também demonstraram alterações da magnetita ao longo do processo de DA. Por meio do uso integrado de difração de raios X (XRD), espectroscopia de absorção de raios X (XANES), magnetometria de dispositivo de interferência quântica supercondutora (SQUID) e espectroscopia de perda de energia (EELS), foi observado que as NPs não apenas diminuíram de tamanho mas perderam íons Fe^{+2} . Sendo assim, a liberação sustentada de ferro a partir das NPs de magnetita estimulou a atividade das metanogênicas sem causar toxicidade ao sistema, levando a um aumento da produção e qualidade do biogás em 180% (CASALS *et al.*, 2014).

A magnetita, óxido metálico obtido de modo relativamente fácil mais frequentemente pelo processo de co-precipitação ou decomposição hidrotermal (REDDY *et al.*, 2012), foi a NPs mais estudada e apresentou-se entre as que melhor impactaram na produção de CH_4 . Sua obtenção comercial também não apresenta grandes dificuldades, sendo comercializada por diversos fornecedores descritos nos artigos analisados nessa meta-análise (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; US Research Nanomaterials, Inc, Houston, TX, USA; Wako Pure Chemical Industries Ltd, Japan; Macklin Chemistry co. Ltd, Shanghai, China; Merck Limited, Darmstadt, Germany).

O ferro zero valente ou ferro de valência zero (ZVI), representado comumente por Fe^0 , também impactou fortemente a produção de CH_4 na DA. Os íons Fe^{+2} possuem grande importância no metabolismo metanogênico. Em estudos envolvendo espécies do gênero *Methanothermobacter*, foi observado sua importância para a síntese de uma série de enzimas como hidrogenases, desidrogenases e redutases, além de ferridoxinas (KASTER *et al.*, 2011). O ferro de valência zero provou ser um doador de íons Fe^{+2} de lenta liberação adequado para a metanogênese e redução do sulfato durante o processo AD, resultando em um aumento na taxa de produção de biogás rico em CH_4 (KARRI; SIERRA-ALVAREZ; FIELD, 2005). Em experimentos utilizando esterco como substrato (resíduo animal), 20

mg/L de NPs de Fe também representaram um aumento no volume de biogás em 1,45 vezes e 1,59 vezes na produção de CH₄ (ABDELSALAM *et al.*, 2017a). A adição de ZVI também foi descrita em conjunto com NPs de magnetita de modo a estimular simultaneamente MIET e DIET, geralmente atribuídas à presença de ZVI e magnetita, respectivamente. Isoladamente ZVI gerou 40,8% a mais de CH₄ que o grupo controle, enquanto a combinação rendeu 68,9% de aumento em substratos de origem municipal (ZHAO *et al.*, 2018). Vale ressaltar que íons de Fe⁺² e Fe⁺³ também podem ser liberados por óxidos de ferro como hematita, maguemita e magnetita, a depender de suas características cristalográficas, as quais são determinantes na dissolução destes minerais (ALLEN; KIRBY; SELLERS, 1988; LAGOEIRO, 1998).

A liberação sustentada de íons de ferro também poderia favorecer a reação de Fenton, de modo a remediar outras substâncias nocivas presentes em águas residuais, por exemplo. A reação de Fenton é uma solução de peróxido de hidrogênio e um catalisador de ferro. Esta reação já vem sendo estudada para degradação de poluentes inorgânicos e orgânicos em tratamentos de águas residuais, bem como em pré-tratamentos na produção de biogás. Tal estratégia pode ser aliada à remoção de poluentes prejudiciais à comunidade microbiana, bem como a qualidade do biofertilizante final. Também são descritos métodos de otimização desta reação para a purificação (upgrade) do gás produzido, sendo essencial a concentração adequada de íons Fe⁺² para a remoção do H₂S pela via de oxidação do radical hidroxila (WANG *et al.*, 2019). Contudo, para que ocorra de modo eficiente, esta reação exige faixas de pH baixíssimas (em torno de 3), o que não é comum na DA. Na verdade, como descrito anteriormente, a redução drástica do pH na DA pode levar à inibição do metabolismo sintrófico da comunidade microbiana (APPELS *et al.*, 2008; NEYENS; BAEYENS, 2003).

O cobalto (Co) - metal de transição, obtido a partir da mineração por processos pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos ou por dissolução em soluções ácidas (ácido clorídrico) ou básicas (amônia) dependendo do minério fonte - e suas NPs são produzidas por métodos como pirólise em atmosfera inerte, decomposição termal, irradiação a laser, redução de sais, todos envolvendo uma série de condições especiais e certas limitações. O cobalto e suas NPs são usados na indústria principalmente para fabricação de corantes de cor azulada, também sendo encontrado em ligas metálicas, baterias e como catalizadores (KHUSNURIYALOVA *et al.*, 2021). Na DA, o Co está entre os elementos traços mais

importantes, sendo necessário na síntese de cobalamina e coenzima B12, importantes partes de complexos enzimáticos envolvidos na metanogênese (ZHANG *et al.*, 2009). Dessa maneira, vem sendo demonstrado o benefício da suplementação deste elemento por meio de NPs. Recentemente, ABDELWAHAB *et al.* (2021) relataram um aumento de 14,81% na produção de biogás, a partir de esterco bovino, com a adição de 2 mg/L de NPs de Co, além de relatarem que a qualidade do digestato gerado foi comparável ao obtido comercialmente, demonstrando também um efeito benéfico na degradação do substrato (ABDELWAHAB *et al.*, 2021). HASSANEIN *et al.* (2019) testaram diferentes concentrações de Ni, Co, Fe e magnetita e, em seguida, combinações entre estas composições na DA de resíduos de avicultura (“cama de frango”). Foi observado que as concentrações de 4,5 mg/L de Co, 100 mg/L de Fe e 15 mg/L de magnetita aumentaram entre 27-30% a produção de CH₄, enquanto as misturas das mesmas resultaram na diminuição significativa da produção de H₂S (HASSANEIN; LANSING; TIKEKAR, 2019). O mesmo grupo também demonstrou os efeitos de misturas semelhantes em digestores em operação contínua, em que houve aumento de 23,7% na produção de biogás e uma depleção significativa na produção de H₂S, além do aumento nas concentrações de Fe, Ni e Co (presentes nas NPs) e N, P, Zn, Mn, Cu e Na, os quais são resultado da maior eficiência no processo de digestão e agregam maior valor ao digestato em termos de uso como biofertilizante (HASSANEIN; KELLER; LANSING, 2021). Nos resultados descritos no item 5.1.4, e demonstrados na Figura 16, é possível observar que as concentrações para NPs de cobalto não ultrapassam os 6 mg/L e que os maiores aumentos na produção de CH₄ estão em torno de 3 mg/L, muito abaixo das faixas de ferro e magnetita, provavelmente devido ao fato do cobalto atuar como micronutriente. De certa maneira, isso é vantajoso economicamente, visto que NPs de cobalto são fornecidas entre \$ 12 a 95,00/g (*Nanografi Nano Technology; SS Nanomaterials, Inc; US Research Nanomaterials, Inc*), dependendo das especificações de tamanho e de pureza. Contudo, a estreita faixa ótima de adição de NPs torna mais delicada a previsibilidade dos resultados, uma vez que 1 mg/L já pode diminuir os benefícios apresentados. Vale, mais uma vez, ressaltar o baixo número de observações para estas NPs, o que reduz a possibilidade de deduzir os impactos dessa NPs para mais substratos com maior segurança.

Vale ainda destacar que a presença de NPs no digestato, potencial biofertilizante, requer maiores estudos, considerando a segurança de alimentos produzidos, uma vez que a

presença de NPs pode impactar a diversidade da microbiota de animais, solos e vegetais, favorecendo ou não microrganismos benéficos e/ou patogênicos (SIEMER *et al.*, 2018).

6.1.3. Magnetita

A superioridade no número de experimentos relatados para NPs de magnetita permitiu a realização de análises mais detalhadas em relação aos seus parâmetros de adição no processo de DA. A obtenção de uma grande quantidade de dados a respeito da adição de NPs de magnetita permitiu elaborar mais análises e assim, compreender melhor os efeitos dessas NPs. Contudo, vale ressaltar que é necessário que mais experimentos com informações mais claras em outras composições sejam feitos para que os impactos de outras NPs também possam ser esclarecidos de maneira mais aprofundada.

6.1.3.1. Tamanho e concentração

NPs de magnetita de tamanhos menores, além de serem mais empregadas, parecem alcançar resultados mais relevantes na produção de biogás, dependendo da concentração (Figuras 16, 17 e 18). Dentre as vantagens atribuídas ao uso de NPs de maneira geral, foi citado anteriormente a área de superfície, que é inversamente proporcional ao tamanho médio das NPs, especialmente considerando que a maioria é descrita com formatos próximos a esferas (JUNTUPALLY *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2022; ZAIDI *et al.*, 2021). Sendo assim, NPs com menores dimensões teriam vantagens sobre as maiores, além de potencialmente apresentarem melhor dispersão com menor gasto de material no lodo presente nos reatores. Contudo, foi observado que, apesar das NPs menores de 50 nm apresentarem os resultados mais altos em relação à produção de CH₄, NPs entre 50 e 100 nm apresentam maior quantidade de observações com aumentos expressivos na produção de CH₄, ainda que não tenham dados individuais únicos tão altos como nas NPs menores de 50 nm. Esse dado sugere que talvez estas NPs possam ter impactos mais previsíveis e menos variáveis na produção de biogás por DA. Foi observado também que o impacto desta faixa de tamanho não tem correlação significativa com a sua concentração, sugerindo que mais fatores estão envolvidos no seu efeito na DA.

