



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JESSICA KLAROSK HELENAS PERIN

**INFLUÊNCIA DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE RESÍDUOS DE
PODAS URBANAS NO DESEMPENHO DA CODIGESTÃO
ANAERÓBIA DE RESÍDUOS ALIMENTARES**

LONDRINA - PR
2023

JESSICA KLAROSK HELENAS PERIN

**INFLUÊNCIA DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE RESÍDUOS DE
PODAS URBANAS NO DESEMPENHO DA CODIGESTÃO
ANAERÓBIA DE RESÍDUOS ALIMENTARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes

Coorientadora: Profª. Dra. Maria Inês Rezende

LONDRINA - PR
2023

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

Perin, Jessica Klarosk Helenas.

Influência dos pré-tratamentos de resíduos de podas urbanas no desempenho da codigestão anaeróbia de resíduos alimentares / Jessica Klarosk Helenas Perin. - Londrina, 2023.
214 f. : il.

Orientador: Fernando Fernandes.

Coorientador: Maria Inês Rezende.

Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Tecnologia e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Codigestão anaeróbia de resíduos orgânicos - Tese. 2. Pré-tratamentos de resíduos lignocelulósicos - Tese. 3. Geração de biogás e metano - Tese. I. Fernandes, Fernando. II. Rezende, Maria Inês. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Tecnologia e Urbanismo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. IV. Título.

CDU 62

JESSICA KLAROSK HELENAS PERIN

**INFLUÊNCIA DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE RESÍDUOS DE PODAS URBANAS
NO DESEMPENHO DA CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS
ALIMENTARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Mônica Sarolli Silva de Mendonça Costa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste

Dr. Rubens Perez Calegari
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP

Dra. Samantha Christine Santos
Institute of Energy and Environment - IEE/USP

Prof. Dr. Thiago Edwiges
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Londrina, 03 de março de 2023.

Aos meus pais, Jefferson e Miriam, à minha irmã Julia e
ao amor da minha vida, meu esposo Fernando, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar meus caminhos, iluminar meus passos, me dar forças para seguir em frente e ser, muitas vezes, o único capaz de acalmar meu coração. “(...) *Ainda vai me agradecer, por tudo que eu permiti você viver. Alguém vai perguntar, como que aconteceu? Você responderá: Foi Deus*”.

Ao professor Dr. Fernando Fernandes, meu querido orientador, por todo suporte, incentivo e ensinamentos durante os anos de orientação, seja no mestrado ou no doutorado, contribuindo grandemente com o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Dra. Maria Inês Rezende, minha coorientadora e anjo que Deus colocou no meu caminho, por todo apoio, ombro, paciência e dedicação durante esta jornada. Agradeço, principalmente, por não medir esforços para me ajudar e por estar sempre disposta a compartilhar conhecimento.

A professora Dra. Emília Kiyomi Kuroda, pelo apoio diário e pela troca de conhecimentos e experiências durante os anos.

Aos professores componentes da banca de qualificação e defesa, Dra. Mônica Sarolli Silva de Mendonça Costa, Dr. Rubens Perez Calegari, Dra. Samantha Christine Santos e Dr. Thiago Edwiges, pelas valiosas contribuições. Agradeço, especialmente, ao professor Rubens, pela acolhida no laboratório da ESALQ e por todo auxílio no desenvolvimento de análises específicas.

À professora Dra. Nicole Caldas Pan, por toda ajuda e disponibilidade, mesmo antes, durante e depois da gravidez. Nunca esquecerei o quanto você foi fundamental neste processo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Estadual de Londrina, pelos ensinamentos. Aos funcionários da UEL, Tânia, Nelson, Agnaldo, Osvaldo, Ivan e Carlos, pela gentileza, colaboração e constante auxílio na execução das tarefas.

Aos amigos do LabTAR: Priscila Borth, pela amizade maravilhosa que construímos durante todo tempo que trabalhamos juntas; José Augusto Pimenta, pelo companheirismo e amizade, desde o mestrado, dividindo alegrias, frustrações e memes; Adriana Challiol, por nosso encontro - mesmo que tardio - e pela parceria, amizade, conversas e desabafos, seja no doutorado ou na loucura da segunda graduação; Maurício Bortoloti, pela amizade, pelas risadas e por último, mas não menos importante, pelas infinitas ajudas com meus reatores ou qualquer outro parafuso “a ser apertado”; Isabela Sicchieri, pela amizade, companheirismo e auxílio - no laboratório ou no trabalho. Agradeço também aos meus amigos: Amanda Alcaide, Betina

Navarro, Emily Assunção, Fernanda Avila, Renan Galvão e Thainara Fernandes, pelos momentos de apoio, descontração e por fazerem os meus dias mais felizes.

Aos alunos de Iniciação Científica, por toda ajuda e apoio, principalmente às minhas gêmeas favoritas: Maria Fernanda e Vitória Louzado.

Aos meus amados pais, Jefferson Caruso Helenas e Miriam Perez Klarosk Helenas, que são minha razão de viver, agradeço pelo dom da vida, pelo apoio incondicional e por todas as palavras de sabedoria ditas quando necessário. À minha irmã Julia Klarosk Helenas, minha melhor amiga, por todo amor e suporte.

Ao amor da minha vida, meu esposo Fernando Tupiná Perin, por tudo, absolutamente tudo. Por ser apoio, ombro, cúmplice e parceiro. Por toda paciência e, principalmente, por todas as palavras de calma, sabedoria, força e coragem. Sem você, eu não teria conseguido! À minha “filha” Lisa, por ser quem esteve comigo todos os dias, literalmente todos, no meu colo, ao meu lado ou deitada no meu pé. Mãe de pet sim e com orgulho!

À Isabela Machado, colega de faculdade, doutorado e profissão, pelas inúmeras conversas e desabafos; suas palavras e ombro foram fundamentais nos meus dias difíceis.

Àqueles que mesmo não fazendo parte da vida científica, estiveram presentes em todos os meus momentos - todos - de alegrias, angustias, frustrações, dúvidas e, principalmente, conquistas: minha sogra Sylvia, meu sogro Carlos, meus cunhados Carlos e Lucas, minhas cunhadas Victória e Geiciane, meus avós Celi, Sylvio e Nair, minhas amigas do trabalho Mariane, Rafaela e Josiane, aos meus compadres Victória e Luiz Gustav, minhas pequenas princesas Geórgia, Amélia e Olívia e minhas melhores amigas, Marcela, Camila, Nayara, Rebeca, Gisele e Ana Claudia. Palavras são pequenas perto do quanto eu amo vocês!

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização e conclusão desta etapa!

“Só vive o propósito quem suporta o processo”.
(Autor desconhecido)

PERIN, Jessica Klarosk Helenas. **Influência dos pré-tratamentos de resíduos de podas urbanas no desempenho da codigestão anaeróbia de resíduos alimentares**. 214 páginas. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A crescente busca por fontes renováveis de energia torna a codigestão anaeróbia - CoDA de resíduos alimentares - RA e biomassa lignocelulósica, como resíduos de poda urbana – RPU (grama, galhos e folhas), uma alternativa para a produção de biogás. Porém, a complexa estrutura desta biomassa torna o pré-tratamento uma das etapas mais relevantes do processo, seja para aumentar a disponibilidade dos componentes de interesse e/ou facilitar a ação das enzimas. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência dos pré-tratamentos químico, físico e biológico nos RPU, visando a otimização da sua CoDA com RA quanto à produção de metano. Para isso, o trabalho foi dividido em três etapas. A Etapa 1 refere-se à aplicação de diferentes pré-tratamentos ao RPU (químico com H₂SO₄, químico com NaOH, físico por auto-hidrólise e biológico com o fungo *Pleurotus ostreatus*) variando os tempos de residência, temperatura e concentração, objetivando a conversão da estrutura lignocelulósica do material. Com base nestes resultados, a Etapa 2 avaliou, a partir do Ensaio BMP, a produção específica de metano - PEM da CoDA de RA e RPU pré-tratado e da mono-digestão de RPU pré-tratado, variando o percentual de RPU adicionado. Uma vez que o pré-tratamento biológico apresentou resultados mais satisfatórios frente aos objetivos do trabalho, na Etapa 2A estudou-se condições de cultivo do *Pleurotus ostreatus*, variando os fatores esterilização, solução umedecedora e nutrientes, com o objetivo de avaliar diferentes possibilidades de desenvolvimento do fungo. A Etapa 3 comparou e avaliou qualitativamente o biogás e efluente gerados em dois reatores em escala piloto (Reator A: CoDA de RA + RPU bruto e Reator B: CoDA de RA + RPU pré-tratado biologicamente). Os resultados da Etapa 1 indicaram que os pré-tratamentos ácido (3%, 125 °C e 22 minutos), alcalino (5,5%, 104 °C e 15 horas), auto-hidrólise (121 °C, 1 atm e 15 minutos) e biológico (28 °C e 14 dias) foram as condições mais favoráveis para conversão de açúcares, remoção de lignina, aumento nos teores de celulose e mudanças na estrutura do RPU. A Etapa 2 indicou que, embora a CoDA de RA + 30% de RPU pré-tratado alcalino tenha promovido maiores remoções de sólidos totais voláteis - STV (55,37%) e demanda química de oxigênio - DQO (58,53%) e a CoDA de RA + 30% de RPU pré-tratado ácido tenham apresentado maiores volumes de biogás acumulado (981,01 NmL) e produção específica de biogás (298,59 NmL gSTV⁻¹), não houve diferença significativa entre as condições de CoDA de RA + 30% de RPU pré-tratado alcalino, RA + 30% de RPU pré-tratado ácido e RA + 30% de RPU pré-tratado biologicamente no que se refere a PEM. Portanto, selecionou-se o pré-tratamento biológico para continuidade do estudo. Os resultados da Etapa 2A indicaram que tanto a solução umedecedora composta apenas por água, quanto a com condições ideais, promoveram remoção de lignina e crescimento do fungo, apontando possibilidade de economias financeiras no preparo destas. Por fim, os resultados da Etapa 3 mostraram que o Reator B apresentou maiores taxas de conversão de matéria orgânica (82,74% para STV e 82,21% para DQO), produção média de biogás (16,40 L), produção específica de biogás (400,70 L kgSTV⁻¹), produção média de metano (10,17 L d⁻¹), PEM (235,73 L kgSTV⁻¹) e percentual médio de metano (58,83%) quando comparados ao Reator A. Conclui-se que a aplicação de pré-tratamento aos resíduos lignocelulósicos, em especial o biológico com *Pleurotus ostreatus*, é uma alternativa para otimizar a produção de biogás e metano em processos anaeróbios, uma vez que promoveu resultados satisfatórios quando utilizado como co-substrato com RA. A biomassa fúngica inativa pode ter sido utilizada como matéria orgânica pelos microrganismos e influenciado nas maiores conversões orgânicas.

Palavras-chave: Resíduos Orgânicos. Pré-tratamento biológico. Biometanização.

PERIN, Jessica Klarosk Helenas. **Influence of pre-treatment of urban pruning waste on the performance of anaerobic co-digestion of food waste.** 214 pages. Thesis (Doctorate in Civil Engineering) - State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The growing search for renewable energy sources makes anaerobic co-digestion - ACoD of food waste - FW and lignocellulosic biomass, such as urban pruning waste – UPW (grass, branches and leaves), an alternative for the production of biogas. However, the complex structure of this biomass makes pre-treatment one of the most relevant steps in the process, either to increase the availability of the components of interest and/or to facilitate the action of the enzymes. In this sense, the present study aims to evaluate the influence of chemical, physical and biological pre-treatments on UPW, aiming at optimizing its ACoD with FW in terms of methane production. For this, the work was divided into three stages. Step 1 refers to the application of different pre-treatments to the UPW (chemical with H₂SO₄, a chemical with NaOH, physical by auto-hydrolysis, and biological with the fungus *Pleurotus ostreatus*) varying the residence times, temperature, and concentration, aiming at the conversion of the lignocellulosic structure of the material. Based on these results, Step 2 evaluated, based on the BMP Test, the specific methane production – SMP of ACoD from FW and pre-treated UPW and mono-digestion of pre-treated UPW, varying the percentage of added UPW. Since the biological pre-treatment presented more satisfactory results given the objectives of the work, in Step 2A adverse conditions for the growth of *Pleurotus ostreatus* were evaluated, varying the sterilization factors, wetting solution, and nutrients, to infer different possibilities of fungus development. Step 3 compared and qualitatively evaluated the biogas and effluent generated in two reactors on a pilot scale (Reactor A: FW ACoD + crude UPW and Reactor B: FW ACoD + biologically pre-treated UPW). The results of Step 1 indicated that the acid (3%, 125 °C and 22 minutes), alkaline (5.5%, 104 °C and 15 hours), autohydrolysis (121 °C, 1 atm and 15 minutes) and biological pretreatments (28 °C and 14 days) were the most favorable conditions for sugar conversion, lignin removal, increase in cellulose contents and changes in the RPU structure. Step 2 indicated that, although RA ACoD + 30% alkaline pre-treated RPU promoted greater removals of total volatile solids - STV (55.37%) and chemical oxygen demand - COD (58.53%) and the RA ACoD + 30% acid pre-treated RPU showed higher volumes of accumulated biogas (981.01 NmL) and specific biogas production (298.59 NmL gSTV⁻¹), there was no significant difference between the ACoD conditions of RA + 30% alkaline pre-treated RPU, RA + 30% acid pre-treated RPU and RA + 30% biologically pre-treated RPU with regard to SMP. Therefore, biological pre-treatment was selected to continue the study. The results of Step 2A indicated that both the wetting solution composed only of water, and the one with ideal conditions, promoted lignin removal and fungus growth, pointing to the possibility of financial savings in their preparation. Finally, the results of Step 3 showed that Reactor B had higher organic matter conversion rates (82.74% for STV and 82.21% for COD), average biogas production (16.40 L), specific production of biogas (400.70 L kgSTV⁻¹), average methane production (10.17 L d⁻¹), SMP (235.73 L kgSTV⁻¹) and average methane percentage (58.83%) when compared to Reactor A. It is concluded that the application of pre-treatment to lignocellulosic residues, in particular the biological one with *Pleurotus ostreatus*, is an alternative to optimize the production of biogas and methane in anaerobic processes, since it promoted satisfactory results when used as a co -substrate with RA. The inactive fungal biomass may have been used as organic matter by the microorganisms and influenced the higher organic conversions.

Keywords: Organic Waste. Biological pre-treatment. Biomethanation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais componentes químicos estruturais da biomassa lignocelulósica.....	29
Figura 2	Diagrama do processo de produção de biogás a partir da digestão anaeróbia.....	35
Figura 3	Reações que ocorrem durante o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos	48
Figura 4	Fluxograma do delineamento experimental do estudo	57
Figura 5	Materiais que compõem o resíduo de poda urbana	58
Figura 6	Coleta e preparo do resíduo alimentar	59
Figura 7	Preparo do resíduo de poda urbana.....	60
Figura 8	Processo de preparo do inóculo: a) Solidificação do BDA nas placas de petri; b) Placas inoculadas com plugs contendo hifas fúngicas; c) Processo de crescimento do fungo; d) Placas após 15 dias de incubação	61
Figura 9	Inoculação do RPU para pré-tratamento biológico: a) Adição das hifas fúngicas no RPU; b) Final do pré-tratamento biológico: Pleurotus ostreatus em todo RPU	64
Figura 10	Interrupção do pré-tratamento biológico	64
Figura 11	Coleta e preparo do inóculo.....	68
Figura 12	Reator utilizado para o Ensaio BMP	70
Figura 13	Desenvolvimento do experimento da Etapa 2A	74
Figura 14	Detalhamento do sistema de biodigestão piloto de 50 L	75
Figura 15	Sistema de reatores anaeróbio em escala piloto de 50 L	76
Figura 16	Equipamentos utilizados para análises quali-qualitativas do biogás: medidor de vazão (a) e analisador portátil de gases (b).....	80
Figura 17	Cromatograma típico dos ácidos graxos voláteis estudados	84
Figura 18	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento ácido, com concentração fixada em 1,68.....	92

Figura 19	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e concentração, após o pré-tratamento ácido, com temperatura fixada em 1,68.....	92
Figura 20	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função da temperatura e concentração, após o pré-tratamento ácido, com tempo fixado em 1,68	92
Figura 21	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento alcalino, com concentração fixada em 1,68.....	97
Figura 22	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e concentração, após o pré-tratamento alcalino, com temperatura fixada em 1,68.....	98
Figura 23	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função da temperatura e concentração, após o pré-tratamento alcalino, com tempo fixado em 1,68	98
Figura 24	Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento biológico	103
Figura 25	FTIR para o RPU bruto e pré-tratados.....	106
Figura 26	Microscopia eletrônica de varredura do RPU bruto	109
Figura 27	Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento ácido.....	109
Figura 28	Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento alcalino.....	110
Figura 29	Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento por auto-hidrólise.....	111
Figura 30	Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento biológico	111
Figura 31	Produção específica acumulada de biogás para seleção do inóculo..	116
Figura 32	Figura 32 – Produção específica acumulada de biogás para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado.....	126
Figura 33	Produção específica acumulada de metano para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado.....	127

Figura 34	Taxa de produção diária de biogás para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado.....	128
Figura 35	Produção específica acumulada de biogás entre os mesmos tipos de pré-tratamento.....	130
Figura 36	Produção específica acumulada de biogás para as condições de mono-digestão anaeróbia com RPU bruto e pré-tratado	131
Figura 37	Ajuste do modelo cinético de Gompertz para produção de metano..	134
Figura 38	Meios de cultivo sem esterilização	139
Figura 39	Meios de cultivo com esterilização e crescimento do <i>Pleurotus ostreatus</i>	141
Figura 40	Monitoramento de pH afluente e efluente dos reatores em escala piloto.....	146
Figura 41	Monitoramento da AT, AGV e relação AI/AP dos reatores em escala piloto	147
Figura 42	Monitoramento do NKT, N-amoniaco e NH ₃ dos reatores em escala piloto	151
Figura 43	Produção de biogás e metano durante o monitoramento dos reatores.	153
Figura 44	Concentrações de AGV no Reator A durante o período experimental	159
Figura 45	Concentrações de AGV no Reator B durante o período experimental	159
Figura 46	Abundância relativa de filo das bactérias presentes nos reatores em escala piloto.....	164
Figura 47	Abundância relativa de classe das bactérias presentes nos reatores em escala piloto.....	167
Figura 48	Abundância relativa de ordem das bactérias presentes nos reatores em escala piloto.....	168
Figura 49	Abundância relativa de família das bactérias presentes nos reatores em escala piloto.....	169
Figura 50	Abundância relativa de gênero das bactérias presentes nos reatores em escala piloto.....	170
Figura 51	Abundância relativa de filo das arqueas presentes nos reatores em escala piloto.....	172

Figura 52	Abundância relativa de classe das arqueas presentes nos reatores em escala piloto.....	172
Figura 53	Abundância relativa de ordem das arqueas presentes nos reatores em escala piloto.....	174
Figura 54	Abundância relativa de família das arqueas presentes nos reatores em escala piloto.....	175
Figura 55	Abundância relativa de gênero das arqueas presentes nos reatores em escala piloto.....	176
Figura 56	Comparação entre os Reatores A (a) e B (b): estrutura lignocelulósica.....	178
Figura 57	Comparação entre os Reatores A (a) e B (b): biofilme e adesão microbológica.....	178
Figura 58	Imagens de MEV da diversidade de microrganismos aderidos na superfície do RPU no Reator A.....	179
Figura 59	Imagens de MEV da diversidade de microrganismos aderidos na superfície do RPU no Reator B.....	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Substâncias e concentrações estimulantes e inibidoras na digestão anaeróbia.....	44
Tabela 2	Estudos envolvendo a produção de metano a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas.....	54
Tabela 3	DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento ácido de poda urbana	61
Tabela 4	DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento alcalino de poda urbana	61
Tabela 5	DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento biológico de poda urbana	62
Tabela 6	Situações, tratamentos e substratos utilizados no ensaio de BMP ...	69
Tabela 7	Condições experimentais para avaliação do crescimento do <i>Pleurotus ostreatus</i>	73
Tabela 8	Condições experimentais avaliadas nos reatores em escala piloto...	75
Tabela 9	Parâmetro físico-químico, referência, método e frequência de monitoramento.....	75
Tabela 10	Gradiente de temperatura de forno para análise dos AGV.....	84
Tabela 11	Tempos de retenção dos AGVs e íons utilizados na identificação de cada ácido	84
Tabela 12	Parâmetros de validação do método quali-quantitativo de análise de AGV.....	85
Tabela 13	Composição química do resíduo de poda urbana	89
Tabela 14	Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento ácido.....	90
Tabela 15	Análise de variância para pré-tratamento ácido	91
Tabela 16	Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento ácido.....	94
Tabela 17	Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento alcalino..	95
Tabela 18	Análise de variância para pré-tratamento alcalino	97
Tabela 19	Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento alcalino..	98

Tabela 20	Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento auto-hidrólise	100
Tabela 21	Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento por auto-hidrólise	101
Tabela 22	Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento biológico	101
Tabela 23	Análise de variância para pré-tratamento biológico	102
Tabela 24	Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento biológico	103
Tabela 25	Atividade enzimática da lacase após os pré-tratamentos biológicos.....	104
Tabela 26	Condições de pré-tratamento do RPU selecionadas para continuidade do estudo	105
Tabela 27	Valores máximos dos números de onda do FTIR.....	106
Tabela 28	Atribuições típicas dos componentes da biomassa lignocelulósica..	107
Tabela 29	Ácidos Graxos Voláteis das condições selecionadas nos pré-tratamentos do RPU	112
Tabela 30	Compostos inibidores das melhores condições de pré-tratamento do RPU	113
Tabela 31	Caracterização físico-química do inóculo e substratos utilizados no ensaio BMP.....	116
Tabela 32	Macro e micronutrientes do resíduo alimentar utilizado na Etapa 2	118
Tabela 33	Valores médios de pH, AT, AGV e AGV/AT antes e depois do Ensaio BMP	119
Tabela 34	Valores médios de STV, DQO e remoções antes e depois do Ensaio BMP.....	121
Tabela 35	Valores médios de NKT e N-amoniaco antes e depois do Ensaio BMP.....	122
Tabela 36	Volume produzido de biogás, produção específica de biogás e metano e composição do biogás gerado (CH ₄ , CO ₂ e H ₂ S) das condições experimentais.....	124
Tabela 37	Parâmetros cinéticos de Gompertz modificado para produção de metano	135

Tabela 38	Produção específica acumulada de metano para as condições estudadas e Teste Tukey	136
Tabela 39	Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento biológico – Etapa 2A	140
Tabela 40	Análise de variância para a lignina considerando os fatores avaliados	142
Tabela 41	Valor médio para produção de meio de cultivo considerando a condição ideal	143
Tabela 42	Caracterização físico-química do inóculo e substratos utilizados na Etapa 3	144
Tabela 43	Macro e micronutrientes do resíduo alimentar utilizado na Etapa 3	145
Tabela 44	Valores médios de pH, alcalinidade total e AGV nos períodos de monitoramento	148
Tabela 45	Balanço de massa teórico para cada período de monitoramento dos reatores.....	149
Tabela 46	Análises quali-quantitativas do biogás gerado por TDH em cada reator.....	156
Tabela 47	Compostos inibidores nos reatores durante o período experimental	161
Tabela 48	Correlação entre a comunidade microbiana e as condições operacionais	177

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AI	Alcalinidade Intermediária
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Alcalinidade Parcial
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AT	Alcalinidade Total
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BMP	<i>Biochemical Methane Potential</i>
CG	Cromatógrafo Gasoso
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
CoDA	Codigestão Anaeróbia
COP-21	21ª Conferência do Clima
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CTU	Centro de Tecnologia e Urbanismo
DA	Digestão Anaeróbia
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5 Dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSob	Digestato Sobrenadante
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FB	Fibra Bruta
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FF	2-furfuraldeído
FID	Detector de Ionização de Chama
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GEE	Gases de Efeito Estufa
GL	Graus de Liberdade
HAc	Ácido Acético

HBu	Ácido Butírico
HIb	Ácido Isobutírico
HIv	Ácido Isovalérico
HVa	Ácido Valérico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPr	Ácido Propiônico
5-HMF	5-hidroximetil-2-furfuraldeído
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LabTAR	Laboratório de Tratamento de Águas e Resíduos
LD	Limite de Detecção
LDA	Lignina em Detergente Ácido
LQ	Limite de Quantificação
LS	Lodo Sedimentado
MDL	Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSF	Material Sólido Fermentado
N-amoniacal	Nitrogênio Amoniacal
NKT	Nitrogênio Total Kjeldahl
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PE	Produção Específica
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PNRS	Política Nacional dos Resíduos Sólidos
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RA	Resíduo Alimentar
RPU	Resíduo de Poda Urbana
RSU	Resíduo Sólido Urbano
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TCD	Detector de Condutividade Térmica
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VDI	<i>Verein Deutscher Ingenieure</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVO GERAL	25
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
3.1	PANORAMA GERAL DOS RESÍDUOS ORGÂNICOS, BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA	26
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	28
3.2.1	Estrutura da Biomassa Lignocelulósica	29
3.2.1.1	Celulose.....	30
3.2.1.2	Hemicelulose.....	30
3.2.1.3	Lignina.....	31
3.2.1.4	Outros componentes	32
3.3	RESÍDUO DE PODA URBANA: PROPRIEDADES E POTENCIAL COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENERGIA.....	32
3.4	PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	33
3.4.1	Digestão Anaeróbia.....	34
3.4.1.1	Hidrólise.....	36
3.4.1.2	Acidogênese.....	36
3.4.1.3	Acetogênese.....	37
3.4.1.4	Metanogênese.....	38
3.4.2	Fatores que Afetam a Digestão Anaeróbia	39
3.4.2.1	pH, ácidos graxos voláteis e alcalinidade.....	39
3.4.2.2	Teor de sólidos e demanda química de oxigênio.....	41
3.4.2.3	Carga orgânica volumétrica.....	41
3.4.2.4	Relação C/N.....	42
3.4.2.5	Macro e micronutrientes	43
3.4.2.6	Temperatura.....	44
3.4.2.7	Agitação.....	45
3.4.2.8	Tempo de detenção hidráulica.....	45
3.5	CODIGESTÃO ANAERÓBIA: UMA ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAR O PROCESSO.....	46
3.6	PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	47

3.6.1	Pré-tratamento Químico Ácido	49
3.6.2	Pré-tratamento Químico Alcalino	50
3.6.3	Pré-tratamento Físico	50
3.6.4	Pré-tratamento Biológico.....	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	56
4.2	RESÍDUOS UTILIZADOS.....	58
4.3	COLETA E PREPARO DOS SUBSTRATOS.....	58
4.4	PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1	60
4.4.1	Pré-tratamentos Químicos: Ácido e Alcalino.....	60
4.4.2	Pré-tratamento Físico: Auto-hidrólise.....	62
4.4.3	Pré-tratamento Biológico: Basidiomiceto <i>Pleurotus ostreatus</i>	62
4.4.3.1	Microrganismo e manutenção	63
4.4.3.2	Preparo do inóculo e cultivo	63
4.4.3.3	Interrupção do pré-tratamento	64
4.4.3.4	Determinação da atividade de lacase.....	65
4.4.4	Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Lignina, Balanço de Massa, Rendimento e Deslignificação	65
4.4.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	67
4.5	ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2	68
4.5.1	Aparato Experimental	69
4.5.2	Análise Quantitativa do Biogás	70
4.5.3	Análise Qualitativa do Biogás	72
4.5.4	Cinética: Modelo de Gompertz Modificado	73
4.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> – ETAPA 2A	73
4.6.1	Manutenção, Preparo do Inóculo, Cultivo e Interrupção do Pré-tratamento	74
4.7	CODIGESTÃO ANAERÓBIA - ETAPA 3	74
4.7.1	Aparato Experimental	75
4.7.2	Partida dos Reatores Anaeróbios.....	77
4.7.3	Operação e Monitoramento dos Reatores Anaeróbios	77
4.7.4	Balanço de massa teórico	78
4.7.5	Análises quali-quantitativas do biogás.....	79
4.8	PARÂMETROS DE CONTROLE E DE DESEMPENHO	80

4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	82
4.10	ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR GC-MS.....	82
4.10.1	Preparo de Amostras.....	83
4.10.2	Análise Quali-quantitativa de Ácidos Graxos Voláteis.....	83
4.11	ANÁLISE DOS TEORES DE FURFURAL E 5-HIDROXIMETILFURFURAL.....	86
4.12	ANÁLISE DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	86
4.13	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA EXISTENTE.....	86
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	87
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1	PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1.....	89
5.1.1	Pré-tratamento Ácido: Ácido Sulfúrico.....	90
5.1.2	Pré-tratamento Alcalino: Hidróxido de Sódio.....	95
5.1.3	Pré-tratamento Físico: Auto-hidrólise.....	99
5.1.4	Pré-tratamento Biológico: Basidiomiceto <i>Pleurotus ostreatus</i>	101
5.1.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	106
5.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	108
5.1.7	Ácidos Graxos Voláteis.....	112
5.1.8	Compostos Inibidores.....	113
5.1.9	Considerações sobre a Etapa 1.....	114
5.2	ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2.....	115
5.2.1	Parâmetros de Controle Operacional.....	119
5.2.2	Parâmetros de Desempenho do Sistema.....	120
5.2.2.1	Geração de biogás e de metano..	124
5.2.3	Cinética: Modelo de Gompertz Modificado.....	133
5.2.4	Análises Estatísticas.....	136
5.2.5	Considerações sobre a Etapa 2.....	137
5.3	AValiação DO Crescimento DO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> - ETAPA 2A.....	138
5.3.1	Considerações sobre a Etapa 2A.....	143
5.4	CODIGESTÃO ANAERÓBIA – ETAPA 3.....	144
5.4.1	Parâmetros de Controle Operacional.....	146
5.4.2	Parâmetros de Desempenho do Sistema.....	149
5.4.2.1	Geração de biogás e metano.....	153
5.4.2.2	Ácidos graxos voláteis.....	158

5.4.2.3	Compostos inibidores	160
5.4.2.4	Comunidade microbiana.....	163
5.4.2.4.1	<i>Bactérias</i>	164
5.4.2.4.2	<i>Arqueas</i>	171
5.4.2.5	Microscopia eletrônica de varredura	177
5.4.3	Considerações sobre a Etapa 3	181
6	CONCLUSÕES.....	183
6.1	PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1.....	183
6.2	ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2.....	184
6.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> - ETAPA 2A.....	185
6.4	CODIGESTÃO ANAERÓBIA - ETAPA 3.....	186
6.5	CONSIDERAÇÕES GERAIS DO ESTUDO.....	187
7	RECOMENDAÇÕES.....	188
	BIBLIOGRAFIA	189

1 INTRODUÇÃO

A quantidade de resíduos sólidos urbanos - RSU produzidos no Brasil representa um dos problemas enfrentados nos dias atuais. Adicionalmente, a pandemia da COVID-19 promoveu mudanças no estilo de vida da população e influenciou diretamente na geração destes resíduos, alcançando um total de 82,5 milhões de toneladas geradas em 2020, com taxa crescente de geração per capita de resíduos ($1,07 \text{ kg dia}^{-1}$) (ABRELPE, 2021). Numericamente, o Brasil registrou 79 milhões de toneladas de RSU no ano de 2019 e, deste montante, cerca de 45,3% correspondem a matéria orgânica, referente aos restos de alimentos derivados do processo de comercialização e consumo e resíduos de poda urbana provenientes da manutenção de áreas verdes (ABRELPE, 2020; BRASIL, 2022).

Segundo dados do Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil, em 2019 o setor de resíduos sólidos urbanos representou 4% do total de emissões de gases de efeito estufa no Brasil, o que corresponde a 96 milhões de toneladas de $\text{CO}_{2\text{eq}}$ emitidas (ABRELPE, 2020). Neste contexto, utilizar a fração orgânica deste material para conversão energética representa uma alternativa ambientalmente sustentável, aumentando a vida útil dos aterros sanitários e gerando produtos com valor agregado.

A busca por soluções técnicas mais viáveis para uma gestão sustentável dos resíduos sólidos torna-se indispensável para a preservação e manutenção da qualidade ambiental (HELENAS, 2019). Perin *et al.* (2020) explicam que uma alternativa ao tratamento dos resíduos orgânicos é a digestão anaeróbia - DA; processo biológico que permite a geração do biogás por meio da degradação do material orgânico, resultando em subprodutos com possibilidade de aplicação energética a partir do metano e um efluente biofertilizante com possibilidade de aplicação na produção vegetal como fonte nutricional.

Dentre os resíduos orgânicos passíveis de aplicação na digestão anaeróbia, estão os resíduos alimentares - RA, que representam grande parcela dos resíduos sólidos urbanos e são compostos por alto teor de matéria orgânica. Porém, alguns problemas em relação à estabilidade do processo anaeróbio utilizando os RA são encontrados (BORTH *et al.*, 2021), especialmente por seu baixo valor de pH (características ácidas), baixa relação C/N, acúmulo de amônia e elevado teor de matéria orgânica rapidamente biodegradável, que causa a acidificação do sistema devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis - AGV e consequente inibição da metanogênese (DAVID *et al.*, 2018). Assim, a codigestão anaeróbia - CoDA, utilizada quando o objetivo é estabilizar simultaneamente mais de um substrato, tem sido estudada para aumentar a produção de metano, melhorando fatores relevantes do processo, como equilíbrio correto entre

macro e micronutrientes, diluição dos inibidores, diminuição do conteúdo de nitrogênio, entre outros parâmetros que são passíveis de otimizar o rendimento de biogás e melhorar sua composição.

Outros resíduos gerados em grandes quantidades e que podem ser aplicados na codigestão anaeróbia dos RA são aqueles provenientes da poda urbana - RPU, gerados na forma de galhos, ramos, folhas, sementes e grama (MEIRA, 2010). Estima-se que a biomassa lignocelulósica compreenda cerca de 50% da biomassa disponível no mundo, o que ressalta seu potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). No entanto, ainda que sejam materiais relevantes para balanceamento do processo anaeróbio, a estrutura da biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemiceluloses e lignina, componentes da parede celular vegetal (LU *et al.*, 2013), cuja principal função é criar uma barreira natural contra a ação de microrganismos, promovendo certa resistência a degradação destes.

Diante disso, o uso de técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica passa a ser uma etapa fundamental para aumentar a eficiência de conversão de biogás a partir destes resíduos, auxiliando na redução da cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, remoção da lignina e hemicelulose e aumento a área acessível para os microrganismos (YU *et al.*, 2019). Dentre os pré-tratamentos disponíveis, destacam-se os físicos (moagem e/ou hidrotérmicos), químicos diluídos ou concentrados (alcalinos ou ácidos) e biológicos (KIM; HAN, 2012; JAIN *et al.*, 2015; DUTRA, 2018; ATELGE *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2022).

A escolha do pré-tratamento depende do tipo e composição da biomassa e da ponderação das vantagens e desvantagens de cada um deles frente aos objetivos de aplicação do resíduo tratado. Os pré-tratamentos físicos, por exemplo, embora sejam bastante simples e com implicações ambientais mínimas, podem ser mais caros devido ao alto consumo de energia e com menor rendimento de metano. O mesmo ocorre com os pré-tratamentos químicos; ainda que o processo promova melhores conversões estruturais do resíduo lignocelulósico, podem ser tóxicos para os microrganismos atuantes na digestão anaeróbia, além de comprometer a qualidade do biofertilizante. Já os pré-tratamentos biológicos, mesmo que apresentem uso mínimo de energia e menores formações de inibidores, são mais lentos (KHAN *et al.*, 2022).

Embora o emprego de variados pré-tratamentos, isolados ou associados, venha sendo estudado e tenham apresentado resultados satisfatórios frente a conversão dos componentes da estrutura lignocelulósica dos resíduos vegetais, a busca por tecnologias alternativas de pré-tratamento que abracem os aspectos ambientais, econômicos e sustentáveis tem crescido. Neste sentido, não foram encontrados estudos específicos utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus* no

pré-tratamento biológico de resíduos de poda urbana, visando sua utilização na CoDA de resíduos alimentares. Ainda, não foram identificados trabalhos que mostrem que a biomassa fúngica atuante no pré-tratamento também é utilizada como matéria orgânica pelos microrganismos anaeróbios para a otimização da produção de biogás e metano.

Desta forma, este estudo propõe a investigação de diferentes tecnologias de pré-tratamento aos resíduos de poda urbana, a fim de avaliar a influência destes tratamentos na disponibilização da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal. Visa-se a otimização para a sua codigestão anaeróbia com resíduo alimentar, de forma a melhorar o desempenho do processo e aumentar o potencial de produção de biogás e metano, e também como alternativa de tratamento dos resíduos sólidos orgânicos estudados.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos pré-tratamentos químico, físico e biológico nos resíduos de poda urbana - RPU, visando a otimização da sua codigestão anaeróbia - CoDA com resíduo alimentar - RA quanto à produção de metano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos pré-tratamentos químico ácido, químico alcalino, físico e biológico em RPU, no que tange às modificações estruturais e disponibilização dos açúcares da parede celular, variando os fatores concentração, tempo de residência e temperatura;
- Comparar o potencial bioquímico de metano, a partir do Ensaio BMP (*Biochemical Methane Potential*), dos RPU bruto, RPU pré-tratados e do RA, a partir de variadas condições operacionais (mono-digestão e codigestão anaeróbia com diferentes proporções de sólidos totais voláteis - STV);
- Investigar no pré-tratamento biológico a influência dos fatores solução umedecedora (com e sem esterilização) e nutrientes no desenvolvimento e atuação do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* no RPU, no que se refere a remoção de lignina, disponibilização de açúcares e produção de lacase;
- Comparar o desempenho da codigestão anaeróbia de RA com RPU bruto e melhor resposta de RPU pré-tratado, em reatores de escala piloto de 0,05 m³, realizando monitoramento de parâmetros físico-químicos e do desempenho operacional;
- Identificar e quantificar a comunidade microbiana presente no efluente dos reatores pilotos, a partir do sequenciamento e quantificação de DNA.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PANORAMA GERAL DOS RESÍDUOS ORGÂNICOS, BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA

A crescente preocupação com o meio ambiente tem servido de base para que a sociedade questione os meios de exploração dos recursos naturais, a intensidade como são explorados e as consequências ambientais decorrentes de sua utilização (SELLA *et al.*, 2019). Aliado a exploração dos recursos naturais escassos e seus impactos ambientais, existe também a preocupação de cunho social e econômico no que se refere a gestão de resíduos sólidos urbanos - RSU ao longo da última década.

Considerando que quase metade (45,3%) dos resíduos gerados no País representa fração orgânica, torna-se fundamental o desenvolvimento de tecnologias que possam ser aplicadas para a geração de produtos com valor agregado, especialmente quando se trata das perdas e desperdício de alimentos (OLIVEIRA; GATTAMORTA, 2021). De acordo com Porpino e Antonioli (2020), a família brasileira desperdiça, em média, 128 kg de alimentos por ano. O desperdício de alimentos contribui para o consumo excessivo de água e combustíveis fósseis que, juntamente com as emissões provenientes de sua decomposição, têm impacto nas mudanças climáticas globais. Assim, reduzir o problema dos resíduos alimentares e/ou aplicar uma gestão sustentável em seu tratamento tem se tornado uma prioridade na agenda de vários governos e setores econômicos, principalmente para alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável - ODS da Organizações das Nações Unidas - ONU.

Bortoloti (2021) apresenta que os resíduos alimentares podem apresentar composição variada, uma vez que aspectos como cardápios, tipos de alimentos servidos, local de geração, cultura, geografia, etc., colaboram para que não tenham uma característica marcante e homogênea. Por possuírem alto teor orgânico (entre 70 a 90% em sólidos totais voláteis), a sua disposição inadequada pode promover passivos ambientais, dado que os produtos da sua degradação são precursores de contaminação hídrica, assoreamento de rios e lagos, proliferação de macro e microvetores, geração de odores e emissão de gases de efeito estufa - GEE (BORTH, 2021). Por outro lado, as propriedades biodegradáveis e a riqueza de nutrientes presentes nos resíduos alimentares os tornam aptos a processos biológicos para reciclagem e valorização, fato este que também contribui com a diversificação da matriz energética brasileira e das fontes renováveis de energia.

O desenvolvimento de fontes renováveis de energia, embora acelerado, não é proporcional ao aumento da demanda energética. Neste sentido, visando uma sociedade

industrial mais sustentável e uma gestão eficaz das emissões de GEE, torna-se imprescindível reduzir a dependência da população por fontes não-renováveis de energia, como combustíveis fósseis e nucleares (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012; RÜHL *et al.*, 2012).

Historicamente, quando comparado ao resto do mundo, o Brasil se destaca por apresentar alto percentual de fontes renováveis de energia em sua oferta interna (EPE/MME, 2020). Segundo Unesco (2021), o Brasil possui uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo, o que pode ser confirmado com o alto percentual de contribuição (85%) das energias renováveis na geração de eletricidade no país em 2020. De acordo com a Nota Técnica referente a Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis no Brasil, verificou-se, durante o ano de 2020, um acréscimo na participação da geração de energia a partir da biomassa no total ofertado por essa matriz (crescimento de 0,8%), quando comparado ao mesmo período de 2019 (EPE/MME, 2021).

O crescimento populacional, atrelado a intensa urbanização e desenvolvimento tecnológico, confirmam a necessidade de geração de energia a partir de novas fontes, uma vez que, atualmente, mais de 84% das demandas globais de energia estão sendo atendidas por recursos de combustíveis fósseis e têm efeitos ambientais adversos. Portanto, essas complicações motivaram o uso racional dos recursos naturais disponíveis e dos produtos residuais por meio da abordagem da biorrefinaria (GODINHO *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2022).

Khan *et al.* (2022) explicam que existem três categorias de biocombustíveis baseadas nas matérias-primas utilizadas para sua produção: as partes comestíveis das lavouras são utilizadas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis de 1ª geração, os materiais lignocelulósicos são utilizados para a produção de biocombustíveis de 2ª geração e os biocombustíveis de 3ª geração são produzidos por microalgas como matéria-prima.

As vantagens relacionadas ao uso dos combustíveis renováveis vão além dos impactos econômicos e ambientais que estes promovem. Para a questão econômica, a diversificação da matriz energética, o aumento dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de tecnologias, o crescimento e desenvolvimento da agricultura e a sustentabilidade são os pontos que se destacam. Da mesma forma, do ponto de vista ambiental, destacam-se os impactos relativos à redução de poluentes atmosféricos, a diminuição de gases estufa, melhoria do uso da terra, uso adequado das águas e sequestro de carbono (CHEMMÉS *et al.*, 2013).

Espera-se que, até 2030, as fontes renováveis no Brasil, tanto para geração de energia, quanto para biocombustíveis, representem entre 28% e 33% do total de recursos usados, que o país alcance uma participação estimada de 45% de energias renováveis na composição da sua matriz energética e que a participação de bioenergia sustentável na matriz energética brasileira

aumente para, aproximadamente, 18%. Assim, serão cumpridas as metas estabelecidas no acordo da 21ª Conferência do Clima - COP-21 em Paris, 2015. Neste contexto, a pressão para reduzir os GEE tende a ser cada vez maior e, como consequência disto, a biomassa lignocelulósica, por ser considerada um recurso renovável, se mostrará cada vez mais atraente (EPE, 2016).

Considerando uma perspectiva futura, com uma economia baseada em biocombustíveis, a valorização sustentável dos recursos advindos de biomassas, especialmente por meio da digestão anaeróbia, será uma opção provável e indispensável (EL ACHKAR *et al.*, 2016).

3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Devido à grande disponibilidade da biomassa lignocelulósica, o seu bioprocessamento surge como uma alternativa sustentável e economicamente interessante, haja vista sua abundância, seu potencial energético, baixos custos operacionais, menor toxicidade e o fato de ser renovável (BASTOS, 2020).

O termo biomassa lignocelulósica refere-se a toda matéria de origem vegetal, proveniente de floresta nativa ou plantada; resíduos de poda urbana; culturas agrícolas e seus resíduos (ex.: galhos e/ou cascas de árvores, palha de trigo, bagaço e palha de cana-de-açúcar); e resíduos de madeira e da indústria de papel (GOMES, 2019).

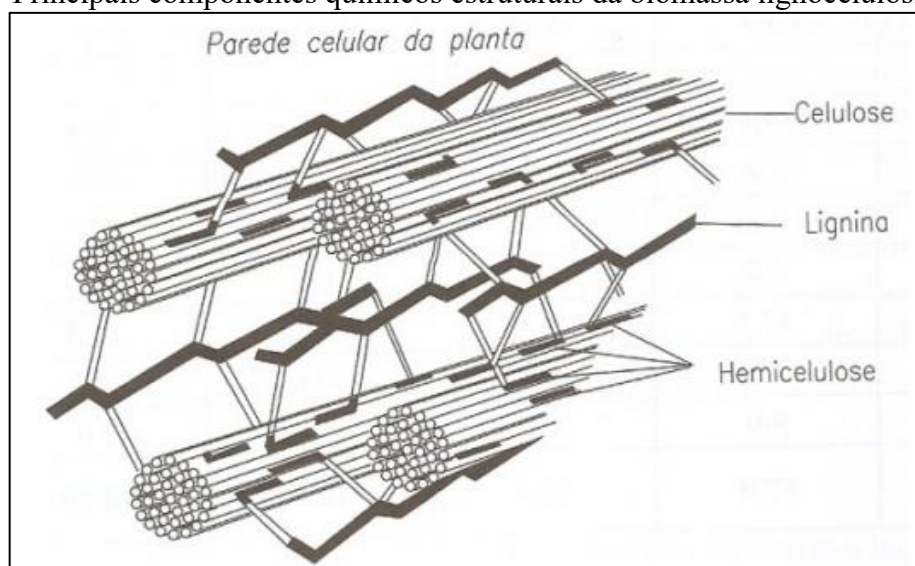
Estima-se que cerca de 181,5 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica sejam produzidas anualmente em todo o mundo, estando disponíveis de forma razoavelmente limpa e em grande quantidade (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; BAËTA, 2016). Ribeiro (2016) apresenta em seu estudo que o Brasil é o terceiro maior produtor agrícola do mundo, superado apenas pelos Estados Unidos e pela União Europeia, o que faz com que a quantidade de resíduos oriundos do setor agrícola no país seja elevada.