A análise da concentração de adição das NPs de magnetita durante a DA mostrou que a faixa ideal de concentração para utilização de NPs de magnetita no aumento da produção de biogás está abaixo de 100 mg/L quando empregadas NPs menores de 50 nm (Figura 18). Este possível “limite” na concentração de nanomagnetita destas dimensões pode estar relacionado a provável dissolução das mesmas ao longo do tempo, liberando íons de Fe^{+2} e Fe^{+3} , os quais podem ser benéficos, especialmente considerando que tal elemento é de suma importância na formação de hidrogenases, desidrogenases, redutases e ferridoxinas, importantes no metabolismo de metanogênicas e da maioria dos microrganismos da comunidade envolvida na DA. Contudo, em altas concentrações o ferro se torna tóxico para a maioria dos microrganismos, exigindo, portanto, quantidades controladas (GOSWAMI *et al.*, 2016). Se as NPs entre 50 a 100 nm se apresentarem como opções mais estáveis à dissolução e, portanto, menos propensas a causar estresse por superdosagem, talvez sejam uma escolha mais segura. A falta de correlação estatística entre variáveis de concentração e a resposta da produção de CH_4 para NPs entre 50 e 100 nm não apenas sugere que há mais variáveis influenciando nesse impacto, mas que o efeito das mesmas deve estar além da liberação de íons ferro, uma vez que a alta concentração poderia facilmente causar estresse. Dessa forma, é provável que as NPs nesta faixa de tamanho tenham influência condutora como estímulo à DIET, mais que na liberação de ferro. Tais deduções só podem ser confirmadas com segurança a partir do emprego de análises da comunidade microbiana atreladas ao perfil de condutividade do digestato.

Para uma discussão mais aprofundada sobre a liberação de íons de ferro seria necessário ter a caracterização cristalográfica das NPs por microscopia de alta resolução (HRTEM), uma vez que o perfil de liberação depende, em geral, da existência de faces irregulares nos cristais que proporcionem instabilidade eletrônica na estrutura molecular do cristal. A magnetita apresenta três planos cristalográficos: [110], [111] e [100]. De acordo com os estudos de ALLEN *et al.* (1998) e YAMAZAKI (2020), a face [111] é duas vezes mais propensa à dissolução devido ao arranjo molecular compacto de átomos de oxigênio, que seriam facilmente protonados sob condições ácidas. Assim sendo, a dissolução de NPs com mais faces [111] estariam mais propensas a dissolução que NPs com faces [110] e [100]. Tais estudos também sugeriram que NPs mais alongadas, por apresentarem maior superfície de contato relativa, também estariam mais propensas a dissolução (ALLEN; KIRBY;

SELLERS, 1988; YAMAZAKI, 2020). Entende-se assim, que NPs com tais características cristalográficas, bem como formatos com inclusões que resultam na maior superfície de contato seriam de maior interesse se o propósito da sua adição for estritamente a liberação de íons ferro. Contudo, afirmar que o impacto das NPs no sistema é unicamente causado por tal liberação só é possível com técnicas de caracterização refinadas dos materiais empregados, muito pouco observadas nos trabalhos envolvendo a adição de NPs na DA (CASALS *et al.*, 2014). Mais uma vez, se reforça que trabalhos envolvendo nanotecnologia requerem técnicas refinadas de caracterização dos nanomateriais, sendo imperativo a padronização de informações mínimas necessárias.

6.1.3.2. Funcionalização

Durante a coleta de dados e a análise dos trabalhos envolvidos nesta meta-análise, foi possível observar o emprego de NPs com algumas formas de recobrimento. Apesar do teste estatístico não apontar diferença significativa no aumento da produção de CH₄ em comparação aos experimentos com NPs sem recobrimento, o emprego de NPs com recobrimento pode ter benefícios em diferentes maneiras para a DA. ALI *et al.* (2020) utilizaram NPs de magnetita recobertas de carbamida e resultaram em uma maior produção de CH₄ no grupo em que foram adicionados 75 mg/L de NPs recobertas do que o observado com a mesma concentração de NPs puras (ALI; MAHAR; SHERAZI, 2020). Estes resultados estão de acordo com os encontrados pelo mesmo grupo em um estudo publicado em 2022 no qual NPs de magnetita com ureia não apenas resultaram em um maior aumento de CH₄, como atingiram a fase estacionária de produção mais rapidamente que os outros 2 tratamentos do estudo (NPs recobertas por brometo de cetiltrimetilo e NPs sem capeamento) e o grupo controle (ALI *et al.*, 2022). KHALID *et al.* (2019) prepararam NPs de magnetita utilizando L-lisina como agente de capeamento com a finalidade de evitar agregação das mesmas, quando adicionadas à DA de palha de arroz com e sem pré-tratamento alcalino. Apesar de não comparar o efeito das NPs sem o recobrimento, a justificativa utilizada para o emprego do recobrimento (evitar agregação) ressalta um desafio no emprego de NPs sintéticas, que potencialmente dificulta a dispersão adequada dessas estruturas no digestato (KHALID *et al.*, 2019).

A presença de uma espécie de recobrimento pode, portanto, promover maior estabilidade às NPs, ou mesmo simular uma cobertura orgânica (uma vez que a maioria se trata de compostos de carbono e nitrogênio) de modo a diminuir o estresse aos microrganismos. Tais dados também despertam novas possibilidades de funcionalização com substâncias de interesse que possam estimular de alguma maneira a DA. Vale lembrar que os preços médios dos nano ímãs revestidos com amina, polietileno glicol (PEG) e carboxila são de aproximadamente US\$ 40.000, 32.000 e 100.000/kg (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021) ressaltando a importância do desenvolvimento de novos métodos de produção de NPs com características semelhantes quanto ao revestimento.

6.2. Efeito de NPSs e NMOBs na produção de biogás e CH₄ em digestatos provenientes de digestores anaeróbios

6.2.1. NMOBs e NPSs

Como descrito nos itens anteriores, NPs de magnetita apresentam resultados relevantes quando adicionadas na DA, quando menores que 50 nm em quantidades inferiores a 100 mg/L, ou com menor influência da concentração em NPs entre 50 e 100 nm. Também foi descrito o emprego de agentes de recobrimento como estratégias para maximizar o potencial de tais estruturas. Por fim, foi observado que alguns substratos apresentaram maiores benefícios que outros na adição de NPs de magnetita, ferro e cobalto (Figura 16). Portanto, torna-se válido explorar o impacto de NMOBs frente a diferentes substratos e comparar seu efeito ao de NPS de magnetita de dimensões similares na produção de biogás e CH₄.

A produção de NMOBs, apesar de sustentável e economicamente vantajoso quando comparado a outras NPs magnéticas de mesma qualidade (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021), ainda apresenta desafios como o baixo rendimento na sua produção em larga escala. Dentre os desafios, o cultivo de BMs é descrito como um processo fastidioso, devido entre outras dificuldades a manutenção das células magnetotáticas sem que ocorram deleções em sítios do MGC, gerando organismos não magnéticos (SCHÜBBE *et al.*, 2003; ULLRICH *et al.*, 2005) ou magnetossomos de tamanho e formato alterados, bem como defeitos nos planos cristalinos, que diminuem a estabilidade dos cristais à dissolução e afetam seu perfil

magnético (LI *et al.*, 2012). Tais desafios podem ser um problema na aplicação industrial das NMOBs, apesar dos avanços em métodos de otimização para mitigar tais dificuldades e aumentar a eficiência dessa produção biológica (BASIT *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2011). Entende-se, portanto a importância de manter o controle de qualidade rigoroso, incluindo tamanho, formato e integridade da membrana, além de assegurar a limpeza adequada dos detritos após o processo de extração de cristais. Nas imagens de microscopia obtidas, é possível observar os tamanhos e formatos uniformes das NMOBs produzidas neste trabalho. Como foi observado nos resultados da meta-análise, NPs com tamanho acima de 100 nm já não beneficiam de forma relevante a DA e, portanto, é importante o controle fino do tamanho da NP a ser empregada. A observação das faces das NPs é muito importante uma vez que defeitos nos planos cristalinos podem resultar em perfis de liberação de ferro diferentes, o que poderá impactar a comunidade microbiana de forma desigual. Sem a devida caracterização, os experimentos se tornam irreprodutíveis.

Devido à propriedade de monodomínio magnético dada pela perfeição cristalográfica e pelas proporções de tamanho características de NMOBs é possível que estas poderiam ter efeito condutor que beneficiasse a DIET. A membrana biológica, por sua vez, apresenta diferentes grupos funcionais e sítios de ancoragem, amplificando as possibilidades de interações e potenciais carreadores de metabólitos ou elétrons entre a comunidade microbiana (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021; LIN *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2018). Apesar da resistência da membrana (AMOR *et al.*, 2015), ainda é possível que certa liberação de íons de Fe^{+2} ocorra de modo discreto, estimulando controladamente o metabolismo metanogênico. Já foi demonstrado que há um acúmulo de íons ferro dentro da membrana do magnetossomo e a persistência do cristal mesmo após o período de nucleação do mesmo (AMOR *et al.*, 2020; WERCKMANN *et al.*, 2017).