No entanto, nem sempre a destinação destes materiais é adequada, o que reflete diretamente em seu uso como fonte renovável e perda do seu potencial energético, gerando um passivo ambiental (BRAGATTO, 2010). Assim, no contexto do aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, surgiu o conceito de biorrefinaria, que objetiva o aproveitamento integrado de todos os componentes da biomassa vegetal, transformando os resíduos e subprodutos gerados de determinado processo em matéria-prima para viabilidade de outro processo (GRAVITIS; SUZUKI, 1999).

3.2.1 Estrutura da Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é constituída, basicamente, dos biopolímeros de celulose ($C_6H_{10}O_5$)_x, hemicelulose ($C_5H_8O_4$)_y e lignina ($C_9H_{10}O_3(OCH_3)$)_z (Figura 1) - componentes estes que representam a maior parte da massa seca do material, além dos extrativos e cinzas (BALAT, 2011). Quimicamente, este material é composto de 35-50% de celulose, 25-35% de hemicelulose e 15-20% de lignina. Esta composição varia de acordo com a diversidade da biomassa, condições de crescimento, parte da planta e idade da colheita (PARAJULI *et al.*, 2015).

Figura 1 – Principais componentes químicos estruturais da biomassa lignocelulósica



Fonte: Lora e Venturini (2012)

O material lignocelulósico também é formado por uma pequena quantidade de outros materiais, como proteínas, sais minerais e metabólitos secundários e sua composição química varia significativamente de espécie para espécie ou até mesmo dentro da própria espécie, dependendo da idade, fase de crescimento, tipo de solo, estresse hídrico, índice de radiação solar, etc. Ou seja, tais fatores podem promover a alteração dos componentes básicos do material lignocelulósico, mesmo que dentro de um mesmo tipo de biomassa (ZHANG; HUANG; RAMASWAMY, 2008; SANTOS, 2017).

Toda a composição desta biomassa tem a função de fornecer à planta apoio estrutural, impermeabilidade e resistência. De maneira geral, esta estrutura é responsável por criar uma barreira natural contra possíveis ataques de microrganismos e estresse oxidativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Como os materiais lignocelulósicos são recalcitrantes, a hidrólise enzimática

- devido ao grau de polimerização, a cristalinidade da celulose, a área de superfície disponível, o teor de umidade e de lignina, por exemplo, pode-se afirmar que as características químicas e morfológicas destes são as principais responsáveis pela dificuldade de sua conversão em biocombustíveis (WU *et al.*, 2016).

3.2.1.1 Celulose

A celulose é o composto orgânico natural mais abundante na natureza e está presente em espécies vegetais superiores (ex.: árvores) (GOMES, 2019). Trata-se de um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) (COSTA, 2013). Baêta (2016) afirma que uma cadeia de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose.

Formada por regiões cristalinas altamente organizadas e regiões amorfas pouco ordenadas, a estrutura da celulose é mantida por ligações de hidrogênio e pelas forças de Van der Waals (TURUMTAY, 2015). Porém, é na região amorfa da estrutura que existem torções capazes de alterar o arranjo ordenado da celulose. Mesmo assim, sua forma está diretamente relacionada a origem do material da parede celular e de como ele foi obtido (BRIENZO *et al.*, 2017; SANTOS, 2017).

Por conta da complexidade de sua estrutura, a degradação da celulose é dificultada, ou seja, quanto maior o grau de polimerização da molécula de celulose, menor será sua solubilidade devido as ligações intermoleculares de hidrogênio (ZHANG; LYND, 2004). Neste contexto, para que haja a conversão da cadeia em monômeros de glicose, é necessária uma etapa de hidrólise. De acordo com Baêta (2016) e Santos (2017), a presença de hemicelulose e lignina torna ainda mais difícil esta hidrólise, portanto, uma etapa de pré-tratamento na biomassa lignocelulósica pode maximizar a quebra.

3.2.1.2 Hemicelulose

Entre os polímeros abundantes na natureza, encontra-se a hemicelulose. Tanto a quantidade de açúcares (monômeros), quanto a composição química da hemicelulose variam em função de alguns fatores, como origem botânica, parte da planta, o tipo de tecido, estágio e condições de crescimento (SANTOS 2017; LIMA, 2018).

De acordo com Baêta (2016), Travaini *et al.* (2016) e Santos (2017), por estarem localizadas, principalmente, na parede celular da biomassa lignocelulósica, associadas as

microfibras de celulose (ligações de hidrogênio) e lignina (ligações covalentes), a função da hemicelulose é garantir elasticidade, flexibilidade e rigidez ao material vegetal, promovendo uma importante integridade estrutural.

Segundo Gomes (2019), as hemiceluloses são compostas por diferentes unidades de açúcares (formando cadeias ramificadas), sendo estas formadas por glicose; manose e galactose (hexoses); e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais.

Considerando o aspecto estrutural, pode-se afirmar que a hemicelulose é mais semelhante a celulose do que a lignina, no entanto, suas cadeias moleculares são menores e com peso molecular mais baixo (SOUZA, 2016). Diferentemente da celulose, a estrutura das hemiceluloses não contém regiões cristalinas, ou seja, são mais susceptíveis a hidrólise química sobre condições mais brandas (FREITAS, 2011).

3.2.1.3 Lignina

Superada apenas pela celulose, a lignina é a segunda macromolécula mais abundante na superfície terrestre (LIMA, 2018). De acordo com Higuchi (1997), a lignina é um heteropolímero não glucosídico tridimensional formado por monômeros do tipo fenil-propano, dentre os quais, em sua maioria, têm-se os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. Por possuir uma estrutura complexa, de caráter fenólico e reticulada, exerce um papel fundamental para as plantas. Além do suporte mecânico ofertado, a lignina forma uma estrutura rígida capaz de promover força compressiva ao tecido e às fibras individuais das plantas e resistência contra deformação à parede celular (BRAGATTO, 2010; SANTOS, 2017).

Além de papel estrutural, a lignina auxilia no transporte de água, nutrientes e metabólitos, uma vez que torna hidrofóbica a parede celular, ou seja, inibe a absorção de água; desta forma, pode-se considerar que a lignina é uma das responsáveis pela evolução das plantas vasculares. Ademais, a lignina é o componente mais recalcitrante da parede da célula da planta, promovendo resistência biológica contra insetos, patógenos e microrganismos, pois dificulta a penetração das enzimas degradadoras de polissacarídeos (NOVO, 2012; MESCHEDE *et al.*, 2012; TRAVAINI *et al.*, 2016; BRIENZO *et al.*, 2017). Resumidamente, quanto maior for a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química e enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

3.2.1.4 Outros componentes

Juntamente com os principais componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), as espécies vegetais também são constituídas por outros compostos com baixo peso molecular. Sua composição é bastante variável e dependente de fatores como a espécie da planta e a região a qual foi cultivada. Embora representem pequena porcentagem da massa total da parede vegetal, possuem grande influência sobre as propriedades e qualidades da biomassa lignocelulósica, sendo responsáveis por características como cheiro, cor e resistência ao apodrecimento do vegetal (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005; ESTEVES, 2011).

Os constituintes em menor proporção dividem-se em duas classes: a primeira corresponde aos extrativos, que são substâncias secundárias, com baixa massa molecular, solúveis em água e/ou solventes orgânicos ou ainda volatilizados em presença de vapor e são encontrados em baixa quantidade nos materiais lignocelulósicos; e a segunda, denominada de cinzas, é considerada de difícil extração e são representados pelos sais, óxidos de potássio, sódio, cálcio e manganês (ASSUMPCÃO, 2015). Para Lima (2018) os extrativos e cinzas representam entre 5-20% (em massa seca) de todo material lignocelulósico.

3.3 RESÍDUO DE PODA URBANA: PROPRIEDADES E POTENCIAL COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENERGIA

Um importante indicador de desenvolvimento e padrão de vida da sociedade é o consumo energético da localidade. As preocupações ambientais relativas à geração e utilização de energia, bem como a constante redução das reservas fósseis e perspectivas de escassez do abastecimento, maximizam a necessidade de reverter o cenário atual (PEREIRA *et al.*, 2012; POTTMAIER *et al.*, 2012).

Neste contexto de expansão, buscam-se estratégias, preferencialmente sustentáveis, para garantir a renovação da matriz energética brasileira. Considerando que o Brasil abriga inúmeros tipos de fontes primárias de geração de energia elétrica, o País avança sentido a redução das emissões de carbono, quando comparado aos seus pares globais (EDWIGES, 2017).

O futuro dos resíduos de poda urbana como fonte de energia é promissor, especialmente em países emergentes, uma vez que a geração desta biomassa, passível de aproveitamento, é significativa. Segundo Taha *et al.* (2016), o material lignocelulósico representa o maior recurso renovável do mundo, além de ser uma matéria-prima abundante na

natureza e de baixo custo. Estima-se que 50% da biomassa disponível no mundo seja lignocelulósica, o que reforça o seu potencial para desenvolvimento de produtos e tecnologias (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; LIMAYEM; RICKE, 2012).

O aumento da produtividade agroindustrial, consequência da aplicação de novas tecnologias, associado ao crescimento desta atividade, resultam em um acúmulo de resíduos lignocelulósicos. Neste sentido, o interesse na utilização desta biomassa promoveu intenso incentivo no desenvolvimento de bioprocessos capazes de empregar estas fontes como substratos, seja para aproveitamento energético, ou para demais áreas de interesse, como produção de etanol, enzimas, ácidos orgânicos, etc. (SÁNCHEZ, 2009; TAHA *et al.*, 2016).

3.4 PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

No Brasil, durante o período da crise energética na década de 70, a busca por alternativas tecnológicas e sustentáveis para geração de energia e preservação do meio ambiente despertou interesse frente a digestão anaeróbia, especialmente pela sua capacidade de estabilizar matéria orgânica (KIM, 2018). Passadas algumas décadas, a manutenção da produção de energia do país, ainda muito dependente de hidrelétricas - e extremamente suscetível às condições climáticas, foi agravada pela escassez de chuvas na maior parte do Brasil durante o ano de 2021, assim, o cenário de crise energética retomou discussões acerca da diversificação da matriz energética brasileira (ANEEL, 2021).

De acordo com Lima (2018), aspectos como a disponibilidade de energia limpa, a otimização de tecnologias e processos e as crescentes exigências legais e ambientais têm impulsionado o desenvolvimento sustentável dos países. Os sistemas energéticos, baseados em fontes renováveis de energia, contribuem com esse objetivo e cumprem papel fundamental na substituição de petróleo e derivados.

Rabelo (2010) afirma que, dentre estas fontes, o biogás recebe destaque, pois sua captura e combustão são maneiras relativamente simples de reduzir emissões de GEE, disponibilizar um combustível e até mesmo gerar receita adicional por meio dos créditos de carbono, mediante implantação de projetos de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo - MDL.

Perin *et al.* (2020) afirmam que a digestão anaeróbia é uma alternativa ao tratamento dos resíduos orgânicos, uma vez que aproveitar a fração orgânica deste material (cerca de 45% de todos os resíduos gerados no país) para conversão energética corresponde a uma alternativa ambientalmente sustentável, gerando produtos de valor e aumentando a vida útil dos aterros sanitários.

3.4.1 Digestão Anaeróbia

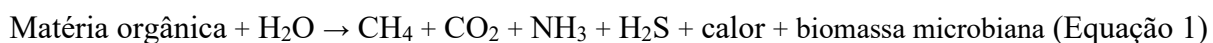
Uma alternativa sustentável para aproveitamento do resíduo lignocelulósico e produção de biogás é a digestão anaeróbia - DA. De acordo com Baêta *et al.* (2016), a celulose e a hemicelulose podem ser convertidas em metano por meio da digestão anaeróbia, gerando energia renovável e aumentando o potencial energético do agronegócio no País.

A DA é um processo biológico em que, na ausência de oxigênio molecular, bactérias facultativas ou estritamente anaeróbias e arqueas atuam na degradação de compostos orgânicos complexos e estes, a partir de uma série de processos oxidativos, por meio da ação combinada de diferentes microrganismos com atividades específicas, são convertidos em substâncias mais simples, como metano, água, produtos inorgânicos (dióxido de carbono) e biofertilizantes (matéria orgânica estabilizada) (PROBIOGÁS, 2016; KADAM; PANWAR, 2017). Desta forma, o produto gerado em uma etapa, torna-se o substrato para a etapa seguinte, resultando em um equilíbrio dinâmico interespecíes (GEHLEN, 2013). Segundo Lima (2018), os principais resultados deste processo são: fração líquida (constituída por biocompostos simples solúveis), fração gasosa (formada pelo biogás, rico em metano) e fração sólida (lodo anaeróbio).

Em geral, o biogás é constituído, basicamente, por metano - CH₄, hidrogênio - H₂, dióxido de carbono - CO₂ e gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio - H₂S e suas concentrações são variáveis. A composição do biogás está relacionada às características do substrato utilizado no processo, do tipo de reator e dos parâmetros operacionais, como tempo de detenção hidráulica, carga orgânica volumétrica, agitação, temperatura, entre outros (OLIVEIRA, 2009).

Segundo Davies e Stulp (2016), ao ser lançado na atmosfera, o CH₄ presente no biogás representa uma ação 20 vezes maior do que o CO₂, em relação à retenção do calor responsável pelo aquecimento do planeta, ou seja, um enorme potencial de poluição no que se refere ao efeito estufa. Porém, quando comparado a outros combustíveis fósseis, sua queima gera menos poluentes atmosféricos por unidade de energia gerada, assim, é considerado um combustível limpo, ambientalmente promissor e tem sido amplamente utilizado para geração de calor, vapor, eletricidade, em equipamentos e aplicação industrial (GEHLEN, 2013; BAÊTA, 2016).

De acordo com Kelleher *et al.* (2002), a DA pode ser representada pela Equação 1:

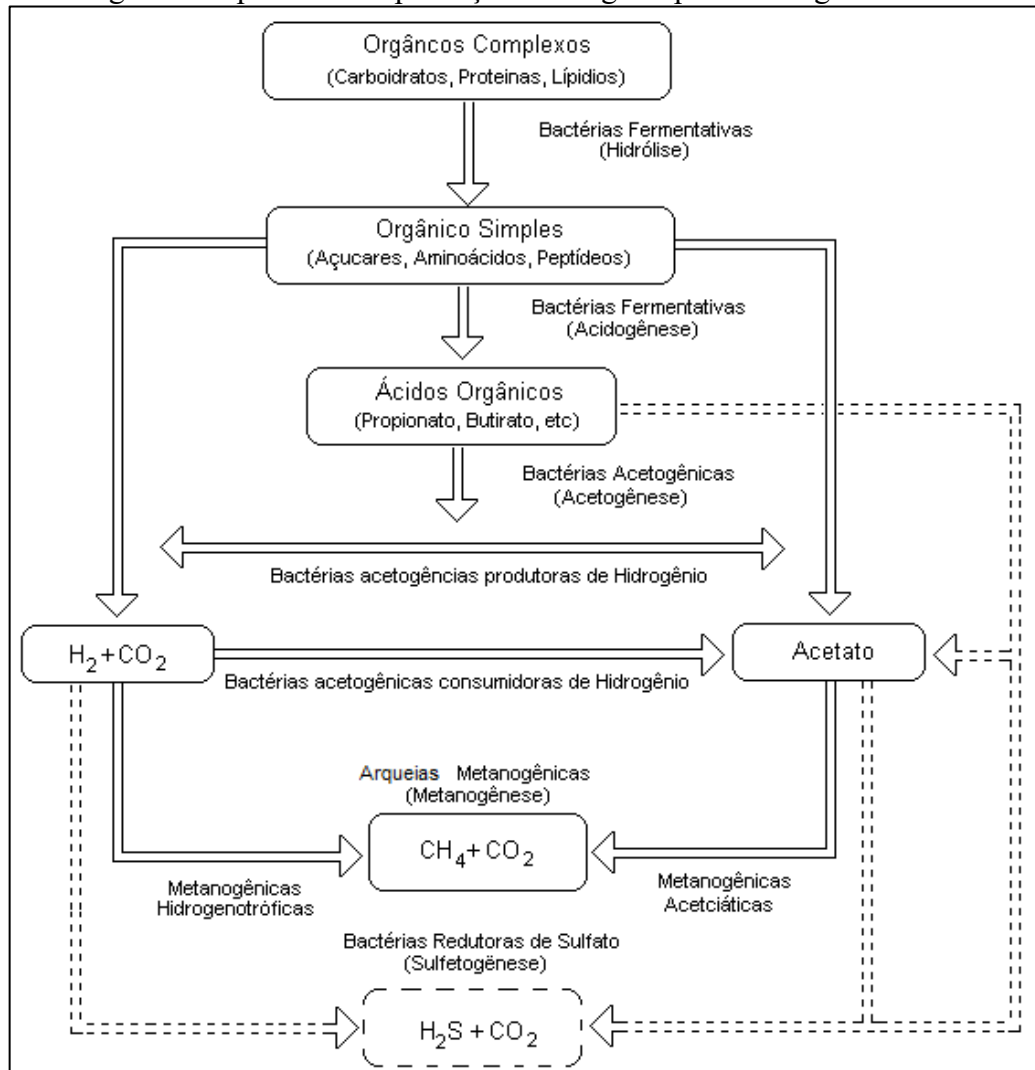


A geração de biogás e, conseqüentemente, produção de metano por meio da digestão anaeróbia, utilizando-se de diferentes substratos, é crescente, especialmente por ser uma

tecnologia considerada ideal em decorrência dos seus benefícios econômicos e ambientais. Outras vantagens oferecidas pelo biogás são apresentadas por Baêta (2016): i) produzido a partir de recursos renováveis, ii) produção independente de fontes externas provenientes do petróleo, iii) contribui com a redução da poluição causada por resíduos orgânicos, responsáveis por grande parte da poluição de água doce e iv) auxilia a atardar os impactos da gestão inadequada de resíduos.

A degradação biológica de compostos orgânicos complexos ocorre em múltiplos estágios bioquímicos consecutivos, cada qual realizado por grupos de microrganismos específicos. Nestas reações em cadeia, são continuamente gerados diversos produtos intermediários que são processados (RAJESHWARI *et al.*, 2000). A digestão anaeróbia compreende inúmeras reações complexas e pode ser sintetizada em quatro etapas principais, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Diagrama do processo de produção de biogás a partir da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Chernicharo (2016)

3.4.1.1 Hidrólise

Na primeira fase do processo de digestão anaeróbia, hidrólise, cadeias orgânicas longas, como proteínas, lipídeos, polímeros a base de açúcares e carboidratos, são transformados em substâncias quimicamente mais simples e solúveis em meio aquoso (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011). Essa ação é realizada por enzimas (ex.: celulases, lipases, amilases) produzidas e excretadas por bactérias pertencentes a gêneros como *Clostridium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Vibrio* e *Bacterioides* (LUCENA, 2008). Trata-se de uma etapa importante no processo, visto que pode ser considerada um fator limitante na degradação anaeróbia. Após a hidrólise, a passagem do substrato para o interior das células dos microrganismos, através da parede celular, será facilitada (LIMA, 2018).

Gomes (2019) afirma que, durante a hidrólise, fibras são convertidas em açúcares redutores e, posteriormente, estes são recuperados para fermentação e continuidade no processo de digestão anaeróbia. Assim, esta etapa é de fundamental importância para a conversão de biomassa lignocelulósica em biogás, uma vez que as arqueas metanogênicas não são capazes de assimilar diretamente as macromoléculas que constituem o complexo lignocelulósico (BAËTA, 2016; LIMA, 2018).

Essa atividade acontece pela ação de exoenzimas excretadas por microrganismos anaeróbios facultativos e/ou estritamente anaeróbios. Ao consumirem grande parte do oxigênio dissolvido presente no sistema, os microrganismos promovem uma redução no potencial redox do meio, garantindo condições ideais para sua atuação (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; GEHLEN, 2013).

3.4.1.2 Acidogênese

A acidogênese ocorre de maneira concomitante à etapa da hidrólise, uma vez que, no interior das células dos microrganismos acidogênicos, as substâncias solúveis, oriundas da etapa de hidrólise, são metabolizadas em compostos mais simples, como ácidos de cadeia curta, moléculas C1-C5 (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, acetato e ácido butírico), álcoois, hidrogênio, óxido de nitrogênio, sulfato de hidrogênio e CO₂. Desta forma, a etapa acidogênica será limitante do processo apenas se o material a ser degradado não for de fácil hidrólise (COSTA *et al.*, 2014; HELENAS, 2019).

Como os ácidos graxos voláteis são os principais produtos dos organismos fermentativos, estes são usualmente designados de bactérias fermentativas acidogênicas

(VICTORINO, 2017). Lucena (2008) apresenta que várias bactérias acidogênicas têm sido encontradas em reatores anaeróbios, como as pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, etc.

3.4.1.3 Acetogênese

Edwiges (2017) apresenta que, na acetogênese, os compostos gerados anteriormente são transformados, a partir de bactérias sintróficas acetogênicas e homoacetogênicas. As primeiras, transformam os ácidos orgânicos em álcoois, hidrogênio, dióxido de carbono e ácido acético, que é o principal substrato dos microrganismos metanogênicos. Desta forma, afirma-se que este estágio é essencial para gerar substrato para a etapa seguinte (GOMES, 2019). Para Baêta *et al.* (2016), cerca de 75% da produção de metano de um reator anaeróbio advém desta rota.

Como as bactérias acetogênicas crescem em relação simbiótica com os microrganismos metanogênicos, podem sobreviver e crescer apenas a partir da energia obtida em concentrações baixas de H₂. Assim, os valores de pressão de hidrogênio, produzidos nesta etapa, são fundamentais para manter o equilíbrio dinâmico entre as etapas de acetogênese e metanogênese (GOMES, 2019).

Se a pressão de hidrogênio aumentar no sistema, a formação de ácido acético pelos microrganismos acetogênicos é comprometida, afetando a produção de CH₄ pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas. Por outro lado, para minimizar o aumento da pressão de hidrogênio, existe a dependência de outra classe de microrganismos metanogênicos, bactérias homoacetogênicas, as quais utilizam CO₂ e H₂ gerados para a produção de ácido acético. Desta forma, o equilíbrio entre as fases de acetogênese e metanogênese é fundamental para a elevada conversão de metano a partir de qualquer fonte de carbono (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; BAÊTA *et al.*, 2016; EDWIGES, 2017; GOMES, 2019).

Lucena (2008) apresenta que a acetogênese inclui membros dos gêneros: *Syntrophomonas*, que utilizam valeriato e butirato como substrato e *Syntrophobacter*, que utilizam propionato como substrato. Já Silva (2009), ressalta a importância que têm as espécies metanogênicas *Methanotherix soehngenii*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanosarcina mazei* em consumir acetato. Relata, ainda, que as espécies *Methanotherix*, apesar de sua afinidade com acetato, predominam em condições de baixa concentração desse substrato, enquanto que *Methanosarcinas* prevalecem a elevadas concentrações.

3.4.1.4 Metanogênese

Esta etapa, responsável pela formação de metano, ocorre em condições estritamente anaeróbias e pode ser realizada por microrganismos metanogênicos acetoclásticos ou hidrogenotróficos. A primeira espécie utiliza como substrato moléculas de acetato para conversão em CH₄ e CO₂, enquanto a segunda espécie converte CO₂ e H₂ em CH₄.

De maneira resumida, a via hidrogenotrófica é desempenhada por microrganismos que reduzem o CO₂ a CH₄, utilizando principalmente o hidrogênio como doador de elétrons, podendo também utilizar o formato e álcoois secundários para essa finalidade (LIU; WHITMAN, 2008). Na via acetoclásticas, o acetato é clivado em um grupo carboxílico que é oxidado a CO₂ e em um grupo metil que é reduzido a CH₄, em duas reações enzimáticas homólogas as duas últimas etapas da via hidrogenotrófica (ALVES, 2018).

Compostos contendo grupos metil, como metilaminas e metanol, também são utilizados pelas arqueas metanogênicas como substratos. Os microrganismos que possuem essa via metabólica são denominados metilotróficos e podem pertencer as seguintes ordens: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* e/ou *Methanomassiliicoccales* (LIU; WHITMAN, 2008; VANWONTERGHEM *et al.*, 2016).

Elevadas taxas de produção de metano são possíveis em condições ideais de crescimento, tanto para os microrganismos acetogênicos, quanto metanogênicos (OLIVEIRA, 2009; ZHENG *et al.*, 2014)

Em geral, considera-se que a etapa da metanogênese é limitante para a taxa de produção de metano, fato este relacionado às baixas taxas de crescimento específico dos microrganismos metanogênicos e a sensibilidade destes a mudanças de temperatura, pH e presença de compostos inibidores (GEHLEN, 2013; BAËTA, 2016).

Deublein e Steinhauser (2011) afirmam que quando a formação de metano ocorre de maneira satisfatória, não há nenhum problema durante a fase acetogênica. Por sua vez, se a formação de metano é desequilibrada, é sinal de superacidificação. De acordo com Oliveira (2009), os microrganismos metanogênicos acetoclásticos utilizam, basicamente, o ácido acético e metanol para a geração de metano e gás carbônico e os metanogênicos hidrogenotróficos utilizam o hidrogênio e dióxido de carbono; estas reações são descritas a seguir e representam, respectivamente, a ação de cada um dos tipos de arqueas mencionados (Equações 2 e 3):



A reação apresentada pela Equação 2 é responsável por, aproximadamente, 70% do metano produzido durante o processo de digestão anaeróbia, em que o grupo metil é reduzido a metano e o grupo carboxílico é oxidado a gás carbônico (OLIVEIRA, 2009).

Costa *et al.* (2014) e Victorino (2017) mencionam que de todo metano produzido, 70% é formado pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas na rota do acetato (pertencem a dois gêneros principais: *Methanosarcina* - formato de cocos e *Methanosaeta* - formato de filamentos) e 30% é formado pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas na rota do H₂/CO₂ (os gêneros mais frequentemente isolados em reatores anaeróbios são *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*).

O processo de DA também pode incluir uma quinta fase, a sulfetogênica, dependendo da presença de sulfato na composição química do substrato e das condições de operação do reator. Nesta etapa, as bactérias sulforedutoras reduzem sulfatos e formam sulfetos, utilizando para suas ações ampla variedade de substratos, incluindo ácidos graxos voláteis, ácidos aromáticos, hidrogênio, metanol, etanol, glicerol, açúcares, aminoácidos e compostos fenólicos. Assim, as bactérias competem com as bactérias fermentativas (hidrolíticas), acetogênicas e metanogênicas pelos substratos disponíveis (CHERNICHARO, 2016).

3.4.2 Fatores que Afetam a Digestão Anaeróbia

Helenas (2019) explica que, por se tratar de um processo biológico, o sucesso da digestão anaeróbia está relacionado com o equilíbrio das reações do processo, de forma a garantir que o consórcio microbiano esteja saudável e o reator estável. Neste sentido, o meio deve possuir condições ideais para que as reações de conversão da matéria orgânica ocorram adequadamente. Estas condições influenciam diretamente na operação e nos resultados obtidos neste tratamento.

Em meio aos fatores existentes, os que podem intervir mais significativamente são: pH, ácidos graxos voláteis - AGV, alcalinidade, teor de sólidos e demanda química de oxigênio - DQO, carga orgânica volumétrica - COV, relação C/N, macro e micronutrientes, temperatura, agitação e tempo de detenção hidráulica - TDH.

3.4.2.1 pH, ácidos graxos voláteis e alcalinidade

Um fator com grande influência sobre o crescimento dos microrganismos em um sistema anaeróbio é a concentração de íons H₃O⁺ no meio. Para Castilhos Junior (2000), o pH

deve ser mantido na faixa de 6 a 8, com valores ótimos entre 7 e 7,2. Gomes (2019) afirma que valores abaixo desta faixa indicam queda de produção de biogás, podendo chegar à paralisação com valores inferiores a 6. O autor afirma ainda que o melhor cenário para conversão de proteínas a aminoácidos ocorre em sistemas cujo pH encontra-se entre 7 e 7,5. Por sua vez, para a conversão de aminoácidos a ácidos, o valor ótimo do pH é, aproximadamente, 6,3.

Controlar o pH no sistema é função da concentração de ácidos voláteis ionizados, da concentração de nitrogênio sob a forma de amônia, do acúmulo de bicarbonato e da fração de gás carbônico (CASTILHOS JUNIOR, 2000). De maneira geral, as bactérias acidogênicas produzem ácidos voláteis a partir do fracionamento da matéria orgânica, promovendo um aumento da acidez do meio e conseqüente redução de pH. Quando as arqueas metanogênicas iniciam sua conversão, transformando ácidos em metano, neutralizam o meio e elevam o pH (PINTO, 1999).

Outro fator atuante sobre o pH do meio, podendo estabilizá-lo, é o bicarbonato, uma vez que a concentração deste íon é diretamente proporcional ao teor de dióxido de carbono e ao pH do sistema. Portanto, se as bactérias acidogênicas são muito rápidas e produzem mais alimento do que as arqueas metanogênicas conseguem converter, o dióxido de carbono é liberado no meio e estará em maior concentração do que o bicarbonato, impedindo a queda acentuada do pH (PINTO, 1999; GOMES, 2019).

Gomes (2019) reforça que se a taxa de hidrólise do processo for mais alta do que a taxa metanogênica e a alcalinidade não for suficientemente elevada, é possível que ocorra o acúmulo de ácidos graxos voláteis e de hidrogênio.

Outros parâmetros relevantes para o monitoramento e estabilidade de reatores anaeróbios são os AGVs e a alcalinidade. Helenas (2019) explica que a acidez, referente a concentração de ácidos no sistema, relaciona-se à capacidade de o processo anaeróbio suportar o aumento do pH com a adição de uma base. Já a alcalinidade total, referente a concentração de álcalis presentes no meio, indica a capacidade de o sistema resistir a queda do pH quando adicionado ácido, ou seja, capacidade média de tamponamento.

Para Metcalf e Eddy (2016), um processo anaeróbio adequado deve apresentar alcalinidade total - AT na faixa de 1000 a 5000 mg L⁻¹ e concentração de ácidos voláteis inferior a 2.000 mg L⁻¹. Além da alcalinidade total, é relevante monitorar os valores da relação entre a alcalinidade intermediária (AI - alcalinidade bicarbonato) e parcial (AP - alcalinidade dos ácidos orgânicos), pois valores de AI/AP superiores a 0,3 apontam distúrbios no processo anaeróbio e possível necessidade de interferências operacionais e/ou medidas corretivas (CHERNICHARO, 2016).

A combinação dos parâmetros AGV e AT também apontam informações sobre a estabilidade do processo. Gueri (2017) explica que tal relação indica, indiretamente, se há acúmulo de ácidos no sistema e se os produtos intermediários do processo estão sendo convertidos em metano. Callaghan *et al.* (2002) apresentam três valores críticos para a relação AGV/AT: menor que 0,4 indica estabilidade do reator; entre 0,4 e 0,8 alguma possível instabilidade e, portanto, necessário redobrar a atenção e acima de 0,8 o sistema apresenta instabilidade significativa.

3.4.2.2 Teor de sólidos e demanda química de oxigênio

A produção de biogás pode ser afetada pela composição do resíduo utilizado no processo; por exemplo, em um substrato facilmente biodegradável, quanto maior for a quantidade de sólidos totais voláteis - STV, sólidos estes que representam o conteúdo orgânico da amostra, maior será a produção de metano. A demanda química de oxigênio - DQO também é um fator diretamente proporcional a produção de biogás (PINTO, 1999).

A eficiência da digestão anaeróbia pode ser quantificada a partir da variação do teor de STV no sistema, uma vez que é possível quantificar a matéria orgânica consumida ao final do tempo de detenção hidráulica. Ou seja, se o STV do afluente não reduzir, quando avaliado o efluente, pode ser um indicativo de que produtos orgânicos estão acumulando e não estão sendo convertidos em biogás. Além disso, a quantidade de microrganismos presentes no inóculo que, em geral, são capazes de converter a matéria orgânica, pode ser estimada pelos STV (HELENAS, 2019; NAVARRO, 2020).

Por sua vez, a DQO refere-se a um parâmetro utilizado para monitoramento da estabilização da matéria orgânica dentro de um reator. Desta forma, quanto maior eficiência de remoção, maior será a degradação do substrato (SGORLON *et al.*, 2011).

Por fim, afirma-se que a quantidade de metano ou biogás produzida em ensaios de bancada pode ser interpretada em função da quantidade de STV ou DQO presentes na mistura de inóculo e substrato (ANGELIDAKI *et al.*, 2009).

3.4.2.3 Carga orgânica volumétrica

Aplicar uma carga orgânica volumétrica - COV adequada ao sistema anaeróbio pode contribuir com um processo estável e um melhor rendimento de biogás. Neste sentido, entende-se por COV a quantidade de STV inserida no reator, por unidade de tempo (dias), considerando

o volume do digestor. Ou seja, é o quociente entre a massa diária de STV no substrato e o volume do reator, determinada pela unidade ($\text{kgSTV m}^{-3}\text{d}^{-1}$) (GUERI, 2017; HELENAS, 2019).

Uma das desvantagens da digestão anaeróbia é sua sensibilidade às variações na biomassa, desta forma, a composição da matéria-prima determinará o nível de atividades bioquímicas que ocorrerão durante o processo e, conseqüentemente, se este será afetado com a sobrecarga ou falta de oferta (RAJAGOPAL; MASSÉ; SINGH, 2013).

A produção de metano tende a aumentar com o aumento da COV, contudo, o equilíbrio do processo também pode ser perturbado. No caso de substratos facilmente biodegradáveis e com baixa capacidade de tamponamento, a alta carga orgânica aplicada poderá levar a formação de AGV, redução de pH e inibição das arqueas metanogênicas (PATINVOH *et al.*, 2017). Resíduos ricos em proteínas possuem alto potencial de produção de metano, no entanto, altas cargas destes materiais estão associadas à instabilidade do processo, decorrente da liberação de nitrogênio amoniacal, causando inibição do processo (SAYARA; SANCHÉZ, 2019).

Outra maneira que pode inibir a atividade microbiana nas fases de fermentação é permitir variações repentinas no tipo de substrato a ser inserido ao reator, assim, torna-se fundamental que o reator seja dimensionado de maneira adequada aos parâmetros de entrada, como o tipo de substrato e a carga orgânica diária de alimentação (HELENAS, 2019). Borth (2021) afirma ainda que a adição diária de um grande volume de um material pode promover inibição dos microrganismos, considerando o aumento na concentração de AGV (valores acima de 2.000 mg L^{-1} são considerados prejudiciais), resultante da elevada taxa de hidrólise/acidogênese em relação à metanogênese. O excesso de AGV relaciona-se com a redução do pH do meio, inibição dos processos e menor conversão em metano.

Portanto, a aplicação de uma COV adequada ao sistema é de extrema importância para o bom funcionamento e desempenho do reator. Desta forma, o estudo dos valores ideais para cada situação é essencial, visto que depende, principalmente, da composição do resíduo e condições operacionais aplicadas (MALINOWSKY, 2016).

3.4.2.4 Relação C/N

A produção de biogás pode ser otimizada com a adição de substratos que possuam uma relação C/N ótima para o processo, justamente por fornecer níveis de nutrientes suficientes e adequados aos microrganismos atuantes no sistema (REILLY; DINSDALE; GUWY, 2015).

Sayara e Sánchez (2019) apresentam que baixos valores da relação C/N são capazes de formar concentrações mais altas de amônia, resultando, eventualmente, em impedimento do

crescimento microbiano. Por sua vez, caso a relação C/N esteja acima do valor ideal durante a fase fermentativa, grandes quantidades de AGV podem ser produzidas.

Yang *et al.* (2015) explicam que esta relação pode variar de acordo com os diferentes substratos passíveis de conversão, no entanto, para que o processo de digestão anaeróbia ocorra de maneira satisfatória, Castilhos Junior (2000) afirma que o ideal é que esta proporção varie entre 20 e 30, pois valores inferiores ou superiores a este intervalo podem proporcionar efeitos significativos no processo de biodigestão anaeróbia.

Um dos métodos mais utilizados para otimizar a relação C/N dos substratos selecionados para geração de biogás é a codigestão anaeróbia. Khalid *et al.* (2011) explicam que a CoDA proporciona maior estabilidade na alimentação do reator, melhorando a relação C/N, reduzindo a concentração de nitrogênio e minimizando problemas com o acúmulo de compostos voláteis e amônia. Assim, “o co-substrato pode fornecer nutrientes que estejam deficientes e, ao mesmo tempo, proporcionar de maneira geral um efeito sinérgico positivo no meio, conduzindo à digestão estável e a melhorias no rendimento de biogás” (SIMÕES, 2017, p. 111).

3.4.2.5 Macro e micronutrientes

Rabelo (2010) explica que os microrganismos necessitam que os substratos utilizados sejam fontes de macro e micronutrientes, como cálcio, magnésio, potássio, sódio, zinco, ferro, cobalto, cobre, molibdênio, níquel e manganês. Porém, quando estes elementos se apresentam em altas concentrações, podem promover um efeito inibidor no processo de conversão. Por sua vez, elementos como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre desempenham importante papel no rendimento dos gases de fermentação.

Como exemplo, tem-se a presença de nutrientes essenciais, como o ferro, e micronutrientes, como o níquel e o cobalto, que possuem efeitos positivos na produtividade de metano. Chen, Steele e Stuckey (2018) afirmam que tanto o níquel, quanto o ferro são essenciais à síntese enzimática durante o crescimento das bactérias e arqueias acetoclásticas. Além disso, o níquel tem importante papel na atividade de coenzimas que participam da conversão do substrato em metano durante a metanogênese. Já o enxofre, se estiver presente em grandes quantidades, pode aumentar a produção de H₂S, afetando a produção do biogás (CORTEZ; LORA, 1997).

Motta (1986) afirma que, na fermentação, pequenas quantidades de determinados íons, como o K⁺, Na⁺, Ca²⁺, amônia iônica NH₄⁺, Mg²⁺ e S²⁻ promovem o estímulo ao metabolismo

celular, da mesma forma que, quando presentes em concentrações maiores, manifestam propriedades inibidoras. O fenômeno da inibição ainda é bastante discutido; Motta (1986) afirma que em maiores concentrações, os íons atravessam a delicada membrana celular e podem interferir no mecanismo biológico da célula.

A Tabela 1 indica as concentrações de estímulo e inibição de cada um dos principais íons durante o processo de digestão anaeróbia.

Tabela 1 - Substâncias e concentrações estimulantes e inibidoras na digestão anaeróbia

Substância	Concentração estimulante (mg L ⁻¹)	Concentração moderadamente inibidora (mg L ⁻¹)	Concentração fortemente inibidora (mg L ⁻¹)	Principais microrganismos afetados
Cálcio	100-200	2.500-4.500	8000	-
Cobalto	-	0,6-7	-	-
Cobre	0,03-2,4	0,5-1,0	0,7-350	culturas acidogênicas
	0,03-2,4	1-10	1-175	culturas acetogênicas e metanogênicas
Cromo trivalente	0,01-15	-	2,0 (solúvel)	-
			180-420 (total)	-
Cromo hexavalente	0,01-15	-	3,0 (solúvel)	-
			200-250 (total)	-
Magnésio	75-150	1.000-1.500	3000	-
Manganês	-	50-100	-	-
Molibdênio	< 0,05	500	-	-
Níquel	0,03-27	0,1-0,5	100-1.300	culturas acidogênicas
	0,03-27	0,1-0,5	7,3-270	culturas acetogênicas e metanogênicas
Nitrogênio	5-200	1.500-3.000	3000	-
Potássio	200-400	2.500-4.500	12.000	-
Selênio	-	5	0,038-0,14	-
Sódio	100-200	3.500-5.500	8000	-
Sulfeto	-	< 200	200	-
	0,03-2	3,5-20	3,4-1.500	culturas acidogênicas
Zinco	0,03-2	1-5	1-1.600	culturas acetogênicas e metanogênicas

Fonte: Adaptado de Hendriks, Van Lier e Kreuk (2018), Helenas (2019), Deodato (2019) e Borth (2021)

Conforme exposto, estes elementos podem ocasionar estímulos positivos, se presentes em concentrações adequadas, ou acarretar toxicidade e/ou inibição, caso estejam em concentrações acima dos valores apresentados.

3.4.2.6 Temperatura

A atividade enzimática dos microrganismos, especialmente as bactérias, depende rigorosamente da temperatura, uma vez que alterações muito repentinas são capazes de promover desequilíbrio no sistema, principalmente nas bactérias formadoras de metano (RABELO, 2010).

É possível classificar as arqueas metanogênicas em função da sua temperatura de desenvolvimento. De acordo com Pinto (1999) e Oliveira (2009), os microrganismos

psicrofílicos atuam em uma faixa inferior a 20 °C e são pouco capazes de produzir biogás; os microrganismos mesofílicos operam em temperaturas situadas na faixa de 20 a 40 °C e, por se tratar de uma temperatura operacional mais confiável, não necessitam de um controle rigoroso, além de o processo de digestão e gaseificação ser altamente acelerado; e os microrganismos termofílicos atuam a uma faixa acima de 40 °C, possuem maiores taxas de conversão e menor tempo de residência do resíduo no digestor, porém, custos operacionais mais altos.

Para Chernicharo (2016), os processos biológicos podem ser afetados pela temperatura de duas maneiras: i) influenciando as velocidades de reações enzimáticas; e ii) influenciando as transferências de massa. Assim, a hidrólise pode ser afetada diretamente por este parâmetro, visto que a velocidade global da reação do processo de degradação anaeróbia poderá ser restringida caso haja redução na atividade enzimática, uma vez que a hidrólise é a etapa inicial e responsável por disponibilizar o substrato para as demais etapas (CHERNICHARO, 2016).

3.4.2.7 Agitação

O objetivo da agitação é promover maior contato do substrato com os microrganismos presentes no meio, de forma a distribuir homogeneamente o calor na biomassa, dar maior uniformidade aos produtos intermediários e finais da digestão anaeróbia e assegurar que não haja formação de uma crosta/espuma na parte superior do efluente, capaz de obstruir o reator (PINTO, 1999).

Souza *et al.* (2008) afirmam que a agitação é capaz de promover um aumento significativo na produção volumétrica de metano, pois a falta de agitação permite a formação de microbolhas de gases, especialmente CO₂, capaz de aprisionar grande número de bactérias, impedindo que as mesmas atuem na conversão dos compostos orgânicos presentes no sistema.

3.4.2.8 Tempo de detenção hidráulica

Tempo de Detenção Hidráulica – TDH refere-se ao tempo que o material permanece no interior do biodigestor, ou seja, período de tempo entre a entrada do afluente e saída do efluente. Este tempo de retenção varia de 4 a 60 dias, dependendo do tipo de substrato utilizado para a alimentação do reator e do próprio modelo utilizado (OLIVEIRA, 2009).

O TDH é determinado pela relação entre o volume do reator e o volume diário de carga introduzida no sistema, ou seja, quantidade de matéria orgânica adicionada. Afirma-se que o

TDH é o tempo necessário para que a mistura seja digerida e para que ocorra a maior e melhor produção de biogás durante o processo de digestão anaeróbia.

De maneira geral, o TDH varia em função do tipo de resíduo a valorizar, do tipo de reator e das condições de reação. Para reatores anaeróbios do tipo CSTR, o tempo de detenção hidráulico mínimo é, em média, entre 15 e 20 dias. Já os biodigestores em fase sólida são mais comuns com operação em batelada, assim, neste modelo de reator o tempo de digestão varia entre 2 a 4 semanas. Quando considerado condições de operação, a temperatura, o teor de sólidos e a agitação do digestor anaeróbio são os parâmetros que mais afetam o TRH. Os reatores que funcionam em regime mesofílico, por exemplo, possuem TDHs (10-40 dias) superiores aos reatores que funcionam em regime termofílico (CARRILHO, 2012; KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019).

Rabelo (2010) explica que o tempo de detenção hidráulica influencia diretamente no rendimento do reator, uma vez que a retirada precoce do substrato pode promover ineficiência do processo, pela não utilização de todo o potencial da matéria orgânica do meio, e a retirada tardia do substrato pode significar perda de tempo e uso ineficiente do digestor.

3.5 CODIGESTÃO ANAERÓBIA: UMA ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAR O PROCESSO

A digestão anaeróbia é uma realidade para o tratamento de resíduos orgânicos, porém as características de alguns materiais dificultam o bom funcionamento do biodigestor, para tal, a codigestão anaeróbia é uma opção para ultrapassar os inconvenientes da digestão e melhorar a viabilidade econômica do processo (MALINOWSKY, 2016).

A CoDA é um método utilizado para otimizar o rendimento da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos através da mistura de diferentes substratos, estabelecendo um equilíbrio nutricional entre eles. Esta estratégia pode se dar pela diluição do resíduo, a mistura com outro substrato ou ambos. A determinação da proporção ideal entre os substratos beneficia as características de funcionamento do biodigestor, melhora a relação C/N, diminui a concentração de nitrogênio e resultam em maior rendimento de biogás (BORTH, 2021).

Estudos sobre a digestão anaeróbia de resíduos alimentares demonstram a dificuldade de manutenção de um processo estável, principalmente por estes apresentarem baixa relação C/N e elevado teor de matéria orgânica rapidamente biodegradável, que podem causar a acidificação do sistema pelo acúmulo de AGV e consequente inibição da metanogênese (HELENAS, 2019). Muitos são os benefícios da codigestão anaeróbia de resíduos alimentares, como a diluição de potenciais compostos tóxicos, ajuste do teor de umidade e pH, fornecimento

de alcalinidade, ampliação da diversidade de microrganismos no processo, entre outros (DAVID *et al.*, 2018). Borth (2021) afirma que a CoDA de resíduos alimentares com materiais lignocelulósicos pode otimizar o processo, visto que o equilíbrio destes resíduos é capaz de melhorar algumas características da mistura e favorecer o desempenho do tratamento biológico.