As NPSs apresentam uma grande variedade de formas e tamanhos em uma mesma amostra, além da ausência de uma membrana biológica. Dessa forma, são potencialmente mais instáveis. As NPSs teriam, em teoria, maior potencial para interações devido a sua maior superfície de contato dado pelas imperfeições cristalográficas, mas também possível dissolução, a qual poderia resultar em estímulo ou toxicidade à comunidade microbiana a depender da dosagem, implicando na necessidade de um controle fino na concentração e taxa

de liberação de tais íons no sistema. Se a liberação de ferro for o principal benefício para a comunidade microbiana e consequente aumento na produção de biogás, os NMOBs podem não ser a melhor opção. Neste caso, as NPs com defeitos nos planos cristalinos poderiam liberar maior quantidade de ferro e superar o efeito de NMOBs.

Dado que já foi demonstrado a vantagem econômica e sustentável da produção de NMOBs (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021) e seu potencial biotecnológico (VARGAS *et al.*, 2018), cabe também considerar a biomineralização de NMOBs modificadas geneticamente. Ao passo que a biomineralização de NMOBs resulta em estruturas de alta qualidade, a engenharia genética em BMs visando alterar o tamanho e formato das NMOBs também é estudada (ARAKAKI *et al.*, 2010; RAWLINGS *et al.*, 2014; YAMAGISHI *et al.*, 2016), potencializando futuras aplicações biotecnológicas por explorar a produção de partículas com tamanhos e formatos que atendam às demandas das aplicações biotecnológicas. Mais estudos são necessários para determinar quais modificações seriam relevantes para se explorar os benefícios de NMOBs, inclusive de sua membrana biológica, na DA.

6.2.2. Efeito de NMOBs e NPSs em diferentes digestatos

XIE *et al.* (2020) testaram diferentes NPs metálicas e à base de carbono na DA de esgoto primário. As NPs de magnetita foram analisadas em 3 concentrações distintas (50, 100 e 200 mg/L), sendo observado o aumento da produção de CH₄ com a adição de NPs. Todavia, concentrações mais altas (200 mg/L) causaram toxicidade no sistema, levando a menores benefícios e mesmo efeito inibitório na DA (XIE *et al.*, 2020). Era esperado que NPSs e NMOBs apresentassem benefícios na produção de CH₄ quando adicionadas aos lodos. O que não foi observado nos experimentos. Esses resultados sugerem que mais fatores, além de tamanho e concentração, determinam o efeito benéfico ou não da adição de NPs na DA. Neste sentido, a caracterização detalhada das características químicas das NPs antes, durante, e após a sua adição na DA, bem como a determinação do perfil da comunidade microbiana ao longo da DA são essenciais para uma compreensão mais clara do processo e predição dos efeitos de NPs na produção de biogás.

Outra observação importante envolve duas limitações presentes no desenho experimental do experimento piloto para observação do efeito de NMOBs: a avaliação de uma única concentração de NMOBs (100 mg/L) e a utilização de pequenos volumes de lodo e *headspace*. Esse desenho experimental foi escolhido devido ao objetivo de testar o efeito de NPSs e NMOBs em diferentes substratos, projeto este que ainda está em andamento. Contudo, a análise de apenas uma concentração de NMOBs e NPSs não permite afirmar se a concentração utilizada era acima ou abaixo do necessário para observar efeitos significativos nos lodos avaliados, como foi possível no trabalho descrito acima (XIE *et al.*, 2020). Vale ressaltar também que foram empregados frascos de 3 mL com volume útil de 1 mL de substrato. O lodo proveniente de digestores anaeróbicos, por se tratar de amostra normalmente heterogênea, frequentemente requer homogeneização prévia aos experimentos. Sendo assim, análises com volumes tão pequenos não são comuns. Isso acontece pois, quanto menor o volume empregado, maior a diferença causada pela presença de mais ou menos partículas maiores de matéria orgânica entre os frascos. Quando são usados volumes superiores, essa diferença tende a causar menos discrepância entre as réplicas (HOLLIGER *et al.*, 2016).

Dessa forma, apesar de se tratarem de experimentos inéditos, ainda não é possível afirmar se, em resposta a diferentes condições bioquímicas de diferentes substratos a serem empregados, o efeito de NPSs e NMOBs pode apresentar ou não variações significativas. Todavia, as informações obtidas a partir dos trabalhos incluídos na meta-análise, além dos exemplos incluídos, sugerem que NPs de magnetita tendem a causar impacto na DA (ABDELSALAM *et al.*, 2017a; HE *et al.*, 2019; JIN; ZHAO; ZHANG, 2019; XIE *et al.*, 2020), o que não foi observado nos experimentos nem com NPSs, nem com NMOBs. Se apenas NMOBs não tivessem apresentado efeito, mas NPSs impactassem de alguma maneira, este resultado seria indicativo de que as NMOBs não teriam efeito de fato na DA. Contudo, como a adição NPSs como as empregadas nesse experimento é conhecidamente efetivo na produção de CH₄, sugere-se então otimizar os parâmetros do desenho experimental, analisando mais concentrações de NPs e em volumes maiores de modo a afirmar com maior confiança o real impacto de NMOBs e NPSs em diferentes substratos.

É possível observar também nas Figuras 21 e 22 que as curvas de evolução na produção de gás, em sua maioria, não atingiram período estacionário da produção de gás, dificultando afirmar se haveria ou não diferenças até a fase estacionária da produção, ou seja, quando a produção diária é $\leq 1\%$ da produção das 3 últimas amostragens, período sugerido na literatura para fim de experimentos de potencial de produção de CH_4 (HOLLIGER *et al.*, 2016). Por fim, vale considerar que não foi possível quantificar a produção cumulativa de biogás, apenas seu conteúdo de CH_4 e CO_2 . Dessa maneira, mesmo que a produção de biogás total tenha sido maior ou menor e, assim, porcentagens similares representem volumes totais diferentes, mais experimentos são necessários. No futuro, sugere-se acompanhar a produção cumulativa de biogás, bem como o conteúdo de CH_4 e outros gases, até a fase estacionária da produção. É imperativo também estudar a comunidade microbiana envolvida e sua transformação frente aos tratamentos de modo a traçar parâmetros para a escolha de qual estratégia de adição de NPs será empregada. Por fim, o perfil estrutural das NPs empregadas utilizando técnicas de microscopia analítica e de alta resolução é uma demanda urgente considerando a importância de tais dados na nanotecnologia e na reprodutibilidade de dados.

Ainda são necessários mais experimentos para avaliar se o impacto na DA se deu pela suplementação de nutrientes como o ferro, ou pelo estímulo à atividade sintrófica elétrica (DIET). Vale ressaltar que é provável que diferentes substratos tenham comunidades microbianas com demandas/carências distintas dependendo de sua composição. Em determinadas situações pode ser necessária a adição de NPSs de cobalto, ferro ou magnetita em baixas concentrações e tamanhos em prol do estímulo metabólico-enzimático para um digestor, enquanto outros casos exigirem a adição de NMOBs mais estáveis e com características magnéticas que favoreçam a DIET e contribuam, assim, para a estabilidade da comunidade microbiana.

É válido acrescentar que as NMOBs apresentam em sua membrana biológica uma variedade de grupos funcionais (por exemplo, amina, fosfato e carboxila), aumentando a gama de funcionalizações e potenciais interações dentro da DA. Assim, NMOBs podem atuar na degradação de poluentes ou outras interações ainda não exploradas, além do seu papel condutor na DA. Reforça-se assim a importância de se caracterizar de modo aprofundado as NPs empregadas e as variações biológicas e químicas do digestato durante os experimentos,

de modo a explorar de forma clara e cientificamente reprodutível todo o seu potencial biotecnológico envolvido (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021).

7. CONCLUSÃO

Foi realizada uma meta-análise que demonstrou o impacto de NPs de diferentes composições, tamanhos e concentrações na produção de CH₄ por DA. Foi possível observar que algumas composições de NPs como a magnetita apresentam maiores aumentos na produção de CH₄, bem como delinear alguns parâmetros de tamanho e concentração em que são observados os maiores benefícios. Foi apontado também que a adição de NPs requer cautela quanto a algumas composições, com foco em óxidos de zinco e cobre, e à concentração empregada, podendo causar efeitos inibitórios à metanogênese. Foi demonstrado que o aumento na concentração e no tamanho das NPs empregadas não acarreta diretamente em melhores resultados na produção de CH₄. NPs de magnetita com dimensões próximas a 50 nm em concentrações próximas a 50 mg/L são as que demonstraram melhores resultados no aumento da produção de CH₄. Também foi possível discutir algumas relações entre as condições geopolíticas globais e a origem dos trabalhos analisados.

Uma parcela ínfima dos trabalhos apresentou caracterizações mais aprofundadas dos perfis cristalinos e químicos das NPs empregadas e das mudanças na comunidade microbiana envolvida no processo. Vale ressaltar também a expressiva variação de maneiras em expressar dados importantes como produção de CH₄, concentração de NPs empregadas, tamanho das NPs empregadas e suas origens ou métodos de produção, isso quando eram descritos nos trabalhos de maneira clara. Entende-se, portanto, a urgência em se padronizar as informações mínimas requeridas nesses tipos de trabalhos, de modo a permitir a comparação, validação e reprodutibilidade dos resultados descritos nos trabalhos.

Foram realizados experimentos pilotos de maneira a explorar a potencial aplicação de NMOBs na DA para o aumento da produção de biogás. Apesar de ainda pouco conclusivos, estes foram (até onde se sabe) os primeiros experimentos envolvendo NMOBs e biogás, apresentando-se, portanto, como um grande potencial de inovação biotecnológica. No futuro, novos testes serão realizados de modo a esclarecer mais detalhes, bem como explorar mais aplicações da NMOBs e BMs para a otimização da produção de biogás.