3.6 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

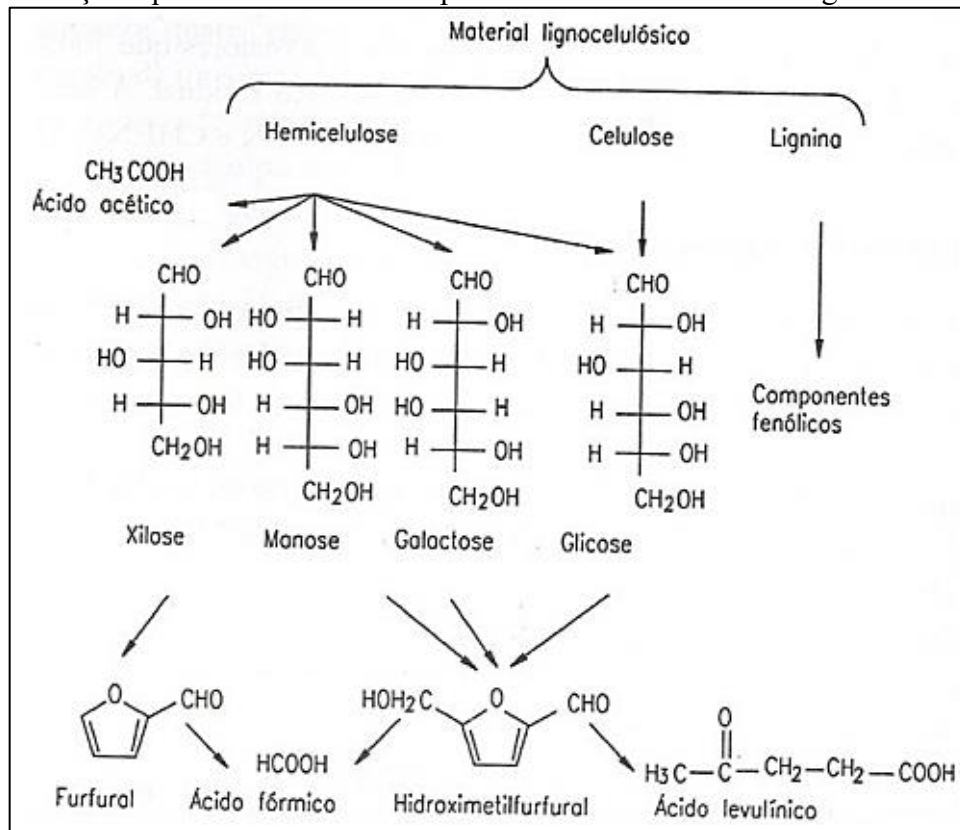
O pré-tratamento do material lignocelulósico tem como objetivo reduzir a recalitrância da biomassa, a partir da alteração das características estruturais da parede celular, visando a acessibilidade e susceptibilidade da fração celulósica a ação das enzimas na etapa de hidrólise (PIETROBON, 2008).

Patinvoh *et al.* (2017) citam alguns pontos que devem ser considerados ao selecionar possíveis tecnologias de pré-tratamento, são eles: i) custo e efetividade; ii) acessibilidade microbiana aos nutrientes; iii) possíveis inibições na produção de biogás; iv) requisitos de energia e; v) tecnologias verdes ou *eco-friendly*. Além disso, importante reforçar que, para atingir a máxima produtividade de bioenergia, o método e as melhores condições de pré-tratamento devem ser escolhidos, ponderando também, o tipo de biomassa, a sua composição e qual o produto desejado (COSTA *et al.*, 2014).

Além de romper ou modificar o complexo lignocelulósico, os pré-tratamentos visam diminuir o teor de lignina e/ou hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose, diminuir o tamanho das partículas e aumentar a área superficial e porosidade da biomassa, facilitando a acessibilidade dos microrganismos à fração polissacarídica (AGBOR *et al.*, 2011; ROSSI, 2015).

Busca-se também minimizar a formação de substâncias inibidoras às enzimas e aos microrganismos, uma vez que na etapa de pré-tratamento, especialmente durante a desestruturação da fibra lignocelulósica, são formados subprodutos da degradação capazes de apresentar efeitos inibidores nas fases da digestão anaeróbia e reduzir a produção de metano (SARKAR *et al.*, 2012; BAËTA *et al.*, 2016). Santos (2017) afirma que a composição e concentração destes subprodutos variam conforme o tipo e condições de pré-tratamento realizado. Gomes (2019) cita alguns exemplos desses inibidores: lignina e seus componentes fenólicos, 2-furfuraldeído (degradação de pentoses) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (5-HMF) (degradação de hexoses) e diferentes ácidos orgânicos como acético, fórmico, urônico, levulínico, vanílico e outros (Figura 3).

Figura 3 - Reações que ocorrem durante o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos



Fonte: Lora e Venturini (2012)

Os furanos apresentam mecanismos capazes de inibir o processo anaeróbio, afetando a integridade e fluidez da membrana plasmática dos microrganismos, o que também é possível de ser causado pelos compostos fenólicos. Os inibidores de menor peso molecular e de maior hidrofobicidade são aqueles que apresentam maior toxicidade, o que ocorre em razão de sua maior facilidade de se permeabilizar pela membrana plasmática e atingir o citoplasma (SILVÉRIO, 2017). Assim, estes compostos limitam a produção de bioenergia, uma vez que são tóxicos a alguns grupos microbianos responsáveis pelo processo de biodegradação da biomassa lignocelulósica.

Para que um pré-tratamento seja considerado eficaz, deve disponibilizar quantidade suficiente de açúcares fermentescíveis, evitando a degradação de carboidratos e a formação de subprodutos inibidores, além de ser viável economicamente (CHEMMÉS *et al.*, 2013; ROSSI, 2015). Ou seja, de maneira resumida, independentemente do tipo de pré-tratamento escolhido, inúmeros fatores devem ser ponderados para sua aplicação: baixo consumo de produtos químicos e energia, menor custo operacional, baixo investimento, pequena produção de resíduos, reagentes químicos não corrosivos para minimizar custos de manutenção com o reator, altos rendimentos de produtos - como biogás e metano, facilidade de recuperação da lignina e

outros constituintes - visando sua aplicação para geração de coprodutos com maior valor agregado, entre outros (GALBE; ZACCHI, 2010; CANILHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2015).

Neste sentido, desenvolver e estudar novos pré-tratamentos estão em constante avanço, principalmente no que se refere a aplicação destes em conversões energéticas de biomassa (GALBE; ZACCHI, 2010). Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados como físicos, químicos, biológicos ou a combinação destes e a escolha da tecnologia a ser aplicada está essencialmente relacionada ao material lignocelulósico em questão e ao produto de interesse (RIBEIRO, 2016).

3.6.1 Pré-tratamento Químico Ácido

O pré-tratamento ácido é uma tecnologia bastante eficaz para substratos com alto teor de lignina, uma vez que além de decompor a lignina, a hemicelulose é hidrolisada em monossacarídeos (SOUSA *et al.*, 2009; SALIHU; ALAM, 2016). No entanto, segundo Jain *et al.* (2015), quando este pré-tratamento é realizado com ácidos fortes, pode haver a produção de subprodutos inibitórios, como furfural e hidroximetilfurfural, assim, o uso de ácidos diluídos combinados com métodos térmicos é uma opção para evitar a formação de tais produtos (MUSSOLINE *et al.*, 2013).

Os tratamentos termoquímicos, ou seja, metodologias que envolvem o uso de reagentes químicos e variação de temperatura, são tecnologias amplamente estudadas, haja vista seu potencial de aumentar a acessibilidade enzimática aos açúcares da biomassa (WON; KIM; OH, 2012). Nestes casos, a presença de um ácido como catalisador da reação torna as ligações glicosídicas entre os monômeros da celulose susceptíveis à hidrólise. Costa (2013) afirma que nos pré-tratamentos ácidos, a solução pode ser concentrada (> 10%) ou diluída (0,1 a 10%). Em geral, quando o pré-tratamento de resíduo lignocelulósico é realizado com ácido concentrado, os mais comuns são H₂SO₄ e HCl, com concentração entre 30 e 70% e temperaturas na ordem de 40 °C. Por sua vez, para os pré-tratamentos com ácidos diluídos, normalmente é utilizado soluções com concentrações que variam entre 0,1 e 10% e temperatura entre 100 e 160 °C, empregando H₂SO₄, HCl, H₃PO₄ e HNO₃ (COSTA, 2013).

Desta forma, o uso de ácidos em pré-tratamentos permite a conversão da celulose e hemicelulose em glicose e xilose e/ou arabinose, respectivamente (WHITE; YOHANNAN; WALKER, 2008; GURGEL, 2010).

3.6.2 Pré-tratamento Químico Alcalino

O objetivo do pré-tratamento alcalino é aumentar a quantidade de partículas sólidas e, conseqüentemente, aumentar a área de superfície do substrato, tornando-o mais acessível às atividades microbianas (MODENBACH; NOKES, 2012). Regauskas *et al.* (2014) afirmam que os tratamentos que envolvem altos valores de pH são capazes de remover grande parte da lignina e uma menor quantidade de hemicelulose.

Entre os pré-tratamentos químicos, o alcalino tem sido amplamente utilizado em materiais lignocelulósicos com alto teor de lignina, especialmente por reduzir o grau de inibição da fermentação do metano, fornecer menor custo de produção e não demandar elevadas temperaturas em sua aplicação (RABELO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). Porém, embora o uso de hidróxido de sódio seja o mais comumente relatado para o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos, o descarte de efluentes de sistemas de digestão anaeróbia contendo Na^+ pode levar a impactos ambientais negativos, como salinização do solo e poluição da água (ZHENG *et al.*, 2014).

Oliveira (2010) apresenta que neste tipo de pré-tratamento, é necessária a aplicação de condições de reação mais severas, como concentração de álcali $> 10\%$ e temperaturas acima de $150\text{ }^\circ\text{C}$. Costa (2013) afirma que a maioria dos pré-tratamentos alcalinos utilizam como catalisador o NaOH, KOH, H_2O_2 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaO_2 .

As principais reações envolvidas no processo de pré-tratamento alcalino são a quebra das ligações glicosídicas e a dissolução das ligações éster da parede celular, promovendo mudanças na estrutura da biomassa e redução na cristalinidade da celulose (ZHANG; ZANG, 2016).

3.6.3 Pré-tratamento Físico

Um dos principais métodos de pré-tratamento físico empregado em materiais lignocelulósicos destinados à produção de biocombustíveis é a moagem, que tem como principal objetivo aumentar a área acessível do material e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade das partículas. A redução do material em dimensões entre 0,2 e 2 mm pode promover o aumento do rendimento da hidrólise total e, conseqüentemente, diminuir o tempo de digestão (COSTA, 2013).

Ainda, diferentes técnicas de pré-tratamento físico utilizando variação de temperaturas têm sido estudadas e empregadas em resíduos lignocelulósicos para melhorar a taxa de hidrólise

na digestão anaeróbia da matéria-prima. Destaca-se que na literatura inúmeros termos são utilizados para este tipo de processo, sendo os mais comuns: auto-hidrólise, liquefação aquosa, extração aquosa, pré-tratamento aquoso, hidrotérmólise, pré-tratamento hidrotérmico e cozimento em água sob pressão (FREITAS, 2011).

Trata-se de um processo em que o material lignocelulósico é exposto ao vapor d'água saturado, em um reator sob determinada pressão, por certo período de tempo, seguido por uma descompressão brusca. As moléculas de vapor d'água, com condições de pressão e temperatura específicas, penetram na parede celular recalcitrante por difusão e quando ocorre a evaporação repentina da umidade condensada, proveniente da liberação brusca de pressão, há a separação mecânica das fibras. No momento da explosão, é gerada uma força de cisalhamento capaz de quebrar as ligações químicas que mantêm os componentes da biomassa unidos, separando seus principais constituintes e aumentando sua vulnerabilidade à bioconversão (PITARELO, 2013; WANG, 2015).

O principal efeito dos tratamentos hidrotérmicos sobre resíduos lignocelulósicos é a hidrólise parcial da hemicelulose, clivagem e desestruturação da celulose e a despolimerização da lignina e remoção de extrativos (PIERRE *et al.*, 2011; RUIZ; THOMSEN; TRAJANO, 2017). Dentre as vantagens do uso desta tecnologia estão: menos onerosa quando comparada à outras técnicas, não demandam a aquisição de produtos químicos e a formação de inibidores durante o pré-tratamento com água quente líquida é relativamente baixo (LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2019).

3.6.4 Pré-tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico refere-se à despolimerização da biomassa lignocelulósica por enzimas produzidas por microrganismos, aumentando a acessibilidade de açúcares para a etapa de hidrólise (SINGH *et al.*, 2008). Como a hidrólise de compostos complexos é a primeira etapa da digestão anaeróbia, todo o processo será potencializado em função da reação prévia causada pela degradação biológica, ou seja, a digestão anaeróbia começará antes e mais rapidamente. Desta forma, a hidrólise deixa de ser uma etapa longa e limitante para o processo (PÉREZ-CHÁVEZ; MAYER; ALBERTO, 2019).

Mesmo necessitando de monitoramento constante dos parâmetros relativos às necessidades do agente biológico aplicado no processo, o pré-tratamento biológico é mais seguro do ponto de vista ambiental quando comparado aos métodos físicos e químicos, uma vez que requer menor entrada de energia e consumo de produtos químicos, além de ser

conduzido em condições ambientais mais brandas, como temperatura, pressão e pH, gerando poucos inibidores que afetam negativamente a digestão anaeróbia (ZHENG *et al.*, 2014).

Várias são as vantagens da aplicação desta tecnologia de pré-tratamento, no entanto, alguns desafios são encontrados antes de serem implementados em escala comercial: longo tempo de pré-tratamento, competição por carboidratos pelos microrganismos durante o pré-tratamento e produção de biogás a jusante e aumento de custo do investimento relativo a possível necessidade de processos de esterilização. Por outro lado, há o aumento da acessibilidade da celulose após a aplicação deste método, o que pode contribuir com a produção de biogás. Assim, um dos principais objetivos do pré-tratamento biológico é minimizar a perda de carboidratos e maximizar a remoção de lignina para matérias-primas de alta digestibilidade (MUSTAFA; POULSEN; SHENG, 2016).

Os organismos predominantemente responsáveis pela degradação de complexos lignocelulósicos são os fungos e, especificamente no grupo dos basidiomicetos lignocelulolíticos, encontram-se organismos capazes de degradar componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, os quais servem como fonte de energia para seu crescimento e reprodução (KIRK; FARRELL, 1987).

Sánchez (2009) explica que a degradação fúngica pode ocorrer de forma intracelular ou extracelular, quando as moléculas a serem degradadas são insolúveis ou muito grandes (como é o caso da lignina, celulose e hemicelulose). Hoje, os fungos de podridão branca são reconhecidos como os mais eficientes na degradação de substratos lignocelulósicos, principalmente pela sua forte atuação enzimática, uma vez que promovem a desestruturação da parede celular e expõem a celulose e hemicelulose - que ficam disponíveis para digestão (ROUCHES *et al.*, 2016).

Inúmeras enzimas estão relacionadas à biodegradação de substratos lignocelulósicos, desta forma, o sistema lignolítico é composto, principalmente, pelas enzimas manganês peroxidases - MnP, as ligninas peroxidases - LiP e as lacases - Lac. Todas são comumente produzidas por fungos de podridão branca, mas existem espécies de fungos que são eficientes degradadores de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas (GILL; ARORA, 2003). Min *et al.* (2001) afirmam que as Lac e MnP catalisam a formação de radicais intermediários da lignina de alto peso molecular, porém, são capazes de oxidar apenas componentes fenólicos de lignina. Por sua vez, as LiP são bastante eficazes tanto na oxidação de compostos fenólicos, quanto de não fenólicos. De um modo geral, ordena-se, em ordem crescente, as enzimas do complexo ligninolítico de acordo com seus potenciais de oxidação em: LiP, MnP e Lac (KIRK; CULLEN, 1998).

Especificamente sobre as lacases, referem-se à polifenol oxidases produzidas por muitos fungos, particularmente aqueles que degradam lignina. A lacase recebeu o número de classificação *EC 1.10.3.2 p-diphenol di-oxigênio oxidoreductase*. Segundo Rezende (2002), esta oxidase pode ser produzida por ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos. Entretanto, ela é particularmente abundante na última classe. Devido ao seu potencial oxidativo, estas enzimas catalisam a oxidação de um grande número de substâncias, entre elas os compostos aromáticos, o que tem despertado a atenção de pesquisadores para o emprego das lacases em diferentes processos industriais. Entre os compostos oxidados pelas lacases, destaca-se a lignina - foco do pré-tratamento biológico (REZENDE, 2002).

Wan e Li (2012) explicam que a boa eficiência do pré-tratamento biológico está relacionada a determinados fatores que capazes de afetar o crescimento e o metabolismo fúngico, como é o caso do teor de umidade, tempo e temperatura de incubação.

O teor de umidade é um fator crucial para o crescimento dos fungos, já que quando está abaixo do nível necessário, resulta em solubilidade limitada de nutrientes, dificultando a absorção eficiente destes pelos fungos, e quando o nível de umidade é demasiadamente alto, limita a circulação de oxigênio no meio e aumenta o risco de contaminação a partir do crescimento desfavorável de outros microrganismos (SARKAR *et al.*, 2012). Lu (2007) indica que a faixa ótima de umidade para deslignificação do substrato varia de 70 a 80%.

Xu *et al.* (2017) explicam que se o objetivo do pré-tratamento biológico for a alta degradação de lignina, o período de incubação e a temperatura podem influenciar na taxa de deslignificação. O tempo de incubação varia de semanas a meses, dependendo do crescimento do fungo e da recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Já para a temperatura, os fungos de podridão branca não suportam condições termofílicas, pois são mesofílicos, crescendo entre 15 e 35 °C, com alta taxa de deslignificação entre 25 e 30 °C (YOON *et al.*, 2014).

Vários tipos de fungos, como ascomicetos e de podridão branca, já foram investigados em diferentes biomassas lignocelulósicas para degradação dos componentes estruturais, porém, este primeiro grupo é mais conhecido por degradar celulose e hemicelulose, com pouca capacidade de degradar lignina, enquanto os fungos de podridão branca podem degradar celulose, hemicelulose e lignina em taxas iguais (MUSTAFA; POULSEN; SHENG, 2016).

Pleurotus spp. é o terceiro gênero de cogumelo mais cultivado no mundo e é conhecido por apresentar alto valor nutricional. Esses fungos são capazes de colonizar e degradar uma enorme variedade de resíduos lignocelulósicos, com período de cultivo menor do que outros cogumelos comestíveis (ISIKHUEMHEN; MIKIASHVILLI, 2009).

A maioria dos fungos da podridão branca (por exemplo, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Trametes versicolor*, etc.), decompõem simultaneamente a lignina e a holocelulose (celulose e hemicelulose), resultando em baixa recuperação de celulose, enquanto algumas espécies desintegram, preferencialmente, a lignina e parte da hemicelulose, deixando um resíduo rico em celulose, como é o caso do *Pleurotus ostreatus*, que desintegra seletivamente a lignina com resíduo de celulose muito alto (KAINTHOLA *et al.*, 2019).

Taniguchi *et al.* (2005), ao avaliarem os efeitos do pré-tratamento biológico em resíduo lignocelulósico com quatro cepas diferentes de fungos da podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus ostreatus*), consideraram o *Pleurotus ostreatus* o fungo de maior sucesso, uma vez que foi capaz de decompor seletivamente a fração de lignina.

Mustafa, Poulsen e Sheng (2016) pré-trataram palha de arroz com dois tipos de fungos (*Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma reesei*) e o primeiro apresentou melhores resultados de decomposição seletiva de lignina e hemicelulose, resultando em um aumento de 120% no rendimento de metano em comparação com a palha de arroz não tratada. Ainda, Mustafa *et al.* (2017), ao avaliarem o pré-tratamento da palha de arroz por diferentes combinações de métodos físicos (moagem) e biológicos (incubação com *Pleurotus ostreatus*) para melhorar sua biodegradabilidade e produção de biogás durante a digestão anaeróbia em estado sólido, obtiveram como resultado que, em comparação com a palha de arroz não tratada, a combinação de pré-tratamento fúngico e moagem aumentou o rendimento de metano em 165%.

Mediante inúmeras vantagens, muitos estudos envolvendo o uso de técnicas de pré-tratamento vêm sendo conduzidos para produção de biogás a partir de resíduos lignocelulósicos por meio da digestão anaeróbia, assim, a Tabela 2, a seguir, apresenta uma breve revisão da literatura sobre o assunto.

Tabela 2 - Estudos envolvendo a produção de metano a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas

Tipo de pré-tratamento	Biomassa lignocelulósica	Condições do pré-tratamento	Principais resultados	Referências
Químico Alcalino (NaOH)	Silagem de grama seca, sorgo e palha de trigo, hastes de girassol	* Concentração: 0,5% - 10% * Temperatura: 20 - 150 °C * Tempo: 3 - 48 horas	* Deslignificação variando de 23,3% a 36,3% * Melhora na produção de metano de 10 a 44% * Melhoria na estabilidade do processo	Xie <i>et al.</i> , 2011; Sambusiti <i>et al.</i> , 2012; Sambusiti <i>et al.</i> , 2013; Monlau <i>et al.</i> , 2013
Químico Ácido (H ₂ SO ₄)	Bagaço de cana, silagem de capim, palha de trigo	* Concentração: 0,1% - 9% * Temperatura: 120 - 135 °C * Tempo: 15 - 120 minutos	* Aumento na concentração de açúcares * Redução das concentrações de lignina, celulose e hemicelulose * Redução no consumo de energia e no tempo do processo anaeróbio * Aumento de até 20% no rendimento de metano	Moraes; Broetto, 2012; Shultz <i>et al.</i> , 2014; Taherdanak; Zilouei; Karimi, 2016; Deng <i>et al.</i> , 2019
Físico (Auto-hidrólise)	Palha de trigo, palha de arroz, talos de girassol, bagaço de cana, cavaco de madeira de Eucalipto, gramíneas, resíduos sólidos urbanos	* Temperatura: 100 - 252°C * Pressão: 0,1 - 3 MPa * Tempo: 5 - 120 minutos	* Aumento na concentração de açúcares * Eficiência de deslignificação * Aumento entre 7 e 220% no rendimento de metano	Longue Junior; Colodette, 2011 Chandra, Takeuchi, Hasegawa, 2012a; Chandra, Takeuchi, Hasegawa, 2012b; O-Thong <i>et al.</i> , 2012; Leitão <i>et al.</i> , 2016;
Biológico (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	Palha de arroz, resíduos sólidos urbanos, palha de feijão	* Temperatura: 28 - 30 °C * Tempo: 7 - 28 dias	* Redução das concentrações de lignina, celulose e hemicelulose * Aumento de até 165% no rendimento de metano	Mustafa <i>et al.</i> , 2017; Gomes <i>et al.</i> , 2020

Fonte: A autora (2023)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Tratamento de Águas e Resíduos – LabTAR, vinculado ao Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo – CTU da Universidade Estadual de Londrina - UEL, localizada na cidade de Londrina - PR.

4.1 ETAPAS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi dividido em quatro etapas experimentais, conforme fluxograma representado pela Figura 4:

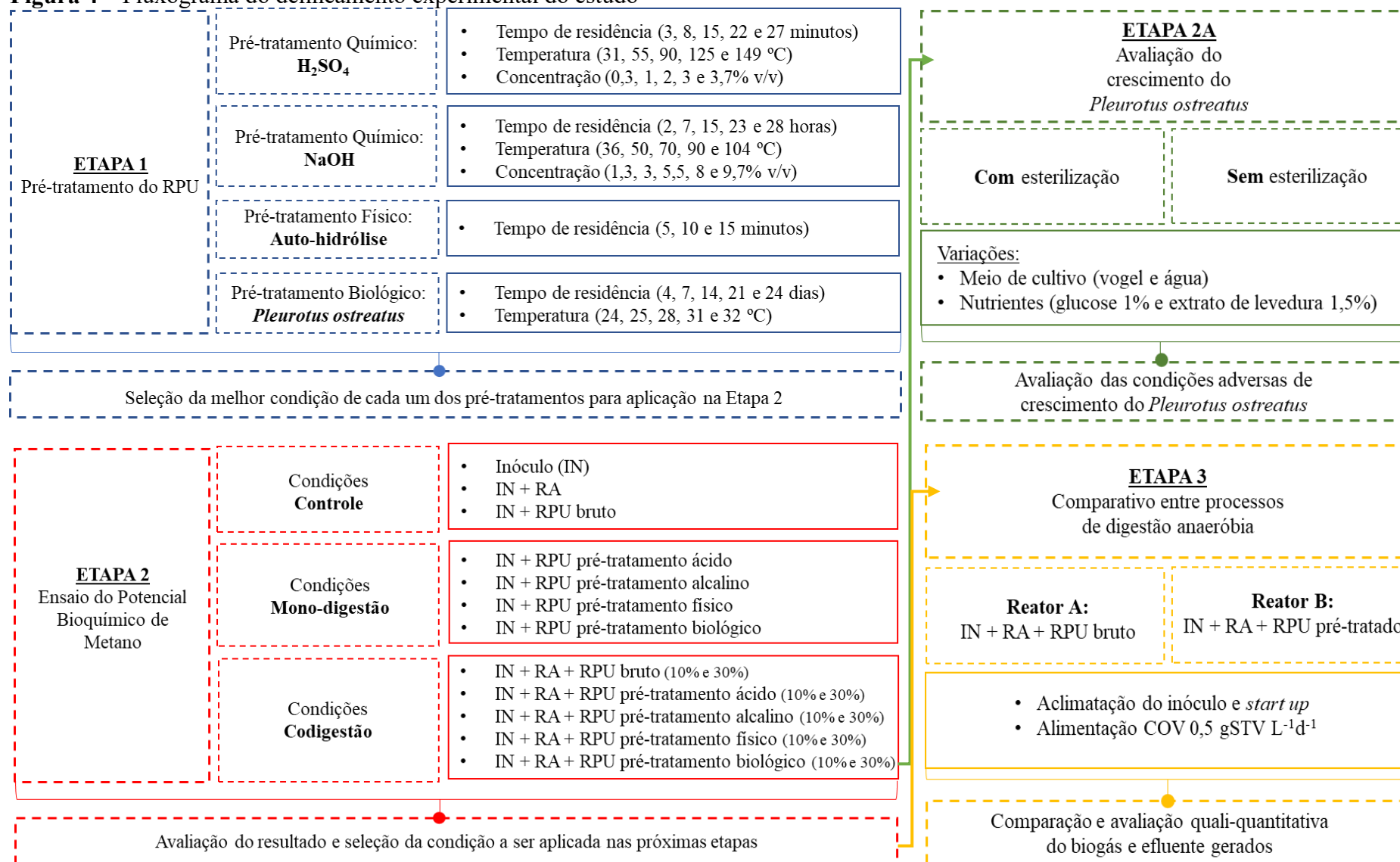
Etapa 1 - Pré-tratamento do Resíduo de Poda Urbana - RPU: Primeira fase do experimento, em que quatro tipos de pré-tratamentos (químico com ácido sulfúrico, químico com hidróxido de sódio, físico por auto-hidrólise e biológico com *Pleurotus ostreatus*) foram aplicados no RPU, variando-se os fatores tempo de residência, temperatura e concentração, com objetivo de conversão da estrutura lignocelulósica do material.

Etapa 2 - Ensaio do Potencial Bioquímico de Metano - BMP: A partir das melhores condições experimentais da Etapa 1, esta etapa teve como finalidade a avaliação da produção específica de metano da codigestão anaeróbia de resíduos alimentares - RA e RPU pré-tratado, bem como da mono-digestão anaeróbia de RPU pré-tratado, em escala de bancada, variando-se o percentual de RPU pré-tratado adicionado em função do RA.

Etapa 2A - Avaliação do crescimento do *Pleurotus ostreatus*: Após seleção do pré-tratamento biológico como foco do estudo, avaliou-se condições adversas de crescimento do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, variando-se os fatores esterilização, solução umedecedora e nutrientes, com o objetivo de inferir diferentes possibilidades de desenvolvimento do fungo.

Etapa 3 - Comparativo entre processos de digestão anaeróbia: Esta etapa teve como finalidade a comparação e avaliação quali-quantitativa do biogás e efluente gerados em dois reatores em escala piloto, sendo: Reator A (Inóculo + RA + RPU bruto) e Reator B (Inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente).

Figura 4 – Fluxograma do delineamento experimental do estudo



Fonte: A autora (2023)

4.2 RESÍDUOS UTILIZADOS

O resíduo alimentar utilizado para este estudo refere-se ao resíduo proveniente do restaurante industrial de uma Cooperativa Agroindustrial da cidade de Londrina. O resíduo é composto, basicamente, de sobras limpas (alimento de preparo que não foi distribuído) e sobras sujas (alimento oferecido no balcão de distribuição e que não pode ser reutilizado e os restos de alimentos deixados nas bandejas dos consumidores).

Já o resíduo de poda urbana, é composto por grama, folhas e galhos (Figura 5).

Figura 5 - Materiais que compõem o resíduo de poda urbana



Fonte: A autora (2023)

Segundo os dados disponibilizados pela administração do setor de jardinagem da universidade, o campus possui, aproximadamente, 900.000 m² de área verde. Por não possuir um quadro grande de funcionários para a capina dos gramados e corte dos galhos e folhas das árvores, estes são realizados conforme a demanda e disponibilidade de mão-de-obra. Além disso, nem todo o material cortado é recolhido; parte permanece no próprio local de apara, parte é destinada a um espaço específico para esta finalidade, dentro da própria universidade, e os galhos grandes/largos e toras de madeira são destinados a Fazenda Escola da UEL. A destinação deste material, na maioria das vezes, se dá em áreas não utilizadas do campus, onde o material fica disposto até sua decomposição. De acordo com Bortoloti (2021), a geração de resíduos de corte de grama no campus - somente na área que recebe o serviço de jardinagem (122.200 m²), aproxima-se de 0,29 kg m⁻², em massa. Já para os resíduos de podas de árvores (folhas e galho), estima-se que a geração gire entre 96 e 120 m³ ano⁻¹.

4.3 COLETA E PREPARO DOS SUBSTRATOS

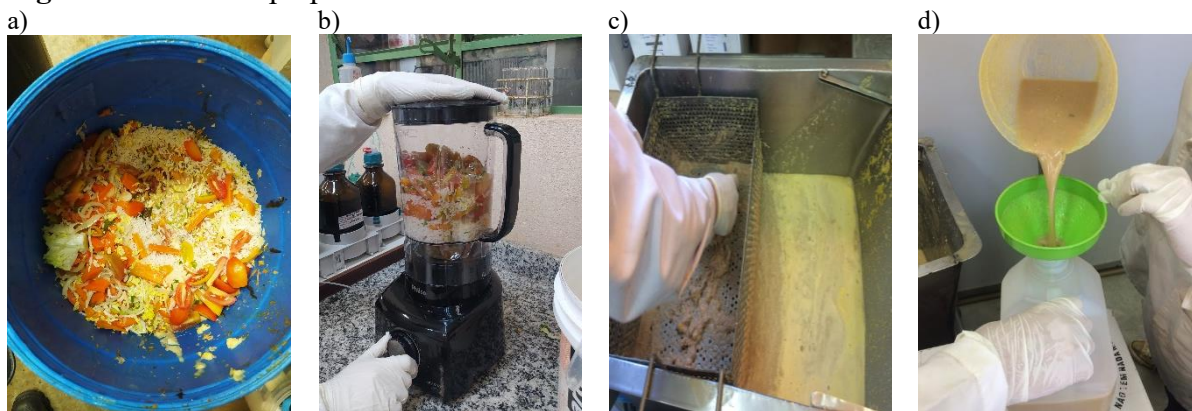
Como substrato, coletou-se uma bombona de 50 L - separada pelos funcionários da Cooperativa - contendo os resíduos alimentares provenientes do restaurante da empresa. A

bombona era preenchida durante 2 ou 3 dias e armazenada sem refrigeração em local específico até sua coleta.

O cardápio do RA utilizado na Etapa 2 continha arroz branco, feijão, bisteca suína, macarrão ao molho vermelho, mandioca, cenoura refogada, salada de alface e tomate e melão (talos de cebola, alho, folhas de alface, cascas de melão, cascas de cenoura, talos de salsinha e cebolinha), por sua vez, o cardápio utilizado na Etapa 3 possuía arroz branco, feijão, coxa e sobrecoxa assada, macarrão alho e olho, salada de repolho e tomate e laranja (talos de cebola, alho, folhas de repolho, cascas de laranja, talos de salsinha e cebolinha) (Figura 6-a).

No laboratório, com o auxílio de água, o substrato foi triturado em liquidificador doméstico com intuito de promover a uniformização do tamanho dos resíduos particulados (Figura 6-b), peneirados em peneira com abertura de 5 mm (Figura 6-c), armazenados em galões plásticos de 5 L (Figura 6-d) e conservado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização (Figura 6). Importante destacar que a quantidade de água utilizada para tritura do RA foi mínima, apenas para facilitar a moagem do material, não afetando a caracterização real do substrato.

Figura 6 – Coleta e preparo do resíduo alimentar



Fonte: A autora (2023)

Todo o resíduo de poda urbana utilizado como substrato neste experimento foi coletado uma única vez, logo após o corte, por todo o campus universitário. Coletou-se grama, folhas e galhos (secos e verdes). Considerando a coleta de resíduos na universidade, a proporção em peso de cada um dos materiais para a composição da poda urbana é de 47,2% para grama, 26,3% para folhas e 26,5% para galhos, sendo que destes, 14,9% referem-se a galhos secos e 11,6% galhos verdes. Os materiais foram mantidos em local coberto por 48h para secagem natural e, posteriormente, foram triturados com auxílio de um moinho de facas, com tamanho médio da malha de 1,19 mm. A Figura 7 mostra o processo de secagem natural do substrato (Figura 7-a), a trituração do resíduo (Figura 7-b) e o RPU pronto para uso (Figura 7-c).

Figura 7 - Preparo do resíduo de poda urbana

Fonte: A autora (2023)

4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1

Considerando que, em geral, a presença da lignina na estrutura dos resíduos lignocelulósicos promove certa rigidez e resistência, dificultando a degradação dos polímeros celulose e hemicelulose, foram desenvolvidos quatro tipos de pré-tratamentos (químico ácido e alcalino, físico por auto-hidrólise e biológico com basidiomiceto) para facilitar o acesso e a digestibilidade enzimática e microbiológica da poda urbana e selecionar a melhor condição experimental para aplicação na digestão e codigestão anaeróbia com resíduos alimentares.

Para esta etapa experimental, foram avaliados os teores de lignina, celulose e hemicelulose antes e depois dos pré-tratamentos nos RPU bruto e pré-tratados, bem como a composição de açúcares totais e redutores nestes. Especificamente para o pré-tratamento biológico, avaliou-se também a atividade de lacase da fração líquida pós-tratamento do RPU.

Os fatores escolhidos para este estudo foram selecionados com base em trabalhos referentes a pré-tratamentos já publicados na literatura. Escolheu-se, portanto, uma faixa - ampla e condizente com os tratamentos - de concentrações, tempo de residência e temperaturas para avaliação (LONGUE JUNIOR; COLODETTE, 2011; XIE *et al.*, 2011; SAMBUSITI *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014; MUSTAFA *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2019).

4.4.1 Pré-tratamentos Químicos: Ácido e Alcalino

Foram avaliadas por Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR as variáveis tempo de residência, temperatura e concentração de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio para o desenvolvimento dos pré-tratamentos químicos. O DCCR requereu 18 experimentos, sendo

8 ensaios fatoriais, 6 axiais e 4 centrais. A Tabela 3 especifica os ensaios realizados no pré-tratamento químico com ácido sulfúrico e a Tabela 4 os ensaios do pré-tratamento químico com hidróxido de sódio.

Tabela 3 - DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento ácido de poda urbana

Ensaio	Variáveis Codificadas			Planejamento Experimental		
				Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Concentração (% v/v)
1	-1,0	-1,0	-1,0	8	55	1,0
2	1,0	-1,0	-1,0	22	55	1,0
3	-1,0	1,0	-1,0	8	125	1,0
4	1,0	1,0	-1,0	22	125	1,0
5	-1,0	-1,0	1,0	8	55	3,0
6	1,0	-1,0	1,0	22	55	3,0
7	-1,0	1,0	1,0	8	125	3,0
8	1,0	1,0	1,0	22	125	3,0
9	-1,682	0,0	0,0	3	90	2,0
10	1,682	0,0	0,0	27	90	2,0
11	0,0	-1,682	0,0	15	31	2,0
12	0,0	1,682	0,0	15	149	2,0
13	0,0	0,0	-1,682	15	90	0,3
14	0,0	0,0	1,682	15	90	3,7
15	0,0	0,0	0,0	15	90	2,0
16	0,0	0,0	0,0	15	90	2,0
17	0,0	0,0	0,0	15	90	2,0
18	0,0	0,0	0,0	15	90	2,0

Fonte: A autora (2023)

Tabela 4 - DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento alcalino de poda urbana

Ensaio	Variáveis Codificadas			Planejamento Experimental		
				Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração (% v/v)
1	-1,0	-1,0	-1,0	7	50	3,0
2	1,0	-1,0	-1,0	23	50	3,0
3	-1,0	1,0	-1,0	7	90	3,0
4	1,0	1,0	-1,0	23	90	3,0
5	-1,0	-1,0	1,0	7	50	8,0
6	1,0	-1,0	1,0	23	50	8,0
7	-1,0	1,0	1,0	7	90	8,0
8	1,0	1,0	1,0	23	90	8,0
9	-1,682	0,0	0,0	2	70	5,5
10	1,682	0,0	0,0	28	70	5,5
11	0,0	-1,682	0,0	15	36	5,5
12	0,0	1,682	0,0	15	104	5,5
13	0,0	0,0	-1,682	15	70	1,3
14	0,0	0,0	1,682	15	70	9,7
15	0,0	0,0	0,0	15	70	5,5
16	0,0	0,0	0,0	15	70	5,5
17	0,0	0,0	0,0	15	70	5,5
18	0,0	0,0	0,0	15	70	5,5

Fonte: A autora (2023)

Em frascos de borossilicato com capacidade total de 310 mL, contendo 100 mL de solução água deionizada/ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio nas concentrações predefinidas (v/v) (Tabela 3 e Tabela 4), adicionou-se 10 g de resíduo de poda urbana triturada (suspensão com 8,06% de ST). Em seguida, os frascos foram submetidos às temperaturas e tempos de residência descritos. Ao término do processo, as amostras contidas nos frascos foram peneiradas, obtendo-se duas frações: a sólida e a líquida. A fração sólida foi lavada com água corrente para a neutralização do pH, seca em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C por 24h e armazenadas em potes plásticos para posterior utilização. Por sua vez, a fração líquida foi armazenada a -10 °C até a sua utilização.

4.4.2 Pré-tratamento Físico: Auto-hidrólise

Em frascos de borossilicato de 310 mL contendo 100 mL de água deionizada, adicionou-se 10 g de resíduo de poda urbana triturada (suspensão com 8,06% de ST) e, em seguida, os frascos foram fechados e autoclavados. Fixou-se a temperatura da autoclave em 121 °C e a pressão em 1 atm, variando apenas os tempos de residência em 5, 10 e 15 minutos. Ao término do processo, as amostras contidas nos frascos foram filtradas e separadas em fase sólida e líquida. A fração sólida foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C por 24h e armazenadas em potes plásticos para posterior utilização e a fração líquida foi armazenada a -10 °C até a sua utilização.

4.4.3 Pré-tratamento Biológico: Basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*

As variáveis tempo de incubação (4, 7, 14, 21 e 24 dias) e temperatura (24, 25, 28, 31 e 32 °C) foram avaliadas utilizando Delineamento Composto Central Rotacional com 4 pontos fatoriais, 4 axiais e 4 centrais, totalizando 12 ensaios (Tabela 5).

Tabela 5 - DCCR aplicado à otimização do pré-tratamento biológico de poda urbana

Ensaio	Variáveis codificadas		Planejamento Experimental	
			Tempo (d)	Temperatura (°C)
1	-1,0	-1,0	7	25
2	1,0	-1,0	21	25
3	-1,0	1,0	7	31
4	1,0	1,0	21	31
5	-1,414	0,0	4	28
6	1,414	0,0	24	28
7	0,0	-1,414	14	24

8	0,0	1,414	14	32
9	0,0	0,0	14	28
10	0,0	0,0	14	28
11	0,0	0,0	14	28
12	0,0	0,0	14	28

Fonte: A autora (2023)

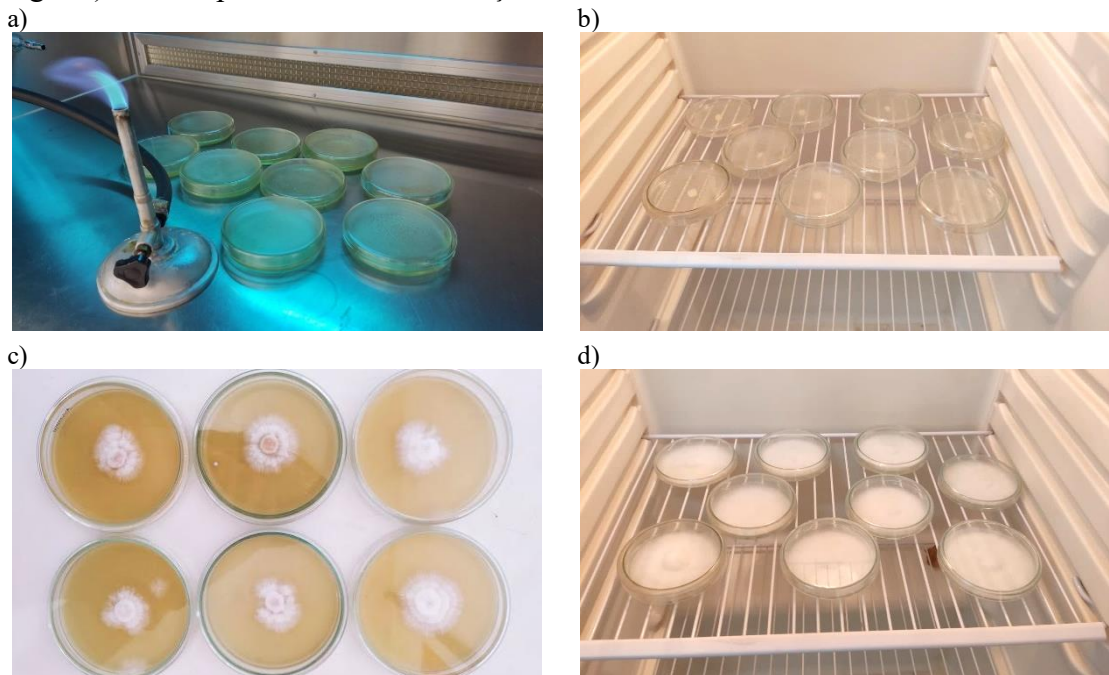
4.4.3.1 Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, cedido pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. O mesmo foi mantido em tubos de ensaio, contendo meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar - BDA, inclinados a 4 ± 2 °C e repicados trimestralmente.

4.4.3.2 Preparo do inóculo e cultivo

O inóculo foi desenvolvido em placas de Petri contendo meio sólido de BDA e as placas foram incubadas durante 15 dias a 28 °C (Figura 8).

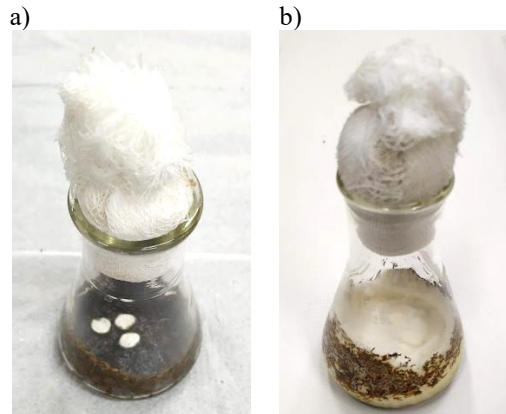
Figura 8 – Processo de preparo do inóculo: a) Solidificação do meio BDA nas placas de petri; b) Placas inoculadas com plugs contendo hifas fúngicas; c) Processo de crescimento do fungo; d) Placas após 15 dias de incubação



Fonte: A autora (2023)

Os tratamentos consistiam de três esferas de 0,7 cm de diâmetro, retiradas de placas distintas contendo hifas homogeneamente distribuídas do respectivo microrganismo, as quais foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL, contendo 3,5 g de poda urbana e 20 mL de solução umedecedora, composta por meio Vogel e água deionizada, acrescido de 1% (p/v) de glucose e 1,5% (p/v) de extrato de levedura, previamente autoclavados (Figura 9).

Figura 9 – Inoculação do RPU para pré-tratamento biológico: a) Adição das hifas fúngicas no RPU; b) Final do pré-tratamento biológico: *Pleurotus ostreatus* em todo RPU



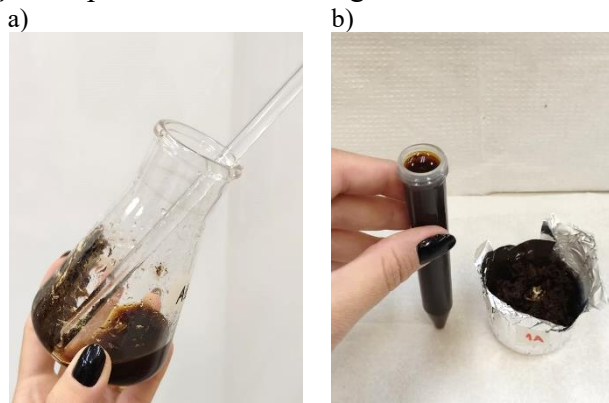
Fonte: A autora (2023)

Os Erlenmeyers inoculados foram incubados nos tempos de incubação e temperaturas estabelecidos para este pré-tratamento (Tabela 5).

4.4.3.3 Interrupção do pré-tratamento

Após decorrido o tempo pré-estabelecido, adicionou-se 15 mL de água deionizada em cada Erlenmeyer e, com um bastão de vidro, homogeneizou-se o material (Figura 10-a) e, com uma peneira, separou-se o RPU pré-tratado (Figura 10-b) da fração líquida (Figura 10).

Figura 10 – Interrupção do pré-tratamento biológico



Fonte: A autora (2023)

Mediu-se o pH da fração líquida após sua centrifugação por 15 minutos a 1600 rpm e armazenou-se a -10 °C até a sua utilização. A fração sólida foi seca em estufa a 70 °C por 48h e armazenadas em potes plásticos para posterior utilização. O peso seco do MSF foi determinado pesando-se este depois da secagem em estufa.

4.4.3.4 Determinação da atividade de lacase

O ensaio enzimático foi desenvolvido segundo Barbosa *et al.* (1996), com volume final de 1 mL contendo 150 µL de 2,6-dimetoxifenol 10 mM (DMP), 150 µL de tampão MacIlvaine (pH 5), extrato enzimático (0,5 mL) e 200 mL água deionizada. O ensaio foi incubado durante 5 minutos em banho-maria termostaticado a 50°C e as leituras foram realizadas a 468 nm ($\epsilon = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A unidade de atividade da lacase é definida como a quantidade de enzima que oxida µmoles de DMP por mL min⁻¹.