Ao longo do texto foi também possível compreender que a tecnologia para a produção de biogás por DA é uma área altamente multidisciplinar, englobando desde engenharia, biologia até análises mais sociais e políticas. Dessa forma, é imperativo que haja a colaboração entre tais áreas de modo a evoluir de maneira mais completa possível a compreensão a respeito dessa promissora solução de sustentabilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M.; ABBASI, S. A. Biogas and Biogas Energy: An Introduction. In: **Biogas Energy**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 1–10.

ABDELSALAM, E. *et al.* Comparison of nanoparticles effects on biogas and methane production from anaerobic digestion of cattle dung slurry. **Renewable Energy**, v. 87, p. 592–598, 2016.

ABDELSALAM, E. *et al.* Influence of zero valent iron nanoparticles and magnetic iron oxide nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of manure. **Energy**, v. 120, p. 842–853, 2017a.

ABDELSALAM, E. *et al.* Effects of Co and Ni nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of slurry. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 108–119, 2017b.

ABDELWAHAB, T. A. M. *et al.* Impact of iron nanoparticles on biogas production and effluent chemical composition from anaerobic digestion of cattle manure. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020a.

ABDELWAHAB, T. A. M. *et al.* Application of nanoparticles for biogas production: Current status and perspectives. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 00, n. 00, p. 1–13, 29 maio 2020b.

ABDELWAHAB, T. A. M. *et al.* Cobalt nanoparticles to enhance anaerobic digestion of cow dung: focusing on kinetic models for biogas yield and effluent utilization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2021.

ABREU, F. *et al.* “Candidatus magnetoglobus multicellularis”, a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1318–1322, 2007.

ABREU, F. *et al.* Common ancestry of iron oxide- and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. **ISME Journal**, v. 5, n. 10, p. 1634–1640, 2011.

ABREU, F. *et al.* Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 4426–4441, dez. 2016.

ABREU, F. *et al.* Magnetotaxis in Prokaryotes. **eLS**, n. May, p. 1–14, 2020.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMAJELLE. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. p. 1–147, set. 2012.

ALI, A. *et al.* Experimental Investigation of Methane Generation in the Presence of Surface and Un-Surface Nanoparticles of Iron Oxide. **AgriEngineering**, v. 4, n. 1, p. 134–140, 2022.

ALI, A.; MAHAR, R. B.; SHERAZI, S. T. H. Methane Augmentation of Anaerobic Digestion of Food Waste in the Presence of Fe₃O₄ and Carbamide Capped Fe₃O₄ Nanoparticles. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 8, p. 4093–4107, 2020.

ALKANOK, G.; DEMIREL, B.; ONAY, T. T. Determination of biogas generation potential as a renewable energy source from supermarket wastes. **Waste Management**, v. 34, n. 1, p. 134–140, 2014.

ALLEN, G. C.; KIRBY, C.; SELLERS, R. M. The effect of the low-oxidation-state metal ion reagent tris-picolinatovanadium(II) formate on the surface morphology and composition of crystalline iron oxides. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 84, n. 1, p. 355–364, 1988.

AMOR, M. *et al.* Chemical signature of magnetotactic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 6, p. 1699–1703, 2015.

AMOR, M. *et al.* Magnetotactic Bacteria Accumulate a Large Pool of Iron Distinct from Their Magnetite Crystals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 22, p. 1–20, 4 set. 2020.

ANGELIDAKI, I. *et al.* Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 452–466, 2018.

APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008.

ARAKAKI, A. *et al.* Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 65–70, 2010.

BARBER-ZUCKER, S.; ZARIVACH, R. A look into the biochemistry of Magnetosome biosynthesis in magnetotactic bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 13–22, 2017.

BASIT, A. *et al.* Improved methods for mass production of magnetosomes and applications: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2020.

BAZYLINSKI, D. A.; FRANKEL, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 217–230, 2004.

BAZYLINSKI, D. A.; LEFÈVRE, C. T.; SCHÜLER, D. Magnetotactic Bacteria. In: ROSENBERG, E. *et al.* (Eds.). . **The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 454–494.

BOSCARO, M. E. *et al.* Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on microbial diversity and biogas production in anaerobic digestion of crude glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 160, n. April, p. 106439, 2022.

BRUNDTLAND, G. **The World Commission on Environment and Development - Our Common Future**. 1. ed. Geneva, Switzerland: Oxford University Press, 1987. v. 14

BRYANT, M. P. *et al.* Methanobacillus omelianskii. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 31, p. 20–31, 1967.

BUTLER, R. F.; BANERJEE, S. K. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. **Journal of Geophysical Research**, v. 80, n. 29, p. 4049–4058, 10 out. 1975.

CASALS, E. *et al.* Programmed iron oxide nanoparticles disintegration in anaerobic digesters

boosts biogas production. **Small**, v. 10, n. 14, p. 2801–2808, 2014.

CHANG, L. *et al.* The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 86, n. 1, p. 42–61, 2006.

CHEN, Y. R. *et al.* A novel species of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes from Lake Yuehu in China. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 637–647, 2015.

CORREA, T.; PRESCILIANO, R.; ABREU, F. Why Does Not Nanotechnology Go Green? Bioprocess Simulation and Economics for Bacterial-Origin Magnetite Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–12, 20 ago. 2021.

CORREA, T. *et al.* Biomineralization of Magnetosomes: Billion-Year Evolution Shaping Modern Nanotools. In: **Nanocrystals**. IntechOpen, 2020. p. 13.

CRUZ VIGGI, C. *et al.* Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 13, p. 7536–7543, 2014.

CYPRIANO, J. *et al.* Uptake and persistence of bacterial magnetite magnetosomes in a mammalian cell line: Implications for medical and biotechnological applications. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215657, 23 abr. 2019.

CYPRIANO, J. *et al.* Magnetosome Biomineralization by Magnetotactic Bacteria. In: BERENJIAN, A.; SEIFAN, M. (Eds.). vol 36. **Mineral Formation by Microorganisms**. 1. ed. Switzerland: Springer, Cham, 2022. p. 243–281.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 992–998, 2011.

DENG, L.; LIU, Y.; WANG, W. **Biogas Technology**. Singapore: Springer Singapore, 2020.

ENZMANN, F. *et al.* Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2018.

FAIVRE, D. *et al.* Intracellular Magnetite Biomineralization in Bacteria Proceeds by a Distinct Pathway Involving Membrane-Bound Ferritin and an Iron(II) Species. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 44, p. 8495–8499, 12 nov. 2007.

FARGHALI, M. *et al.* Impacts of iron oxide and titanium dioxide nanoparticles on biogas production: Hydrogen sulfide mitigation, process stability, and prospective challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 240, n. January, p. 160–167, 2019.

FARGHALI, M. *et al.* Prospects for biogas production and H₂S control from the anaerobic digestion of cattle manure: The influence of microscale waste iron powder and iron oxide nanoparticles. **Waste Management**, v. 101, p. 141–149, 2020.

FEHRENBACH, H. *et al.* Criteria for a sustainable use of bioenergy on a global scale. **Texte: Research Report**, n. 30– 08, UBA- FB 206 41 112, p. 130 + 110 ann., 2008.

FRANKEL, R. B.; BAZYLINSKI, D. A. How magnetotactic bacteria make magnetosomes queue up. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 329–331, 2006.

GERBA, C. P.; ROSE, J. B. International guidelines for water recycling: Microbiological considerations. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 3, n. 4, p. 311–316, 2003.

GOSWAMI, R. *et al.* An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: A step towards sustainable waste management. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

GROSSER, A. *et al.* Effects of silver nanoparticles on performance of anaerobic digestion of sewage sludge and associated microbial communities. **Renewable Energy**, v. 171, p. 1014–1025, 2021.

HAMMER, Ø. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HASSANEIN, A.; KELLER, E.; LANSING, S. Effect of metal nanoparticles in anaerobic digestion production and plant uptake from effluent fertilizer. **Bioresource Technology**, v.

321, n. October 2020, p. 124455, 2021.

HASSANEIN, A.; LANSING, S.; TIKEKAR, R. Impact of metal nanoparticles on biogas production from poultry litter. **Bioresource Technology**, v. 275, n. November 2018, p. 200–206, 2019.

HE, C. *et al.* Synergistic effect of magnetite and zero-valent iron on anaerobic degradation and methanogenesis of phenol. **Bioresource Technology**, v. 291, n. July, p. 121874, 2019.

HE, Q. *et al.* Insight into the impact of ZnO nanoparticles on aerobic granular sludge under shock loading. **Chemosphere**, v. 173, p. 411–416, 2017.

HEDGES, L. V.; GUREVITCH, J.; CURTIS, P. S. The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. **Ecology**, v. 80, n. 4, p. 1150–1156, 1999.

HIJAZI, O. *et al.* Life cycle assessment of the use of nanomaterials in biogas production from anaerobic digestion of manure. **Renewable Energy**, v. 148, p. 417–424, 2020.

HOLLIGER, C. *et al.* Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 2016.

HUANG, J. *et al.* Biochar and magnetite promote methanogenesis during anaerobic decomposition of rice straw. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 143, n. 5, p. 1–4, 2020.