4.4.4 Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Lignina, Balanço de Massa, Rendimento e Deslignificação

O método de determinação dos componentes fibrosos dos resíduos lignocelulósicos proposto por Van Soest (1964) é fundamentado na utilização de detergentes, reagentes específicos, para separação das diferentes frações constituintes do material. A partir de uma amostra, a matéria seca é dividida em conteúdo celular (fração solúvel da célula vegetal) e parede celular (fração insolúvel).

Nesta metodologia, são medidas as frações da fibra que são insolúveis em detergentes neutros - FDN ou em detergentes ácidos - FDA e, após o tratamento da fração, o resíduo é digerido com ácido sulfúrico e o resultado é considerado como lignina em detergente ácido - LDA. Calcula-se por diferença a hemicelulose (FDN – FDA) e celulose (FDA – LDA) (HINDRICHSEN *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2021).

Diversos métodos alternativos a este foram desenvolvidos visando a simplificação analítica dos procedimentos originais, assim, neste trabalho utilizou-se a metodologia proposta por Farias *et al.* (2015), que compararam equipamentos e tecidos alternativos na determinação de FDN e FDA com o método convencional. Utilizou-se, portanto, tecido não tecido - TNT e a autoclave para determinação dos teores de FDN e FDA.

O RPU foi seco e triturado. Os saquinhos de tecido TNT com gramatura de 100 g m⁻² foram confeccionados manualmente, com dimensões 5,0 cm x 5,0 cm. Em seguida, foram

acondicionadas 0,7 g de RPU por saquinho e este foi selado. O preparo dos detergentes para determinação de FDN e FDA foi realizado segundo metodologia de Van Soest (1964).

Os saquinhos foram colocados na autoclave, em solução de FDN e/ou FDA, em meio fechado sob aquecimento (105 °C) por 60 minutos. Depois de retirados da solução, os saquinhos foram enxaguados e dispostos em uma bandeja para secagem em estufa de ar forçado a 60 °C por 24 horas. Posteriormente, foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados para determinação do teor de FDN e FDA (Equação 4).

$$\text{FDN ou FDA (\%)} = \frac{(\text{peso saquinho+resíduo})-(\text{peso saquinho vazio})}{\text{peso da amostra (em matéria seca)}} * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Para análise de lignina (Equação 5) os saquinhos foram mergulhados em solução de ácido sulfúrico 72% por 3 horas, mexendo-se a cada 30 minutos e, decorrido o tempo, os saquinhos foram enxaguados, secos em estufa de ar forçado a 60 °C e pesados.

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{(\text{peso saquinho+resíduo})-(\text{peso das cinzas})}{\text{peso da amostra (em matéria seca)}} * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Por fim, este material foi disposto em cadinhos previamente calcinados e pesados e colocados em mufla a 500 ° C e por 4 horas. Mantidos em repouso até atingir a temperatura ambiente, os cadinhos foram pesados para determinação do teor de cinzas.

i) Balanço de Massa

O balanço de massa foi calculado por meio da Equação 6.

$$\text{Balanço de massa (\%)} = \text{TC t} + \text{TH t} + \text{TL t} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

TC t = teor de celulose total (%);

TH t = teor de hemiceluloses total (%);

TL t = teor de lignina total (%).

ii) Rendimento

O cálculo de rendimento do processo de pré-tratamento foi calculado em relação à massa final do RPU após o pré-tratamento (base seca) e a massa inicial do RPU bruto, conforme Equação 7.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{M_f}{M_i} * 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

M_f = massa final (g) obtida após o pré-tratamento;

M_i = massa inicial (g) antes do pré-tratamento.

iii) Deslignificação

As amostras pré-tratadas foram submetidas a análise do teor de lignina e a extensão de deslignificação foi determinada pelo emprego da Equação 8.

$$\text{Deslignificação (\%)} = \frac{(L_b - [(L_{pt} + R/100)])}{L_b} * 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

L_b = teor de lignina do resíduo bruto (%);

L_{pt} = teor de lignina do resíduo pré-tratado (%);

R = rendimento (%).

4.4.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Para a avaliação das melhores condições de cada um dos pré-tratamentos realizados no RPU, a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR foi útil na investigação qualitativa das alterações sofridas pela biomassa com a solubilização e/ou remoção da lignina e hemicelulose. Os grupos funcionais existentes no RPU foram identificados visando melhor análise das modificações do resíduo quando submetido aos pré-tratamentos.

As análises foram realizadas na UEL em um Espectrofotômetro Frontier FTIR (PerkinElmer, EUA), com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 *scans*, na faixa de análise de 650 a 4000 cm⁻¹. Para a obtenção dos espectros, uma pequena fração de cada amostra triturada foi posicionada na superfície do cristal de ZnSe com diamante e foi aplicado um torque correspondente a 100 N com o braço articulado. O comando para leitura com o laser na região do infravermelho foi dado através do computador acoplado ao equipamento.

4.5 ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2

Com os resultados dos pré-tratamentos do RPU obtidos na Etapa 1, realizou-se o Ensaio do Potencial Bioquímico de Metano - Ensaio BMP. O ensaio para avaliação do potencial bioquímico de metano gerado foi desenvolvido a partir da metodologia adaptada do teste *Biochemical Methane Potential*, originalmente proposto por Owen *et al.* (1979) e aperfeiçoado por Chynoweth *et al.* (1993), Hansen *et al.* (2004), Raposo *et al.* (2011), Strömberg, Nistor e Liu (2014) e Holliger *et al.* (2016).

O inóculo utilizado nesta etapa refere-se ao efluente de um reator anaeróbico em escala piloto, com volume total de 500 L, temperatura mesofílica de 37 °C, em operação, que trata os resíduos alimentares provenientes do restaurante universitário da UEL em regime semi-contínuo. Este foi coletado e mantido em repouso por 10 dias para desgaseificação e consumo da matéria orgânica remanescente (Figura 11).

Figura 11 – Coleta e preparo do inóculo



Fonte: A autora (2023)

Com o objetivo de identificar a melhor condição experimental, foram avaliados, em triplicata, as seguintes situações: a) condições de controle; b) condições de mono-digestão (inóculo e RPU pré-tratado) e; c) condições de codigestão anaeróbia (inóculo + RA + RPU pré-tratado), todos com a proporção padrão de inóculo:substrato - I:S de 1 (CHYNOWETH *et al.*, 1993). Com base nos dados e resultados obtidos nos trabalhos de Malinowsky (2016), Magalhães (2018) e Borth (2021), testou-se a substituição de 10% e 30% da massa de STV do RA por RPU nas condições de CoDA.

Foram desenvolvidos, no total, 17 tratamentos, conforme apresenta a Tabela 6.

Tabela 6 – Situações, tratamentos e substratos utilizados no ensaio de BMP

Situações	Tratamento	Substratos
Condições Controle	A1	Inóculo
	A2	Inóculo + RA
	A3	Inóculo + RPU bruto
Condições de Mono-digestão anaeróbia	B1	Inóculo + RPU tratamento ácido
	B2	Inóculo + RPU tratamento alcalino
	B3	Inóculo + RPU tratamento biológico
	B4	Inóculo + RPU tratamento auto-hidrólise
Condições de Codigestão anaeróbia	C1	Inóculo + RA + RPU bruto 10*
	C2	Inóculo + RA + RPU bruto 30**
	C3	Inóculo + RA + RPU tratamento ácido 10*
	C4	Inóculo + RA + RPU tratamento ácido 30**
	C5	Inóculo + RA + RPU tratamento alcalino 10*
	C6	Inóculo + RA + RPU tratamento alcalino 30**
	C7	Inóculo + RA + RPU tratamento biológico 10*
	C8	Inóculo + RA + RPU tratamento biológico 30**
	C9	Inóculo + RA + RPU tratamento auto-hidrólise 10*
	C10	Inóculo + RA + RPU tratamento auto-hidrólise 30**

* Substituição de 10% do teor de STV do RA por RPU pré-tratado.

** Substituição de 30% do teor de STV do RA por RPU pré-tratado.

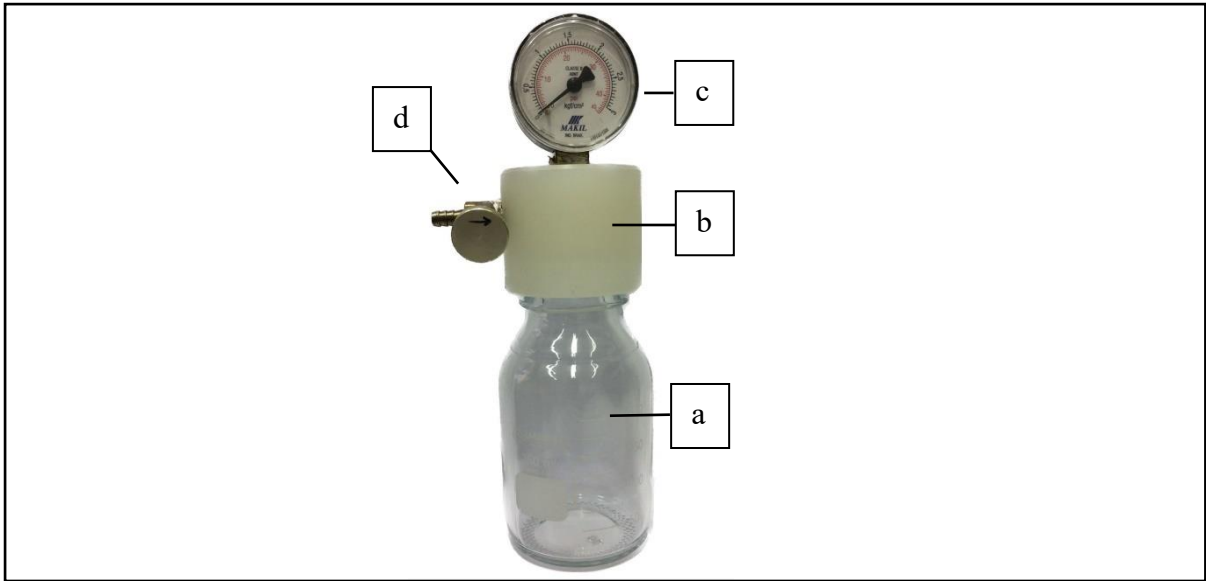
Fonte: A autora (2023)

O Tratamento A1 foi realizado para subtração da produção deste nos demais tratamentos. Por sua vez, os Tratamentos A2 e A3 foram realizados para considerações iniciais acerca dos substratos RA e RPU bruto.

O Ensaio BMP foi conduzido em batelada e os frascos foram mantidos em câmara incubadora de agitação orbital (Nova Técnica - Shaker NT714), na ausência de luz, com temperatura mesofílica de 37 ± 1 °C (Norma VDI 4630/2006) e agitação controlada de 120 rpm.

4.5.1 Aparato Experimental

Para condução do experimento, foram utilizados frascos de borossilicato (Figura 12-a) com capacidade volumétrica total de 310 mL e útil de 120 mL, com tampas de nylon tecnil (Figura 12-b) adaptadas com duas saídas. Em uma das saídas foi acoplado um manômetro (Figura 12-c), com leitura máxima de 3 kgf cm^{-2} (escala de $0,05 \text{ kgf cm}^{-2}$), para medição da produção volumétrica de biogás a partir da pressão interna, e em outra saída foi adaptada uma válvula agulha de latão (Figura 12-d), usada para a purga e análise qualitativa do biogás gerado durante o processo de digestão anaeróbia (Figura 12).

Figura 12 – Reator utilizado para o Ensaio BMP

Fonte: A autora (2023)

4.5.2 Análise Quantitativa do Biogás

A pressão interna dos reatores foi monitorada diariamente por meio dos manômetros acoplados em suas tampas e, posteriormente, o gás produzido foi convertido em termos de volume de biogás gerado entre o dia atual da medição e o dia anterior (Equação 9), com base na Lei dos Gases Ideias, segundo Clapeyron (MACIEL; JUCÁ, 2011; LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011).

$$V_{\text{BIOGÁS}} = \frac{\text{PF} * V_{\text{UF}} * C}{R * \text{TF}} * 1000 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

$V_{\text{BIOGÁS}}$ = biogás gerado entre o dia atual da medição e o anterior (mL);

PF = pressão interna do frasco (mbar);

V_{UF} = volume útil do frasco ocupado pelo gás, *headspace* (L);

C = volume molar (22,41 L mol⁻¹);

R = constante universal dos gases (83,14 L mbar mol⁻¹K⁻¹);

TF = temperatura do frasco (K).

Por sua vez, o volume acumulado de biogás durante o experimento foi obtido a partir da Equação 10.

$$V_{\text{ACUM}} = V_{\text{BIOGÁS}} + V_{\text{ACUM } 1} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

$V_{\text{BIOGÁS}}$ = obtido na Equação 1 (mL);

$V_{\text{ACUM 1}}$ = refere-se ao volume acumulado do dia anterior (mL).

Strömberg, Nistor e Liu (2014) afirmam que caso o vapor da água presente no biogás não seja considerado nos cálculos, o volume produzido nas Condições Normais de Temperatura e Pressão – CNTP poderá ser superestimado em 2 a 8%. Neste sentido, a Equação 11 é utilizada para estimar a pressão de vapor da água presente em testes de digestão anaeróbia conduzidos nas mesmas condições do presente trabalho (0,6 a 1,1 bar e temperatura entre 10°C a 40°C).

$$P_W = 10^{\frac{8,1962 - \frac{1730,63}{T_{\text{GÁS}} - 39,724}}{}} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:

P_W = pressão do vapor d'água (mbar);

$T_{\text{GÁS}}$ = temperatura do gás (K).

O volume final de biogás produzido foi ajustado segundo a CNTP, utilizando a pressão atmosférica local fornecida pela Estação Agrometeorológica do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR de Londrina, conforme a Equação 12.

$$V_{\text{CNTP}} = V_{\text{ACUM}} * \frac{(P_{\text{ATM}} - P_W)}{P_{\text{CNTP}}} * \frac{T_{\text{CNTP}}}{T_F} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde:

V_{CNTP} = volume de biogás acumulado no período ajustado às CNTP (NmL);

V_{ACUM} = volume de biogás acumulado no período (mL);

T_{CNTP} = temperatura normal (273,15 K);

T_F = temperatura do frasco no ambiente de incubação (K);

P_{ATM} = Pressão atmosférica local (Londrina) no dia da medição (mbar);

P_W = Pressão do vapor da água (62,6 mbar);

A produção específica de metano, referente a produção volumétrica deste em relação à massa de STV adicionada no reator, foi calculada a partir da Equação 13 (ANGELIDAKI *et al.*, 2009; LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011).

$$PEM = \left(\frac{V_{\text{CNTP}}}{m_{\text{STV}_{\text{adic.}}}} \right) \quad (\text{Equação 13})$$

Onde:

PEM = volume de metano (NmL gSTV⁻¹);

V_{CNTP} = volume de biogás acumulado no período ajustado às CNTP (NmL);

mSTV_{adic.} = massa de STV adicionada no tratamento (gSTV).

O critério de finalização do experimento seguiu as orientações propostas pela VDI 4630 (2006), que sugere que o monitoramento seja realizado até que os tratamentos atinjam 1% da produção diária em relação ao total acumulado no período (Equação 14).

$$\text{Taxa de geração de biogás (\%)} = \frac{V_{\text{BIOGÁS}} * 100}{V_{\text{ACUM}}} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

V_{BIOGÁS} = biogás gerado entre o dia atual da medição e o anterior (mL);

V_{ACUM} = volume de biogás acumulado no período (mL);

Para os cálculos de todos os tratamentos estudados, foram descontadas as produções das condições controle.

4.5.3 Análise Qualitativa do Biogás

Além do volume de biogás gerado, determinou-se a composição do biogás em relação ao teor de metano - CH₄, gás carbônico - CO₂ e gás sulfídrico - H₂S, utilizando-se o analisador de gases portátil da marca Dräger®, modelo X-am 7.000, através do acoplamento de uma mangueira na saída específica para coleta de gases do frasco de BMP. A frequência de amostragem de biogás para análise de sua composição dependeu do acúmulo do biogás gerado. Desta forma, com base na capacidade de detecção do equipamento e a partir de testes preliminares, estabeleceu-se que a purga para verificação dos teores de gases pelo Dräger® seria feita quando o manômetro indicasse pressão entre 1,50 e 2 kgf cm⁻², com vazão de 0,05 kgf cm⁻²s⁻¹.

O analisador portátil foi previamente validado e verificado por um Cromatógrafo Gasoso - GC (7890 A – Agilent) com detecção por um Detector de Ionização de Chama - FID e Detector de Condutividade Térmica - TCD. As colunas Haysep Q (9 Ft x 1,8” x 2,0 mm) e MolSieve 5A (6 Ft x 1,8” x 2,0 mm) foram usadas e uma taxa de fluxo constante de 18 mL min⁻¹ com hélio como gás de transporte. O método validado apresentou resultados satisfatórios

quanto aos parâmetros de linearidade ($> 0,99 R^2$), precisão (0,26 – 2,00%), acurácia, especificidade e seletividade.

4.5.4 Cinética: Modelo de Gompertz Modificado

A equação de primeira ordem de Gompertz modificada foi usada para descrever a produção acumulada de biogás e metano, por meio do Software OriginPro 8.0, a partir do ajuste da curva de regressão não linear, conforme Equação 15.

$$B(t) = B_0 * \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_b + e}{B_0} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 15})$$

Onde:

$B(t)$ = produção acumulada de metano (NmL gSTV⁻¹);

B_0 = potencial de produção de metano (NmLCH₄ gSTV⁻¹);

R_b = taxa máxima de produção de metano (NmL d⁻¹);

λ = fase *lag* (d): tempo necessário para aclimação dos microrganismos no ambiente e/ou tempo necessário para produzir o metano (ABU-REESH, 2014; ZHAO *et al.*, 2016).

4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO PLEUROTUS OSTREATUS – ETAPA 2A

A partir dos resultados da Etapa 2, desenvolveu-se um novo experimento com o objetivo de avaliar o potencial de crescimento do microrganismo *Pleurotus ostreatus* em resíduo de poda urbana, variando agentes externos que podem contribuir e/ou prejudicar seu desenvolvimento. Fixando-se o tempo de incubação (14 dias) e a temperatura (28 °C), foram conduzidas 16 diferentes condições experimentais, em triplicata, variando a solução umedecedora, nutrientes e esterilização, conforme apresenta a Tabela 7.

Tabela 7 - Condições experimentais para avaliação do crescimento do *Pleurotus ostreatus*

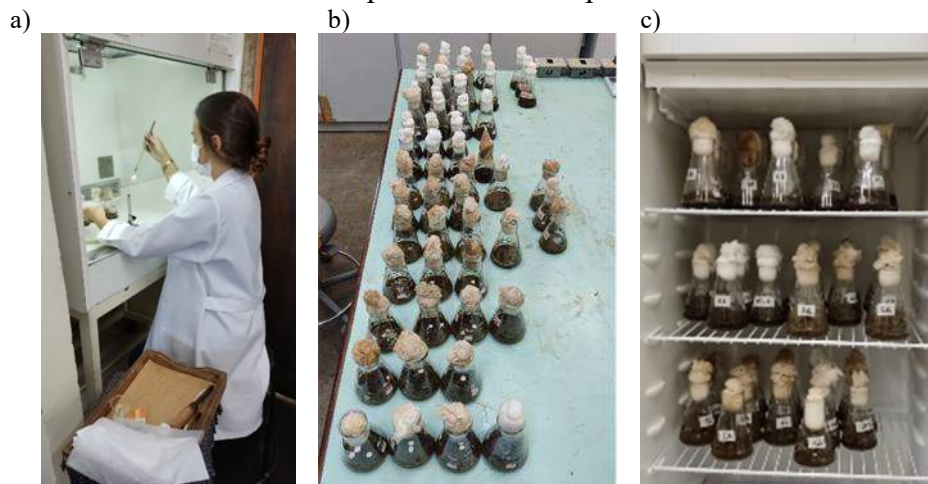
Condição	Solução umedecedora	Nutrientes		Esterilização
Controle 1	Vogel	Glucose 1%	Extrato de Levedura 1,5%	Sim
A1	Água	Glucose 1%	Extrato de Levedura 1,5%	Sim
B1	Vogel	Glucose 1%	-	Sim
C1	Água	Glucose 1%	-	Sim
D1	Vogel	-	Extrato de Levedura 1,5%	Sim
E1	Água	-	Extrato de Levedura 1,5%	Sim
F1	Vogel	-	-	Sim
G1	Água	-	-	Sim
Controle 2	Vogel	Glucose 1%	Extrato de Levedura 1,5%	Não

A2	Água	Glucose 1%	Extrato de Levedura 1,5%	Não
B2	Vogel	Glucose 1%	-	Não
C2	Água	Glucose 1%	-	Não
D2	Vogel	-	Extrato de Levedura 1,5%	Não
E2	Água	-	Extrato de Levedura 1,5%	Não
F2	Vogel	-	-	Não
G2	Água	-	-	Não

Fonte: A autora (2023)

A Figura 13 apresenta o processo de inoculação (Figura 13-a e Figura 13-b) e incubação (Figura 13-c) das diferentes condições testadas nesta etapa experimental.

Figura 13 - Desenvolvimento do experimento da Etapa 2A



Fonte: A autora (2023)

4.6.1 Manutenção, Preparo do Inóculo, Cultivo e Interrupção do Pré-tratamento

As etapas que antecedem o desenvolvimento deste experimento foram conduzidas a partir das metodologias expostas nos tópicos 4.4.3.1 (microrganismo e manutenção), 4.4.3.2 (preparo do inóculo e cultivo) e 4.4.3.3 (interrupção do pré-tratamento), com exceção das soluções umedecedoras, que foram preparadas com base nas condições expostas na Tabela 7.

4.7 CODIGESTÃO ANAERÓBIA - ETAPA 3

Ao selecionar um dos pré-tratamentos como foco do estudo, esta etapa teve como objetivo a comparação e avaliação quali-quantitativa do biogás e efluente gerados em dois reatores em escala piloto, variando-se os co-substratos adicionados (RPU bruto e RPU pré-tratado), conforme apresentado na Tabela 8. Em ambos os reatores, substituiu-se 30% da massa de STV do RA pelo RPU utilizado.

Tabela 8 – Condições experimentais avaliadas nos reatores em escala piloto

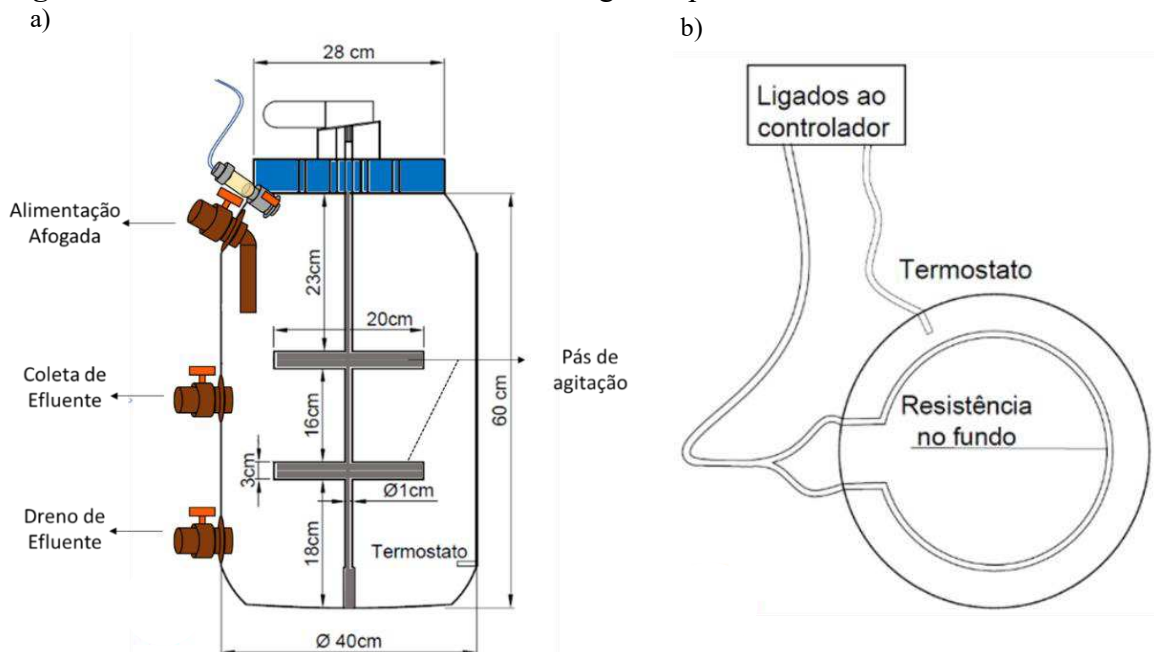
Condição	Inóculo	Substrato	Co-substrato
Reator A	Dejeto suíno digerido	Resíduo alimentar	Resíduo de poda urbana bruto
Reator B	Dejeto suíno digerido	Resíduo alimentar	Resíduo de poda urbana pré-tratado

Fonte: A autora (2023)

O inóculo utilizado nesta etapa refere-se ao efluente de um reator anaeróbio em operação, que trata dejetos suínos, localizado na Granja de Suinocultura da Fazenda Escola da UEL. Este foi coletado e mantido em repouso dentro dos reatores por 10 dias, para aclimação e desgaseificação. Os substratos utilizados nesta etapa, bem como sua coleta e preparo foram apresentados nos tópicos 4.2 e 4.3.

4.7.1 Aparato Experimental

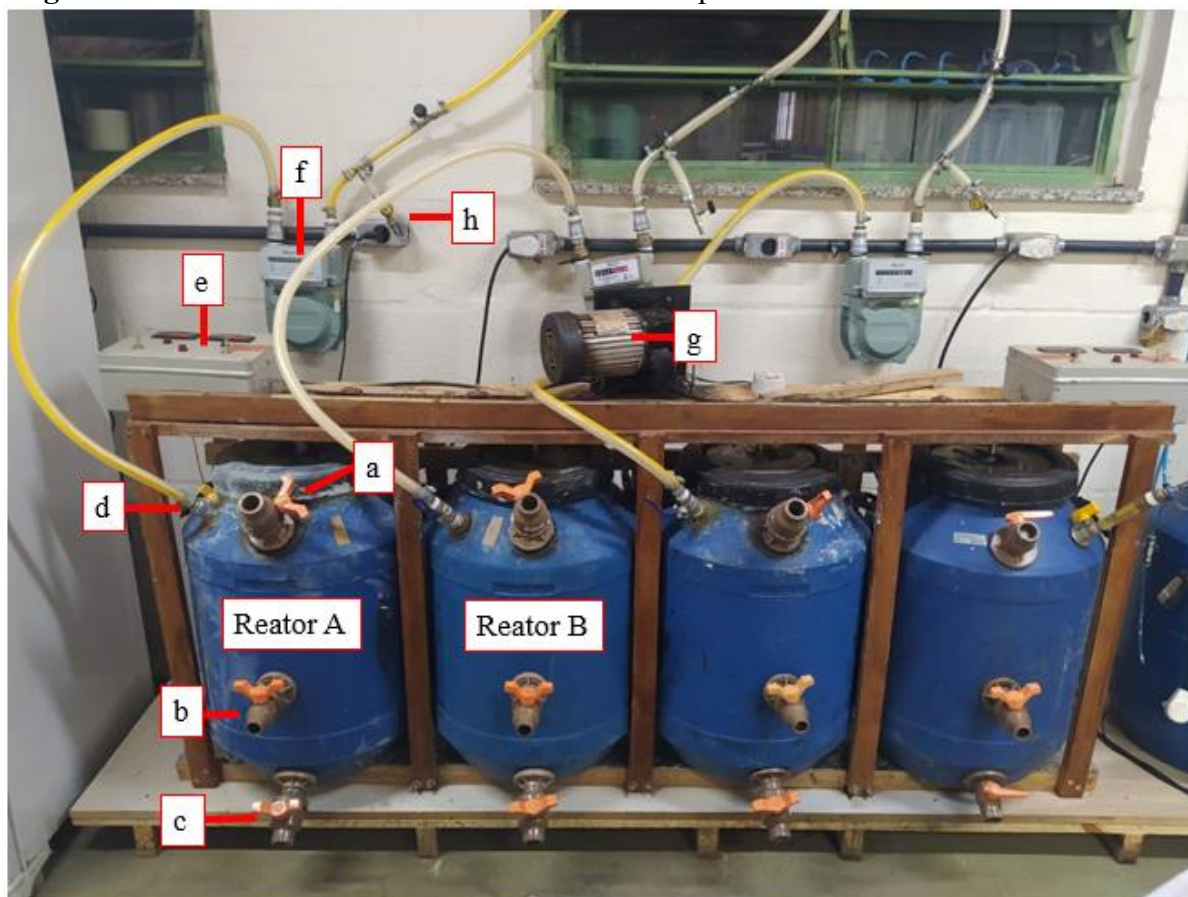
Os reatores pilotos possuíam volumes total de 60 L e útil de 50 L, sendo fabricados em bombonas de polietileno de alta densidade - PEAD, com dimensões de 60 cm de altura e 40 cm de diâmetro. As tampas foram confeccionadas em um sistema reforçado com uma chapa metálica na parte superior. Cada reator possuía abertura afogada para alimentação e duas conexões laterais para retirada de efluente (níveis intermediário e inferior). O detalhamento dimensional e de conexões dos reatores (Figura 14-a) e do sistema de aquecimento (Figura 14-b) estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Detalhamento do sistema de biodigestão piloto de 50 L

Fonte: Adaptado de Navarro (2020)

Os reatores utilizados neste experimento estão agrupados em um sistema de quatro reatores (Figura 15) e contam com controle de agitação - composto por um único motor acoplado a um sistema de engrenagens e corrente - e temperatura - controlada por um termostato instalado no fundo do reator.

Figura 15 - Sistema de reatores anaeróbio em escala piloto de 50 L



a) Entrada do afluente; b) Coleta do efluente; c) Coleta de fundo do efluente; d) Saída do biogás; e) Controlador de temperatura; f) Medidor de vazão; g) Sistema de agitação; h) Ponto de análise do biogás.

Fonte: A autora (2023)

O sistema possuía uma mangueira que direcionava o biogás gerado para um medidor de vazão (modelo G1.0, fabricado pela AÉPIO, com vazão máxima de $1,6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) e saída específica para análise qualitativa do biogás (teores de CH_4 , CO_2 , O_2 e H_2S), a partir do analisador portátil MRU[®] Optima 7 Biogas.

Assim como o Dräger[®], o analisador portátil MRU[®] Optima 7 Biogas foi validado e verificado pelo GC (7890 A – Agilent) com detecção por FID e TCD. As colunas Haysep Q (9 Ft x 1,8” x 2,0 mm) e MolSieve 5A (6 Ft x 1,8” x 2,0 mm) foram usadas e uma taxa de fluxo constante de 18 mL min^{-1} com hélio como gás de transporte. A validação do método apresentou

resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de linearidade ($> 0,99 R^2$), precisão (0,26 - 2,00%), acurácia, especificidade e seletividade.

4.7.2 Partida dos Reatores Anaeróbios

A partida dos dois reatores ocorreu simultaneamente, preenchendo-se 50% do volume útil destes (25 L) com inóculo e mantendo em repouso por 10 dias, para aclimação em temperatura mesofílica (37 °C) e desgaseificação. Passado o período de adaptação, os reatores foram alimentados com RA e RPU (bruto para Reator A e pré-tratado para Reator B) e a diluição da mistura foi realizada com água desclorada, de forma que a carga orgânica volumétrica - COV do afluente fosse de $0,5 \text{ kgSTV m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ (COV fixa para toda a Etapa 3) e TDH de 30 dias. As alimentações ocorriam três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras) e, neste período de partida, não houve retirada de efluente - apenas o suficiente para análises de controle e desempenho, uma vez que o objetivo era completar o volume útil do reator com os substratos do estudo.

4.7.3 Operação e Monitoramento dos Reatores Anaeróbios

Passado o período de partida (tempo necessário para que o volume útil dos reatores fosse preenchido), iniciou-se a fase operação e monitoramento dos sistemas, com TDH de 30 dias. As alimentações mantiveram a COV de $0,5 \text{ kgSTV m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, com frequência de três vezes por semana, porém, antes da adição do afluente nos reatores, retirava-se o mesmo volume de efluente pelo registro localizado no nível intermediário. Outra adaptação realizada neste período foi que a diluição da mistura de substrato afluente era realizada com digestato sobrenadante.

O digestato sobrenadante - DSob refere-se ao líquido obtido a partir da sedimentação do efluente retirado dos reatores e apresenta como características baixa concentração de sólidos e propriedades alcalinizantes. A formação e obtenção do DSob ocorria da seguinte forma: o efluente retirado de cada um dos reatores era armazenado em baldes específicos com tampas e, até a próxima alimentação do reator (cerca de 48 horas), estes permaneciam em repouso, de forma que as partículas com maior densidade sedimentavam (formando uma camada de lodo no fundo dos baldes - digestato sedimentado). Assim, o líquido obtido após a sedimentação deste material (digestato sobrenadante), aproximadamente 80% do volume total do balde, era utilizado para equalização das misturas afluentes da alimentação seguinte.

Kainthola, Kalamdhad e Goud (2019) explicam que a recirculação do efluente também é usada para aumentar a transferência de massa no reator entre o inóculo e o substrato, especificamente quando a mistura fracionada é fornecida no reator. A recirculação do efluente é combinada com água para diluir o efeito inibitório dos ácidos graxos voláteis de amônia acumulados e outros metabólitos presentes neste (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

4.7.4 Balanço de massa teórico

O balanço de massa realizado no tratamento anaeróbio de reatores é baseado no princípio que nenhuma massa é criada ou destruída, mas sim transformada. Este cálculo é aplicado em para verificar a eficiência de conversão do substrato em biogás (NAVARRO, 2020).

Para verificar os percentuais de conversão de sólidos totais voláteis, foi realizada a somatória de todo o STV adicionado - STV_{ADD} ao sistema com o STV remanescente do período anterior - STV_{RMA} , considerando esse valor como o STV afluente do período - STV_{AF} . Para verificação do STV efluente - STV_{EF} , foi realizada a somatória de todo o STV retirado do sistema - STV_{RT} por meio da concentração de STV de cada retirada efluente, assim como a massa final de STV remanescente no sistema ao fim do referido período - STV_{RMP} . A diferença entre o STV_{AF} e o STV_{EF} , foi considerado o STV convertido em biogás - STV_C . Desse modo, calculou-se a taxa de conversão do parâmetro - TC_{STV} , de acordo com as Equações 16 e 17.

$$STV_C = (STV_{ADD} + STV_{RMA}) - (STV_{RT} + STV_{RMP}) \quad (\text{Equação 16})$$

$$\% TC_{STV} = \frac{STV_C}{STV_{AF}} * 100 \quad (\text{Equação 17})$$

Onde:

STV_C = STV convertido em biogás e biomassa;

STV_{ADD} = somatória do STV adicionado;

STV_{RMA} = STV remanescente do período anterior;

STV_{RT} = STV retirado do sistema no efluente;

STV_{RMP} = STV remanescente no sistema ao fim do referido período;

STV_{AF} = STV afluente do processo;

$\% TC_{STV}$ = percentual da taxa de conversão de STV;

Para verificação da taxa de conversão da DQO utilizou-se do mesmo modelo de cálculo, conforme Equações 18 e 19. Do mesmo modo, realizou-se as mesmas análises para os períodos referentes a utilização de cada substrato.

$$DQO_C = (DQO_{ADD} + DQO_{RMA}) - (DQO_{RT} + DQO_{RMP}) \quad (\text{Equação 18})$$

$$\% TC_{DQO} = \frac{DQO_C}{DQO_{AF}} * 100 \quad (\text{Equação 19})$$

Onde:

DQO_C = DQO convertido em biogás e biomassa;

DQO_{ADD} = somatória do DQO adicionado;

DQO_{RMA} = DQO remanescente do período anterior;

DQO_{RT} = DQO retirado do sistema no efluente;

DQO_{RMP} = DQO remanescente no sistema ao fim do referido período;

DQO_{AF} = DQO afluyente do processo;

$\% TC_{DQO}$ = percentual da taxa de conversão de DQO;

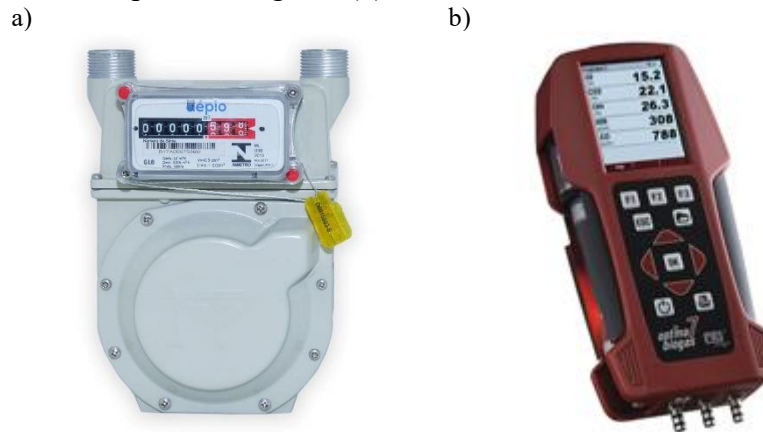
As análises de STV e DQO do afluyente ocorreram semanalmente para STV e quinzenalmente para DQO. Para as amostras efluentes, o STV foi analisado semanalmente e a DQO foi analisada quinzenalmente, referente à metade e final do TDH.

4.7.5 Análise quali-quantitativas do biogás

A produção de biogás foi quantificada com a utilização do medidor de vazão (Figura 16-a) instalado na tubulação de biogás que interliga o reator ao gasômetro. O medidor de vazão modelo G1.0, fabricado pela Aépio, possui vazão máxima de $1,6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

A qualidade do biogás produzido foi aferida *in loco* por meio do analisador portátil de biogás MRU[®] Optima 7 (Figura 16-b) a cada alimentação. O equipamento é acoplado ao reator em uma saída de gás específica para verificação qualitativa. O analisador portátil de gases exibe, em percentual, os gases CH_4 , CO_2 e O_2 ; e em ppmV o H_2S , a partir de sensores acoplados ao aparelho. A amostragem e coletas de dados referentes ao qualitativo e quantitativo de biogás, ocorreram anteriormente às operações de retirada de efluente e alimentação.

Figura 16 - Equipamentos utilizados para análises quali-qualitativas do biogás: medidor de vazão (a) e analisador portátil de gases (b)



Fonte: A autora (2023)

Para verificar a eficiência da conversão de STV em biogás, calculou-se a produção específica de biogás - PE. Para isso, os volumes acumulados de biogás quantificados foram relacionados com a massa de STV adicionada no mesmo período, por meio da Equação 20.

$$PE = \frac{VA}{MSA} \quad (\text{Equação 20})$$

Onde:

PE = produção específica de biogás ($\text{m}^3 \text{kSTV}_{\text{add}}^{-1}$);

VA = volume acumulado de biogás (m^3);

MSA = massa de STV adicionada (kgSTV);

A PE foi verificada para cada TDH monitorado, assim como para o período total da utilização de cada um dos substratos afluentes. Desta forma, tornou-se possível a avaliar a influência de cada substrato na produção de biogás.

4.8 PARÂMETROS DE CONTROLE E DE DESEMPENHO

A caracterização físico-química dos inóculos, substratos e misturas foi realizada antes e após os experimentos em todas as etapas experimentais. Nas Etapas 1 e 2A, antes e depois dos experimentos, utilizou-se como meios de avaliação os seguintes parâmetros: lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, açúcares totais e redutores e lacase. Para a Etapa 2, antes e depois do experimento, e Etapa 3, avaliaram-se os parâmetros físico-químicos de controle operacional (temperatura, pH, alcalinidade, AGV e relação AGV/AT) e de desempenho (DQO,

série de sólidos, N-amoniacoal, NKT e produção de biogás). A Tabela 9 apresenta a referência, metodologia e frequência de cada um deles.

Tabela 9 - Parâmetro físico-químico, referência, método e frequência de monitoramento

Parâmetro	Referência	Método	Frequência
Temperatura (°C)	2550 B (*)	-	Diária
pH	4500 H (*)	Potenciométrico	3x/semana
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	2320 B (*)	Titulométrico	3x/semana
AGV (mg L ⁻¹)	Dilallo e Albertison (1961)	Titulométrico e CG-MS	3x/semana
Série de sólidos (mg L ⁻¹)	2540 adaptado (*)	Gravimétrico	1x/semana
DQO (mg L ⁻¹)	5220 C Refluxo fechado (*)	Espectrofotométrico	Semanal
NKT (mg L ⁻¹)	4500 - N _{org} B e C (*)	Micro-Kjeldhal	Quinzenal
Proteínas N-amoniacoal (mg L ⁻¹)	Instituto Adolfo Lutz (2008) 4500 - NH ₃ B e C	Kjeldhal * 6,25 Destilação e titulação	Quinzenal Quinzenal
Lipídios (mg L ⁻¹)	Instituto Adolfo Lutz (2008)	Estração direta em Soxhlet	Início do experimento
Carboidratos (mg L ⁻¹)	Instituto Adolfo Lutz (2008)	Diferença entre 100 e a soma das percentagens de proteínas, lipídios, água e cinzas	Início do experimento
COT (mg L ⁻¹)	Jiménez e Garcia (1991)	STV÷1,8	Início do experimento
Macro e micro nutrientes (**)	MAPA (2017)	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente. Sensores catalíticos infravermelhos e detectores eletroquímicos	Início do experimento 3x/semana
Gases (CH ₄ , CO ₂ , H ₂ S)	-	-	-
Açúcares totais	Dubois <i>et al.</i> (1956)	-	Início e fim do experimento
Açúcares redutores	Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	-	Início e fim do experimento
Lignina, cinzas, celulose, hemicelulose	Método de Van Soest (1967)	Gravimétrico	Início e fim do experimento
Lacase	Barbosa <i>et al.</i> (1996)	-	Fim do experimento

(*): Método baseado no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA AWWA; WEF, 2012). (**): Análises realizadas em laboratório externo.

Fonte: A autora (2023)

De acordo com APHA (2017), o método para determinação de sólidos estabelece a temperatura de 105 °C para secagem de matéria orgânica, porém, para evitar possíveis perdas de matéria orgânica volátil da amostra, adaptou-se a metodologia para secagem na temperatura de 90 °C (ANGELIDAKI *et al.*, 2009).

Em função das características peculiares das amostras de resíduo alimentar utilizadas neste estudo, especialmente em relação ao tamanho dos particulados e desuniformidade de distribuição, estabeleceu-se como procedimento padrão para análise de DQO a submissão das

amostras ao banho ultrassônico (modelo UltraCleaner 7000 da marca Unique) por 15 minutos em temperatura ambiente e frequência de 55 kHz após a diluição das mesmas.

Estima-se que o conteúdo de nitrogênio a partir das proteínas é de, aproximadamente, 16%, assim, o valor empírico de 6,25 é utilizado para estimar a quantidade proteína com base nos valores de nitrogênio (LUTZ, 2008). Neste sentido, a determinação da proteína foi realizada a partir da metodologia de análise do Nitrogênio Total Kjeldahl - NKT, multiplicando o valor do NKT por 6,25.

Por sua vez, o valor de carbono orgânico das amostras foi determinado por meio do método da mufla, que considera que o teor de carbono fixo de resíduos sólidos orgânicos varia entre 56% e 58% dos STV da amostra. Utiliza-se, portanto, o valor de STV dividido pelo fator 1,8 - valor comumente adotado no Brasil (JIMNEZ; GARCIA, 1992; PROSAB, 2003).

Para que não ocorresse o entupimento das tubulações dos reatores, optou-se por utilizar o liquidificador (20 segundos em velocidade baixa) para misturar o RPU aos substratos (RA e DSob), de forma a desfazer possíveis grânulos de resíduo e facilitar a alimentação dos sistemas.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV foi utilizada na análise morfológica dos resíduos de poda urbana bruto e após os pré-tratamentos (Etapa 1) e nas amostras do efluente final dos Reatores A e B (Etapa 3). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL, em microscópio eletrônico modelo Quanta 200 (Philips).

O preparo das amostras consistiu na centrifugação e lavagem com Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M e posterior fixação com uma solução composta por Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,0% Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M e Tetróxido de Ósmio 1%. Então, realizou-se outra lavagem com Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, processo de desidratação etanólica, secagem ao ponto crítico (modelo CPD 030, marca Bal-tec), montagem dos suportes e metalização com ouro (SCD 050, marca Bal-tec).

4.10 ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR GC-MS

A determinação dos Ácidos Graxos Voláteis - AGV foi realizada de duas maneiras. A primeira consistiu na análise titulométrica segundo Dilallo e Albertison (1961), realizada três vezes por semana nas amostras recém coletadas de afluente e efluente dos reatores. Este método

permite uma identificação imediata da quantidade de AGV presente na amostra e tem o objetivo principal de monitoramento ágil para a tomada de decisões. Porém, segundo Ribas, Moraes e Foresti (2007), o método titulométrico apresenta uma perda de, pelo menos, 20% dos ácidos, os quais são volatilizados no momento do preparo, aquecimento e titulação.

O outro método consistiu em uma análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas – CG-MS. A fração líquida das melhores condições de cada pré-tratamento (Etapa 1), bem como amostras semanais de monitoramento dos Reatores A e B (Etapa 3) foram congeladas a -10°C para posterior análise, objetivando a quantificação dos principais ácidos orgânicos (ácido acético – HAc, propiônico – HP, isobutírico – Hib, butírico – HB, isovalérico – Hiv e valérico – HV) presentes nas amostras. Este método foi validado e implementado por Quadros (2023).

4.10.1 Preparo de Amostras

Após testes preliminares, as amostras foram preparadas da seguinte forma: volumes de 15 mL de cada amostra foram centrifugados a 4000 rpm, por 10 minutos e, na sequência, o sobrenadante das amostras foi filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno - PVDF, com $0,22\ \mu\text{m}$ de porosidade média, para remoção de sólidos suspensos.

Por fim, as amostras filtradas foram diluídas em Metanol grau HPLC (Honeywell, pureza $> 99\%$), de modo a se obter concentrações da ordem de $5\ \text{mg L}^{-1}$, tomando como base as concentrações quantificadas de AGV de cada amostra pelo método titulométrico (DILALLO; ALBERTISON, 1961).

Após o preparo, as amostras foram armazenadas em vials com 2 mL de capacidade volumétrica, que foram selados com tampa roscável contendo septo de camada dupla e armazenados a -10°C para posterior análise no CG-MS.

4.10.2 Análise Quali-quantitativa de Ácidos Graxos Voláteis

Foi utilizado o Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas – CG-MS (PerkinElmer - Clarus 690 acoplado a Clarus SQ8). As condições cromatográficas foram adotadas com base em testes preliminares e dados da literatura. Assim, para a análise cromatográfica dos compostos foi utilizada coluna cromatográfica (PerkinElmer – Elite - 5MS) com fase estacionária (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) que possui baixa polaridade, com dimensões de 30 m de comprimento e $0,25\ \text{mm}$ de diâmetro, e espessura do filme de $0,25\ \mu\text{m}$.

Foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 1 μL ; temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$; modo de injeção split 10:1; o gás de arraste foi o gás Hélio, com velocidade linear de 1 mL min^{-1} ; temperatura da linha de transferência de 250 $^{\circ}\text{C}$; temperatura da fonte de ionização (impacto de elétrons) do espectrômetro de massa de 230 $^{\circ}\text{C}$ e tempo de corte do solvente (*solvent delay*) de 1.50 minutos.

Após testes de temperatura do forno, o gradiente de temperatura que resultou na melhor separação cromatográfica está apresentado na Tabela 10.

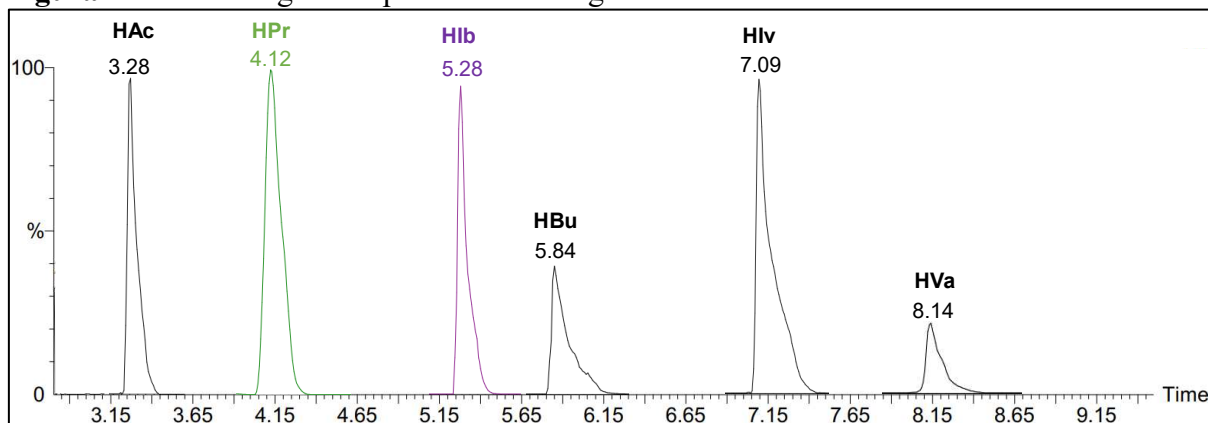
Tabela 10 - Gradiente de temperatura de forno para análise dos AGV

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de espera (min)
-	35	1
5	70	2
45	250	4

Fonte: Quadros (2023)

A Figura 17 apresenta o cromatograma geral dos ácidos graxos voláteis, obtido a partir da injeção dos seis ácidos (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) no equipamento CG-MS.

Figura 17 - Cromatograma típico dos ácidos graxos voláteis estudados



Fonte: Quadros (2023)

A partir do cromatograma geral de massas apresentado, foram identificadas as quebras de massa de maior intensidade para cada um dos ácidos (m/z). Para tal, foi desenvolvido um método de monitoramento específico (modo SIR), o qual permitiu identificação e quantificação dos picos nas massas específicas a seguir (Tabela 11).

Tabela 11 - Tempos de retenção dos AGVs e íons utilizados na identificação de cada ácido

Analito	Tempo de retenção (minutos)	Íons (m/z)
Ácido acético	3,28	60
Ácido propiônico	4,12	77

Ácido isobutírico	5,28	73
Ácido butírico	5,84	60
Ácido isovalérico	7,09	60
Ácido valérico	8,14	60

Fonte: Quadros (2023)

Para garantir que o método de análise de AGVs permitisse resultados confiáveis, Quadros (2023) realizou a validação de acordo com as diretrizes estabelecidas pela ANVISA (2003) e INMETRO (2016), utilizando os parâmetros Limite de Detecção – LD, Limite de Quantificação – LQ, Linearidade, Precisão e Efeito Matriz. Deste modo, foram atendidos todos os parâmetros normativos estabelecidos, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros de validação do método quali-quantitativo de análise de AGVs

Análito	LD	LQ	Linearidade	Precisão		Efeito Matriz
	mg L ⁻¹		R ²	Intra corrida	Inter corrida	
Ácido acético	0,037	0,124	0,9916	3,32	4,81	146
Ácido propiônico	0,264	0,879	0,9892	3,71	4,11	725
Ácido isobutírico	0,190	0,634	0,9708	3,08	4,34	28
Ácido butírico	0,208	0,692	0,9706	3,78	4,48	77
Ácido isovalérico	0,076	0,252	0,9743	3,59	4,92	25
Ácido valérico	0,058	0,195	0,9798	3,11	4,09	95

Fonte: Quadros (2023)

Os valores de LD e LQ obtidos demonstraram que o método possui sensibilidade adequada se comparado a estudos de validação com métodos semelhantes (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Conforme ANVISA (2003), é necessário determinar o coeficiente de correlação – r ($r = \sqrt{R^2}$), sendo o valor mínimo estabelecido para esse parâmetro de 0,99. Sendo assim, a partir dos valores de R² obtidos para as curvas analíticas ajustadas, Quadros (2023) calculou os valores de r e obteve 0,9924; 0,9946; 0,9853; 0,9852, 0,9871 e 0,9899 para HAc, HPr, HIB, HBu, Hiv e HVa, respectivamente, apresentando linearidade satisfatória.

Em relação a precisão intra e intercorrida, os valores obtidos foram inferiores ao limite de 5%, recomendado pela ANVISA (2003). Deste modo, também atenderam o padrão estabelecido.

Quanto ao Efeito Matriz, verifica-se que, de maneira geral, todos os AGV apresentaram elevados valores de realce no sinal cromatográfico, indicando que a complexidade da amostra pode inserir outros compostos com massas (m/z) similares às dos AGV nas quebras de maior intensidade utilizadas para a quantificação do analito.

4.11 ANÁLISE DOS TEORES DE FURFURAL E 5-HIDROXIMETILFURFURAL

Os teores de furfural e 5-HMF foram determinados no RPU bruto, nas melhores condições dos pré-tratamentos e no efluente dos reatores durante o período experimental para monitorar o consumo desses compostos ao longo do experimento.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Sucroderivados e Bioenergia - LTSBio da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, com base na metodologia descrita por Silverio (2017). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo Shimadzu de modelo UFLC Prominence. A coluna empregada foi Shim-pack VP-ODS (5 μm) de 250 x 4,6 mm, a 25 °C. O eluente foi acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético, em fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O detector utilizado foi DAD (Shimadzu SPD-M20A), com o comprimento de onda de 275 nm. O volume de amostra injetado foi de 20 μL . As amostras de RPU bruto, RPU pré-tratados e efluentes dos reatores foram filtradas em membranas de 0,22 μm .

4.12 ANÁLISE DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Com a finalidade de caracterizar os RPU bruto e melhores condições dos pré-tratamentos, bem como monitorar o efluente dos reatores anaeróbios, a análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada no Laboratório de Tecnologia Sucroderivados e Bioenergia - LTSBio da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, por método colorimétrico, de acordo com metodologia desenvolvida por Julkunen-Tiitto (1985). As amostras de RPU e efluentes de reatores foram previamente diluídas em cinquenta vezes.

4.13 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA EXISTENTE

Amostras do inóculo e dos efluentes dos Reatores A e B da Etapa 3 foram submetidas ao sequenciamento genético, em laboratório externo (NGS Soluções Genômicas). O intuito de analisar essas amostras é avaliar o comportamento da comunidade de microrganismos quanto às variações as quais foram submetidas no decorrer do tempo de monitoramento. Para isso, as amostras foram coletadas em frascos cônicos de 15 mL (livres de DNAses, RNAses e pirogênicos), congeladas a -10 °C e enviadas ao laboratório devidamente acomodadas sob temperatura adequada, mantida com o auxílio de placas de gelo em gel.

A extração do DNA total foi realizada usando o QIAmp Fast DNA Stool Kit (Qiagen; Hilden, Germany), conforme recomendações do fabricante, e otimização em laboratório. A análise do DNA quanto a concentração (quantificação) e pureza foi determinada por espectrometria UV-Vis (*NanoDrop™ One/OneC Microvolume – Thermo Fisher Scientific*). Um μL do DNA total extraído foi usado nas reações de amplificação de duas regiões do gene do 16S do rRNA bacteriano. Para as 3 amostras, a região V3-V4 (341F-785R) foi amplificada a partir dos primers contendo pré-adaptadores *Illumina* (para sequenciamento de todas as bactérias presentes na comunidade. Além da região V3-V4, primers contendo pré-adaptadores *Illumina* foram utilizados para sequenciamento da região que identifica espécies de arqueas presentes na comunidade (915F/1386R) (KITTELMANN *et. al.*, 2013).

Os produtos de PCR foram checados em eletroforese de gel de agarose 1 % (m/v) e purificados com esferas magnéticas (ampure x - *Beckman Coulter*). Uma segunda PCR foi realizada para adicionar os adaptadores *Illumina* (barcodes) e construção da biblioteca para sequenciamento. Para tal, 2,5 μL do produto amplificado foram usados na reação. Os produtos de PCR da segunda amplificação foram checados em eletroforese de gel de agarose 1% (m/v), purificados e quantificados para normalização da biblioteca. O pool das amostras da biblioteca foi quantificado por PCR em tempo real (qPCR) e encaminhadas para sequenciamento (MiSeq Syste - *Illumina*) com leituras pareadas de 250 pb e cobertura de 50 mil leituras pareadas por amostra.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2021). Para os modelos apresentados, a significância estatística foi avaliada pelo teste F. Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram validados, ao nível de significância de 5% e 10% (para determinadas condições), pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979) e análise gráfica, respectivamente.

As variáveis respostas dos Delineamentos Composto Central Rotacional foram descritas conforme função polinomial de segunda ordem (Equação 21):

$$y_{ij} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon_{ij} \quad (\text{Equação 21})$$

Onde:

y_{ij} = resposta predita;

β = parâmetros cujos valores devem ser determinados;

i e j = variam de 1 a k variáveis;

x_i e x_j = variáveis independentes definidas em escala codificada de -1 a +1;

ϵ_{ij} = termo de erro aleatório.

As estimativas dos parâmetros neste modelo de regressão estão relacionadas com as estimativas de efeito (MONTGOMERY, 2013). A significância dos parâmetros e suas interações foram testadas pela análise de variância (ANOVA).

Para comparação de médias foi utilizado o teste de teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1

A constituição do RPU utilizado neste estudo baseou-se na geração de grama, folhas e galhos no campus universitário da Universidade Estadual de Londrina. A grama coletada para este estudo refere-se a *Paspalum notatum* e as folhas e galhos referem-se a *Albizia lebeck* (L.) Benth. Assim, a proporção em peso bruto desta composição foi 47,2% para grama, 26,3% para folhas e 26,5% para galhos.

Inicialmente, o resíduo de poda urbana – RPU foi submetido a secagem, moagem e caracterização inicial. A caracterização lignocelulósica do RPU teve como finalidade conhecer sua composição química em relação aos teores de lignina, celulose, hemicelulose e cinzas, que são os componentes de maior interesse destes resíduos. A Tabela 13 apresenta os resultados da caracterização do RPU e de cada um de seus constituintes.

Tabela 13 - Composição química do resíduo de poda urbana

Composição Química	Grama	Folhas	Galhos	Resíduo de Poda urbana
Lignina (%)	5,95 ± 2,11	10,14 ± 0,74	25,20 ± 0,61	18,51 ± 0,79
Celulose (%)	21,39 ± 0,18	19,84 ± 1,29	22,70 ± 1,53	21,79 ± 1,16
Hemicelulose (%)	43,58 ± 3,07	24,39 ± 0,77	24,66 ± 0,29	32,99 ± 0,64
Cinzas (%)	0,88 ± 0,23	2,47 ± 1,06	1,07 ± 0,35	1,24 ± 0,91

Fonte: A autora (2023)

Nota-se que a soma dos componentes não atingiu 100%, fato este explicado pela não quantificação de alguns compostos presentes no material (ex. extrativos) (RABELO, 2010).

Normalmente não são encontrados valores fixos para cada análise, mas sim uma faixa de valores. Isso ocorre porque a constituição final de cada resíduo de poda urbana sofre vários tipos de influência, como espécie da grama e da árvore e composição do material. Ainda assim, o resíduo de poda urbana deste estudo apresenta valores condizentes aos apresentados por Zhang, Loh e Zhang (2018), Panigrahi, Sharma e Dubey (2020) e Borth *et al.* (2022), que encontraram para resíduo vegetal 10,87%, 19,1% e 11% para lignina, 18,21%, 38,01% e 54% para celulose e 23,53%, 25,05% e 16% para hemicelulose, respectivamente.

5.1.1 Pré-tratamento Ácido: Ácido Sulfúrico

O alvo da metodologia de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos com ácido diluído é a solubilização de hemicelulose e lignina, de forma a deixar o material poroso, enriquecido com celulose e adequado para ação enzimática (BRIENZO *et al.*, 2017).

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos na fração sólida do RPU pré-tratado para os parâmetros lignina, celulose, hemicelulose e cinzas, bem como os valores resultantes dos cálculos de balanço de massa, rendimento e deslignificação após os pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico, variando a concentração do reagente, temperatura e tempo.

Tabela 14 – Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento ácido

Ensaio	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Balanço de Massa (%)	Rendimento (%)	Deslignificação (%)
1 (1%, 55 °C, 8 min.)	17,49 ± 0,33	27,28 ± 0,13	24,69 ± 1,75	1,18 ± 0,11	69,45	92,82	12,29
2 (1%, 55 °C, 22 min.)	14,84 ± 0,18	28,41 ± 0,74	25,55 ± 2,12	1,23 ± 0,18	68,80	92,16	26,11
3 (1%, 125 °C, 8 min.)	16,34 ± 0,06	21,22 ± 0,53	31,24 ± 0,40	0,39 ± 0,08	68,80	92,49	18,55
4 (1%, 125 °C, 22 min.)	15,30 ± 0,25	29,49 ± 0,72	23,85 ± 2,83	1,31 ± 0,73	68,64	92,00	23,92
5 (3%, 55 °C, 8 min.)	17,06 ± 0,09	28,92 ± 0,50	24,16 ± 1,25	1,34 ± 0,55	70,14	91,45	15,71
6 (3%, 55 °C, 22 min.)	14,49 ± 0,37	29,56 ± 0,97	23,25 ± 2,60	1,47 ± 0,01	67,30	91,78	28,14
7 (3%, 125 °C, 8 min.)	16,23 ± 0,21	28,66 ± 1,25	26,66 ± 0,19	1,13 ± 0,48	71,55	90,92	20,25
8 (3%, 125 °C, 22 min.)	12,16 ± 0,56	32,96 ± 0,37	21,16 ± 0,87	1,96 ± 0,30	66,28	91,54	39,83
9 (2%, 90 °C, 3 min.)	16,77 ± 0,22	28,16 ± 0,61	24,18 ± 1,18	1,10 ± 0,48	69,11	92,35	16,32
10 (2%, 90 °C, 27 min.)	15,50 ± 0,16	29,70 ± 1,60	25,18 ± 2,46	0,98 ± 0,79	70,38	92,31	22,70
11 (2%, 31 °C, 15 min.)	14,41 ± 0,39	29,96 ± 1,13	24,84 ± 2,65	1,60 ± 0,85	69,21	92,17	28,22
12 (2%, 149 °C, 15 min.)	13,97 ± 0,40	34,75 ± 0,67	22,05 ± 0,76	1,04 ± 0,30	70,77	92,33	30,29
13 (0,3%, 90 °C, 15 min.)	17,59 ± 0,01	29,66 ± 0,17	25,12 ± 1,51	1,48 ± 0,50	72,37	92,98	11,64
14 (3,7%, 90 °C, 15 min.)	14,44 ± 0,59	29,23 ± 0,59	28,53 ± 0,38	1,51 ± 0,95	72,20	88,45	30,97
15 - 18 (2%, 90 °C, 15 min.)	16,05 ± 0,20	29,07 ± 0,47	23,07 ± 0,37	1,94 ± 0,47	68,19	92,22	20,00
RPU bruto	18,51 ± 0,79	21,79 ± 0,62	32,99 ± 0,64	1,24 ± 0,65	73,29	-	-

Fonte: A autora (2023)

No pré-tratamento ácido, as ligações de lignina molecular podem ser quebradas, com posterior condensação e precipitação na superfície da fibra. Neste sentido, a modificação estrutural da lignina permite uma melhor ação enzimática e adsorção catalítica à celulose, aumentando, portanto, a acessibilidade da celulose (GOMES, 2019).

Em todos os tratamentos avaliados, houve redução no percentual de lignina e hemicelulose, com valores de deslignificação que variaram de 11,64% a 39,83%. A menor porcentagem de lignina foi obtida no Ensaio 8 (3%, 125 °C, 22 minutos), atingindo um valor de 12,16% de lignina, com 39,83% de deslignificação.

Por sua vez, ao avaliar os demais resultados apresentados na Tabela 14, destacam-se os teores de celulose obtidos em todas as condições avaliadas. Guedes (2010) explica que os pré-tratamentos químicos rompem as ligações da lignina na fibra, promovendo maior disponibilização da celulose nos resíduos e, conseqüentemente, reduzindo os percentuais de lignina total nos mesmos. Situação semelhante ocorreu quando Santos (2010), submetendo bagaço de cana-de-açúcar ao ataque de H₂SO₄, variando a temperatura (112,5 - 157,5 °C), tempo de residência (5 – 35 minutos) e concentração (0 – 3% m/v), encontrou maiores teores de lignina e celulose após o pré-tratamento. O autor afirma que o pré-tratamento com ácido diluído não remove efetivamente os componentes lignina e celulose, mas sim, aumenta o rendimento da digestibilidade dos materiais lignocelulósicos (SANTOS, 2010).

Pela ANOVA, tem-se que o tempo de residência, a concentração e o termo quadrático da temperatura apresentaram efeito significativo para a remoção de lignina (Tabela 15).

Tabela 15 – Análise de variância para pré-tratamento ácido

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo de residência (L)	1	11,3044	11,3044	17,8887	0,001414 *
Temperatura (Q)	1	1,5571	1,5571	2,4641	0,1447720
Concentração (L)	1	6,2900	6,2900	9,9537	0,009161 *
I(x ²)	1	5,3017	5,3017	8,3897	0,014536 *
Resíduo	11	6,9512	0,6319		
Total	15				

L: linear; Q: quadrático

Fonte: A autora (2023)

Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas. As Figuras 18, 19 e 20 referem-se a superfícies de resposta e de contorno dos fatores tempo de residência (x1), temperatura (x2) e concentração (x3), avaliados em função da remoção de lignina.

Figura 18 – Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento ácido, com concentração fixada em 1,68

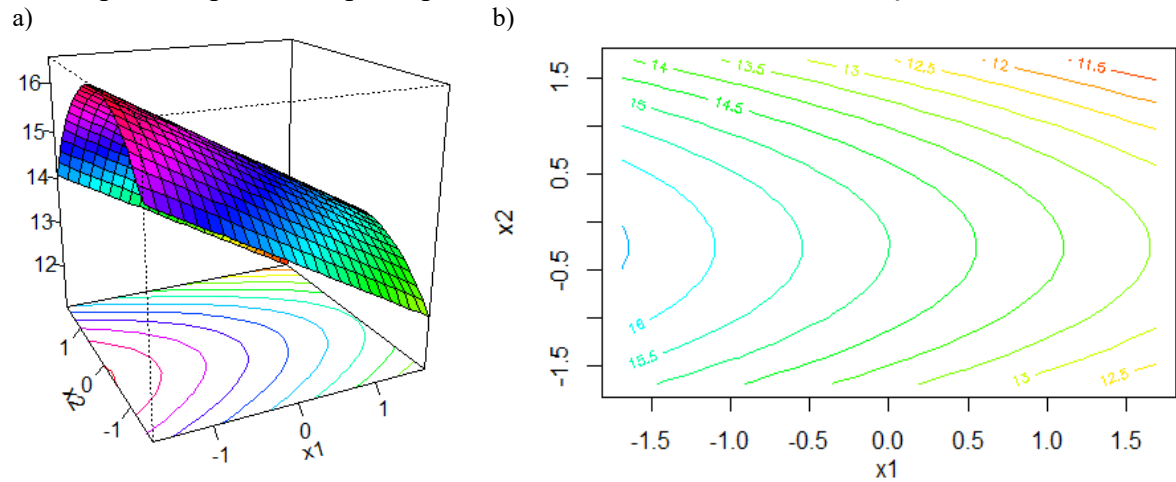


Figura 19 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e concentração, após o pré-tratamento ácido, com temperatura fixada em 1,68

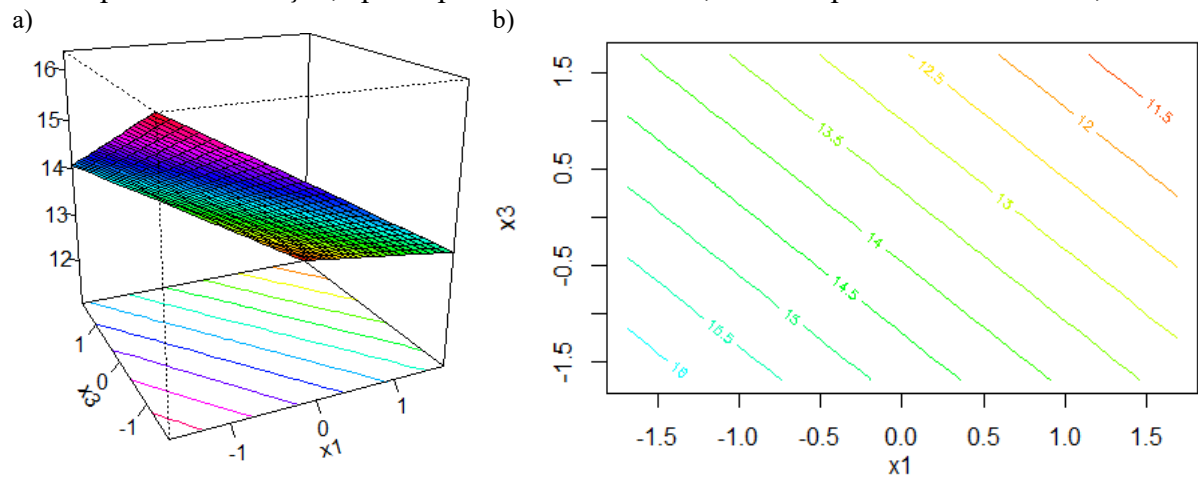
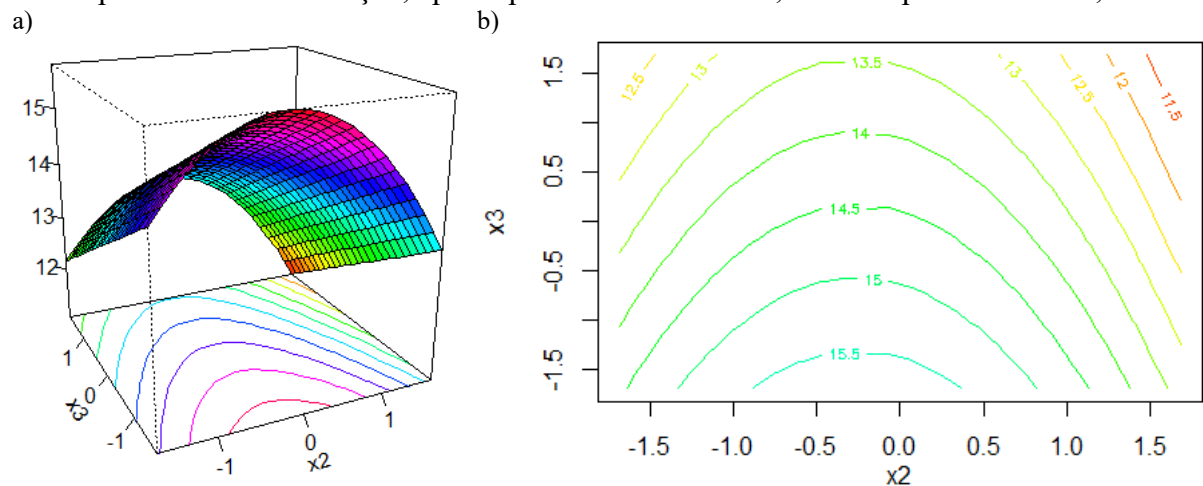


Figura 20 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função da temperatura e concentração, após o pré-tratamento ácido, com tempo fixado em 1,68



Analisando os resultados, foi possível afirmar que as superfícies de resposta e de contorno indicaram como valor predito os fatores x1 (tempo) 27 minutos, x2 (temperatura) 149 °C e x3 (concentração) 3,7%. Selecionou-se como pré-tratamento químico a condição que mais se aproximou das situações ideais, ou seja, Ensaio 8 (22 minutos, 125 °C e 3%). Embora não seja a condição estatística indicada, o ensaio selecionado (com valores aproximados aos preditos) possui melhor remoção de lignina (39,83%), com elevada remoção de hemicelulose (35,86%) e é uma condição indicada nas superfícies apresentadas como vantajosa para a resposta diminuição de lignina. Quando o efeito da presença da lignina é minimizado (deslignificação), a acessibilidade à celulose de baixa cristalinidade pelas enzimas torna-se o mais favorável para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática (JEOH *et al.*, 2007; LIMA, 2018).

Farias *et al.* (2015) afirmam que os resultados obtidos com a análise de FDA e FDN (para cálculo de lignina, celulose e hemicelulose) utilizando o material TNT, apesar de promover redução de custo, pode apresentar maiores desvios quanto ao conteúdo da parede celular, uma vez que é susceptível a retenção de proteínas, pectinas e taninos, devido ao não fracionamento total dos constituintes da parede celular com o detergente neutro. Portanto, tal técnica apresenta-se como limitante quanto ao teor da fração hemicelulósica real presente no material, considerando a solubilização incompleta da hemicelulose com o tratamento com detergente ácido.

Fang, Li e Zhang (2006) explicam que durante o pré-tratamento com ácido diluído, as ligações na lignina e na lignina-hemiceluloses podem sofrer degradação, despolimerização parcial e/ou alterações na organização. O mecanismo de ação do pré-tratamento sobre a lignina pode ocorrer em duas etapas: a primeira seria uma reação muito rápida, onde os fragmentos de lignina de baixa massa molar e elevada reatividade são solubilizados pelo rompimento das ligações lignina-carboidratos e a segunda seria uma reação lenta, onde os fragmentos solúveis reagem uns com os outros, causando a recondensação e repolimerização da lignina (ZHANG; HUANG; RAMASWAMY, 2008).

Guedes (2010) afirma que outra finalidade do pré-tratamento químico é disponibilizar açúcares diretamente fermentescíveis, a partir da lignocelulose, de forma a tornar a celulose mais exposta para que as enzimas capazes de hidrolisar a celulose e hemicelulose em carboidratos monoméricos possam otimizar a conversão da biomassa. Neste contexto, a Tabela **16** apresenta os valores obtidos para as análises de açúcares totais e redutores na fração líquida do RPU antes e depois dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico.

Tabela 16 – Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento ácido

Ensaio	Açúcares Totais (g L ⁻¹)	Açúcares Redutores (g L ⁻¹)
1 (1%, 55 °C, 8 min.)	2,588 ± 0,43	0,369 ± 0,02
2 (1%, 55 °C, 22 min.)	2,494 ± 0,38	0,385 ± 0,11
3 (1%, 125 °C, 8 min.)	2,287 ± 0,02	0,317 ± 0,09
4 (1%, 125 °C, 22 min.)	3,123 ± 0,54	0,439 ± 0,06
5 (3%, 55 °C, 8 min.)	2,662 ± 0,54	0,217 ± 0,01
6 (3%, 55 °C, 22 min.)	2,102 ± 0,37	0,206 ± 0,05
7 (3%, 125 °C, 8 min.)	3,601 ± 0,64	0,187 ± 0,04
8 (3%, 125 °C, 22 min.)	3,436 ± 0,05	0,232 ± 0,01
9 (2%, 90 °C, 3 min.)	2,371 ± 0,23	0,207 ± 0,08
10 (2%, 90 °C, 27 min.)	3,510 ± 0,45	0,137 ± 0,04
11 (2%, 31 °C, 15 min.)	1,631 ± 0,19	0,092 ± 0,06
12 (2%, 149 °C, 15 min.)	5,272 ± 0,29	0,294 ± 0,09
13 (0,3%, 90 °C, 15 min.)	2,339 ± 0,24	0,556 ± 0,03
14 (3,7%, 90 °C, 15 min.)	3,007 ± 0,21	0,196 ± 0,01
15 - 18 (2%, 90 °C, 15 min.)	2,538 ± 0,33	0,156 ± 0,02
RPU bruto	0,722 ± 0,02	0,502 ± 0,04

Fonte: A autora (2023)

Os valores de açúcares totais destes pré-tratamentos variaram entre 1,631 g L⁻¹ e 5,272 g L⁻¹, sendo que a maior conversão ocorreu no Ensaio 12 (2%, 149 °C, 15 min.). Os resultados encontrados na Tabela 16 confirmam que para todos os pré-tratamentos houve ação do ácido sulfúrico diluído sobre a lignina do RPU, com consequente deslignificação. Este fato é comprovado a partir dos valores percentuais de celulose obtidos na maioria dos pré-tratamentos apresentados e aumento dos valores de açúcares totais no meio em todos eles. Manochio *et al.* (2017) afirmam que a exposição da celulose a partir do pré-tratamento ácido facilita o acesso dos agentes hidrolíticos no processo de transformação desta em glicose.

A condição que promoveu maiores concentrações de açúcares redutores após o pré-tratamento foi o Ensaio 13 (0,3%, 90 °C, 15 min.), com valor de 0,556 g L⁻¹. No entanto, no geral, os valores de açúcares redutores representaram, em média, 10% do total de açúcares liberado no meio, representando uma baixa concentração. Aguilar *et al.* (2002) explicam que os açúcares redutores liberados na hidrólise ácida podem derivar tanto da hemicelulose, quanto da celulose. Em geral, os açúcares redutores da celulose (glicose) não são hidrolisados na faixa de condições operacionais comumente usadas para a hidrólise ácida, portanto, é provável que

os açúcares redutores liberados e quantificados neste estudo (xilose e arabinose) decorram das hemiceluloses.

A hidrólise enzimática da celulose é melhorada quando a biomassa pré-tratada possui um baixo teor de hemicelulose, o que confirma a necessidade de condições de temperatura mais elevadas para esta transformação. Em contrapartida, condições operacionais muito severas podem aumentar a degradação dos açúcares, promovendo a formação de inibidores de fermentação e reduzindo a eficiência global do processo de pré-tratamento (ASSUMPÇÃO, 2015). Neste contexto, os experimentos apresentados indicaram que o ácido sulfúrico fornece respostas positivas e eficazes quanto a remoção de lignina e de hemicelulose e conversão destes em açúcares totais.

5.1.2 Pré-tratamento Alcalino: Hidróxido de Sódio

De acordo com Singh, Suhag e Dhaka (2015), pré-tratamentos com hidróxido de sódio possuem excelente capacidade de deslignificação, quando comparados a outros reagentes, e alta digestibilidade da biomassa. Os resultados de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação dos pré-tratamentos químicos com hidróxido de sódio na fração sólida do RPU pré-tratado, variando os fatores concentração, temperatura e tempo são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento alcalino

Ensaio	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Balanço de Massa (%)	Rendimento (%)	Deslignificação (%)
1 (3%, 50 °C, 7h)	11,50 ± 0,21	35,63 ± 1,02	23,45 ± 1,31	0,65 ± 0,73	70,58	89,17	44,60
2 (3%, 50 °C, 23h)	14,17 ± 0,38	37,75 ± 0,16	21,79 ± 0,84	0,67 ± 0,40	73,71	90,82	30,44
3 (3%, 90 °C, 7h)	11,33 ± 0,77	45,56 ± 1,61	21,37 ± 2,22	1,55 ± 0,23	78,26	91,17	44,16
4 (3%, 90 °C, 23h)	13,49 ± 0,55	46,02 ± 0,40	24,24 ± 0,17	1,02 ± 0,73	83,75	92,93	32,24
5 (8%, 50 °C, 7h)	13,59 ± 0,04	32,62 ± 0,88	21,31 ± 1,40	1,03 ± 0,35	67,52	89,06	34,60
6 (8%, 50 °C, 23h)	13,59 ± 0,56	37,25 ± 2,40	23,40 ± 0,53	0,68 ± 0,01	74,24	90,75	33,34
7 (8%, 90 °C, 7h)	15,32 ± 0,41	42,01 ± 0,65	21,16 ± 0,54	1,50 ± 0,30	78,49	91,24	24,46
8 (8%, 90 °C, 23h)	11,29 ± 0,39	45,16 ± 2,00	21,45 ± 2,25	2,01 ± 1,43	77,90	92,32	43,65
9 (5,5%, 70 °C, 2h)	17,59 ± 0,38	41,68 ± 1,81	17,94 ± 0,53	0,90 ± 0,20	77,21	91,38	13,14

10 (5,5%, 70 °C, 28h)	10,33 ± 0,42	42,45 ± 4,33	18,48 ± 3,36	1,56 ± 0,52	71,26	92,46	48,37
11 (5,5%, 36 °C, 15h)	14,51 ± 0,54	34,60 ± 2,45	31,42 ± 1,45	0,90 ± 0,71	80,53	89,57	29,79
12 (5,5%, 104 °C, 15h)	9,41 ± 0,53	48,53 ± 1,27	19,69 ± 1,14	3,14 ± 0,29	77,63	92,47	52,97
13 (1,3%, 70 °C, 15h)	13,79 ± 0,34	32,38 ± 1,34	26,39 ± 0,49	1,17 ± 0,67	72,56	90,68	32,40
14 (9,7%, 70 °C, 15h)	14,56 ± 0,58	37,96 ± 2,18	23,08 ± 2,54	1,12 ± 0,24	75,6	91,05	28,37
15 - 18 (5,5%, 70 °C, 15h)	16,64 ± 0,49	39,10 ± 2,47	20,71 ± 2,01	1,45 ± 0,13	76,45	91,57	17,66
RPU bruto	18,51 ± 0,79	21,79 ± 0,62	32,99 ± 0,64	1,24 ± 0,65	73,29	-	-

Fonte: A autora (2023)

A partir dos dados apresentados, é possível confirmar que este pré-tratamento promoveu elevados valores de deslignificação e alto rendimento do processo.

O Ensaio 12 (5,5%, 104 °C e 15h) apresentou menores valores de lignina (9,41%) e, conseqüentemente, maior deslignificação (52,97%). Valores condizentes foram encontrados por Xie *et al.* (2011) que, tratando resíduo de silagem de grama com NaOH, concluíram que o aumento da temperatura e o aumento da concentração do reagente promovem maiores taxas de deslignificação. Os autores obtiveram cerca de 45% de redução de lignina ao tratar silagem de grama com 5% de NaOH a 100 °C.

Bastos (2020) afirma que as mudanças estruturais das fibras após o pré-tratamento alcalino com NaOH melhoram a etapa metanogênica na digestão anaeróbia, visto que os compostos biodegradáveis (celulose e hemicelulose) estão facilmente acessíveis, otimizando suas conversões em biogás. Ainda, Andrade *et al.* (2018) explicam que quando o pré-tratamento alcalino é utilizado em uma biomassa lignocelulósica, a ruptura do material lignocelulósico promove o aumento da área superficial para a atuação dos microrganismos anaeróbios, o que pode otimizar a digestão anaeróbia. Além disso, o pré-tratamento alcalino atua solubilizando a hemicelulose e permite a preservação de carboidratos facilmente solúveis, que podem ser utilizados como precursores do biogás.

A maioria dos reagentes utilizados em pré-tratamento alcalino, especialmente hidróxido de sódio, tem como objetivo quebrar as ligações éster-carboidratos da lignina e dos grupos acetil da hemicelulose, ocasionando um inchamento da biomassa, de forma a reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a superfície de contato e de porosidade da mesma. Portanto, estas reações contribuem com a solubilização e extração da lignina da biomassa (SOUSA *et al.*, 2009).

Para verificar a relação entre o teor de lignina do resíduo pré-tratado e as demais variáveis do processo (concentração, temperatura e tempo de residência), os resultados foram submetidos à análise de variância, a nível de 10% de significância (Tabela 18).

Tabela 18 – Análise de variância para pré-tratamento alcalino

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
x2	1	7,2910	7,2912	1,5859	0,23006
I(x2 ²)	1	15,7280	15,7283	3,4209	0,08723
Resíduo	13	59,7700	4,5977		
Total	15				

Fonte: A autora (2023)

Pela ANOVA, apenas a temperatura apresentou efeito significativo para a remoção de lignina. Esta afirmação pode ser confirmada quando avaliado os resultados obtidos para este experimento, uma vez que a condição com maior temperatura (104 °C) apresentou maior remoção de lignina e elevado rendimento do processo. Dutra (2018) explica que durante o processo de pré-tratamento com hidróxido de sódio, pode ocorrer forte desestruturação da biomassa, considerável rearranjo das moléculas e aumento na densidade de empacotamento da celulose, confirmando o aumento dos valores desta ao final do pré-tratamento.

Com base nos resultados do DCCR desenvolvido, obteve-se as superfícies de resposta e de contorno para as variações dos fatores concentração, temperatura e tempo de residência em função da remoção de lignina (Figuras 21, 22 e 23).

De forma geral, todas as condições testadas apresentaram respostas relevantes acerca da remoção de lignina. No entanto, ao avaliar estatisticamente os resultados, as superfícies de resposta e de contorno não indicaram uma única região ótima para deslignificação.

Figura 21 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento alcalino, com concentração fixada em 1,68

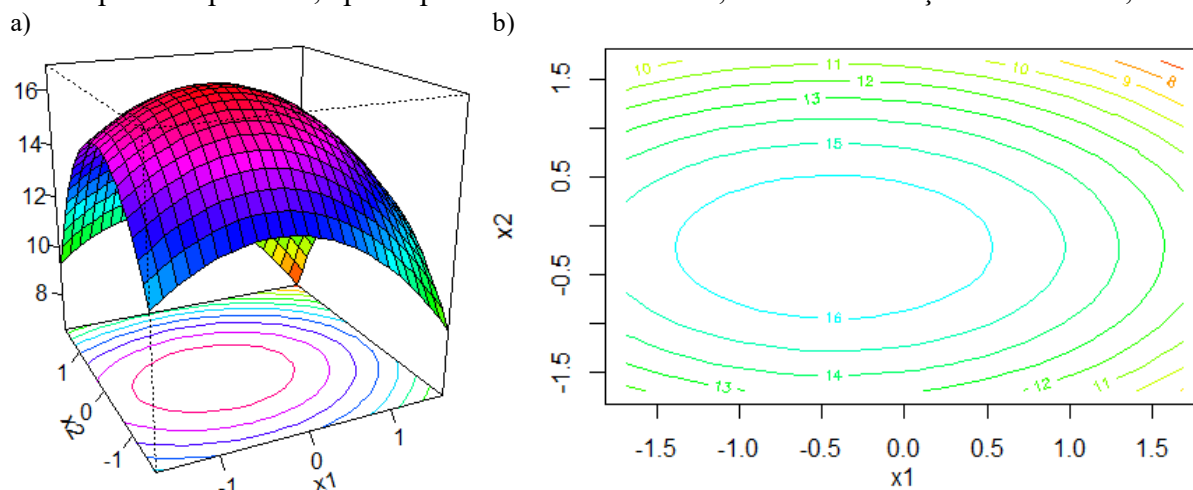


Figura 22 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e concentração, após o pré-tratamento alcalino, com temperatura fixada em 1,68

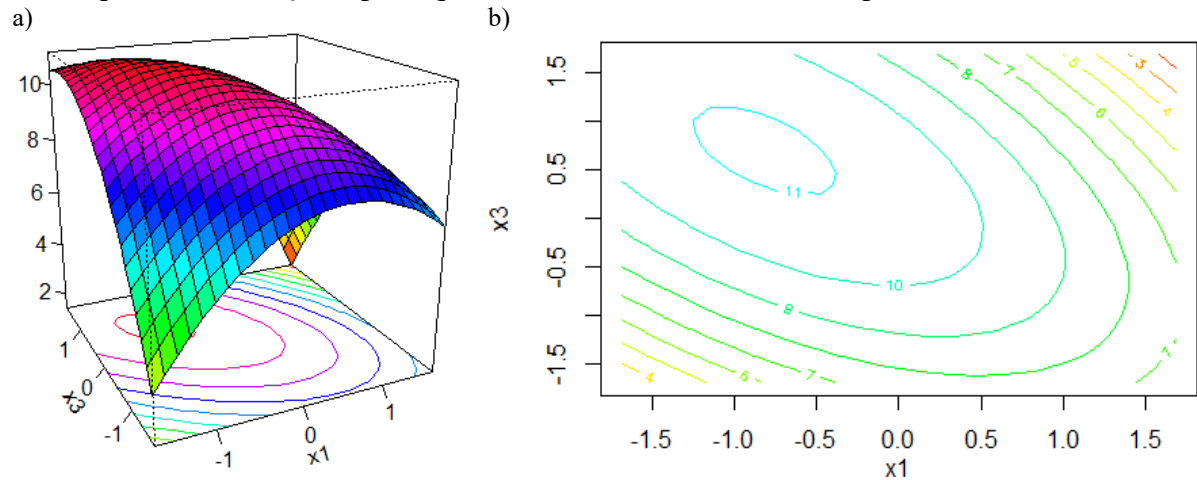
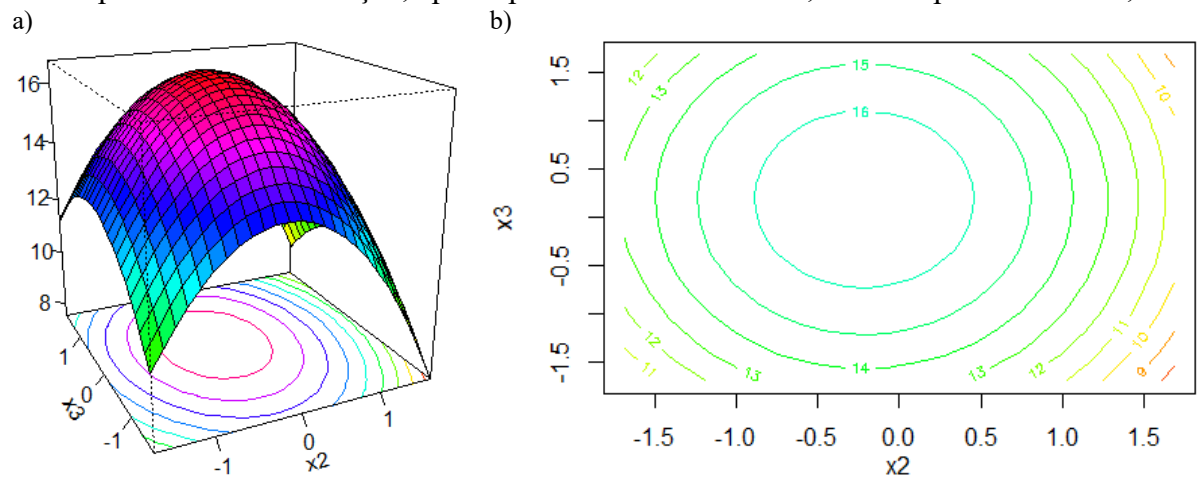


Figura 23 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função da temperatura e concentração, após o pré-tratamento alcalino, com tempo fixado em 1,68



A obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos tem sido apontado como uma alternativa para aumento significativo da produção de biogás. A Tabela 19 mostra os resultados obtidos de açúcares totais e redutores na fração líquida do RPU após o pré-tratamento com hidróxido de sódio para todas as condições avaliadas.

Tabela 19 - Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento alcalino

Ensaio	Açúcares Totais (g L ⁻¹)	Açúcares Redutores (g L ⁻¹)
1 (3%, 50 °C, 7h)	20,845 ± 1,33	1,122 ± 0,33
2 (3%, 50 °C, 23h)	18,488 ± 0,64	1,131 ± 0,13
3 (3%, 90 °C, 7h)	17,508 ± 1,37	1,435 ± 0,09
4 (3%, 90 °C, 23h)	15,271 ± 1,53	1,767 ± 0,37
5 (8%, 50 °C, 7h)	16,722 ± 0,58	1,249 ± 0,22
6 (8%, 50 °C, 23h)	22,491 ± 0,47	2,315 ± 0,42

7 (8%, 90 °C, 7h)	20,688 ± 0,82	2,053 ± 0,32
8 (8%, 90 °C, 23h)	21,871 ± 0,64	1,760 ± 0,07
9 (5,5%, 70 °C, 2h)	18,368 ± 0,68	1,336 ± 0,09
10 (5,5%, 70 °C, 28h)	19,468 ± 0,22	1,563 ± 0,08
11 (5,5%, 36 °C, 15h)	22,537 ± 1,14	0,983 ± 0,03
12 (5,5%, 104 °C, 15h)	23,998 ± 0,95	4,180 ± 0,58
13 (1,3%, 70 °C, 15h)	13,338 ± 2,09	1,761 ± 0,07
14 (9,7%, 70 °C, 15h)	21,122 ± 0,97	1,577 ± 0,12
15 - 18 (5,5%, 70 °C, 15h)	20,924 ± 1,23	1,384 ± 0,17
RPU bruto	0,722 ± 0,02	0,502 ± 0,04

Fonte: A autora (2023)

Os resultados expressos na Tabela 19 indicam aumento significativo de açúcares totais em todas as condições avaliadas, no entanto, a condição com maior remoção de lignina (Ensaio 12 - 5,5%, 104 °C, 15h) também foi a que mais converteu os componentes da parede celular do RPU em açúcares totais (23,998 g L⁻¹) - aumento de, aproximadamente, 33 vezes quando comparado ao resíduo de poda urbana bruto - e redutores (4,180 g L⁻¹).