JIN, Z.; ZHAO, Z.; ZHANG, Y. Potential of direct interspecies electron transfer in synergetic enhancement of methanogenesis and sulfate removal in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor with magnetite. **Science of the Total Environment**, v. 677, p. 299–306, 2019.

JINGURA, R. M.; KAMUSOKO, R. Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: A review. **Biofuel Research Journal**, v. 4, n. 2, p. 573–586, 2017.

JUNTUPALLY, S. *et al.* Relative evaluation of micronutrients (MN) and its respective nanoparticles (NPs) as additives for the enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 290–295, 2017.

KARRI, S.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A. Zero valent iron as an electron-donor for

methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic sludge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 7, p. 810–819, 2005.

KASTER, A. K. *et al.* More than 200 genes required for methane formation from H₂ and CO₂ and energy conservation are present in methanothermobacter marburgensis and methanothermobacter thermotrophicus. **Archaea**, v. 2011, n. 1, 2011.

KATO, S.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1646–1654, 2012.

KHALID, M. J. *et al.* Synergistic effect of alkaline pretreatment and magnetite nanoparticle application on biogas production from rice straw. **Bioresource Technology**, v. 275, n. December 2018, p. 288–296, 2019.

KHUSNURIYALOVA, A. F. *et al.* Preparation of Cobalt Nanoparticles. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2021, n. 30, p. 3023–3047, 2021.

KUMAR, V. *et al.* Insight into interactions between syntrophic bacteria and archaea in anaerobic digestion amended with conductive materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, n. March 2020, p. 110965, 2021.

LAGOEIRO, L. E. Transformation of magnetite to hematite and its influence on the dissolution of iron oxide minerals. **Journal of Metamorphic Geology**, v. 16, n. 3, p. 415–423, 1998.

LEÃO, P. *et al.* North-Seeking Magnetotactic Gammaproteobacteria in the Southern Hemisphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 18, p. 5595–5602, 15 set. 2016.

LEÃO, P. *et al.* Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin for magnetoreception in eukaryotes. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1495–1506, abr. 2020.

LEFÈVRE, C. T. *et al.* Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the

Deltaproteobacteria provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 2712–2735, 2013.

LEFEVRE, C. T.; BAZYLINSKI, D. A. Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 497–526, 2013.

LEFÈVRE, C. T.; WU, L. F. Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 534–543, 2013.

LI, B. *et al.* Simultaneous recovery of nitrogen and phosphorus from biogas slurry by Fe-modified biochar. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 25, n. 4, 2021.

LI, Y. *et al.* The periplasmic nitrate reductase nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 4847–4856, 2012.

LIN, W. *et al.* A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity. **ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 475–479, 2012.

LIN, W. *et al.* Integrating niche-based process and spatial process in biogeography of magnetotactic bacteria. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–9, 2013.

LIN, W. *et al.* Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. **ISME Journal**, v. 12, n. 6, p. 1508–1519, 2018.

LIU, Y. *et al.* Effect of different charged Fe₃O₄ nanoparticles on methane production for anaerobic digestion of wheat straw. **Journal of Cleaner Production**, v. 328, n. May, p. 129655, 2021.

LOVELOCK, J. E.; MARGULIS, L. Atmospheric homeostasis by and for the biosphere: the gaia hypothesis. **Tellus**, v. 26, n. 1–2, p. 2–10, 1974.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n.

8, p. 1222–1244, 2007.

MAHAJAN, R. *et al.* Effect of pretreatments on cellulosic composition and morphology of pine needle for possible utilization as substrate for anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, n. July, p. 105705, 2020.

MAO, C. *et al.* Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015.

MONTEIL, C. L. *et al.* Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1088–1095, 29 jul. 2019.

MORILLO, V. *et al.* Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–12, 2014.

MOTULSKY, H. J.; BROWN, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 1–20, 2006.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 98, n. 1–3, p. 33–50, 2003.

OBAIDEEN, K. *et al.* Biogas role in achievement of the sustainable development goals: Evaluation, Challenges, and Guidelines. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 131, p. 104207, 2022.

OTERO-GONZÁLEZ, L.; FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Inhibition of anaerobic wastewater treatment after long-term exposure to low levels of CuO nanoparticles. **Water Research**, v. 58, p. 160–168, 2014.

PANTIDOS, N.; HORSFALL, L. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 05, 2014.

PARK, J. H. *et al.* Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. **Bioresource Technology**, v. 254, n. November 2017, p. 300–311, 2018.

RAWLINGS, A. E. *et al.* Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 19094–19099, 2014.

REDDY, L. H. *et al.* Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5818–5878, 2012.

RITCHIE, H; ROSER, M; ROSADO, P; (2022). "Energy". **OurWorldInData.org**. Disponível em: '<https://ourworldindata.org/energy>' Acesso em: 09/12/22

RITCHIE, H; ROSER, M; ROSADO, P; (2022). "Fossil fuels". **OurWorldInData.org**. Disponível em: '<https://ourworldindata.org/fossilfuels>' Acesso em: 09/12/22

RITCHIE, H; ROSER, M; ROSADO, P; (2020). "Sector by sector: where do global greenhouse gas emissions come from?". **OurWorldInData.org**. Disponível em: <https://ourworldindata.org/ghg-emissions-by-sector/> Acesso em: 09/12/22

SATALKAR, P.; ELGER, B. S.; SHAW, D. M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? **Science and Engineering Ethics**, v. 22, n. 5, p. 1255–1276, 2016.

SCHNÜRER, A. Biogas production: Microbiology and technology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 156, p. 195–234, 2016.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, A. **Microbiology of the Biogas process**. Uppsala, Sweden.: Swedish University of Agricultural Sciences, 2018.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, Å. **Microbiological handbook for biogas**. Sweden: Swedish Waste Management U2009: 03, Swedish Gas Centre Report 207, 2010.

SCHÜBBE, S. *et al.* Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of

Magnetospirillum gryphiswaldense reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 19, p. 5779–5790, 2003.

SENGUPTA, S.; NAWAZ, T.; BEAUDRY, J. Nitrogen and Phosphorus Recovery from Wastewater. **Current Pollution Reports**, v. 1, n. 3, p. 155–166, 2015.

SIEMER, S. *et al.* Nanosized food additives impact beneficial and pathogenic bacteria in the human gut: A simulated gastrointestinal study. **npj Science of Food**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2018.

SILVA, K. T. *et al.* Optimization of magnetosome production and growth by the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 through a statistics-based experimental design. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2823–2827, 2013.

STEFFEN, W. *et al.* Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 1259855–1259855, 13 fev. 2015.

TOLBA, M. K.; BISWAS, A. K. **Earth and Us**. Oxford: United Nations Environment Programme, 1991.

TRUONG, D. H. *et al.* Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 4, p. 733–744, 2006.

UEBE, R.; SCHÜLER, D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 621–637, 13 out. 2016.

ULLRICH, S. *et al.* A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7176–7184, 2005.

VARGAS, G. *et al.* Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1–25, 2018.

WANG, T. *et al.* Magnetite Triggering Enhanced Direct Interspecies Electron Transfer: A

Scavenger for the Blockage of Electron Transfer in Anaerobic Digestion of High-Solids Sewage Sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7160–7169, 2018.

WANG, Y. *et al.* Removal of gaseous hydrogen sulfide using Fenton reagent in a spraying reactor. **Fuel**, v. 239, n. September 2018, p. 70–75, 2019.

WEILAND, P. Biogas production: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 849–860, 2010.

WERCKMANN, J. *et al.* Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8291, 15 dez. 2017.

XIE, S. *et al.* Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 316, n. July, p. 123970, 2020.

YAMAGISHI, A. *et al.* Control of magnetite nanocrystal morphology in magnetotactic bacteria by regulation of *mms7* gene expression. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–11, 2016.

YAMAZAKI, T. Reductive dissolution of biogenic magnetite. **Earth, Planets and Space**, v. 72, n. 1, 2020.

YU, J. *et al.* Promotion of methane production by magnetite via increasing acetogenesis revealed by metagenome-assembled genomes. **Bioresource Technology**, v. 345, n. October 2021, p. 126521, 2022.

ZAIDI, A. A. *et al.* Nanoparticles synergistic effect with various substrate pretreatment and their comparison on biogas production from algae waste. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v. 16, n. 2, p. 374–382, 2021.

ZHANG, B. *et al.* Cationic polyacrylamide alleviated the inhibitory impact of ZnO nanoparticles on anaerobic digestion of waste activated sludge through reducing reactive oxygen species induced. **Water Research**, v. 205, n. September, p. 117651, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5851–5856, 2011.

ZHAO, Z. *et al.* Potentially shifting from interspecies hydrogen transfer to direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism to resist acidic impact with conductive carbon cloth. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 10–18, 2017.

ZHAO, Z. *et al.* Ferroferric oxide triggered possible direct interspecies electron transfer between *Syntrophomonas* and *Methanosaeta* to enhance waste activated sludge anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 250, n. September 2017, p. 79–85, 2018.

ZHOU, K. *et al.* A novel genus of multicellular magnetotactic prokaryotes from the Yellow Sea. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 405–413, 2012.

9. ANEXOS

n	Número do artigo	1º Autor	Ano	País	Temperatura (°C)	Classificação do substrato	NP Type	Tamanho	Concentração (mg/L)	RR
1	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Ni	100	1	0,287032
2	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Ni	100	1	0,520645
3	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Ni	100	1	0,57982
4	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Ni	100	1	0,489164
5	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Co	100	1	0,269332
6	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Co	100	1	0,426031
7	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Co	100	1	0,538995
8	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Co	100	1	0,389465
9	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnetite	100	10	0,304424
10	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnetite	100	10	0,354853
11	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnetite	100	10	0,579818
12	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnetite	100	10	0,52501
13	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnesium Oxide	100	10	0,214273
14	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnesium Oxide	100	10	0,287032
15	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnesium Oxide	100	10	0,331354
16	8	Zaidi, A	2021	China	37	Aquatic biomass	Magnesium Oxide	100	10	0,29657
17	9	Grosser, A	2021	Poland	37	Municipal waste	Ag	20	40	0,134982
18	9	Grosser, A	2021	Poland	37	Municipal waste	Ag	20	40	-0,12284
19	13	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Ni	90	1	0,160821
20	13	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Ni	90	2	0,533915
21	13	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Ni	90	4	0,430433
22	15	Zhang, Y	2021	China	35	Municipal waste	Carbon based	30	2522,17	0,44007
23	15	Zhang, Y	2021	China	35	Municipal waste	Alumnin Oxide	30	2522,17	1,083896
24	15	Zhang, Y	2021	China	35	Municipal waste	Zinc Oxide	30	2522,17	-2,09758
25	15	Zhang, Y	2021	China	35	Municipal waste	Cooper Oxide	40	2522,17	-0,04006
26	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	80	0,026681
27	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	200	0,028873
28	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	400	0,064404
29	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	600	-0,00896

30	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	162,5	0,020591
31	16	Ziganshina, E	2021	Russia	38	Agricultural waste	Magnetite	75	325	0,016002
32	17	Ajayi-Banji, A	2021	USA	35	Animal waste	Magnetite	17,5	25	0,073564
33	17	Ajayi-Banji, A	2021	USA	35	Animal waste	Magnetite	17,5	50	1,12E-06
34	17	Ajayi-Banji, A	2021	USA	35	Animal waste	Magnetite	17,5	75	-0,01538
35	20	Hassanein, A	2021	USA	NA	Animal waste	Combinação	55,45	1000+120+54	0,2135
36	23	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Combinação	62 - 114 (Ni); 70 - 104 (Co)	30 (Fe); 2 (Ni) e 1(Co)	0,176488
37	23	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Combinação	63 - 114 (Ni); 70 - 104 (Co)	30 (Fe) e 2 (Ni)	0,161587
38	23	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Combinação	64 - 114 (Ni); 70 - 104 (Co)	30 (Fe) e 1(Co)	0,106468
39	23	Abdelwahab, T	2021	India	33	Animal waste	Combinação	65 - 114 (Ni); 70 - 104 (Co)	2 (Ni) e 1(Co)	0,115941
40	33	Xie, S	2020	Australia	35	Municipal waste	Magnetite	75	50	0,07184
41	33	Xie, S	2020	Australia	35	Municipal waste	Magnetite	75	100	0,067714
42	33	Xie, S	2020	Australia	35	Municipal waste	Magnetite	75	200	0,034786
43	35	Juntupally, S	2020	India	35	Animal waste	Magnetite	100	20	0,23269
44	35	Juntupally, S	2020	India	35	Animal waste	Magnetite	100	40	0,489736
45	35	Juntupally, S	2020	India	35	Animal waste	Magnetite	100	60	0,683081
46	35	Juntupally, S	2020	India	35	Animal waste	Magnetite	100	20	0,263401
47	36	Juntupally, S	2021	India	36	Animal waste	Magnetite	100	40	0,535866
48	37	Juntupally, S	2022	India	37	Animal waste	Magnetite	100	60	0,430505
49	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	20	0,205011
50	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	40	0,422735
51	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	60	0,583078
52	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	20	0,344678
53	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	40	0,577041
54	35	Juntupally, S	2020	India	55	Animal waste	Magnetite	100	60	0,481116
55	40	Tetteh, E	2020	South Africa	35	Municipal waste	Magnetite	10	50	0,840472
56	42	Cheng, J	2020	China	NA	Synthetic	Fe	100	500	0,133531
57	42	Cheng, J	2020	China	NA	Synthetic	Fe	100	1000	0,324926
58	42	Cheng, J	2020	China	NA	Synthetic	Fe	100	1500	0,507248
59	42	Cheng, J	2020	China	NA	Synthetic	Fe	100	2000	-0,86835
60	46	Cheng, J	2020	China	37	Synthetic	Magnetite	20	100	0,160255

61	46	Cheng, J	2020	China	37	Synthetic	Magnetite	20	200	0,206035
62	46	Cheng, J	2020	China	37	Synthetic	Magnetite	20	300	0,136728
63	46	Cheng, J	2020	China	37	Synthetic	Magnetite	20	500	0,124737
64	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,556437
65	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,517472
66	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,727754
67	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,767759
68	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,537143
69	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,556437
70	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,577521
71	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,544729
72	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,861482
73	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,796003
74	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	ZVI	70	560	0,664975
75	48	Yan, W	2020	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	773,3	0,56752
76	52	Abdelwahab, T	2020	India	33	Animal waste	Fe	435,1	15	0,529874
77	52	Abdelwahab, T	2020	India	33	Animal waste	Fe	435,1	30	0,759287
78	52	Abdelwahab, T	2020	India	33	Animal waste	Fe	435,1	60	0,705886
79	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	25	0,821678
80	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	50	0,871006
81	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	75	0,896905
82	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	25	0,643254
83	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	50	0,876881
84	57	Ali, A	2019	Pakistan	38	Municipal waste	Magnetite	21	75	0,921553
85	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Magnetite	20	500	0,202706
86	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Magnetite	20	1000	0,17165
87	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Magnetite	20	2000	0,146086
88	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Magnetite	20	4000	0,133059
89	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Fe	50	500	0,173441
90	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Fe	50	1000	0,204798
91	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Fe	50	2000	0,176628
92	63	Zhang, Y	2020	China	37	Municipal waste	Fe	50	4000	0,163846

93	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	Magnetite	29,5	25	0,068205
94	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	Magnetite	29,5	50	0,393631
95	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	Magnetite	29,5	80	0,409358
96	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	ZVI	110	20	-0,03135
97	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	ZVI	110	40	-0,01242
98	70	Kassab, G	2020	Jordan	35	Co-digestion	ZVI	110	60	-0,01242
99	84	Aguilar-Moreno, G	2020	Mexico	36	Animal waste	Magnetite	4,2	20	0,441397
100	84	Aguilar-Moreno, G	2020	Mexico	36	Animal waste	Magnetite	4,2	40	0,183337
101	84	Aguilar-Moreno, G	2020	Mexico	36	Animal waste	Magnetite	4,2	60	0,147158
102	85	Zhou, J	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	560	0,105359
103	85	Zhou, J	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	1120	0,245122
104	85	Zhou, J	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	1680	0,31508
105	86	Yan, W	2019	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	2320	0,351704
106	86	Yan, W	2019	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	2320	0,361012
107	86	Yan, W	2019	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	2320	0,481036
108	86	Yan, W	2019	Singapore	35	Municipal waste	Magnetite	75	2320	0,495773
109	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	81,4	-0,06615
110	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	81,4	-0,02667
111	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	81,4	-0,10126
112	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	162,8	-1,60179
113	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	162,8	-1,65546
114	87	Zhu, K	2019	China	37	Municipal waste	Zinc oxide	30	162,8	-0,24384
115	88	Zhang, Z	2019	China	36	Municipal waste	Magnetite	25	20	0,081781
116	88	Zhang, Z	2019	China	36	Municipal waste	Magnetite	25	50	0,317117
117	88	Zhang, Z	2019	China	36	Municipal waste	Magnetite	25	100	0,462954
118	88	Zhang, Z	2019	China	36	Municipal waste	Magnetite	25	200	0,279539
119	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	11,1	0,269	0,00678
120	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	11,1	2,69	0,04652
121	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	11,1	26,9	0,040005
122	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	9,8	0,024	0,00678
123	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	9,8	0,24	0,00678
124	89	Ghofrani-Isfahani, P	2019	Denmark	55	Agricultural waste	Comp	9,8	2,4	0,013514

125	94	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Magnetite	30	100	0,182322
126	94	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Magnetite	30	500	0,170346
127	94	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Magnetite	30	1000	0,194151
128	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	Magnetite	20	500	0,218656
129	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	Magnetite	20	1000	0,206316
130	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	Magnetite	20	2000	0,180941
131	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	Magnetite	20	4000	0,194714
132	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	500	0,171386
133	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	1000	0,196054
134	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	2000	0,155487
135	102	Xiang, Y	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	50	4000	0,13365
136	106	Abdelsalam, E	2019	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,026668
137	106	Abdelsalam, E	2019	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,052644
138	106	Abdelsalam, E	2019	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,077962
139	106	Abdelsalam, E	2019	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,118784
140	106	Abdelsalam, E	2019	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,287682
141	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Magnetite	175	5000	0,022989
142	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Combinação	50-300 +AR100	2500 + 2500	0,13062
143	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Magnetite	175	5000	-0,03449
144	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Combinação	50-300 +AR100	2500 + 2500	0,127155
145	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Magnetite	175	5000	-0,09786
146	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Combinação	50-300 +AR100	2500 + 2500	0,170956
147	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Magnetite	175	5000	0,074108
148	108	He, C	2019	China	37	Industrial waste	Combinação	50-300 +AR100	2500 + 2500	0,282863
149	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Magnetite	30	20	0,09963
150	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Magnetite	30	100	0,174406
151	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Titanium Oxide	25	100	0,092123
152	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Titanium Oxide	25	500	0,193039
153	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Combinação	30+ 25	20+500	0,125107
154	126	Farghali, M	2019	Japan	38	Animal waste	Combinação	30+ 26	100+500	0,139529
155	134	Yazdani, M	2019	Iran	35	Municipal waste	Fe	30	3	0,362215
156	134	Yazdani, M	2019	Iran	35	Municipal waste	Fe	30	9	0,373204