Em geral, os microrganismos preferem utilizar glicose como substrato antes de consumir outro açúcar (GONG; CAO, TSAO, 1999). De acordo com o estudo desenvolvido por Gong, Cao e Tsao (1999), quando as hemiceluloses são hidrolisadas, uma mistura de monossacarídeos é produzida e os açúcares liberados são, predominantemente, xilose, arabinose e glicose. Ao serem expostos a esta mistura de açúcares, o fenômeno de repressão catabólica é frequentemente observado e os microrganismos irão consumir glicose antes de consumir xilose e arabinose.

Assim, pode-se afirmar que a alta conversão dos componentes da biomassa em açúcares otimizará a produção de biogás a partir dos microrganismos, especialmente após o pré-tratamento alcalino, cujo aumento destes no meio é um indicativo promissor para esta ação microbiana.

5.1.3 Pré-tratamento Físico: Auto-hidrólise

Os métodos hidrotérmicos utilizam água e/ou vapor e calor para o tratamento do material lignocelulósico. Assim, visando avaliar a eficiência do pré-tratamento por auto-hidrólise no que se refere a remoção de lignina do RPU, foram avaliados diferentes tempos de processo e os resultados estão apresentados na Tabela 20, a qual apresenta os valores obtidos

para lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação na fração sólida do RPU pré-tratado.

Tabela 20 - Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento auto-hidrólise

Ensaio	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Balanço de Massa (%)	Rendimento (%)	Deslignificação (%)
1 (5 minutos)	16,55 ± 0,48 ^a	23,47 ± 1,30	30,92 ± 3,18	0,99 ± 0,14	70,94	91,82	17,88
2 (10 minutos)	14,58 ± 0,51 ^b	28,22 ± 1,48	28,00 ± 0,79	0,63 ± 0,50	70,80	92,57	27,06
3 (15 minutos)	13,44 ± 0,53 ^c	27,90 ± 1,68	25,70 ± 0,26	1,74 ± 0,60	67,04	92,83	32,58
RPU bruto	18,51 ± 0,79	21,79 ± 0,62	32,99 ± 0,64	1,24 ± 0,65	73,29	-	-

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023)

Embora nem todos os pré-tratamentos resultem em deslignificação significativa dos materiais lignocelulósicos, as alterações ocasionadas na lignina podem causar modificações em sua estrutura e melhorias nos resultados de bioconversão. Dos tratamentos investigados, a auto-hidrólise realizada no Ensaio 3 (15 minutos) apresentou menores valores de lignina (13,44%), alto rendimento do processo (92,83%) e elevada deslignificação (32,58%).

Oliveira (2012) e Gomes (2019) explicam que como as hemiceluloses tem uma estrutura supramolecular amorfa e de mais fácil acesso do que a celulose, a impregnação de vapor provoca hidrólise preferencialmente das hemiceluloses, removendo-a do material pré-tratado, fato este comprovado a partir dos dados obtidos com o pré-tratamento de auto-hidrólise, uma vez que em todas as condições houve redução dos teores de hemicelulose de 6,27%, 14,46% e 15,43% nos tratamentos com tempo de residência de 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. De maneira geral, observa-se, ainda, um aumento no valor percentual de celulose com o aumento do fator de severidade do pré-tratamento, explicado pela dissolução da hemicelulose e rearranjo ou migração da lignina na biomassa pré-tratada (ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2015).

Como a lignina dificulta o acesso à celulose, busca-se um pré-tratamento eficiente e de baixo custo para tentar melhorar a digestibilidade da biomassa e torná-la mais acessível à clivagem das enzimas que hidrolisam a celulose em glicose. A Tabela 21 apresenta os valores de açúcares totais e redutores obtidos na fração líquida após o processo de auto-hidrólise do RPU.

Tabela 21 - Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento por auto-hidrólise

Ensaio	Açúcares Totais (g L ⁻¹)	Açúcares Redutores (g L ⁻¹)
1 (5 minutos)	3,745 ± 0,16	1,276 ± 0,07
2 (10 minutos)	4,533 ± 0,27	1,283 ± 0,03
3 (15 minutos)	4,871 ± 0,29	1,396 ± 0,03
RPU bruto	0,722 ± 0,02	0,502 ± 0,04

Fonte: A autora (2023)

Todas as condições avaliadas apresentaram valores satisfatórios para açúcares totais e redutores após o pré-tratamento, no entanto, quando submetido a maior tempo de residência (15 minutos), o pré-tratamento promoveu melhores conversões de açúcares (4,871 g L⁻¹).

A remoção da lignina e a solubilização da hemicelulose faz com que a biomassa pré-tratada se torne mais digestível via enzimática do que a biomassa bruta, no entanto, deve-se garantir que o pré-tratamento empregado não produza compostos inibitórios (AGBOR *et al.*, 2011). Freitas (2011) afirma que, geralmente, os principais produtos da auto-hidrólise são monossacarídeos, mistura de oligossacarídeos, ácido acético e produtos de degradação dos monossacarídeos, como furfural e hidroximetilfurfural, os quais podem ainda sofrer reações de decomposição, dando origem ao ácido fórmico e levulínico. Portanto, mesmo que este pré-tratamento não resulte em valores expressivos quanto alteração físico-química do resíduo lignocelulósico, representa uma alternativa tecnológica relevante, principalmente pela não adição de insumos químicos e baixo custo operacional.

5.1.4 Pré-tratamento Biológico: Basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*

A Tabela 22 mostra os valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação obtidos na fração sólida do RPU após o pré-tratamento biológico com fungo *Pleurotus ostreatus*, variando seu tempo de incubação e temperatura.

Tabela 22 - Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento biológico

Ensaio	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Balanço de Massa (%)	Rendimento (%)	Deslignificação (%)
1 (25 °C - 7 dias)	14,40 ± 0,84	22,80 ± 0,75	27,35 ± 0,51	2,21 ± 1,36	64,55	90,85	29,33
2 (25 °C - 21 dias)	13,59 ± 0,29	24,82 ± 0,32	30,34 ± 1,29	1,81 ± 0,02	68,75	90,82	33,28
3 (31 °C - 7 dias)	15,49 ± 0,56	22,78 ± 0,51	29,95 ± 0,74	0,47 ± 0,07	68,21	91,33	23,57
4 (31 °C - 21 dias)	16,80 ± 0,31	21,97 ± 0,46	27,13 ± 0,22	0,28 ± 0,00	65,90	90,63	17,70

5 (28 °C - 4 dias)	14,50 ± 0,61	25,25 ± 0,74	31,71 ± 1,85	079 ± 0,31	71,46	92,09	27,83
6 (28 °C - 24 dias)	17,56 ± 0,45	23,10 ± 0,16	25,76 ± 0,11	0,56 ± 0,20	66,42	91,66	13,04
7 (24 °C - 14 dias)	14,16 ± 0,45	26,02 ± 1,66	29,78 ± 0,82	1,04 ± 0,49	69,96	91,6	29,89
8 (32 °C - 14 dias)	14,84 ± 0,12	25,11 ± 1,25	26,06 ± 0,67	1,68 ± 0,91	66,01	91,58	26,54
9 - 12 (28 °C - 14 dias)	12,46 ± 0,56	27,38 ± 2,04	27,09 ± 1,54	2,03 ± 0,66	66,93	92,11	37,98
RPU bruto	18,51 ± 0,79	21,79 ± 0,62	32,99 ± 0,64	1,24 ± 0,65	73,29	-	-

Fonte: A autora (2023)

Os dados apresentados mostraram que em todos os tratamentos avaliados houve redução dos teores de lignina e hemicelulose, com pequena diferença nos teores de celulose. A condição que se mostrou mais satisfatória para a deslignificação foi a incubação dos fungos durante 14 dias a 28 °C (37,98%), com rendimento do processo de 92,11%.

A maioria dos estudos relatam que um dos efeitos do pré-tratamento biológico é a diminuição da celulose devido à liberação de açúcares. No entanto, não foi o que houve neste experimento. Esta discrepância está relacionada ao basidiomiceto utilizado para os ensaios, haja vista que o *Pleurotus ostreatus* refere-se a um fungo ligninolítico, atuando exclusivamente sobre a lignina e promovendo a despolimerização desta. Assim, o aumento do percentual de celulose neste estudo é justificado pela degradação da lignina, que deixa a celulose mais disponível e facilita o acesso desta pelas celulasas (GOMEZ *et al.*, 2020).

Os resultados estatísticos estão indicados na Tabela 23 e tanto o tempo de incubação, quanto a temperatura foram fatores significativos para este pré-tratamento, a nível de significância de 10%.

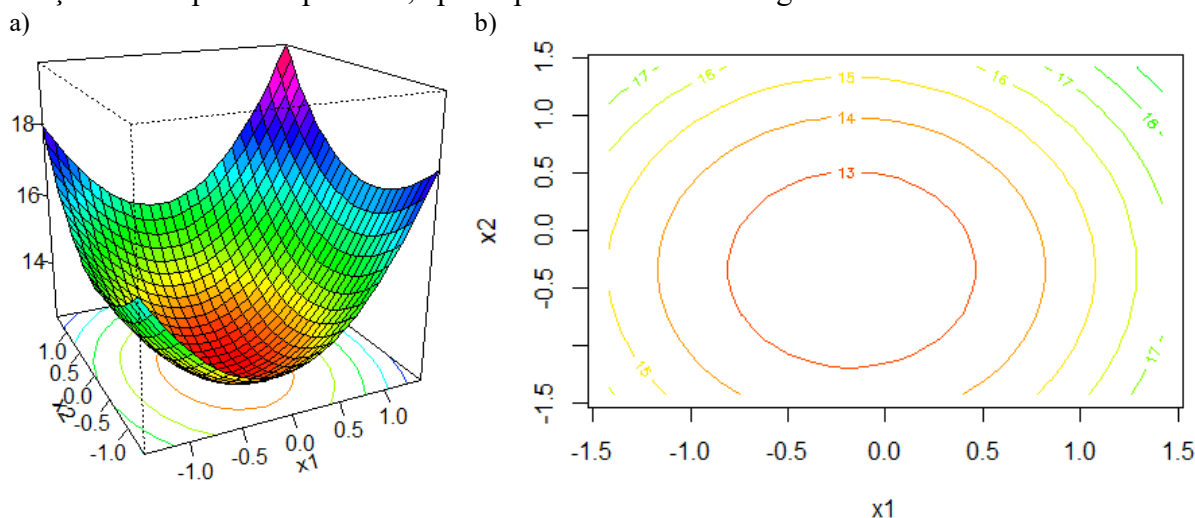
Tabela 23 - Análise de variância para pré-tratamento biológico

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
x1	1	2,9249	2,9249	4,1272	0,081725
x2	1	3,4610	3,4610	4,8838	0,062804
I(x2 ²)	1	2,6139	2,6139	3,6884	0,096256
I(x1 ²)	1	19,2790	19,2790	27,2042	0,001232
Resíduo	7	4,9608	0,7087		

Fonte: A autora (2023)

A partir dos resultados obtidos, as superfícies de resposta e de contorno para as variações dos fatores tempo de incubação e temperatura, em função da remoção de lignina, foram elaboradas (Figura 24).

Figura 24 - Superfícies de resposta (a) e de contorno (b) para obtenção de lignina em função do tempo e temperatura, após o pré-tratamento biológico



Os resultados obtidos indicam que em temperatura 28 °C durante 14 dias de incubação obtém-se menores concentrações de lignina, ou seja, nesta condição há melhor remoção de lignina.

De acordo com Gomez *et al.* (2020), o tempo ideal de incubação de fungos de podridão branca pode variar dependendo do substrato e a principal razão para estas variações está relacionada a umidade do resíduo, tamanho das partículas e processo de esterilização, sendo que este último pode, inclusive, atuar como uma etapa adicional de pré-tratamento, potencializando a solubilização da lignina e hemicelulose do substrato.

A identificação da concentração de açúcares após os pré-tratamentos é de extrema relevância, especialmente porque estes são a principal fonte de carbono para a maioria dos microrganismos que o convertem a biogás, foco do estudo. Os valores de açúcares totais e redutores foram obtidos na fração líquida antes e após os pré-tratamentos biológicos e podem ser avaliados na Tabela 24.

Tabela 24 - Açúcares totais e açúcares redutores após pré-tratamento biológico

Ensaio	Açúcares Totais (g L ⁻¹)	Açúcares Redutores (g L ⁻¹)
1 (25 °C - 7 dias)	7,261 ± 0,77	5,232 ± 0,22
2 (25 °C - 21 dias)	3,187 ± 0,32	0,839 ± 0,08
3 (31 °C - 7 dias)	6,078 ± 0,62	3,606 ± 0,12
4 (31 °C - 21 dias)	4,446 ± 0,17	1,127 ± 0,09
5 (28 °C - 4 dias)	8,067 ± 0,62	6,569 ± 0,32
6 (28 °C - 24 dias)	2,733 ± 0,44	0,639 ± 0,07
7 (24 °C - 14 dias)	4,019 ± 0,43	0,687 ± 0,01

8 (32 °C - 14 dias)	2,368 ± 0,19	0,835 ± 0,01
9 - 12 (28 °C - 14 dias)	3,678 ± 0,29	0,837 ± 0,08
RPU bruto	0,722 ± 0,02	0,502 ± 0,04

Fonte: A autora (2023)

O Ensaio 5 (28 °C, 4 dias) apresentou maiores valores de açúcares totais e redutores (8,067 g L⁻¹ e 6,569 g L⁻¹, respectivamente) após o pré-tratamento com o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*. A partir desta caracterização, afirma-se o quão eficiente foi a etapa de pré-tratamento biológico para o aumento da liberação de açúcares totais a partir das biomassas, indicando uma maior exposição das fibras pertencentes a celulose e hemicelulose às enzimas hidrolíticas. Gomes (2019) explica que após o pré-tratamento biológico, o RPU passa pela etapa de hidrólise enzimática e uma série de enzimas ligninolíticas atuam, disponibilizando açúcares redutores.

Considerando que a lacase é uma enzima produzida pelo *Pleurotus ostreatus* e está relacionada à biodegradação de substratos lignocelulósicos, avaliou-se a produção de lacase para as condições experimentais do pré-tratamento biológico e os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Atividade enzimática da lacase após os pré-tratamentos biológicos

Ensaio	Atividade Enzimática - Lacase (U mL ⁻¹)
Controle: 4 dias	-
Controle: 7 dias	-
Controle: 14 dias	-
Controle: 21 dias	-
Controle: 24 dias	-
1 (25 °C - 7 dias)	0,830 ± 0,008
2 (25 °C - 21 dias)	1,288 ± 0,028
3 (31 °C - 7 dias)	2,946 ± 0,014
4 (31 °C - 21 dias)	5,844 ± 0,059
5 (28 °C - 4 dias)	0,314 ± 0,025
6 (28 °C - 24 dias)	7,152 ± 0,382
7 (24 °C - 14 dias)	7,080 ± 0,144
8 (32 °C - 14 dias)	3,524 ± 0,396
9 - 12 (28 °C - 14 dias)	9,408 ± 0,153

Fonte: A autora (2023)

As condições de controle referem-se ao RPU bruto incubado nos tempos informados. Primeiramente, observa-se que, sem exceção, todos os cultivos realizados após o pré-tratamento biológico apresentaram atividades de lacase mais altas do que seus controles, uma vez que sem a presença do *Pleurotus ostreatus*, não há atividade enzimática no substrato.

A maior atividade enzimática foi obtida nos Ensaios 9 - 12, com valor de 9,408 U mL⁻¹ e a menor atividade da lacase ocorreu no Ensaio 1, com valor de 0,830 U mL⁻¹. Ambas as condições apresentaram tempos de incubação e temperaturas diferentes. A produção de lacase pode ser influenciada por alguns parâmetros, como tempo de cultivo, agitação, tipo e concentração da fonte de carbono e/ou nitrogênio, a presença ou ausência de indutores, pH do meio, temperatura, dentre outros (STRONG; CLAUS, 2011).

É possível verificar que ao fixar a temperatura e variar o tempo de incubação, as maiores atividades enzimáticas ocorreram nos maiores períodos incubados. Franco (2019), ao estudar três diferentes fungos (dentre eles o *Pleurotus ostreatus*) como produtores de lacase, concluiu que o tempo de incubação foi a variável que mais influenciou na produção da enzima.

Por sua vez, ao fixar o tempo de incubação em 14 dias e variar a temperatura, é possível notar que o comportamento de produção de lacase seguiu o mesmo padrão de remoção de lignina: aos 32 °C apresentou os menores resultados de atividade enzimática e deslignificação da condição (3,524 U mL⁻¹ e 26,54%, respectivamente), aos 24 °C apresentou valores de 7,080 U mL⁻¹ para atividade da lacase e 29,89% para deslignificação e aos 28 °C apresentou atividade enzimática de 9,408 U mL⁻¹ e deslignificação de 37,98%. Estes resultados sugerem que a temperatura pode influenciar na produção de lacase e na remoção de lignina (Tabela 23).

Em posse dos resultados desta primeira etapa experimental, foi possível concluir que todas as condições de pré-tratamento obtiveram menores valores de lignina, quando comparados ao RPU bruto. Porém, para dar prosseguimento ao estudo, escolheu-se as melhores condições experimentais de cada um dos pré-tratamentos, considerando não só as maiores remoções de lignina (deslignificação), mas também rendimentos do processo, conversão de açúcares totais e redutores, remoção dos teores de hemicelulose e maior exposição de celulose. Selecionou-se, portanto, as condições de pré-tratamento apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26 – Condições de pré-tratamento do RPU selecionadas para continuidade do estudo

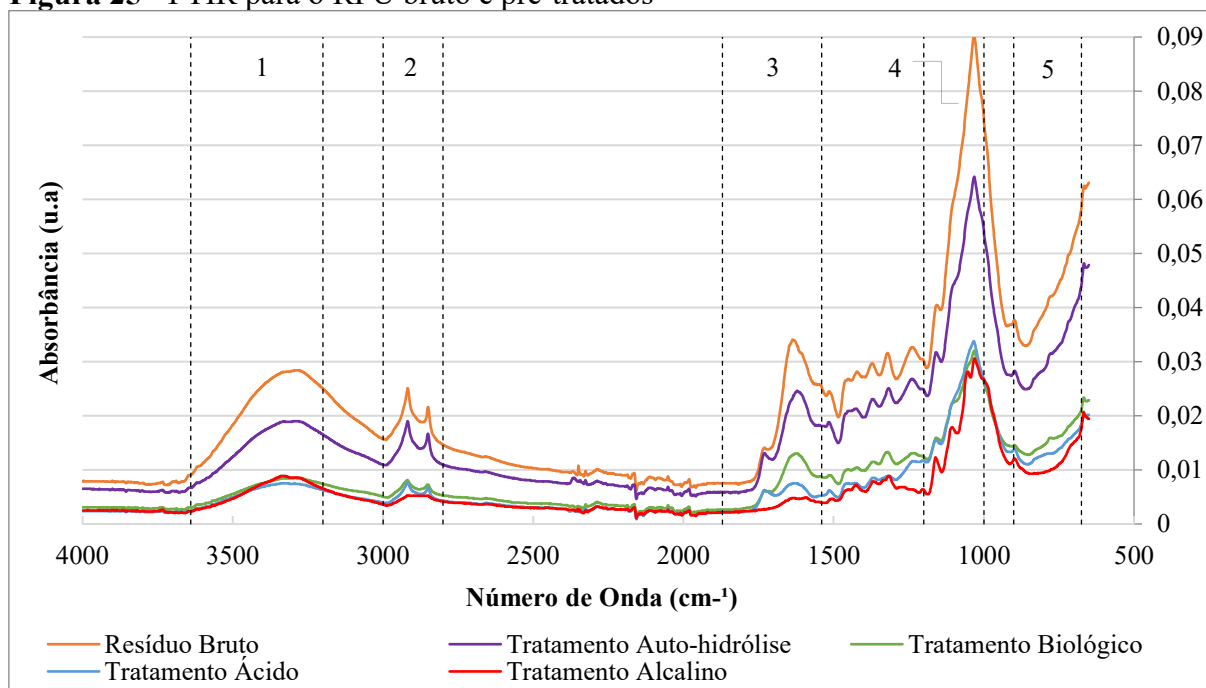
Pré-tratamento	Condição selecionada
Químico: Ácido Sulfúrico	Ensaio 8: 3%, 125 °C, 22 minutos
Químico: Hidróxido de Sódio	Ensaio 12: 5,5%, 104 °C, 15 horas
Físico: Auto-hidrólise	Ensaio 3: 15 minutos, 121 °C
Biológico: Basidiomiceto <i>Pleurotus ostreatus</i>	Ensaio 9 - 12: 28 °C, 14 dias

Fonte: A autora (2023)

5.1.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma excelente ferramenta na análise química de biomassas lignocelulósicas, por não ser destrutiva e requerer mínima preparação da amostra. Ela foi empregada para a identificação dos grupos funcionais, tais como álcoois, ácidos carboxílicos, cetonas e anéis aromático, existentes no RPU bruto e melhores condições dos RPU pré-tratados na região entre 650 e 4000 cm^{-1} . Em virtude da sua estrutura vegetal ser complexa, as bandas espectrais identificadas foram atribuídas aos três componentes principais: lignina, celulose e hemicelulose. Os resultados desta caracterização estão na Figura 25.

Figura 25 - FTIR para o RPU bruto e pré-tratados



Fonte: A autora (2023)

Com o espectrograma apresentado é possível identificar cinco bandas espectrais específicas (1 a 5) e atribuí-las aos grupos funcionais existentes no RPU. Na Tabela 27 são apresentadas o valor máximo dos números de onda para cada intervalo identificado.

Tabela 27 – Valores máximos dos números de onda do FTIR

Pico	Número de Onda Máximo (cm^{-1})
1	3296
2	2918
3	1637
4	1032
5	675

Fonte: A autora (2023)

A Tabela 28 apresenta as atribuições típicas dos grupos funcionais para os principais componentes da biomassa lignocelulósica.

Tabela 28 - Atribuições típicas dos componentes da biomassa lignocelulósica

Faixa de número de onda (cm ⁻¹)	Grupos Funcionais	Atribuição
3640 - 3200	Vibração axial da hidroxila (OH)	Celulose e lignina
3000 - 2840	Deformação axial de alcanos (típico CH ₂ e CH ₃). Estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos	Extrativos, celulose e lignina
1870-1540	Deformação axial de C=O (ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos)	Hemicelulose
1610-1516	Vibração da quinona e dos anéis aromáticos	Lignina
1420-1330	Vibração de deformação angular no plano OH (fenóis).	Lignina e carboidratos
1400-1200	Deformação CH	Hemicelulose
1200-1000	Vibração de deformação grupos acetatos Estiramento C-O-H de álcoois primários e secundários. Estiramento de ligações glicosídicas. Vibração C-O-C de anéis aromáticos	Celulose e hemicelulose
1170-1114	Deformação das ligações C-O (éter) e deformação de OH de álcoois primários	Celulose e lignina
1150-1085	Deformação axial de éteres alifáticos	Lignina
900-675	Vibração angular CH de anéis aromáticos	Lignina
600-420	Deformação angular dos derivados do benzeno	Lignina

Fonte: Silverstein, Webster e Kiemle (2006)

De acordo com a Tabela 28, que discrimina importantes regiões de absorção do material lignocelulósico no espectro de infravermelho e suas atribuições, pode-se comparar os resultados obtidos para os diferentes pré-tratamentos. Destaca-se que se alguns picos em menores intensidades foram encontrados nesta análise, mas apresentam-se com grandes variações e ruídos e, por isso, foram desconsiderados.

As amostras de resíduo de poda urbana pré-tratadas mantiveram o mesmo perfil de bandas características de biomassa do material bruto, porém, com variações importantes nas intensidades de absorção. Os espectros dos RPU pré-tratados apresentaram os mesmos grupos funcionais do RPU bruto, mas a intensidade da absorbância foi menor, o que comprova que os componentes da biomassa lignocelulósica sofreram alterações significativas após o uso de técnicas para facilitar seu acesso.

O pico 1, situado na banda larga 3460 - 3412 cm⁻¹, é referente ao estiramento O-H e está relacionada a presença de álcoois e fenóis com ligação de hidrogênio (ASSUMPÇÃO, 2015). Estes grupos funcionais podem ser atribuídos a celulose e a lignina.

O pico 2, situado na banda 3000 – 2840 cm⁻¹ e com valor máximo em 2918 cm⁻¹, refere-se à deformação axial de alcanos, normalmente grupos metil e metilenos (CH₃ e CH₂) e/ou estiramento C-H em grupos metílicos e metilênicos. São predominantes na celulose, nos extrativos e na lignina e presentes em maior proporção no RPU bruto. Embora estejam presentes

em todas as condições avaliadas, em cada amostra aparece com uma intensidade e alargamento diferentes, sugerindo grupos alifáticos diferentes e em quantidades diferentes em cada uma das amostras (QUINELATO, 2016).

Para a banda $1870 - 1540 \text{ cm}^{-1}$, relacionada ao pico 3, há o início de deformação axial de C=O (ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos), atribuído a hemicelulose. Nota-se que este pico reduz significativamente após os pré-tratamentos, corroborando com a redução percentual de hemicelulose na biomassa em todas as condições. Assumpção (2015) explica que esta redução ocorre em função da característica amorfa da hemicelulose, que a torna mais susceptível a quebra de ligações.

Já o pico 4 ($1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$), atribuído a celulose e hemicelulose, refere-se ao estiramento C-O-H de álcoois primários e secundários e estiramento de ligações glicosídicas, bem como a vibração C-O-C de anéis aromáticos.

Por fim, em relação ao pico 5, referente a banda $900 - 675 \text{ cm}^{-1}$, atribui-se a lignina, com relação aos grupos funcionais que possuem vibração angular CH de anéis aromáticos. O pico máximo indicado em 675 cm^{-1} , caracterizado pela deformação angular de ligações de hidrocarbonetos (C-H) provenientes de grupos aromáticos da lignina, sofreu redução em todas as condições após as amostras serem submetidas aos pré-tratamentos.

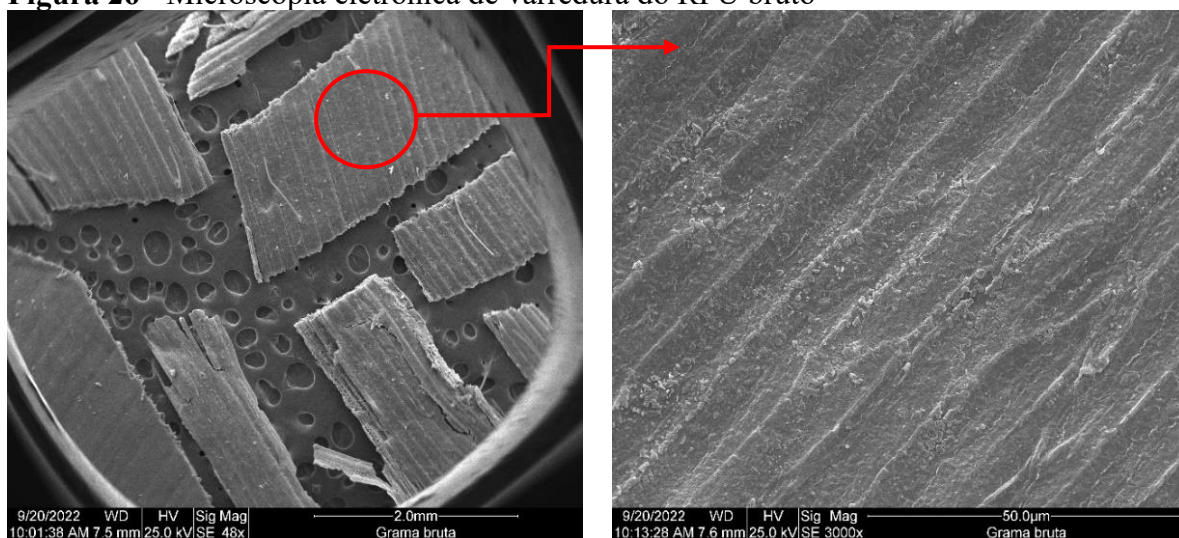
As análises do FTIR confirmaram as alterações na estrutura química do resíduo de poda urbana após as melhores condições de cada um dos pré-tratamentos e em todas as condições foram encontradas evidências da remoção da lignina e hemicelulose no RPU bruto. Afirma-se que esta remoção está relacionada a diminuição da intensidade da absorbância quando comparado os pré-tratamentos o RPU bruto. Estes resultados corroboram com os resultados de caracterização mostrados anteriormente, os quais apresentam a remoção destes compostos após os pré-tratamentos.

5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

O uso do microscópio eletrônico de varredura é útil na identificação das variações morfológicas da biomassa lignocelulósica quando submetida aos processos de pré-tratamentos. As micrografias do RPU bruto e das melhores condições das amostras pré-tratadas em cada uma das técnicas foram geradas, buscando-se comparar possíveis alterações na estrutura das biomassas. As imagens obtidas foram ampliadas em 48x e 3000x para RPU bruto, RPU após pré-tratamento ácido, alcalino e auto-hidrólise e 800x e 5000x para biológico.

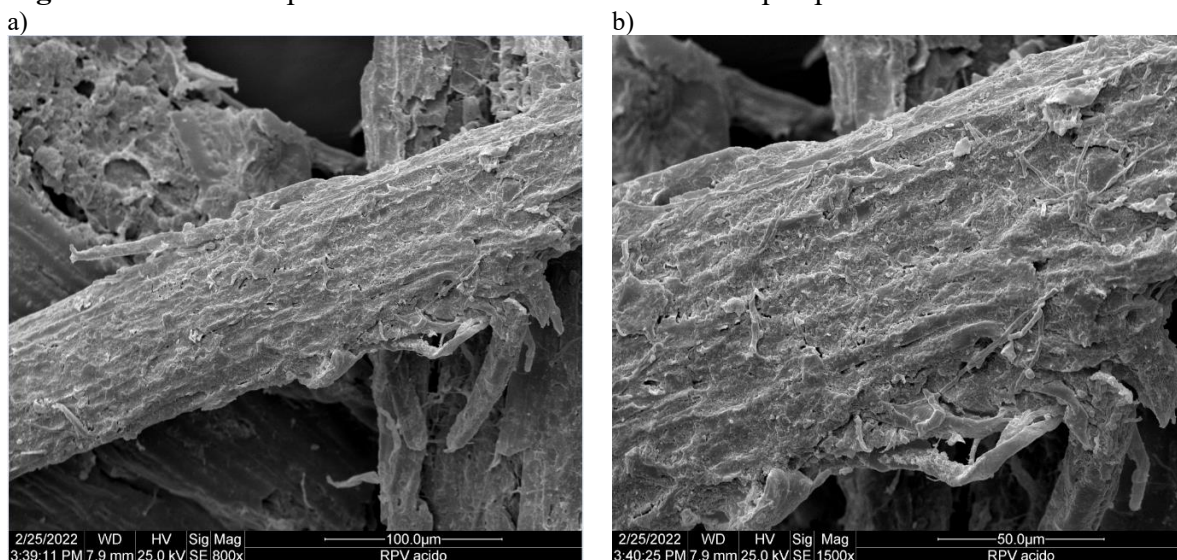
A Figura 26 apresenta a micrografia do RPU bruto e é possível verificar uma estrutura vegetal bem organizada com fibras lisas, compactas e sem nenhuma ruptura. Essa característica é atribuída a presença da barreira vegetal, formada pela lignina e hemicelulose, que recobre toda a cadeia celulósica.

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura do RPU bruto



A Figura 27 apresenta o RPU após o pré-tratamento químico com ácido sulfúrico na concentração v/v 3% a 125 °C por 22 minutos. Como o ácido sulfúrico atua na remoção de parte da fração hemicelulósica e diminuição das ligações lignina-carboidrato, as imagens indicam uma estrutura menos compacta (Figura 27-a), com fissuras nas fibras e aumento da área superficial (Figura 27-b).

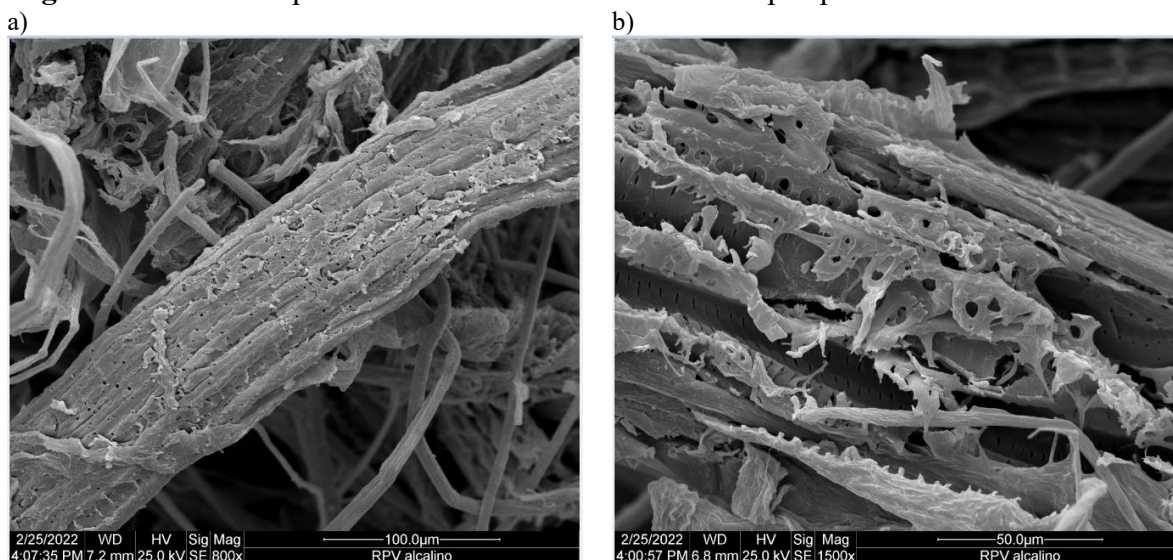
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento ácido



De acordo com Gomes (2019), as modificações estruturais ocorridas após o pré-tratamento ácido provocam ruptura da estrutura recalcitrante da parede celular das fibras vegetais e garantem maior acessibilidade das enzimas ao complexo de carboidratos, assim, favorecem o aumento no rendimento do processo de hidrólise enzimática.

Quando submetido ao pré-tratamento alcalino (5,5%, 104 °C e 15 horas), as imagens do RPU (Figura 28) indicaram uma desestruturação significativa da fibra quando comparado a biomassa bruta. Identifica-se uma perda da camada protetora, especialmente após a solubilização da lignina e hemicelulose. Visualiza-se dois principais efeitos: formação de uma parede celular estratificada, ou seja, uma parede em várias camadas (Figura 28-a) e a ruptura com ocorrência fendas ou canais profundos e paralelos (Figura 28-b).

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento alcalino

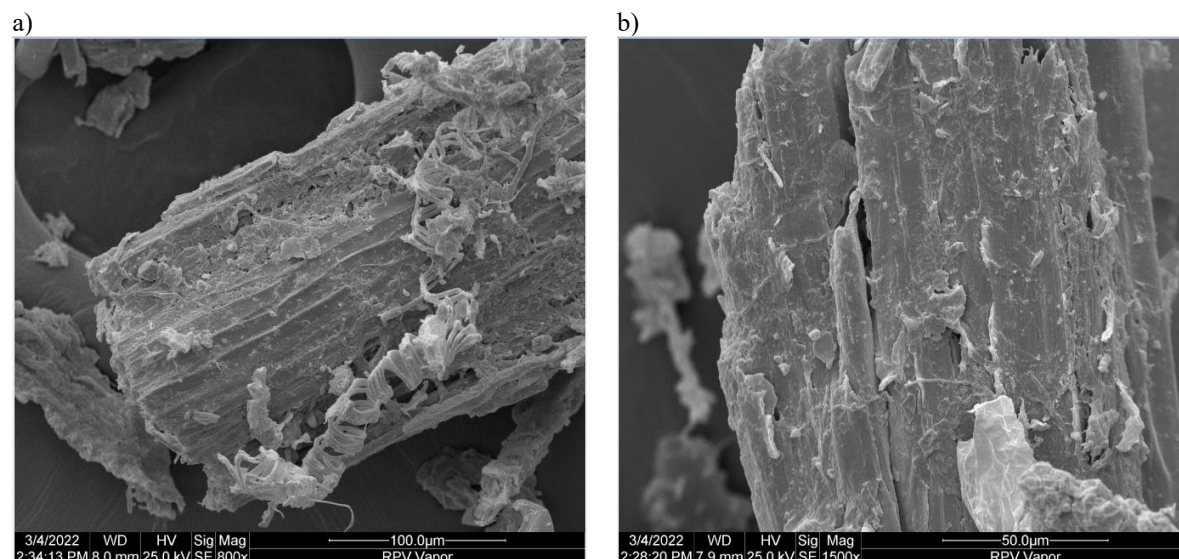


Os resultados e imagens apresentados são confirmados por Li *et al.* (2016) que, ao compararem as fibras da biomassa pré-tratada com ácido e base, observaram que a estrutura após o pré-tratamento alcalino estava mais desordenada que àquela tratada com ácido. Os autores constataram ainda que a remoção de lignina pode apresentar maior influência do que a remoção da hemicelulose na alteração morfológica da biomassa, o que corrobora com as análises de caracterização previamente apresentadas.

A Figura 29 apresenta a micrografia do RPU após o pré-tratamento por auto-hidrólise durante 15 minutos. Verifica-se a presença de paredes desconstruídas em formato circular, maior desorganização da biomassa lignocelulósica (Figura 29-a) e desagregação parcial das fibras estruturais (Figura 29-b). Alteração estrutural semelhante à deste estudo foi encontrada por Souza (2016) que, ao avaliar o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica por 15

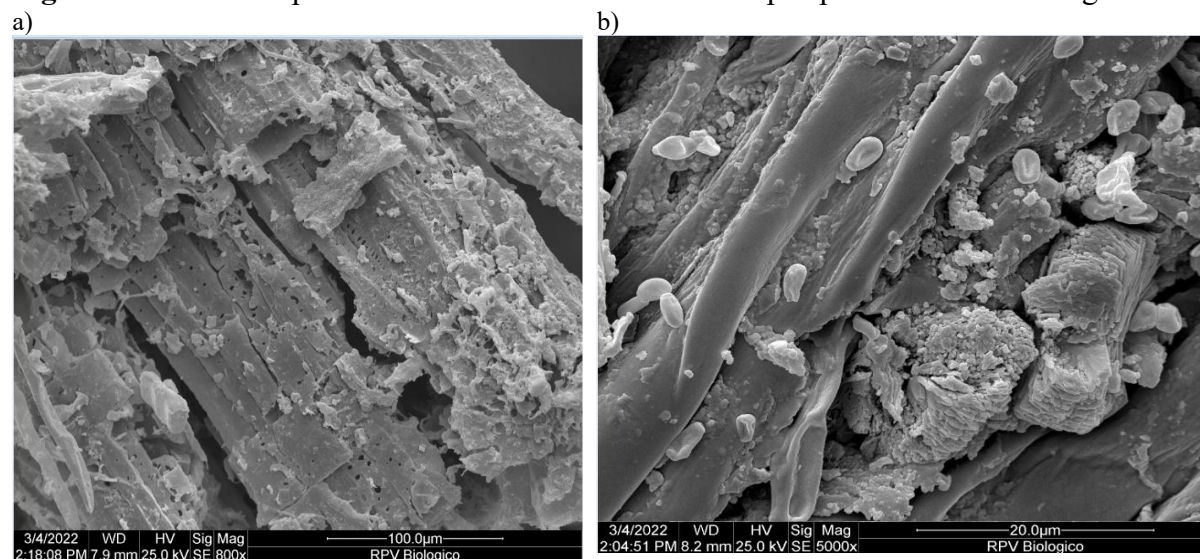
minutos, visualizou maior desorganização da estrutura do material e justificou esta alteração pelo aumento do fator de severidade da condição do pré-tratamento em relação ao resíduo bruto.

Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento por auto-hidrólise



As imagens do resíduo de poda urbana após o pré-tratamento com *Pleurotus ostreatus* (tempo de incubação de 14 dias a 28 °C) foram obtidas (Figura 30) e ficou evidente a desorganização na estrutura da biomassa, com fissuras aparentes, aumento do tamanho de poros (Figura 30-a) e presença de micélio dos fungos (Figura 30-b) quando comparada a amostra controle (RPU bruto).

Figura 30 - Microscopia eletrônica de varredura do RPU após pré-tratamento biológico



Após as análises do MEV, verificou-se que todos os pré-tratamentos provocaram mudanças na estrutura e morfologia do RPU. Os resultados da microscopia mostram que a formação de fissuras e a abertura de fendas na estrutura lignocelulósica colaboram com a maior acessibilidade da celulose, corroborando com as análises químicas prévias que evidenciaram uma grande solubilização dos componentes lignina e hemicelulose, tornando as fibras mais expostas e, com isso, aumentando sua área superficial para posterior conversão.

5.1.7 Ácidos Graxos Voláteis

Avaliar o acúmulo de ácidos graxos voláteis em um sistema é fundamental, pois no processo de digestão anaeróbia, estes estão relacionados ao equilíbrio entre o consórcio de microrganismos acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos existentes, uma vez que tais ácidos são os principais substratos e produtos da comunidade microbiana que participa desse processo (CHERNICHARO, 2016).

A Tabela 29 apresenta a composição dos ácidos gerados após as melhores condições de cada um dos pré-tratamentos de RPU avaliados.

O ácido acético é o mais importante AGV, uma vez que é precursor direto dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, contribuindo com cerca de 70% do metano produzido biologicamente (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). O pré-tratamento com maior formação de ácido acético foi o pré-tratamento biológico, com valor de 2229,59 mg L⁻¹, seguido pelo pré-tratamento alcalino (1996,91 mg L⁻¹). Ribeiro (2016) afirma que o ácido acético é resultado da hidrólise de grupos acetil contidos nas cadeias laterais de hemiceluloses.

Tabela 29 – Ácidos Graxos Voláteis das condições selecionadas nos pré-tratamentos do RPU

Amostra	Ácido Acético (mg L ⁻¹)	Ácido Propiônico (mg L ⁻¹)	Ácido Isobutírico (mg L ⁻¹)	Ácido Butírico (mg L ⁻¹)	Ácido Isovalérico (mg L ⁻¹)	Ácido Valérico (mg L ⁻¹)
RPU bruto	1,59 ± 0,02 ^e	ND	ND	ND	ND	ND
Pré-tratamento Ácido	779,33 ± 51,80 ^d	204,29 ± 1,68 ^b	294,12 ± 5,53	ND	443,51 ± 8,90 ^b	ND
Pré-tratamento Alcalino	1996,91 ± 259,86 ^b	248,11 ± 15,81 ^a	ND	288,64 ± 2,85 ^a	631,15 ± 2,06 ^a	88,10 ± 9,98 ^a
Pré-tratamento Auto-hidrólise	1006,16 ± 32,77 ^c	142,88 ± 9,23 ^c	ND	ND	ND	17,79 ± 0,67 ^c
Pré-tratamento Biológico	2229,59 ± 130,97 ^a	ND	ND	89,36 ± 4,54 ^b	212,26 ± 2,73 ^c	34,84 ± 0,91 ^b

ND: não detectado.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023)

O ácido propiônico é outro intermediário comum do metabolismo de açúcares, proteínas, ácidos orgânicos de cadeia longa e compostos orgânicos mais complexos, podendo responder por até 20% do fluxo de elétrons canalizado para a produção de metano (SPEECE,

1996). Em relação ao ácido propiônico, os maiores valores obtidos foram 248,11 mg L⁻¹, 204,29 mg L⁻¹ e 142,88 mg L⁻¹ para os pré-tratamentos alcalino, ácido e auto-hidrólise, respectivamente.

Apenas condição de pré-tratamento ácido gerou ácido isobutírico, com o valor de 294,12 mg L⁻¹. Por sua vez, as condições de pré-tratamento alcalino e biológico geraram 288,64 mg L⁻¹ e 89,36 mg L⁻¹ de ácido butírico, respectivamente. Em relação ao ácido isovalérico, somente o pré-tratamento por auto-hidrólise não o gerou, enquanto que para as demais condições, as concentrações variaram em 212,26 mg L⁻¹ (biológico), 443,51 mg L⁻¹ (ácido) e 631,15 mg L⁻¹ (alcalino).

O ácido valérico é tradicionalmente obtido por hidrólise de materiais lignocelulósicos (LANGE *et al.*, 2010). Portanto, a maior concentração deste ácido no pré-tratamento alcalino (88,10 mg L⁻¹) pode estar relacionada a maior deslignificação do RPU nesta condição (52,97%).

5.1.8 Compostos Inibidores

Os compostos inibidores podem ser originalmente presentes na biomassa lignocelulósica ou podem ser produzidos por condições drásticas na etapa do pré-tratamento. Os inibidores presentes na biomassa são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Por sua vez, os pré-tratamentos que trabalham em condições severas são fortemente passíveis à formação de componentes inibitórios devido à degradação dos açúcares e da lignina (RABELO, 2010).

A Tabela 30 apresenta os teores de 2-furfuraldeído (FF), 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos totais gerados após as melhores condições dos pré-tratamentos.

Tabela 30 - Compostos inibidores das melhores condições de pré-tratamento do RPU

Amostra	FF (mg L ⁻¹)	5-HMF (mg L ⁻¹)	Compostos Fenólicos Totais (mg L ⁻¹)
RPU bruto	ND	0,19 ± 0,11 ^c	0,24 ± 0,08 ^d
Pré-tratamento Ácido	2,69 ± 0,03 ^b	3,61 ± 0,11 ^d	13,57 ± 1,68 ^b
Pré-tratamento Alcalino	13,79 ± 1,45 ^a	5,48 ± 0,18 ^b	30,66 ± 0,51 ^a
Pré-tratamento Auto-hidrólise	3,63 ± 0,10 ^b	4,65 ± 0,14 ^c	31,70 ± 0,08 ^a
Pré-tratamento Biológico	ND	5,82 ± 0,15 ^a	1,86 ± 0,28 ^c

ND: não detectado; FF: 2-furfuraldeído; 5-HMF: 5-hidroxiacetilfurfural.

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023)

Os produtos gerados a partir da degradação dos açúcares são, basicamente, o FF, formado a partir de açúcares C5 (xilose e arabinose), obtidos da hidrólise das hemiceluloses e

o 5-HMF, formado a partir da degradação de açúcares C6 (glicose), majoritariamente oriundos da celulose (BAÊTA, 2016).