157	134	Yazdani, M	2019	Iran	35	Municipal waste	Fe	30	15	0,305382
158	135	Zhou, J	2019	China	35	Municipal waste	ZVI	60	1000	0,258914
159	140	Hu, Q	2018	China	35	Municipal waste	Other	300	750	0,476924
160	140	Hu, Q	2018	China	35	Municipal waste	Other	300	750	0,344378
161	140	Hu, Q	2018	China	35	Municipal waste	Other	300	750	0,279314
162	140	Hu, Q	2018	China	35	Municipal waste	Other	300	750	0,227578
163	140	Hu, Q	2018	China	35	Municipal waste	Other	300	750	0,115311
164	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Fe	55	15	0,216328
165	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Fe	55	50	0,222389
166	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Fe	55	100	0,258001
167	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Ni	55	3	0,243316
168	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Ni	55	6	0,237381
169	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Ni	55	12	0,328353
170	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Co	55	1,4	0,255081
171	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Co	55	2,7	0,231411
172	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Co	55	5,4	0,263815
173	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Magnetite	494	15	0,24627
174	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Magnetite	494	50	0,234401
175	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Magnetite	494	100	0,231411
176	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Combinação	55	100+12+5,4	0,051129
177	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Combinação	55	200+24+10,8	0,090829
178	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Combinação	55	400+48+21,6	0,081807
179	145	Hassanein, A	2019	USA	35	Animal waste	Combinação	55	1000+120+54	0,009788
180	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	60	0,132614
181	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	80	0,18069
182	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	100	0,253485
183	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	200	0,357897
184	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	60	0,165847
185	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	80	0,278819
186	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	100	0,396273
187	146	Khalid, M	2019	Pakistan	35	Agricultural waste	Magnetite	7,2	200	0,263871
188	147	Lizama, A	2018	Mexico	36	Municipal waste	ZVI	50	15	0,631015

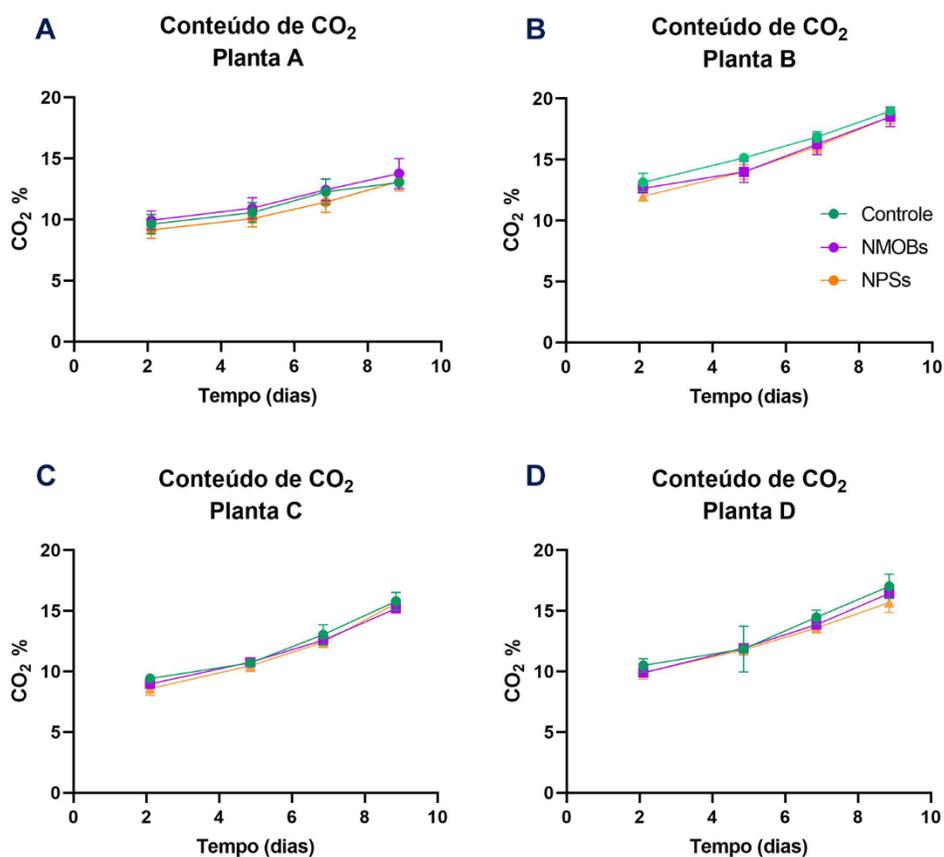
189	147	Lizama, A	2018	Mexico	36	Municipal waste	ZVI	50	21	0,817601
190	147	Lizama, A	2018	Mexico	36	Municipal waste	ZVI	50	27	1,05343
191	148	Tian, T	201	China	30	Synthetic	Manganese Oxide	35	60	0,162519
192	148	Tian, T	201	China	30	Synthetic	Manganese Oxide	35	480	-0,4018
193	148	Tian, T	201	China	30	Synthetic	Manganese Oxide	35	60	0,19471
194	148	Tian, T	201	China	30	Synthetic	Manganese Oxide	35	480	-1,67716
195	220	Abdelsalam, E	2016	Egypt	37	Animal waste	Co	28	1	0,695061
196	220	Abdelsalam, E	2016	Egypt	37	Animal waste	Ni	17	2	0,774474
197	220	Abdelsalam, E	2016	Egypt	37	Animal waste	Fe	9	20	0,514281
198	220	Abdelsalam, E	2016	Egypt	37	Animal waste	Magnetite	7	20	0,769135
199	237	Carpenter, A	2015	USA	30	Industrial waste	ZVI	119	1250	0,09974
200	237	Carpenter, A	2015	USA	30	Industrial waste	ZVI	119	2500	0,245083
201	237	Carpenter, A	2015	USA	30	Industrial waste	ZVI	119	5000	0,245083
202	237	Carpenter, A	2015	USA	30	Industrial waste	ZVI	123	1250	0,09974
203	237	Carpenter, A	2015	USA	30	Industrial waste	ZVI	119	1250	0,281821
204	248	Su, N	2014	China	32	Municipal waste	ZVI	90	500	0,094412
205	248	Su, N	2014	China	32	Municipal waste	ZVI	90	1000	0,043593
206	248	Su, N	2014	China	32	Municipal waste	ZVI	90	2000	-0,09333
207	249	Guan, Z	2015	China	35	Municipal waste	Comp	90	500	0,532074
208	249	Guan, Z	2015	China	35	Municipal waste	Comp	90	500	0,412598
209	249	Guan, Z	2015	China	35	Municipal waste	ZVI	45	500	0,241829
210	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Nickel Oxide	15	1	0,329534
211	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Nickel Oxide	15	10	-0,11723
212	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Nickel Oxide	15	100	-0,2222
213	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Cobalt Oxide	50	1	0,265116
214	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Cobalt Oxide	50	10	-0,10529
215	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Cobalt Oxide	50	100	-0,39297
216	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Magnetite	25	1	0,06332
217	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Magnetite	25	10	0,304356
218	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Magnetite	25	100	0,203979
219	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Combinação	15+50+25	1+1+1	0,417981
220	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Combinação	15+50+25	10+10+10	0,293647

221	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Combinaco	15+50+25	100+100+100	-0,17805
222	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Combinaco	15+50+25	1+1+10	0,487637
223	283	Gran, S	2022	Iran	35	Municipal waste	Combinaco	15+50+25	1+1+100	0,383822
224	284	Gundoshmian, T	2022	Iran	37	Co-digestion	Fe	37,5	50	0,336543
225	284	Gundoshmian, T	2022	Iran	37	Co-digestion	Fe	37,5	70	0,413844
226	284	Gundoshmian, T	2022	Iran	37	Co-digestion	Fe	37,5	90	0,594789
227	284	Gundoshmian, T	2022	Iran	37	Co-digestion	Fe	37,5	110	0,538036
228	287	Abdelwahab, T	2021	Egypt	33	Animal waste	Co	87	1	0,582934
229	287	Abdelwahab, T	2021	Egypt	33	Animal waste	Co	87	2	0,447083
230	287	Abdelwahab, T	2021	Egypt	33	Animal waste	Co	87	3	0,436014
231	296	Ziganshina, E	2022	Russia	38	Animal waste	Magnetite	75	2500	0,047203
232	309	Samer, M	2022	Egypt	37,5	Co-digestion	Cobalt Oxide	26	1	-0,20675
233	309	Samer, M	2022	Egypt	37,5	Co-digestion	Cobalt Oxide	26	2	-0,08759
234	309	Samer, M	2022	Egypt	37,5	Co-digestion	Cobalt Oxide	26	5	0,687012
235	311	Li, L	2022	China	37	Municipal waste	Magnetite	45	530	0,109703
236	311	Li, L	2022	China	37	Municipal waste	Magnetite	45	530	0,067131
237	313	Singh, D	2022	India	35	Animal waste	Iron Oxide	45	9	-0,01183
238	313	Singh, D	2022	India	35	Animal waste	Iron Oxide	45	12	0,072103
239	313	Singh, D	2022	India	35	Animal waste	Iron Oxide	45	15	0,213467
240	313	Singh, D	2022	India	35	Animal waste	Iron Oxide	45	18	0,492311
241	313	Singh, D	2022	India	35	Animal waste	Iron Oxide	45	21	0,290701
242	314	Olatunji, K	2022	South Africa	37	Agricultura waste	Magnetite	49	20	1,214282
243	314	Olatunji, K	2022	South Africa	37	Agricultura waste	Magnetite	49	20	1,245424
244	314	Olatunji, K	2022	South Africa	37	Agricultura waste	Magnetite	49	20	1,43443
245	314	Olatunji, K	2022	South Africa	37	Agricultura waste	Magnetite	49	20	1,055383
246	314	Olatunji, K	2022	South Africa	37	Agricultura waste	Magnetite	49	20	0,725897
247	316	Ali, A	2022	Pakistan	36	Municipal waste	Magnetite	22	75	0,760365
248	316	Ali, A	2022	Pakistan	36	Municipal waste	Magnetite	22	75	0,921596
249	316	Ali, A	2022	Pakistan	36	Municipal waste	Magnetite	22	75	0,888757
250	328	Boscaro, M	2022	Brazil	37	Industrial waste	Magnetite	20	200	0,404775
251	328	Boscaro, M	2022	Brazil	37	Industrial waste	Magnetite	20	400	0,250778
252	328	Boscaro, M	2022	Brazil	37	Industrial waste	Magnetite	20	800	0,232349

253	329	Pang, L	2022	China	55	Animal waste	Zinc oxide	90	136,9	-1,85671
254	332	Mu, H	2022	China	35	Synthetic	Zinc oxide	100	100	-0,49627
255	332	Mu, H	2022	China	35	Synthetic	Combinação	100 + 30	100 + 10	-0,14771
256	332	Mu, H	2022	China	35	Synthetic	Combinação	101 + 30	100 + 50	0,089152
257	332	Mu, H	2022	China	35	Synthetic	Combinação	102 + 30	100 + 100	-0,01044
258	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Titanium Oxide	136	200	0,074986
259	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Zinc Oxide	175	200	-0,52735
260	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Cooper Oxide	112	200	-1,71298
261	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Titanium Oxide	136	200	0,043399
262	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Zinc Oxide	175	200	-0,48955
263	337	Li, H	2022	China	35	Synthetic	Cooper Oxide	112	200	-1,62161
264	344	Qi, L	2021	China	55	Animal waste	Zinc oxide	90	0,03	-1,86052
265	344	Qi, L	2021	China	55	Animal waste	Zinc oxide	90	0,18	-2,52321
266	344	Qi, L	2021	China	55	Animal waste	Zinc oxide	90	0,6	-2,72866
267	348	Liu, Y	2021	China	37	Agricultural waste	Magnetite	15	100	0,207206
268	348	Liu, Y	2021	China	37	Agricultural waste	Magnetite	15	100	0,23601
269	348	Liu, Y	2021	China	37	Agricultural waste	Magnetite	15	100	0,353808
270	351	Farghali, M	2021	Egypt	NA	Animal waste	Iron Oxide	30	100	0,127833
271	351	Farghali, M	2021	Egypt	NA	Animal waste	Titanium Oxide	25	500	-0,20067
272	251	Yinguang, C	2014	China	35	Municipal waste	Titanium Oxide	185	60,42	0
273	251	Yinguang, C	2014	China	35	Municipal waste	Titanium Oxide	185	1510,5	0
274	259	Yang, Y	2013	USA	37	Synthetic	ZVI	55	56	-0,22722
275	259	Yang, Y	2013	USA	37	Synthetic	ZVI	55	560	-0,22722
276	259	Yang, Y	2013	USA	37	Synthetic	ZVI	55	1680	-1,20127
277	261	Yang, Y	2013	USA	37	Municipal waste	Ag	21	1,36	-1,57172
278	264	Doolette, C.L	2013	Australia	NA	Municipal waste	Ag	10	2,546	0,196011
279	273	Yang, Y	2011	USA	37	Municipal waste	Ag	29	10	0,047006
280	273	Yang, Y	2011	USA	37	Municipal waste	Ag	29	40	-0,01617
281	67	Olaya, W	2020	Canada	35	Municipal waste	Zinc oxide	30	6	0,002228
282	67	Olaya, W	2020	Canada	35	Municipal waste	Zinc oxide	100	6	0,005618
283	67	Olaya, W	2020	Canada	35	Municipal waste	Zinc oxide	30	6	-0,01619
284	67	Olaya, W	2020	Canada	55	Municipal waste	Zinc oxide	30	6	0,00482

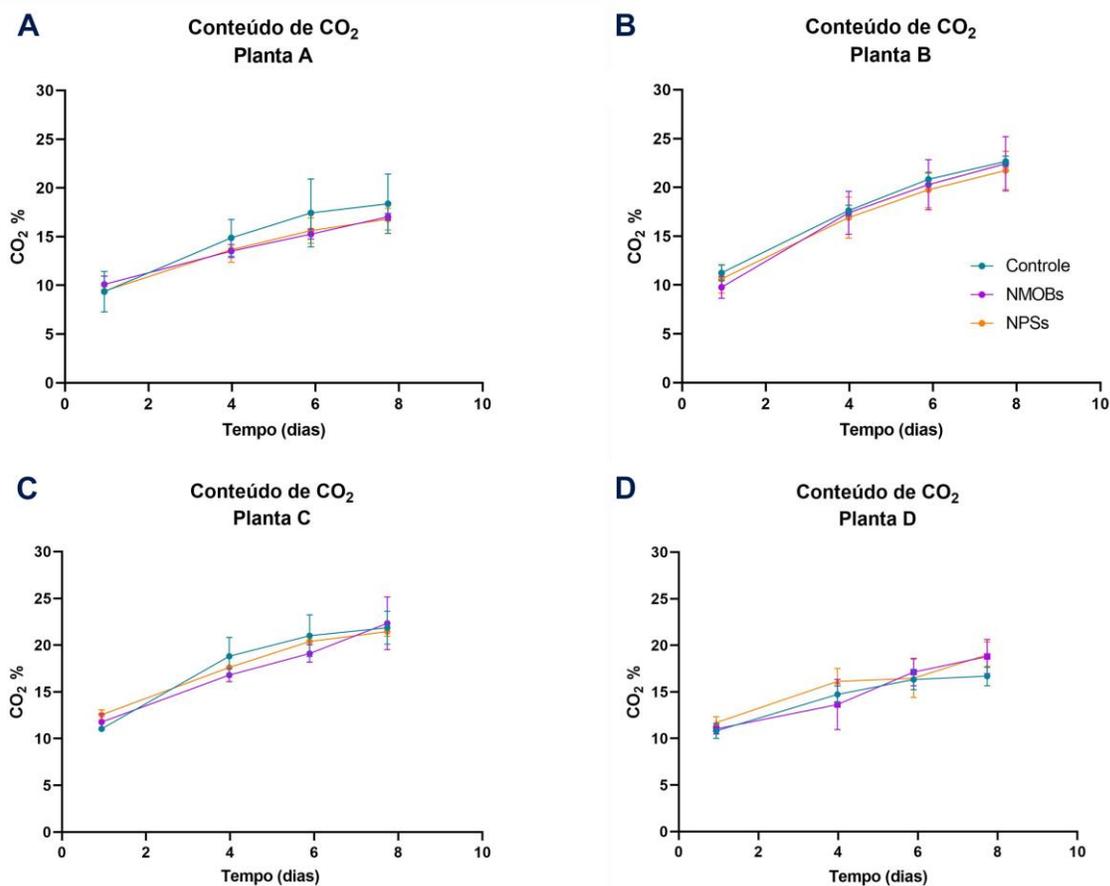
285	67	Olaya, W	2020	Canada	55	Municipal waste	Zinc oxide	100	6	0,005984
286	67	Olaya, W	2020	Canada	55	Municipal waste	Zinc oxide	30	6	-0,0015
287	58	Salama, A	2020	Egypt	35	Aquatic biomass	Nickel Oxide	25	2	1,064189
288	58	Salama, A	2020	Egypt	35	Aquatic biomass	Nickel Oxide	25	2	10,1732
289	56	Hassaneen, F	2020	Egypt	40	Animal waste	Comp	100	500	0,619294
290	56	Hassaneen, F	2020	Egypt	40	Animal waste	Comp	70	500	0,382532

9.2 Produção de CO₂ frente a adição de NMOBs e NPSs em amostras de digestatos de reatores anaeróbicos



Anexo 2. Produção de CH₄ ao longo do experimento na primeira rodada de experimentos utilizando digestatos provenientes de digestores anaeróbicos de esterco em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está

representado pelos pontos de cor verde. A, B, C e D representam diferentes Plantas de digestores anaeróbicos fontes do lodo, nesta rodada de experimentos, todos os lodos empregados eram provenientes de Plantas operando com esterco animal como substrato.



Anexo 3. Concentração de CO₂ ao longo do período de incubação de lodos anaeróbicos na segunda rodada de experimentos em que foram adicionadas 100 mg/L de NMOBs (violeta) ou NPS (laranja). O grupo controle está representado pelos pontos de cor verde (A) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (B) Lodo de digestor operando com esterco animal como substrato; (C) Lodo de digestor operando com resíduo de alimentos como substrato; (D) Lodo de digestor operando com resíduo de esgoto municipal como substrato.