As maiores concentrações de FF foram obtidas no pré-tratamento alcalino (13,79 mg L⁻¹), seguido pelos pré-tratamentos por auto-hidrólise (3,63 mg L⁻¹) e ácido (2,69 mg L⁻¹), enquanto que para o RPU bruto e pré-tratamento biológico este composto não foi detectado nas amostras. Para o 5-HMF, foram observadas concentrações de 0,19 mg L⁻¹ para RPU bruto, 3,61 mg L⁻¹ para RPU pré-tratado com ácido sulfúrico, 4,65 mg L⁻¹ para RPU pré-tratado por auto-hidrólise, 5,48 mg L⁻¹ para RPU pré-tratado com hidróxido de sódio e 5,82 mg L⁻¹ para RPU pré-tratado com *Pleurotus ostreatus*.

Em todas as condições avaliadas, as concentrações de furanos apresentaram-se abaixo dos limites de inibição estabelecidos em literatura. Puttharo *et al.* (2019) afirmam que os produtos de degradação da biomassa, especialmente o furfural em baixa concentração (≤ 1400 mg L⁻¹), aumentam a produção de biogás, no entanto, em concentrações mais altas (> 2000 mg L⁻¹), tanto o FF quanto o 5-HMF podem afetar a produção de biogás.

As análises indicaram presença de compostos fenólicos em todas as amostras, com baixas concentrações no RPU bruto e RPU pré-tratado biologicamente (0,24 e 1,86 mg L⁻¹, respectivamente) e concentrações de 13,57 mg L⁻¹ para o pré-tratamento ácido, 30,66 mg L⁻¹ para o pré-tratamento alcalino e 31,70 mg L⁻¹ para o pré-tratamento por auto-hidrólise.

Os compostos fenólicos solúveis, derivados de lignina, são formados em condições de pré-tratamento acima de 160 °C e possuem elevada toxicidade aos microrganismos quando em concentrações elevadas (> 1200 mg L⁻¹) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; BADSHAH, 2012). Baêta (2016) explica que os compostos fenólicos são conhecidos por promoverem alterações na divisão celular e perda da integridade das membranas biológicas, afetando a capacidade destas na assimilação de compostos, na atuação como barreiras seletivas e matrizes de enzimas e prejudicando no crescimento celular.

5.1.9 Considerações sobre a Etapa 1

Os resíduos de poda urbana apresentam limitações de aplicação na digestão anaeróbia por diversos fatores, especialmente por suas estruturas lignocelulósicas. Ainda assim, com a aplicação de um pré-tratamento ideal, é possível promover resultados positivos em termos de produção de metano.

Para que um pré-tratamento seja considerado eficaz, ele precisa promover resultados satisfatórios de deslignificação, bom rendimento do processo, maiores conversões de açúcares

totais e redutores, remoção dos teores de hemicelulose, maior exposição da celulose e menores geração de inibidores, além de serem economicamente viáveis.

De maneira geral, a aplicação de pré-tratamento físico reduz o tamanho das partículas e o grau de cristalinidade da celulose, facilitando o acesso das enzimas. Os pré-tratamentos químicos apresentam altos rendimentos de glicose, o que favorece a conversão a metano, no entanto, podem gerar passivos ambientais e subprodutos tóxicos ao processo. Por sua vez, os pré-tratamentos biológicos destacam-se pela remoção de lignina e não geração de inibidores.

Ainda, a combinação de pré-tratamentos pode ser uma alternativa eficiente, porém, ainda incipiente e que demanda intensa investigação na compreensão das sinergias envolvidas nos mecanismos atuantes.

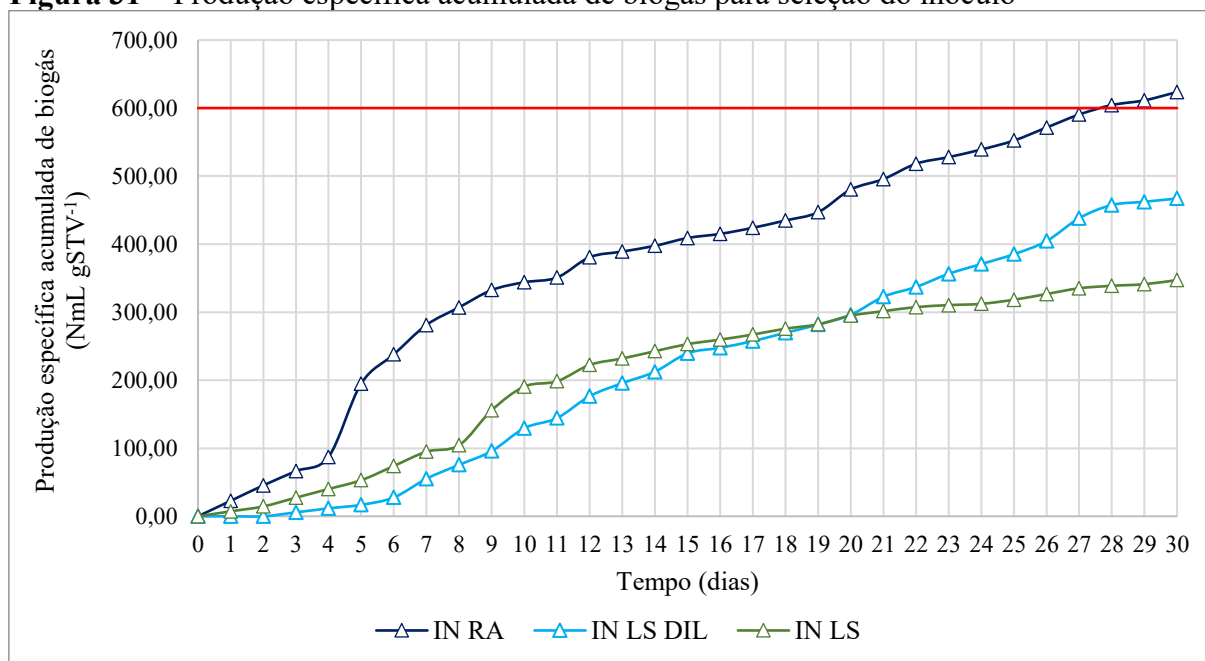
Por fim, com os resultados obtidos nesta etapa experimental, pode-se afirmar que cada pré-tratamento avaliado apresenta prós e contras e a seleção do melhor a ser aplicado no material de estudo deve considerar a realidade da situação, incluindo todos os aspectos citados.

5.2 ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2

Antes de iniciar o Ensaio BMP, realizou-se um experimento prévio para seleção do melhor inóculo para as etapas posteriores em função da sua produção específica de biogás, conforme indicado pela norma VDI 4630 (2006). Avaliou-se três diferentes inóculos: o primeiro refere-se ao efluente proveniente de um reator anaeróbio que trata resíduos alimentares (IN RA), o segundo trata-se do lodo sedimentado do efluente deste mesmo reator anaeróbio (IN LS) e o terceiro refere-se à diluição em 50% (em volume) do segundo inóculo (IN LS DIL), tendo em vista sua grande quantidade de sólidos totais.

Para isto, utilizou-se como substrato de referência a celulose microcristalina (VDI 4630, 2006). Em conformidade com o a norma VDI 4630 (2006), em todas as condições utilizou-se a razão substrato: inóculo de 0,46, ou seja, menor ou igual a 0,5. A Figura 31 apresenta o resultado da seleção de inóculo.

Neste experimento, o critério de aptidão aplicado para seleção dos inóculos foi o de maior produção específica acumulada biogás, utilizando como substrato a celulose microcristalina. De acordo com a norma VDI 4630 (2006), a produção específica acumulada do inóculo nas condições estabelecidas deve ser, ao menos, entre 592 e 600 NmL gSTV⁻¹, que corresponde a 80% da produção normal de biogás (740 - 750 NmL gSTV⁻¹) em testes com este mesmo substrato.

Figura 31 – Produção específica acumulada de biogás para seleção do inóculo

Fonte: A autora (2023)

Embora todos os inóculos tenham apresentado produção satisfatória de biogás, apenas o IN RA atingiu, ao 28º dia, o limite definido para ensaios com substrato de referência, com valor específico acumulado de 623,55 NmL gSTV⁻¹ enquanto os demais não ultrapassaram a marca de 500 NmL gSTV⁻¹ em um mês de avaliação. Assume-se, portanto, que a massa biologicamente ativa tem um nível adequado de desempenho potencial (VDI 4630, 2006). Além disso, ao final dos 30 dias de experimento, o IN RA obteve o maior valor de pH dentre os três (7,59), indicativo de que o processo não apresentou inibição por formação de AGV. Com base neste experimento preliminar, selecionou-se o IN RA como inóculo para aplicação na Etapa 2 deste estudo.

O inóculo e os substratos utilizados foram caracterizados físico-quimicamente e os resultados estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31 - Caracterização físico-química do inóculo e substratos utilizados no ensaio BMP

Parâmetro	Unidade	Inóculo	Resíduo Alimentar	Resíduo de Poda urbana
pH	-	7,81	4,51	6,32
Alcalinidade Total - AT	mg L ⁻¹	3560,50	527,10	125,70
Ácidos Graxos Voláteis - AGV	mg L ⁻¹	1519,00	2292,90	390,40
Demanda Química de Oxigênio - DQOt	mgO ₂ L ⁻¹	28515,80	61317,60	96241,70
Sólidos Totais - ST	mg L ⁻¹	52733,33	199283,33	806,00
Sólidos Totais Voláteis - STV	mg L ⁻¹	32566,67	176650,00	731,00
Sólidos Totais Fixos - STF	mg L ⁻¹	20166,67	22633,33	75,00
STV/ST	-	0,62	0,89	0,91
Nitrogênio Kjeldahl Total - NKT	mg L ⁻¹	3914,64	3795,00	13,40*
Nitrogênio amoniacal	mg L ⁻¹	3153,64	306,53	-

Carbono orgânico	mg L ⁻¹	18092,59	98138,89	406,11
Relação Carbono/Nitrogênio - C/N	-	4,62	25,86	30,29
Carboidratos	% ST	-	59,00	-
Lipídios	% ST	-	16,53	-
Proteínas	% ST	24,46	23,72	-

* mg g⁻¹

Fonte: A autora (2023)

Para garantir a ausência de distúrbios na partida de reatores anaeróbios e assegurar que os microrganismos produtores de metano atuem de maneira estável na formação de metano, a literatura indica que o pH do inóculo apresente-se próximo a neutralidade (entre 6 e 8), valor de pH obtido no inóculo selecionado para este estudo (7,81) (CHERNICHARO, 2016; BASTOS, 2020). Ainda, o inóculo apresenta uma elevada alcalinidade total (2325,8 mg L⁻¹) e um teor de matéria seca orgânica (STV/ST) superior a 50% do teor de sólido (62%), recomendado pela VDI 4630 (2006) e indicativo de parcialmente estabilizado.

O pH do resíduo alimentar (4,51) está de acordo com o relatado por diversos autores para o mesmo substrato, com valores que variaram entre 4,40 e 5,98 (GUERI, 2017; HELENAS, 2019; NAVARRO, 2020; BORTH *et al.*, 2021). A partir destes resultados, é possível afirmar que o pH original ácido dos RA não favorece a atividade das arqueias metanogênicas e este pode estar associado à composição química do substrato, com prevalência de carboidratos que proporcionam rápida produção de AGV (CHERNICHARO, 2016). Assim, sugere-se o uso de um co-substrato capaz de elevar o pH e fornecer a alcalinidade que o sistema precisa para ótimo desempenho do processo anaeróbio (ATELGE *et al.*, 2020).

Como co-substrato, utilizou-se o resíduo de poda urbana. Este apresentou valor de pH de 6,32, com baixo teor de umidade (80,60% de ST) e alto teor de sólidos totais voláteis (73,1%). O elevado teor de STV ressalta o potencial de transformação da matéria orgânica a partir da digestão anaeróbia e contribui para a produção de biogás (KUNZ *et al.*, 2019).

Güelfo *et al.* (2011) afirmam ainda que se a relação STV/ST de um resíduo for acima de 0,7, este pode ser classificado como facilmente biodegradável. Para este estudo, o RA apresentou uma relação de 0,89 e o RPU de 0,91, ambos indicando boas expectativas de biodegradação. Borth *et al.* (2021), ao estudarem a codigestão anaeróbia de RA e RPU a partir do Ensaio BMP, obtiveram como relação STV/ST os valores 0,93 para RA e 0,88 para RPU.

O resíduo alimentar apresentou valor de DQO de 61317,6 mg L⁻¹. Gueri (2017), Helenas (2019) e Navarro (2020), obtiveram os valores de 129760 mg L⁻¹, 144060 mg L⁻¹ e 90918 mg L⁻¹, respectivamente, para o mesmo resíduo. Por sua vez, a DQO do resíduo de poda urbana apresentou valor de 96241,70 mg L⁻¹ e do inóculo o valor de 3560,50 mg L⁻¹,

corroborando com os valores obtidos por outros pesquisadores (MALINOWSKY, 2016; BORTH, 2021; BORTH *et al.*, 2021).

Os valores do RA referentes à carboidratos (59%), lipídios (16,53%) e proteínas (23,72%) estão relacionados ao tipo de cardápio e quantidade de cada alimento contido no resíduo. Estes teores de carboidratos e lipídios em RA são reportados na literatura como componentes de substratos com grande conversão em biogás (ANGELIDAKI *et al.*, 2009; LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011). He *et al.* (2012) utilizaram em seu estudo resíduo de restaurante universitário com valores de 35,47% para carboidratos, 14,42% para proteínas e 24,11% para lipídios, em relação à massa seca. Por sua vez, Navarro (2020) utilizou em seu experimento um resíduo alimentar com valores semelhantes para carboidratos (45,50%), lipídios (25,73%) e proteínas (22,75%), também em função da massa seca.

Além dos macronutrientes essenciais, as concentrações e disponibilidade de micronutrientes no meio, seja de metais essenciais (Na, K, Mg, Ca, Al) ou de elementos traço (Cr, Co, Cu, Zn, Ni, etc.), influenciam diretamente a taxa de crescimento e o metabolismo das diferentes espécies de microrganismos envolvidas na rota metanogênica (ZHANG; JAHNG, 2012). A caracterização dos macros e micronutrientes do RA deste experimento estão apresentadas na Tabela 32.

Tabela 32 – Macro e micronutrientes do resíduo alimentar utilizado na Etapa 2.

Elemento	Unidade	Resíduo alimentar
Boro (B)	mg kg ⁻¹	4,67
Cálcio (Ca)	mg kg ⁻¹	100,00
Cobre (Cu)	mg kg ⁻¹	15,84
Enxofre (S)	mg kg ⁻¹	300,00
Ferro (Fe)	mg kg ⁻¹	10,88
Fósforo (P)	mg kg ⁻¹	400,00
Magnésio (Mg)	mg kg ⁻¹	0,10
Manganês (Mn)	mg kg ⁻¹	1,38
Molibdênio (Mo)	mg kg ⁻¹	0,17
Níquel (Ni)	mg kg ⁻¹	1,59
Potássio (K)	mg kg ⁻¹	500,00
Sódio (Na)	mg kg ⁻¹	1330,00
Zinco (Zn)	mg kg ⁻¹	1,59

Fonte: A autora (2023)

O desenvolvimento completo das atividades microbianas está relacionado a presença de sais em suas fontes de alimento. Porém, em certas quantidades, estes elementos podem interferir e inibir funções fundamentais no processo de geração de biogás (SCHNURER, 2018). Por exemplo, Kugelman e McCarty (1964) relatam que para o sódio, em concentrações de 3500 a 5500 mg L⁻¹, é observada certa instabilidade do sistema e acima de 8000 mg L⁻¹ as

comunidades metanogênicas são fortemente afetadas pelo acúmulo de sais. Neste contexto, Chen, Cheng e Creamer (2008) estabelecem que a concentração ideal para produtores de metano é relatada em cerca de 46 a 115 mg L⁻¹ de Na, 400 mg L⁻¹ de K, 200 mg L⁻¹ de Ca e 720 mg L⁻¹ de Mg. Os valores dos macros e micronutrientes encontrados para o RA estão ligeiramente acima dos indicados para Na e K, mas nada preocupante no que se refere interferência do processo.

5.2.1 Parâmetros de Controle Operacional

A Tabela 33 apresenta os valores iniciais e finais de pH, alcalinidade total - AT, AGV e AGV/AT para as condições estudadas. A AT presente em sistemas anaeróbios refere-se a soma das parcelas da alcalinidade parcial e a parcela relativa aos ácidos orgânicos voláteis (REIS, 2012).

Tabela 33 – Valores médios de pH, AT, AGV e AGV/AT antes e depois do Ensaio BMP

Tratamento	pH		AT (mg L ⁻¹)		AGV (mg L ⁻¹)		AGV/AT	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
A1	7,81	8,12	3560,48	3711,58	1519,02	505,94	0,4	0,1
A2	7,59	7,73	3202,19	3490,92	1889,92	2231,20	0,6	0,6
A3	7,79	7,92	3519,96	3615,83	1567,46	532,45	0,4	0,1
B1	7,49	7,84	3319,87	3177,50	1657,12	378,01	0,5	0,1
B2	7,88	7,73	3717,56	3639,02	1598,31	382,62	0,4	0,1
B3	7,54	7,83	3312,39	3894,09	1663,86	445,43	0,5	0,1
B4	7,70	7,84	3493,16	4416,94	1406,48	428,72	0,4	0,1
C1	7,54	7,53	3176,01	3608,35	1837,87	1935,0	0,6	0,5
C2	7,68	7,74	3228,37	4162,62	1709,90	1208,95	0,5	0,3
C3	7,49	7,37	3096,72	3426,59	1754,00	1509,75	0,6	0,4
C4	7,49	7,70	3159,55	4263,60	1727,25	956,56	0,5	0,2
C5	7,55	7,84	3311,40	4143,17	1970,42	934,09	0,6	0,2
C6	7,69	7,67	3166,28	4274,82	1919,32	393,00	0,6	0,1
C7	7,51	7,81	3092,98	3876,88	1943,42	1838,8	0,6	0,5
C8	7,54	7,53	3101,71	3636,78	1928,96	1508,0	0,6	0,4
C9	7,51	7,80	2989,51	3745,98	1895,22	1606,56	0,6	0,4
C10	7,57	7,75	3060,57	4519,42	1910,65	434,48	0,6	0,1

A1: IN.

A2: IN. + RA

A3: IN. + RPU BRUTO

B1: IN. + RPU ÁC.

B2: IN. + RPU ALC.

B3: IN. + RPU BIO.

B4: IN. + RPU AH

C1: IN. + RA + RPU BRUTO 10

C2: IN. + RA + RPU BRUTO 30

C3: IN. + RA + RPU ÁC. 10

C4: IN. + RA + RPU ÁC. 30

C5: IN. + RA + RPU ALC. 10

C6: IN. + RA + RPU ALC. 30

C7: IN. + RA + RPU BIO. 10

C8: IN. + RA + RPU BIO. 30

C9: IN. + RA + RPU AH 10

C10: IN. + RA + RPU AH 30

Fonte: A autora (2023)

Chernicharo (2016) afirma que é possível obter estabilidade na formação de metano em uma faixa de pH que varia entre 6,0 e 8,0. Ainda, Bidone e Povinelli (1999) afirmam que valores de pH acima de 8,0 podem causar inibições e estresse no sistema, afetando a produção de metano. Em todas as condições testadas, o pH inicial manteve-se dentro da faixa reportada

pela literatura como ideal para conversão orgânica e formação de biogás. Ao final do experimento, todas as condições apresentaram valores de pH próximo da neutralidade.

Como o pH e a alcalinidade estão relacionados, recomenda-se que a alcalinidade inicial seja adequada para garantir a estabilidade do processo, uma vez que a formação de ácidos orgânicos irá consumir a alcalinidade do meio e poderá reduzir o pH do sistema (BORTH, 2021). Metcalf e Eddy (2016) apontam que a faixa ótima de alcalinidade varia entre 1.000 e 5.000 mg L⁻¹. Todos os tratamentos apresentaram alcalinidade inicial com valores dentro desta faixa e na grande maioria das condições, com exceção das condições B1 e B2, houve aumento destes resultados ao final do processo. Helenas (2019) explica que este aumento pode ocorrer por dois motivos: presença do gás carbônico no meio, seja pela sua dissolução na mistura - resultado da diferença de pressão parcial (Lei de Henry) - ou como resultado da decomposição anaeróbia da matéria orgânica e/ou como consequência do processo de amonificação, o que proporciona estabilidade no sistema e manutenção do pH. Paredes *et al.* (2007) explicam que amonificação é a reação de mineralização ou hidrólise do nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal que libera alcalinidade ao meio.

A relação AGV/AT é considerada um excelente parâmetro de monitoramento de reatores anaeróbios, pois se houver grande produção de ácidos voláteis durante o processo - resultado da intensa taxa de hidrólise e acidogênese - o pH pode decair se a alcalinidade do sistema for insuficiente, resultando em inibição parcial ou total dos microrganismos metanogênicos (AMANI *et al.*, 2010). Portanto, avaliou-se tal relação no início e fim do Ensaio BMP. Para que o sistema apresente boa capacidade de tamponamento, a relação AGV/AT deve ser menor ou igual a 0,5 (LEITE *et al.*, 2004). Conforme resultados apresentados na tabela, mesmo com esta relação acima da faixa indicada em algumas condições iniciais, em todos os tratamentos houve redução deste parâmetro, com valores que permaneceram no limite do considerado ideal para estabilidade do processo.

5.2.2 Parâmetros de Desempenho do Sistema

Objetivando avaliar a eficiência de remoção da carga orgânica, realizou-se os parâmetros sólidos totais voláteis - STV, DQO e remoção destes em cada uma das condições experimentais, dado que estes parâmetros indicam indiretamente a quantidade de material orgânico capaz de ser biodegradado pelos microrganismos. A Tabela 34 apresenta estes resultados.

Tabela 34 - Valores médios de STV, DQO e remoções antes e depois do Ensaio BMP

Tratamento	STV (mg L ⁻¹)		Remoção (%)	DQO (mg L ⁻¹)		Remoção (%)
	inicial	final		inicial	final	
A1	7100,00	6725,00	5,28	28515,79	21719,16	23,83
A2	20025,00	9475,00	52,68	53857,21	22298,56	58,60
A3	28975,00	19000,00	34,43	34758,89	26667,96	23,28
B1	54150,00	31550,00	41,74	33410,68	21090,74	36,87
B2	22650,00	19575,00	13,58	26101,68	19441,27	25,52
B3	30600,00	26050,00	14,87	30608,89	22937,33	25,06
B4	41850,00	27825,00	33,51	31096,16	22491,63	27,67
C1	23575,00	11950,00	49,31	53654,18	35963,34	32,97
C2	22200,00	14950,00	32,66	53451,16	29433,50	44,93
C3	21975,00	10675,00	51,42	54669,32	23680,16	56,68
C4	25025,00	12150,00	51,45	38892,42	19872,57	48,90
C5	20725,00	9250,00	55,37	43742,87	18140,80	58,53
C6	20700,00	10125,00	51,09	39631,55	17303,31	56,34
C7	22000,00	10325,00	53,07	39936,10	18445,34	53,81
C8	23175,00	13050,00	43,69	41915,62	20501,00	51,09
C9	22925,00	10325,00	54,96	42981,51	21262,35	50,53
C10	27950,00	16950,00	39,36	44961,03	21947,57	51,19

A1: IN. B4: IN. + RPU AH C6: IN. + RA + RPU ALC. 30
A2: IN. + RA C1: IN. + RA + RPU BRUTO 10 C7: IN. + RA + RPU BIO. 10
A3: IN. + RPU BRUTO C2: IN. + RA + RPU BRUTO 30 C8: IN. + RA + RPU BIO. 30
B1: IN. + RPU AC. C3: IN. + RA + RPU AC. 10 C9: IN. + RA + RPU AH 10
B2: IN. + RPU ALC. C4: IN. + RA + RPU AC. 30 C10: IN. + RA + RPU AH 30
B3: IN. + RPU BIO. C5: IN. + RA + RPU ALC. 10

Fonte: A autora (2023)

A maior parte dos tratamentos apresentaram resultados satisfatórios para remoção de sólidos totais voláteis, com maiores remoções nas condições C5 (55,37%), C9 (54,96%) e C7 (53,07%). Estas condições referem-se aos pré-tratamentos alcalino, auto-hidrólise e biológico, respectivamente, com substituição de 10% do STV do RA por RPV na composição.

Embora a condição C2 seja apenas para controle (inóculo + resíduo alimentar), também apresentou elevada remoção de STV. Este fato pode ser explicado pela composição do tratamento, onde a mistura apresentava apenas resíduo alimentar, que é um substrato facilmente biodegradável quando comparado às condições com resíduos lignocelulósicos. Da mesma forma, as condições de pré-tratamento com melhores remoções foram àquelas cujas composições possuíam apenas 10% de material vegetal, ou seja, misturas com maior fração facilmente biodegradável (RA) e pequena parte lignocelulósica, ainda que após pré-tratamento.

Para a DQO, os valores das condições com RPU pré-tratado variaram entre 38892,42 mg L⁻¹ e 54669,32 mg L⁻¹ (inicial) e 17303,31 mg L⁻¹ e 35963,34 mg L⁻¹ (final). Assim como para o STV, a maior remoção de DQO ocorreu na condição C5 (58,53%). Porém, todas as condições de co-digestão anaeróbia, especialmente as com mistura de RA e 10% de RPU, obtiveram valores satisfatórios na conversão orgânica dos substratos estudados.

Os valores máximos obtidos neste estudo para remoção de DQO e STV estão próximos aos valores encontrados na literatura. Borth (2021), avaliando a digestão anaeróbia de resíduos

alimentares e resíduo de grama pré-tratado a partir do Ensaio BMP, obteve redução de 45,70% de STV e 25,70% de DQO, com TRH aproximado de 65 dias. Por sua vez, ao avaliar a co-digestão anaeróbia de resíduos de restaurante universitário e resíduos lignocelulósicos por meio do Ensaio BMP, Navarro (2020) obteve remoção de 57% de STV e 47,2% de DQO para poda de grama e 45,1% de STV e 39,6% de DQO para poda de árvores (folhas e galhos).

Chernicharo (2006) explica que o nitrogênio é um nutriente inorgânico necessário em grandes concentrações para o crescimento adequado dos microrganismos. Porém, a degradação de compostos orgânicos nitrogenados durante a digestão anaeróbia, como proteínas e ureia, pode formar amônia – representada pelo nitrogênio amoniacal (seja na forma de íons de amônio ou de amônia livre) (McCARTY, 1964; GERARDI, 2003).

A Tabela 35 apresenta os valores de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e nitrogênio amoniacal ionizado livre antes e depois do Ensaio BMP para todas as condições avaliadas.

Tabela 35 – Valores médios de NKT e N-amoniacal antes e depois do Ensaio BMP

Tratamento	NKT (mg L ⁻¹)		N-amoniacal (mg L ⁻¹)		NH ₃ (mg L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
A1	3581,42	3388,74	2947,87	2827,44	335,64	600,16
A2	3187,68	3145,79	2905,98	2822,20	187,06	248,44
A3	2932,16	3573,05	2816,97	2686,07	265,21	421,98
B1	3196,05	4368,92	2916,45	2890,27	150,48	436,31
B2	3229,56	3485,08	2560,40	3078,77	353,32	275,23
B3	3765,73	2823,25	2743,66	2942,63	197,99	276,05
B4	3476,70	578,05	2670,36	2712,25	259,22	57,73
C1	3661,01	586,43	2654,65	2727,96	189,68	29,94
C2	2793,93	3292,40	2434,74	2822,20	198,06	265,67
C3	2894,46	1466,08	2644,18	2707,01	136,28	52,46
C4	3371,98	268,08	2560,40	2356,20	156,43	19,84
C5	2760,42	3652,63	2439,98	2879,80	148,37	364,78
C6	2831,63	3321,72	2508,04	2816,97	206,61	230,42
C7	3200,24	3149,98	2492,34	3115,42	157,49	295,20
C8	3062,01	3631,69	2602,29	2707,01	158,65	185,42
C9	3078,77	2840,01	2743,66	2141,52	150,40	260,55
C10	2974,05	2768,23	2633,71	2069,62	164,61	228,22

A1: IN.

A2: IN. + RA

A3: IN. + RPU BRUTO

B1: IN. + RPU AC.

B2: IN. + RPU ALC.

B3: IN. + RPU BIO.

B4: IN. + RPU AH

C1: IN. + RA + RPU BRUTO 10

C2: IN. + RA + RPU BRUTO 30

C3: IN. + RA + RPU AC. 10

C4: IN. + RA + RPU AC. 30

C5: IN. + RA + RPU ALC. 10

C6: IN. + RA + RPU ALC. 30

C7: IN. + RA + RPU BIO. 10

C8: IN. + RA + RPU BIO. 30

C9: IN. + RA + RPU AH 10

C10: IN. + RA + RPU AH 30

Fonte: A autora (2023)

A partir dos resultados apresentados, nota-se variação de comportamento dos valores de NKT e N-amoniacal. Em alguns tratamentos houve a redução destes parâmetros, enquanto que em outros, os valores aumentaram ao final do experimento. A redução de valores de NKT pode estar relacionado ao consumo deste nutriente por parte dos microrganismos, visto que o

nitrogênio é um nutriente essencial na DA e, geralmente, os compostos nitrogenados provém de proteínas (SCHULTZ, 2015).

Ren *et al.* (2018) explicam que, por possuírem baixa relação C:N e elevado teor de nitrogênio orgânico, a digestão anaeróbia de substratos como o resíduo alimentar podem promover a formação excessiva de nitrogênio amoniacal, composto por nitrogênio amoniacal ionizado (N-NH₄) ou nitrogênio amoniacal ionizado livre (NH₃). Estes podem ser convertidos um ao outro, dependendo do pH, temperatura do meio e concentração de íon de hidrogênio (GERARDI, 2003; BORTH, 2021).

Chernicharo (2006) afirma que altas concentrações de íons de hidrogênio e pH menor que 7,2 podem promover a inibição da atividade dos microrganismos, consequência da concentração de N-NH₄. Por sua vez, para valores elevados de pH, a concentração de íons de hidrogênio diminui e o agente inibidor será o NH₃. Como neste estudo o pH do efluente situou-se entre 7,37 e 8,12, considera-se que a maior parte do nitrogênio amoniacal se encontrava na forma ionizada (N-NH₄).

McCarty (1964) e Gerardi (2003) apresentam faixas de concentrações de N-amoniacal e sua influência no sistema anaeróbio: benéficas se entre 50 e 200 mg L⁻¹, sem efeitos contrários se até 1000 mg L⁻¹, até 3000 mg L⁻¹ podem apresentar inibição se o pH for superior a 7,0 e tóxicos ao sistema se acima de 3000 mg L⁻¹. Dentre as condições avaliadas, apenas os tratamentos B2 e C7 apresentaram valores finais de N-amoniacal superiores ao limite (3078,77 mg L⁻¹ e 3115,42 mg L⁻¹), sendo que as demais estiveram na faixa de alerta (entre 2069,62 mg L⁻¹ 2942,63 mg L⁻¹), com possibilidade de inibição. Ainda assim, não se relaciona estes valores a ineficiência do processo, uma vez que tais resultados não interferiram na produção de biogás.

Pode-se presumir que os valores obtidos de N-amoniacal promoveram a alcalinidade parcial necessária ao sistema - devido a formação de carbonato de amônio [(NH₄)₂CO₃] - e nutrientes aos microrganismos, auxiliando na contraposição de possíveis instabilidades causadas por elevadas concentrações de ácidos orgânicos (YUAN; ZHU, 2016).

Kunz, Steinmetz e Amaral (2019) explicam que a toxicidade da amônia livre às arqueas metanogênicas está relacionada a facilidade desta se difundir através da membrana celular dos microrganismos, causando desequilíbrio dos prótons, variando o pH intracelular e inibindo respostas enzimáticas específicas. Valores de NH₃ entre 150 e 1200 mg L⁻¹ podem promover toxicidade ao sistema (METCALF; EDDY, 2016). De acordo com a Tabela 35, os valores iniciais e finais de NH₃ para todos os tratamentos mantiveram-se no limite inferior reportado pela literatura.

5.2.2.1 Geração de biogás e de metano

O Ensaio BMP tem como objetivo avaliar o potencial de geração de biogás e metano de determinado(s) resíduo(s) orgânico(s). Neste sentido, a Tabela 36 apresenta as médias dos valores de volume acumulado de biogás, da produção específica de biogás e metano, dos teores médio e máximo de CH₄ e teores máximo de CO₂ e H₂S para todas as condições experimentais estudadas. Ressalta-se que estes valores foram obtidos após a subtração da produção específica acumulada de biogás produzida pelo inóculo (condição A1).

Tabela 36 - Volume produzido de biogás, produção específica de biogás e metano e composição do biogás gerado (CH₄, CO₂ e H₂S) das condições experimentais

Tratamento	Volume acumulado de biogás (NmL)	Produção específica de biogás (NmL gSTV ⁻¹)	Produção específica de metano (NmL gSTV ⁻¹)	% média CH ₄	% máx. CH ₄	% máx. CO ₂	ppm máx. H ₂ S
A1	29,21 ± 7,23	7,47 ± 1,85	1,19 ± 0,97	38,00	41,00	16,00	60
A2	826,78 ± 2,62	251,93 ± 11,34	97,83 ± 9,50 ^{cde}	67,66	70,00	18,00	20
A3	325,00 ± 8,89	166,20 ± 14,57	64,42 ± 6,77 ^{gh}	48,66	51,00	26,00	40
B1	566,03 ± 4,44	168,84 ± 5,99	73,21 ± 7,69 ^{fg}	62,00	66,00	32,00	10
B2	649,86 ± 4,45	252,57 ± 1,70	106,66 ± 8,59 ^{bc}	62,66	68,00	26,00	10
B3	484,28 ± 8,89	177,32 ± 10,69	83,84 ± 6,43 ^{efg}	58,66	61,00	22,00	60
B4	352,24 ± 5,75	113,41 ± 18,15	52,80 ± 2,16 ^{hi}	46,33	48,00	28,00	60
C1	371,11 ± 8,88	113,89 ± 4,80	33,21 ± 2,55 ⁱ	41,66	46,00	31,00	20
C2	628,90 ± 13,34	192,11 ± 6,69	85,37 ± 4,70 ^{def}	64,00	67,00	26,00	10
C3	781,90 ± 13,33	238,35 ± 8,73	101,87 ± 10,42 ^{cde}	70,00	74,00	22,00	90
C4	981,01 ± 16,67	298,59 ± 15,39	137,23 ± 4,29 ^a	63,66	70,00	19,00	70
C5	792,38 ± 9,60	241,41 ± 2,91	123,21 ± 7,38 ^{ab}	62,33	64,00	22,00	60
C6	886,70 ± 13,34	270,32 ± 7,71	133,09 ± 3,04 ^a	67,66	70,00	28,00	80
C7	647,77 ± 4,45	197,49 ± 6,12	104,82 ± 9,68 ^{bcd}	64,66	68,00	29,00	20
C8	742,08 ± 8,89	226,08 ± 5,81	135,64 ± 3,42 ^a	69,33	71,00	30,00	40
C9	413,02 ± 12,23	126,63 ± 10,51	65,49 ± 5,66 ^{gh}	65,00	68,00	25,00	40
C10	654,05 ± 4,64	199,28 ± 3,96	111,68 ± 4,24 ^{bc}	63,00	66,00	19,00	40

A1: IN.

B4: IN. + RPU AH

C6: IN. + RA + RPU ALC. 30

A2: IN. + RA

C1: IN. + RA + RPU BRUTO 10

C7: IN. + RA + RPU BIO. 10

A3: IN. + RPU BRUTO

C2: IN. + RA + RPU BRUTO 30

C8: IN. + RA + RPU BIO. 30

B1: IN. + RPU AC.

C3: IN. + RA + RPU AC. 10

C9: IN. + RA + RPU AH 10

B2: IN. + RPU ALC.

C4: IN. + RA + RPU AC. 30

C10: IN. + RA + RPU AH 30

B3: IN. + RPU BIO.

C5: IN. + RA + RPU ALC. 10

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023)

É possível afirmar que todas as condições experimentais apresentaram produção satisfatória de biogás, com teores de metano condizentes com a faixa ideal reportada pela literatura, que indicam a faixa de 50% a 80% para processos anaeróbios com resíduo alimentar (GUERI, 2017; HELENAS, 2019).

Os maiores volume acumulado de biogás (981,01 NmL), produção específica de biogás (298,59 NmL gSTV⁻¹) e produção específica de metano (135,76 NmL gSTV⁻¹) foram

obtidos no tratamento C4. No entanto, foi o tratamento C3 que atingiu o maior teor (74%) e maior média (70%) de metano durante os dias de monitoramento. Ambas as condições são caracterizadas pela codigestão anaeróbia de RA com RPU pré-tratado com ácido sulfúrico. Zheng *et al.* (2014) afirmam que o uso de resíduos lignocelulósicos pré-tratados com ácidos, como o sulfúrico, promovem altos rendimento na produção de biogás e metano, uma vez que se referem a substratos com baixo teor de lignina.

Destaca-se que embora as condições com maior solubilização de lignina (52,97%) e grande conversão de hemicelulose, cujo RPU foi tratado com NaOH, tenham apresentado bons resultados de geração de biogás (792,38 NmL para C5 e 886,70 NmL para C6), não foram as que mais produziram. O pré-tratamento com NaOH melhora a etapa de hidrólise por meio do rompimento da estrutura da lignina (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012a).

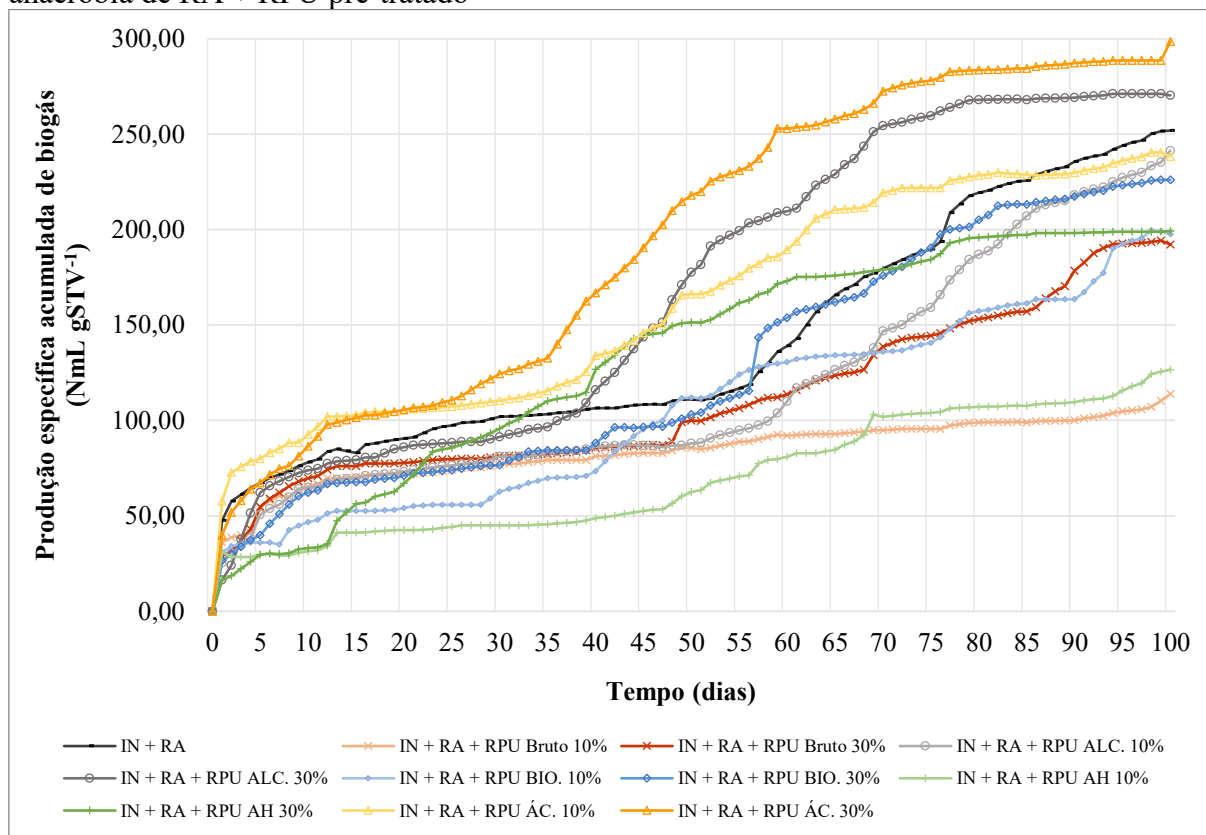
Destaca-se, também, que todas as condições de CoDA com substituição de 30% do STV do RA por RPU pré-tratado apresentaram maiores valores acumulados de biogás e metano, quando comparado às respectivas condições com 10% de substituição.

Em relação aos gases carbônico - CO₂ e sulfídrico - H₂S, as maiores concentrações foram alcançadas pelos tratamentos B1 (32%) e C3 (90 ppm) respectivamente. Tais valores foram obtidos nos primeiros dias de operação, resultado da grande disponibilidade de enxofre presente no substrato (NAVARRO, 2020). Valores superiores foram encontrados por Borth (2021) que, estudando a codigestão anaeróbia de RA e RPU a partir do Ensaio BMP, obteve o teor máximo de 43% para CO₂ e 860 ppm para H₂S.

Ao comparar as Tabela 34 e Tabela 36, nota-se que a condição que apresentou maior conversão de STV (55,37% para C5, IN. + RA + RPU ALC. 10%), não foi a mesma que produziu mais biogás e metano (C4, IN. + RA + RPU ÁC. 30%). Condições alcalinas mais fortes (pH acima de 10) inibem e reduzem o crescimento de arqueas metanogênicas, portanto, menos AGV são convertidos em biogás, resultando em maiores acúmulos de AGVs (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). Após o pré-tratamento alcalino, o RPU apresentava pH médio de 12,5 e, mesmo com lavagem para atingir a neutralidade, o substrato pode ter ficado com resíduos de NaOH em sua estrutura, portanto, o pH inicial equivalente de todas as condições talvez não tenha sido suficiente para equalizar o reagente químico utilizado no pré-tratamento.

A Figura 32 apresenta a produção específica acumulada de biogás durante os 100 dias de monitoramento do experimento apenas para as condições de codigestão anaeróbia de RA com RPU pré-tratado.

Figura 32 – Produção específica acumulada de biogás para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado

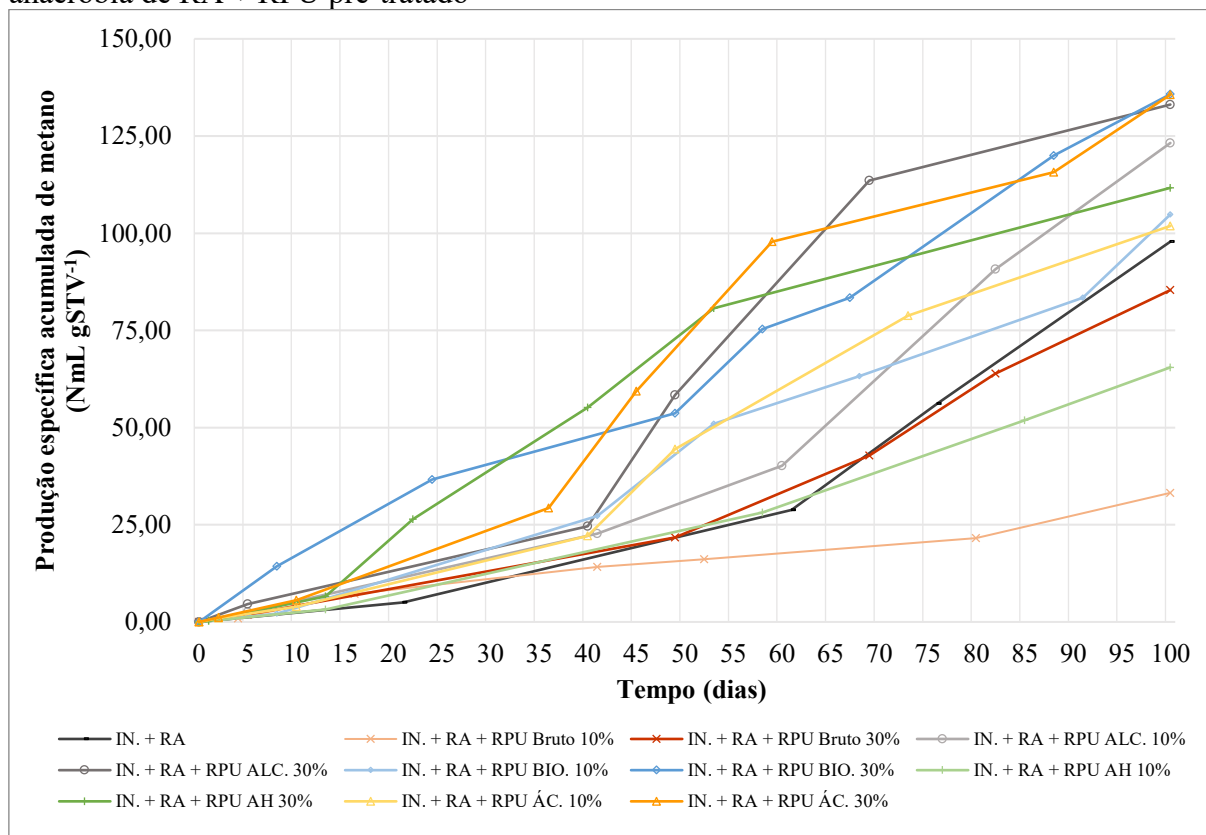


Fonte: A autora (2023)

Conforme citado anteriormente, a condição que apresentou melhor produção específica acumulada de biogás foi o tratamento C4 (IN. + RA + RPU ÁC. 30%), seguida pela condição C6 (IN. + RA + RPU. ALC. 30%). No entanto, ao visualizar o gráfico, a dinâmica de produções durante o experimento apresentou notável variação: nos primeiros 10 dias de operação, a condição C3 (substituição de 10% de STV do RA por RPU pré-tratado com ácido) obteve melhores rendimentos; próximo ao dia 15, a condição C4 equiparou a produção específica acumulada de biogás da C3; e apenas dez dias depois esta última foi ultrapassada. Ainda assim, ambas as condições se referem a CoDA de RA com RPU pré-tratado com ácido sulfúrico. Labatut, Angenent e Scott (2011) explicam que em um Ensaio BMP, as curvas de produção de biogás podem apresentar formas diferentes, uma vez que tanto os mecanismos de digestão anaeróbia de cada resíduo, quanto a formação de substâncias inibidoras, atuam na cinética de degradação desse substrato, resultando em curvas variadas para o processo.

A Figura 33 apresenta os resultados de produção específica – PE acumulada de metano para as condições de codigestão anaeróbia de RA com RPU pré-tratado.

Figura 33 - Produção específica acumulada de metano para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado



Fonte: A autora (2023)

Como a digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos é um processo complexo realizado por um grupo de microrganismos anaeróbios que convertem sólidos totais voláteis a metano, torna-se importante a avaliação das produções de metano em função dos STV adicionados no sistema (MALINOWSKY, 2016). As curvas apresentadas diferem das obtidas para produção específica de biogás, haja vista a diferença nos teores de metano encontrados em cada condição experimental, com valores que variaram de 33,21 NmL gSTV⁻¹ a 137,23 NmL gSTV⁻¹. Pode-se afirmar que as condições C4, C6 e C8 apresentaram os maiores valores de PE de metano, com valores próximos uns dos outros (137,23 NmL gSTV⁻¹, 133,09 NmL gSTV⁻¹ e 135,64 NmL gSTV⁻¹, respectivamente). Estas condições apresentaram elevados valores de ácido acético (Tabela 29) após o pré-tratamento, responsável por grande parte do metano produzido no processo anaeróbio (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). Ao comparar os valores de AGV com os resultados de metano, pode-se afirmar que a elevada PE de metano obtida na condição cujo pré-tratamento foi o alcalino também pode ser explicada pela elevada concentração de ácido valérico (1761,94 mg L⁻¹), especialmente por sua influência positiva no processo anaeróbio, resultado de satisfatória hidrólise do RPU (LANGE *et al.*, 2010).

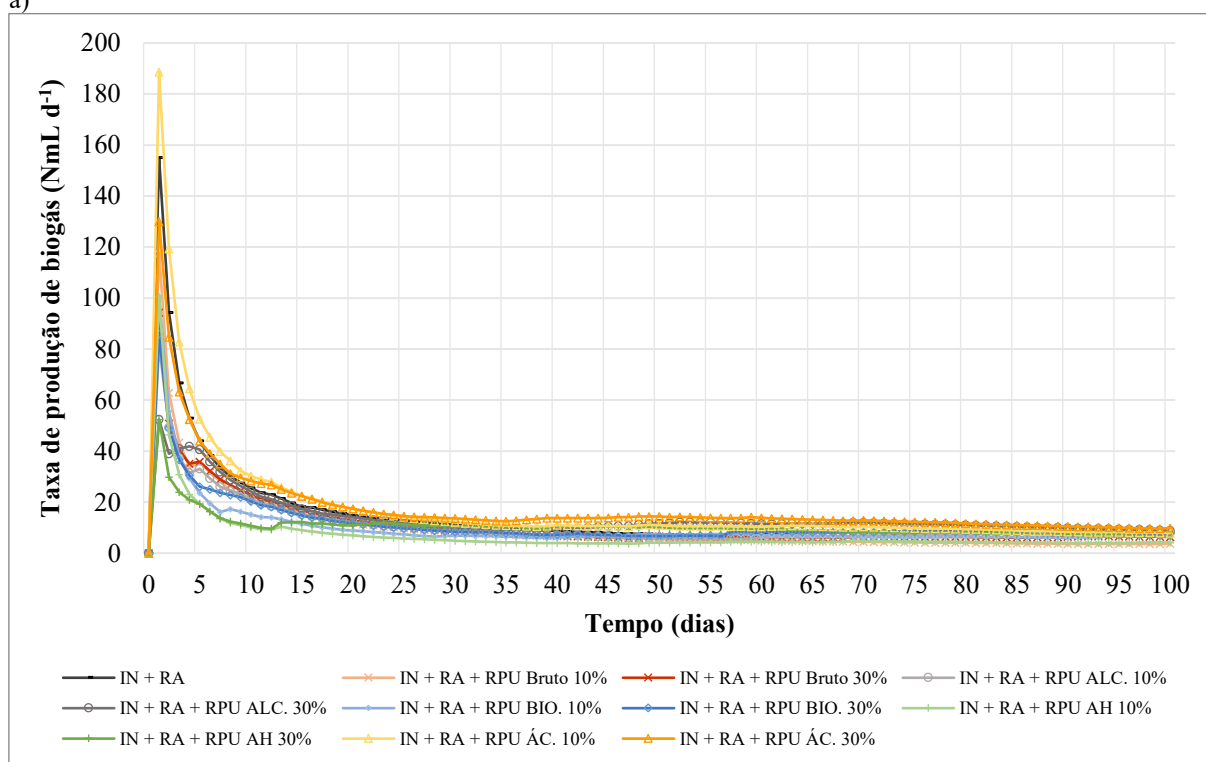
Por sua vez, analisando os resultados de período de fase *lag* obtidos, nota-se que apenas para a condição C8 (IN. + RA + RPU BIO. 30%) esta fase foi menor do que as obtidas para as demais condições. A fase *lag* de crescimento microbiano representa o período que precede a fase de crescimento exponencial, onde os microrganismos encontram-se em um estado de latência (PRATS *et al.*, 2008). Dessa forma, afirma-se que a condição C8 apresentou menor período de adaptação da comunidade microbiana ao meio, com possível condição ambiente de estresse ou deficiência nutricional no momento da inoculação para os demais tratamentos (RIBEIRO, 2016).

Ressalta-se, portanto, que no início do processo, a produção de biogás foi maior, mas a porcentagem de metano era baixa, uma vez que os substratos precisam ser convertidos nas fases da digestão anaeróbia até a geração de metano na fase metanogênica (NAVARRO, 2020).

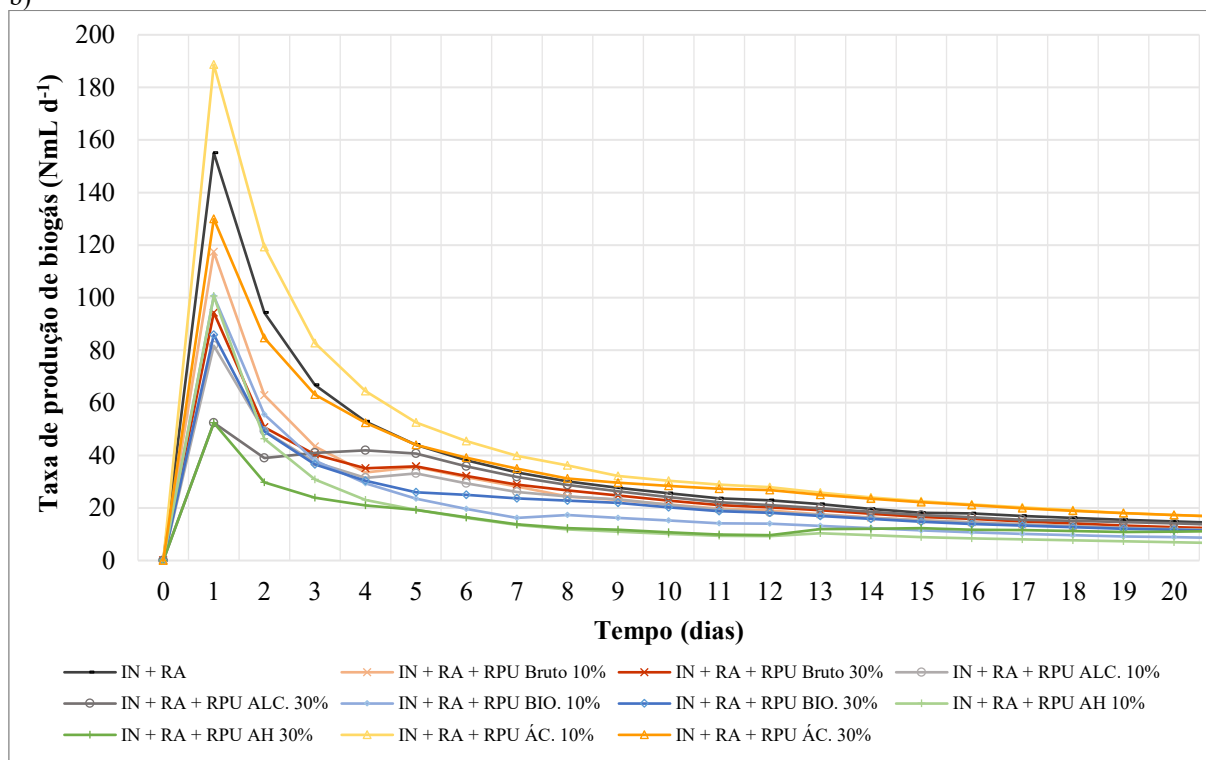
A Figura 33 apresenta a taxa de produção diária de biogás de duas maneiras diferentes: durante todo o período de monitoramento (Figura 34-a) e com destaque nos primeiros quinze dias do ensaio BMP, para melhor visualização do comportamento de cada uma das condições (Figura 34-b).

Figura 34 – Taxa de produção diária de biogás para as condições de codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado

a)



b)



Fonte: A autora (2023)

A maior taxa de geração de biogás foi atribuída a condição C4, no 1º dia de ensaio, com valor igual a 188,63 NmL d⁻¹, valor este superior ao encontrado por Crovador (2014) de 49,45 NmL d⁻¹ e inferior ao obtido por Helenas (2019) de 231,44 NmL d⁻¹.

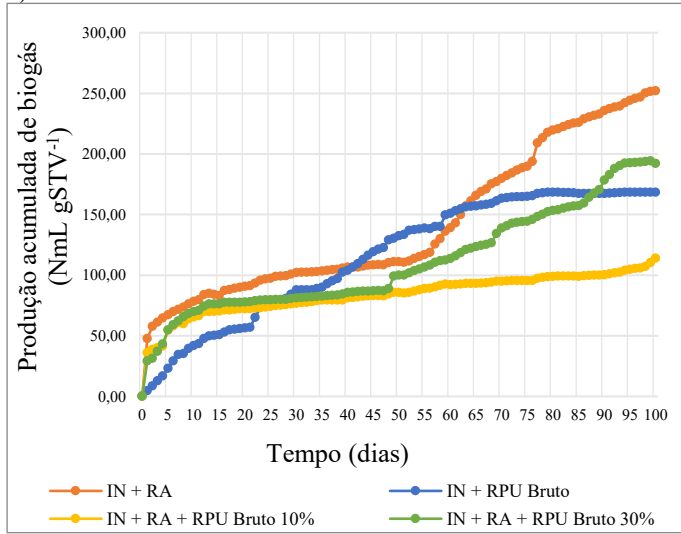
Ambas as figuras indicam que a maior produção de biogás ocorreu nos primeiros dias de experimento. Este pico de geração de biogás no início da incubação das amostras é explicado pela maior quantidade de matéria orgânica disponível e pelos AGVs que já estavam acessíveis na mistura para conversão em biogás. Ou seja, a disponibilidade e o ritmo de conversão atuam de maneira proporcional: à medida que a disponibilidade diminui, o ritmo de conversão e remoção da carga orgânica também diminuem.

Borth (2021) explica também que este pico pode estar relacionado a presença de substâncias facilmente biodegradáveis no substrato, uma vez que após estas serem convertidas, o processo seguiu em um ritmo mais lento, indicando a presença de materiais de difícil degradação por parte dos microrganismos.

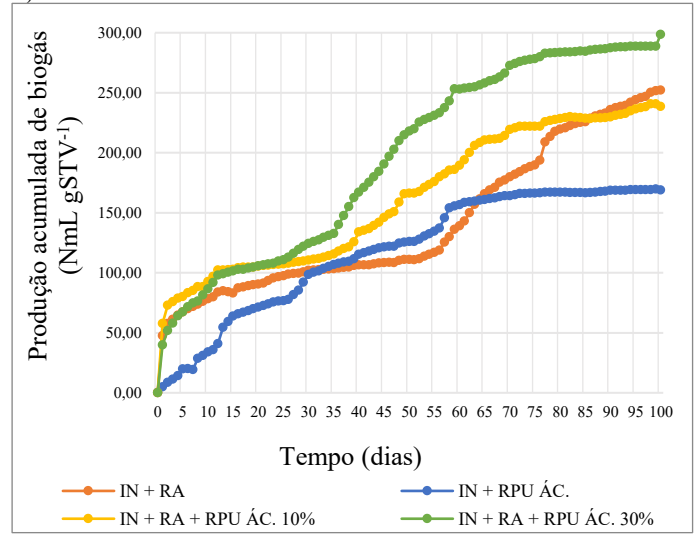
Neste ensaio, avaliou-se tanto o potencial bioquímico de condições de CoDA, quanto de mono-digestão. Elaborou-se, portanto, gráficos separados por categoria de pré-tratamento, ou seja, comparação de mono e codigestão anaeróbia com os mesmos resíduos previamente tratados. Desta forma, a Figura 35 mostra a produção específica acumulada de biogás de todas as condições entre os mesmos tipos de pré-tratamento.

Figura 35 – Produção específica acumulada de biogás entre os mesmos tipos de pré-tratamento

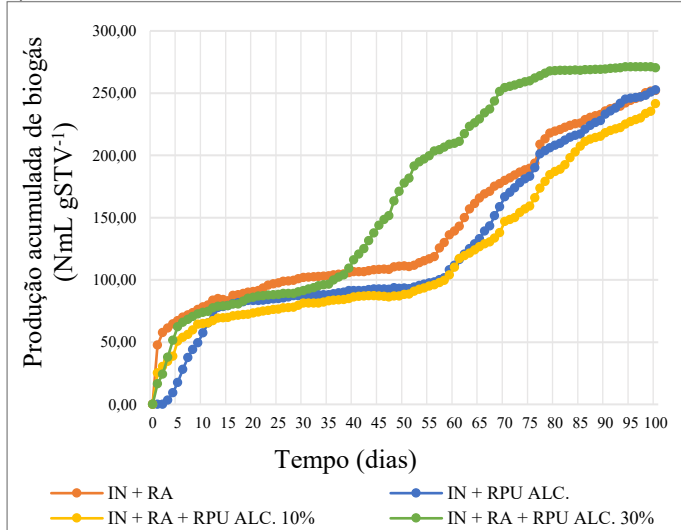
a) RPU Bruto



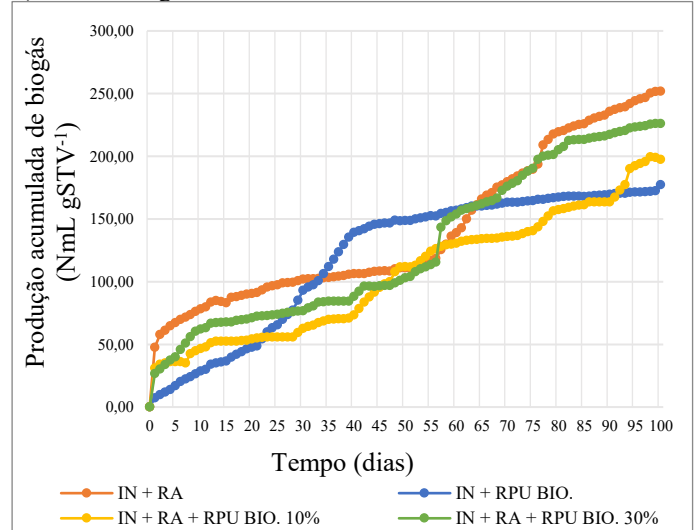
b) RPU Ácido



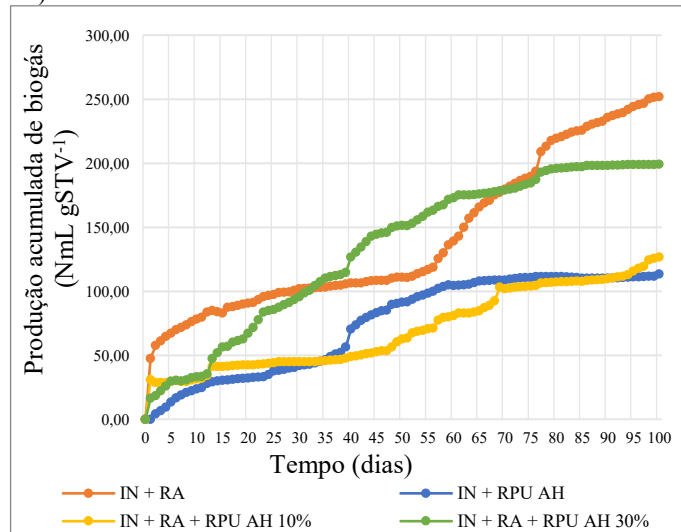
c) RPU Alcalino



d) RPU Biológico



e) RPU Auto-hidrólise



Fonte: A autora (2023)

A Figura 35-a compara o desempenho da mono-digestão de resíduo alimentar, mono-digestão de resíduo de poda urbana bruto e a codigestão anaeróbia destes dois substituindo-se 10% e 30% do STV do RA por RPU. Como esperado, a melhor produção específica acumulada de biogás ocorreu na condição de mono-digestão anaeróbia de RA, com valor de 251,93 NmL gSTV⁻¹, seguido pela CoDA de IN. + RA + RPU B. 30% (192,11 NmL gSTV⁻¹). A grande diferença entre o primeiro e o segundo lugar está relacionada a maior facilidade de degradação dos componentes do substrato RA quando comparado ao RPU (sozinho ou em mistura). Resíduos lignocelulósicos são hidrolisados mais lentamente e muitas vezes de maneira incompleta, considerando sua característica de má digestibilidade que dificulta a conversão do biossólido em biogás (HU *et al.*, 2016; KUNZ *et al.*, 2019).

As comparações entre as condições de mono e codigestão anaeróbia do pré-tratamento químico ácido (Figura 35-b) indicam a melhor produção específica acumulada de biogás para o tratamento IN. + RA + RPU. ÁC. 30% (298,59 NmL gSTV⁻¹). Com pouca diferença entre o segundo e terceiro melhor rendimento, está a mono-digestão de RA e a codigestão anaeróbia de RPU 10%. Afirma-se, neste caso, que a acessibilidade aos componentes do resíduo lignocelulósico promovida pelo pré-tratamento ácido superou a facilidade de biodegradação do RA, assim, tanto os componentes estruturais do RPU, quanto o substrato alimentar disponível foram consumidos nas condições de CoDA - que apresentavam mais compostos orgânicos para conversão em biogás.

A Figura 35-c confronta os resultados de produção específica acumulada de biogás para as condições com RA, RPU e RPU após pré-tratamento químico alcalino. A melhor condição manteve-se para a codigestão anaeróbia de RA + RPU, com substituição de 30%, atingindo o valor máximo de 270,32 NmL gSTV⁻¹ após os 100 dias de experimento. Diferente do obtido para a condição avaliada anteriormente, o segundo e terceiro lugar ficou bastante equivalente no que se refere as condições de mono-digestão de IN. + RA e IN. + RPU ALC. Conforme explica Liao *et al* (2004), as mudanças estruturais das fibras após o pré-tratamento alcalino promovem melhoras na etapa metanogênica da digestão anaeróbia, visto que os compostos biodegradáveis (celulose e hemicelulose) estão facilmente acessíveis. Desta forma, mesmo que o RA apresente facilidade de biodegradação pelos microrganismos, estes também tiveram fácil acesso a celulose e hemicelulose após o pré-tratamento com NaOH para conversão a biogás, o que justifica os valores aproximados em ambas as condições.

Por sua vez, a comparação apresentada na Figura 35-d indica que entre as condições de mono-digestão e codigestão anaeróbia após pré-tratamento biológico, o melhor tratamento ocorreu para a mono-digestão de RA (251,93 NmL gSTV⁻¹), seguido pela codigestão anaeróbia

de IN. + RA + RPU BIO. 30% (226,08 NmL gSTV⁻¹). Embora a mono-digestão tenha se apresentado como melhor situação, sabe-se que a CoDA é uma saída satisfatória para tratamento de mais de um resíduo. Neste caso, trata-se o resíduo alimentar e o resíduo de poda urbana. Considerando uma situação real de uma cidade, por exemplo, opta-se por produzir menos biogás e tratar dois passivos, do que escolher apenas um substrato para tratar com pouca diferença final de rendimento. Ainda, *Pleurotus ostreatus* é um grupo de cogumelos com alto valor nutricional, possuindo diversas aplicações terapêuticas e biotecnológicas (MACHADO, 2009), bem como a inexistência ou baixa formação de subprodutos tóxicos às etapas subsequentes do processo, devido às condições mais brandas de trabalho (SHIRKAVAND *et al.*, 2016), o que faz da sua aplicação no tratamento de resíduos orgânicos uma solução sustentável e ambientalmente correta.

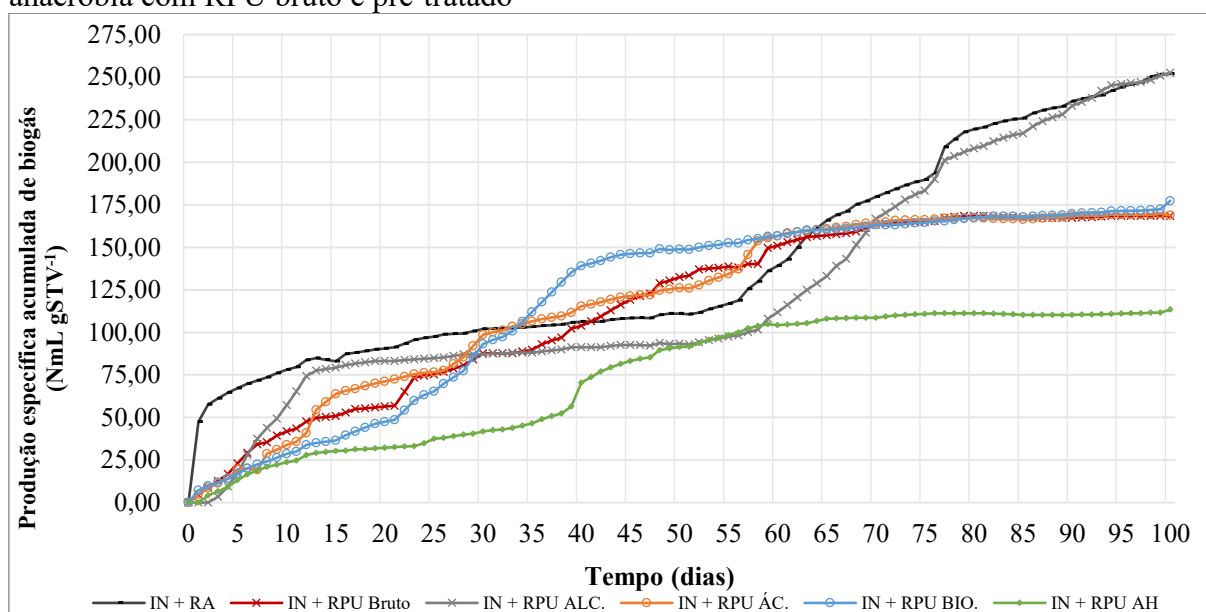
Finalmente, a comparação apresentada na Figura 35-e indica que a maior produção específica acumulada de biogás também ocorreu para a mono-digestão de RA, seguida pela codigestão anaeróbia IN. + RA + RPU AH 30%. Sabe-se que na auto-hidrólise as moléculas de água penetram na biomassa, promovendo a hidratação da celulose, a dissolução das hemiceluloses e a remoção parcial de lignina (RIBEIRO, 2016). Assim, a menor produção específica acumulada de biogás (199,28 NmL gSTV⁻¹) pode estar relacionada a esta remoção parcial de lignina e, conseqüentemente, menos acesso aos açúcares pelos microrganismos nas condições de CoDA.

Magalhães (2018), ao avaliar o desempenho da digestão anaeróbia com resíduos orgânicos oriundos do restaurante universitário, realizou ensaios de potencial bioquímico de metano (BMP) para avaliar a melhor relação inóculo/substrato (I/S) em g/SV e o aumento da produção específica de metano com a utilização de resíduo lignocelulósicos (poda) como co-substrato nas condições operacionais que garantissem a estabilidade do processo de digestão anaeróbia. Os maiores volumes acumulados de biogás (1208,06 NmL) e específico de metano (420,33 NmLCH₄ gSTV⁻¹) foram obtidos na relação I/S 1:1 e os maiores valores de biogás (1566,06 NmL) e produção específica de metano (536,04 NmLCH₄ gSTV⁻¹) foram obtidos com co-substrato de poda na concentração de 5%.

Navarro (2020), ao estudar a digestão anaeróbia de resíduos alimentares com resíduos de poda vegetal, provenientes do corte de grama (GR) e árvores: folhas e galhos (RP), substituindo em 5% do STV do RU nos experimentos em escala de bancada BMP, variou a relação inóculo/substrato em 1:1 e 1:2, obteve maior produção de metano no tratamento de RA+GR (1:1) com 271,33 NmL gSTV⁻¹.

A Figura 36 apresenta a produção específica acumulada de biogás para as condições de mono-digestão com RPU bruto e pré-tratado. O maior valor de PE foi obtido pela condição IN. + RPU ALC., com valor 252,57 NmL gSTV⁻¹. Kim. Lee e Kim (2016) explicam que o pré-tratamento alcalino contribui para o aumento da porosidade da biomassa e do componente celulose por meio da saponificação das ligações de ésteres entre a lignina e hemicelulose, além de romper as ligações de carbono-carbono das moléculas de lignina, facilitando o acesso aos açúcares e promovendo maiores conversões orgânicas.

Figura 36 - Produção específica acumulada de biogás para as condições de mono-digestão anaeróbia com RPU bruto e pré-tratado

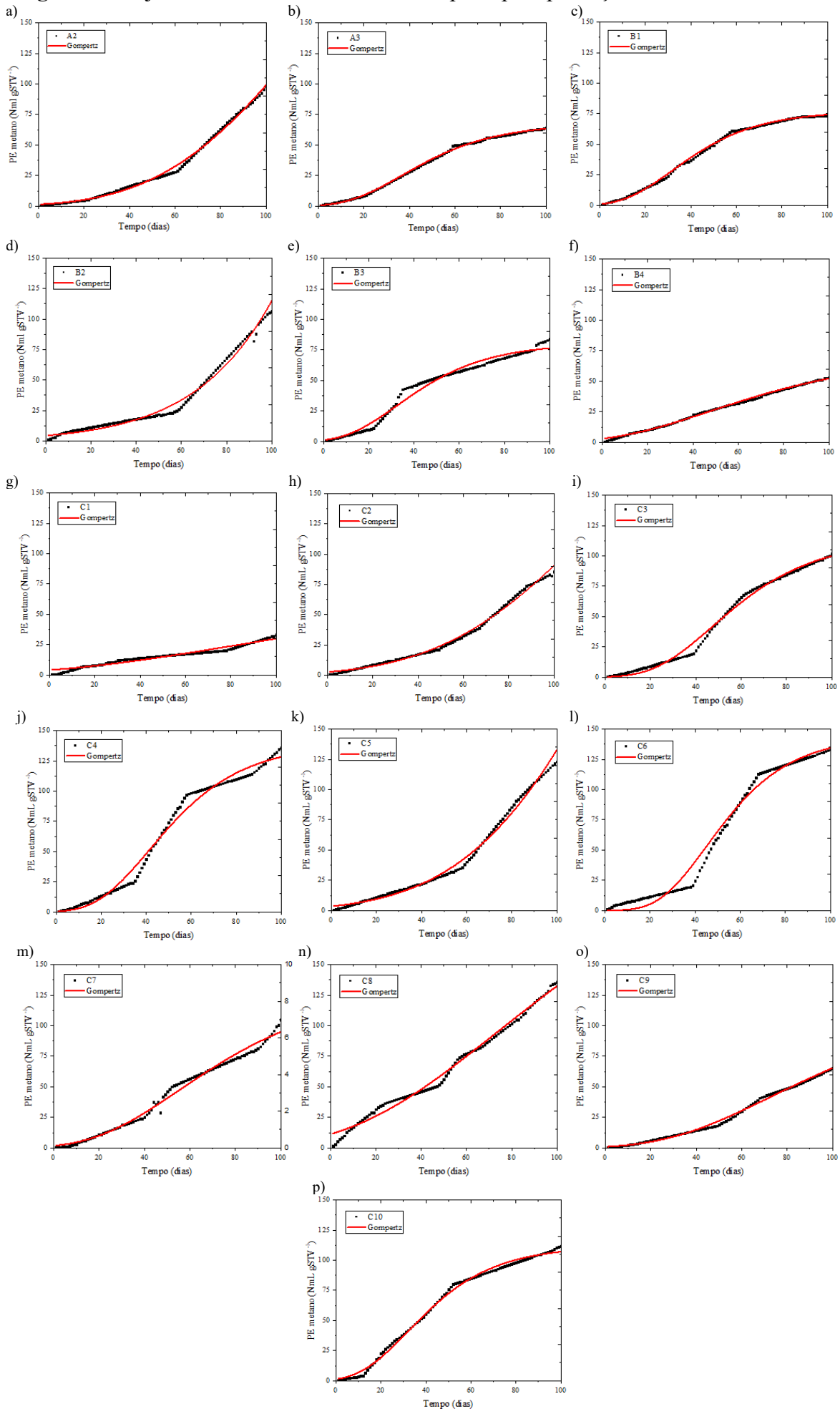


Fonte: A autora (2023)

5.2.3 Cinética: Modelo de Gompertz Modificado

Em sistemas em batelada, como é o caso do Ensaio BMP, diversos modelos analíticos podem ser obtidos visando a modelagem das taxas de transformação (SCHOMMER, 2019). A equação de Gompertz modificada, usualmente aplicada à degradação de substratos orgânicos, é um dos modelos que mais se ajustam aos resultados experimentais de cinética de produção de metano (GOMPertz, 1825). Segundo Schommer (2019), a equação de Gompertz modificado baseia-se na utilização de três parâmetros: produtividade máxima de metano (L_0), taxa máxima de produção de metano (R_b) e tempo de fase *lag* (λ). A produção específica acumulada de metano nas diferentes condições experimentais avaliadas é ilustrada na Figura 37, sendo que as linhas representam o ajuste do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais obtidos.

Figura 37 - Ajuste do modelo cinético de Gompertz para produção de metano



Fonte: A autora (2023)

A Tabela 37 apresenta os coeficientes para os parâmetros do modelo de Gompertz modificado.

O modelo cinético de Gompertz modificado se mostrou adequado para descrever a produção específica acumulada de metano dos tratamentos, prevendo satisfatoriamente o potencial de produção das condições estudadas, uma vez que em todas as condições os valores de coeficiente de determinação (R^2) foram superiores a 0,99. Kafle, Kim e Sung (2012) afirmam que a previsão do rendimento de metano usando este modelo cinético possui um erro de ajuste entre 0,7% e 13,7%.

Tabela 37 - Parâmetros cinéticos de Gompertz modificado para produção de metano

Tratamento	Metano				
	Lreal (NmL)	L0 (NmL)	Rb (NmL CH ₄ d ⁻¹)	λ (d)	R ²
A2	97,83	554,56	2,54	63,43	0,99
A3	64,42	67,74	1,06	13,03	0,99
B1	73,21	77,34	1,33	10,50	0,99
B2	106,66	3009,08	11,72	119,94	0,99
B3	83,84	80,46	1,30	9,89	0,99
B4	52,80	69,12	0,61	6,00	0,99
C1	33,21	67,61	0,31	2,96	0,99
C2	85,37	592,07	2,31	65,20	0,99
C3	101,87	113,98	1,61	21,50	0,99
C4	135,76	139,06	2,19	17,99	0,99
C5	123,21	1874,52	5,96	96,94	0,99
C6	133,09	144,60	2,53	24,13	0,99
C7	104,82	129,01	1,26	17,73	0,99
C8	135,64	256,20	1,47	8,98	0,99
C9	65,49	144,90	0,91	26,70	0,99
C10	111,68	111,70	1,91	10,55	0,99

Fonte: A autora (2023)

A produtividade máxima de metano (L0) obtida pelo modelo indicou que nas condições A2, B2, C2 e C5 era possível maior desempenho, com valores superiores aos encontrados durante o Ensaio BMP. Este fato pode indicar que o experimento foi encerrado antes do tempo ideal, com maiores possibilidades de produtividade. Tal fato também pode ser observado nos perfis de PE de metano obtidos nos gráficos (Figura 36-a, d, h, k, n), cujas curvas mantêm-se em crescimento, sem fase estacionária evidente, como visualizado nas demais condições. Por sua vez, nas condições A3, B1, B4, C3, C4, C6, C7 e C10, o valor de L0 calculado e o Lreal estiveram próximos, indicando que o experimento ocorreu de maneira apropriada, atingindo as expectativas de produção ideal.

Com exceção da condição B2, a qual os resultados apresentaram grande diferença quando comparados aos valores reais do experimento, a taxa máxima de produção (Rb) variou

de 0,91 a 5,96 NmLCH₄ d⁻¹. Sendo que o tratamento C5 apresentou maiores valores de Rb (5,96 NmLCH₄ d⁻¹). Esta condição, referente a codigestão anaeróbia de RA + RPU pré-tratado com hidróxido de sódio, possui boas expectativas de conversão orgânica em biogás e metano pelos microrganismos, haja vista a maior transformação dos componentes estruturais do RPU em glicose, fonte de energia utilizada pelas bactérias anaeróbias.

A fase *lag* corresponde ao tempo necessário para que os microrganismos se adaptem ao ambiente ou o tempo necessário para a produção de biogás. A maior parte dos tratamentos indicaram rápida fase *lag* (λ), com valor médio de 13,02 dias para as condições com menores L0. Valores mais baixos de λ indicam que ocorreu o início do consumo da matéria orgânica logo após a incubação, devido a rápida adaptação dos microrganismos na mistura (ZHAO *et al.*, 2016). Já as condições de L0 elevadas, também obtiveram fase *lag* elevada. Esta situação pode ser explicada pela demora de adaptação dos microrganismos ao meio, bem como degradação mais lenta dos substratos, especialmente os resíduos lignocelulósicos.

5.2.4 Análises Estatísticas

Como o gás de interesse para o aproveitamento energético é o metano, devido ao seu poder calorífico, este foi avaliado estatisticamente. A Tabela 38 apresenta os resultados para a PE de metano após o Ensaio BMP, os quais foram comparados utilizando o Teste de Tukey.

Tabela 38 – Produção específica acumulada de metano para as condições estudadas e Teste Tukey

Tratamento	Média ± DP (NmL gSTV ⁻¹)
C4: IN. + RA + RPU ÁC. 30	137,23 ± 4,29 ^a
C8: IN. + RA + RPU BIO. 30	135,64 ± 3,42^a
C6: IN. + RA + RPU ALC. 30	133,09 ± 3,04 ^a
C5: IN. + RA + RPU ALC. 10	123,21 ± 7,38 ^{ab}
C10: IN. + RA + RPU AH 30	111,68 ± 4,24 ^{bc}
B2: IN. + RPU ALC.	106,66 ± 8,59 ^{bc}
C7: IN. + RA + RPU BIO. 10	104,82 ± 9,68 ^{bcd}
C3: IN. + RA + RPU ÁC. 10	101,87 ± 10,42 ^{cde}
A2: IN. + RA	97,83 ± 9,50 ^{cde}
C2: IN. + RA + RPU BRUTO 30	85,37 ± 4,70 ^{def}
B3: IN. + RPU BIO.	83,84 ± 6,43 ^{efg}
B1: IN. + RPU ÁC.	73,21 ± 7,69 ^{fg}
C9: IN. + RA + RPU AH 10	65,49 ± 5,66 ^{gh}
A3: IN. + RPU BRUTO	64,42 ± 6,77 ^{gh}
B4: IN. + RPU AH	52,80 ± 2,16 ^{hi}
C1: IN. + RA + RPU BRUTO 10	33,21 ± 2,55 ⁱ

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: A autora (2023)

Conforme apresentado anteriormente, os tratamentos C4, C8, C6 e C5 não apresentaram diferença significativa entre si, quando avaliado a produção específica acumulada de metano. Neste sentido, para dar continuidade aos experimentos, optou-se por aprofundar o estudo a respeito do pré-tratamento biológico com o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*. Este pré-tratamento (C8) apresentou 58,88% a mais de rendimento de metano quando comparado ao processo utilizando 30% resíduo bruto (C2) e 308,43% quando comparado à condição utilizando apenas 10% de resíduo bruto (C1). Se a comparação fosse realizada entre as condições utilizando 10% do RPU pré-tratado biologicamente (C7) e sem tratamento (C1), ainda assim o rendimento de metano seria 215,63% maior para a primeira.

A utilização deste fungo apresenta inúmeras vantagens em relação aos demais pré-tratamentos, como a não utilização de compostos químicos, geração de um efluente não prejudicial ao ambiente, menores gastos com reagentes e condições mais brandas de tratamentos. Ainda neste contexto, verificou-se a ausência de literatura usando este basidiomiceto para pré-tratamento de resíduo de poda urbana com vistas a aproveitamento energético a partir do biogás. Portanto, acredita-se que este estudo seja de grande valia para o meio acadêmico, especialmente para pesquisadores atuantes na área de tratamento de resíduos orgânicos que buscam, cada vez mais, tornar seus projetos sustentáveis e ambientalmente corretos.

5.2.5 Considerações sobre a Etapa 2

Uma vez que o ensaio BMP é realizado em um sistema de digestão anaeróbia em batelada, deve-se considerar que este não reflete a realidade do sistema. Como no BMP há grande quantidade de inóculo, as condições são otimizadas devido à elevada alcalinidade e quantidade de microrganismos adicionada. Além disso, neste sistema há um controle operacional mais rigoroso dos parâmetros de monitoramento e de desempenho, com menor influência de fatores externos.

Assim, este teste não oferece informações sobre estabilidade do processo com reatores alimentados continuamente com o material investigado, sobre a produção de biogás em condições práticas diferentes das de realização do teste, devido a possíveis efeitos sinérgicos positivos ou negativos e sobre os limites de carga orgânica volumétrica.

Nesse sentido, por fornecer resultados do potencial máximo de produção de biogás de um substrato em função do inóculo utilizado, o Ensaio BMP é uma ferramenta que auxilia na

tomada de decisões para seleção de condições a serem aplicadas em escalas maiores. Contudo, o aumento de escala exige cautela e, por isso, as condições podem levar a resultados diferentes.

Para a Etapa 2, embora o pré-tratamento ácido tenha promovido melhores reduções de STV e DQO e o alcalino tenha resultados em melhores volumes acumulados de biogás, não houve diferença significativa entre eles e o pré-tratamento biológico quando considerada a produção específica de metano.

Uma possível justificativa para este resultado é a presença da matéria orgânica proveniente da biomassa fúngica no sistema. Como o *Pleurotus ostreatus* é um microrganismo aeróbio, sua atuação ocorre apenas enquanto cresce no material lignocelulósico. A partir do momento que o pré-tratamento biológico é interrompido e o RPU é aplicado no sistema anaeróbio, a biomassa fúngica transforma-se em matéria orgânica passível de conversão, uma vez que não sobrevive em meios anaeróbios. Neste caso, além da matéria orgânica proveniente do resíduo alimentar e do resíduo de poda urbana previamente hidrolisado, os microrganismos anaeróbios contam com a matéria orgânica proveniente do fungo para conversão em biogás e metano.

Desta forma, o pré-tratamento com *Pleurotus ostreatus* se mostrou uma alternativa promissora para a produção de biogás e metano, pois além de menos oneroso, é eficiente no que se refere à solubilização e remoção de estruturas recalcitrantes dos resíduos lignocelulósicos, além de produzirem baixas quantidades de possíveis inibidores da DA.

5.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *PLEUROTUS OSTREATUS* - ETAPA 2A

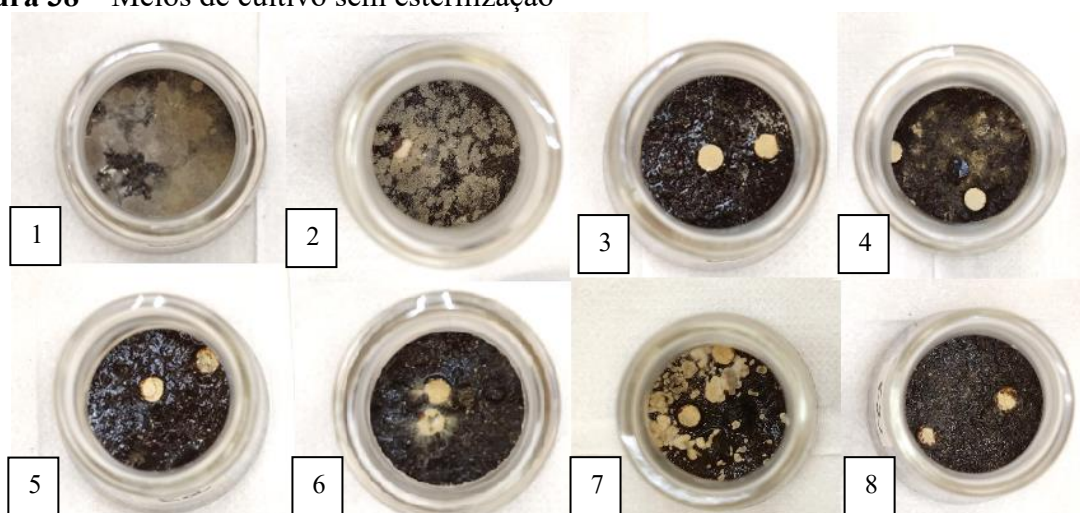
A composição da solução umedecedora determina a quantidade e qualidade do crescimento fúngico. Quando um fungo cresce bem em um substrato e não em outro, acredita-se que nutrientes específicos estejam envolvidos (CARNAÚBA *et al.*, 2007). Neste sentido, buscou-se avaliar diferentes soluções umedecedoras para crescimento de *Pleurotus ostreatus*, visando comparar este crescimento em diferentes cenários e apresentar uma possibilidade de economia financeira na aplicação em maior escala.

Sabe-se que para que o crescimento dos fungos em soluções umedecedoras seja eficiente, são necessários alguns cuidados durante seu preparo. Isso porque são fundamentais que as condições estejam ideais para simular um ambiente natural para proliferação de microrganismos. A esterilização destas soluções é fundamental dentro do processo. O principal objetivo é remover totalmente a capacidade reprodutiva de todos microrganismos indesejáveis para uma determinada análise, deixando o meio propício somente para o objeto de estudo.

Porém, é uma técnica dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e do consumo de energia, e a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes orgânicos da solução umedecedora (TEIXEIRA; SOUSA; TEIXEIRA, 2005).

Neste sentido, avaliou-se a necessidade da esterilização das soluções umedecedoras do RPU em que o fungo *Pleurotus ostreatus* seria adicionado. Fixando o tempo de incubação (14 dias) e a temperatura (28 °C), dois blocos de placas foram cultivados, variando-se a solução umedecedora, os nutrientes e a esterilização. A Figura 38 apresenta os meios de cultivo sem esterilização, sendo que os números se referem aos seguintes tratamentos: 1) Controle 2, 2) A2, 3) B2, 4) C2, 5) D2, 6) E2, 7) F2 e 8) G2.

Figura 38 – Meios de cultivo sem esterilização



CONTROLE 2: Vogel, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Não estéril

A2: Água, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Não estéril

B2: Vogel, 1% Glucose, Não estéril

C2: Água, 1% Glucose, Não estéril

D2: Vogel, 1,5% Extrato de Levedura, Não estéril

E2: Água, 1,5% Extrato de Levedura, Não estéril

F2: Vogel, Não estéril

G2: Água, Não estéril

Fonte: A autora (2023)

De acordo com a imagem, é possível observar que nas condições em que as soluções não foram esterilizadas, houve crescimento de microrganismos diversos, sem especificidade de crescimento do fungo de interesse. O calor úmido da autoclavagem conduz à destruição rápida de organismos por coagulação das proteínas constituintes das suas células. Ou seja, o meio de cultivo (solução umedecedora + RPU) ficará livre de qualquer interferente e pronto para receber a hifa específica para crescimento e desenvolvimento. Nota-se, portanto, a presença de outras culturas, impedindo o crescimento próspero do foco do estudo (fungo *Pleurotus ostreatus*), ou o não crescimento de nenhuma cultura. Assim, este bloco de meios de cultivo foi descartado e a etapa experimental prosseguiu apenas com o bloco esterilizado.

A Tabela 39 apresenta os resultados de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após o experimento da Etapa 2A.

Tabela 39 - Valores de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, balanço de massa, rendimento e deslignificação após pré-tratamento biológico – Etapa 2A

Tratamento	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Balanço de Massa (%)	Rendimento (%)	Deslignificação (%)
Controle 1	21,95 ± 2,21	29,40 ± 1,64	21,74 ± 2,69	1,98 ± 0,50	73,09	89,13	19,68
A1	20,67 ± 0,87	32,77 ± 1,10	21,12 ± 1,81	2,37 ± 0,75	74,55	92,60	24,39
B1	25,56 ± 1,52	29,31 ± 2,20	20,35 ± 1,86	1,84 ± 0,09	75,22	90,27	6,49
C1	22,44 ± 2,40	34,41 ± 2,31	19,39 ± 1,02	1,95 ± 0,81	76,24	95,08	17,89
D1	20,73 ± 1,80	32,73 ± 1,02	18,86 ± 1,09	2,18 ± 0,20	72,32	90,14	24,14
E1	24,27 ± 3,33	29,60 ± 2,54	19,99 ± 1,51	1,33 ± 0,68	73,86	88,53	11,22
F1	22,28 ± 2,22	32,78 ± 1,11	20,27 ± 0,72	1,61 ± 0,42	75,33	92,98	18,49
G1	24,43 ± 3,80	33,29 ± 2,87	21,02 ± 2,45	2,26 ± 0,42	78,74	94,45	10,61
RPU bruto	27,33 ± 3,22	12,38 ± 3,17	22,35 ± 1,00	0,91 ± 0,32	62,06	-	-

CONTROLE 1: Vogel, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

A1: Água, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

B1: Vogel, 1% Glucose, Estéril

C1: Água, 1% Glucose, Estéril

Fonte: A autora (2023)

D1: Vogel, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

E1: Água, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

F1: Vogel, Estéril

G1: Água, Estéril

Importante ressaltar que para esta etapa, realizou-se, novamente, a caracterização do RPU bruto. Esta caracterização fez-se necessária por dois motivos: a grande heterogeneidade do RPU e a realização do experimento em momento diferente da primeira caracterização.

Os dois fatores que mais frequentemente determinam o sucesso de uma cultura de fungos são a origem da cepa e o meio nutritivo onde são cultivados. O meio nutritivo é composto por elementos essenciais e por componentes opcionais. Os nutrientes essenciais são os sais inorgânicos, os carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Por sua vez, os componentes opcionais - que podem ser incluídos para auxiliar o crescimento de determinadas culturas - são as fontes de nitrogênio orgânico, ácidos orgânicos e substâncias complexas (ZAVATTIERI, 2002).

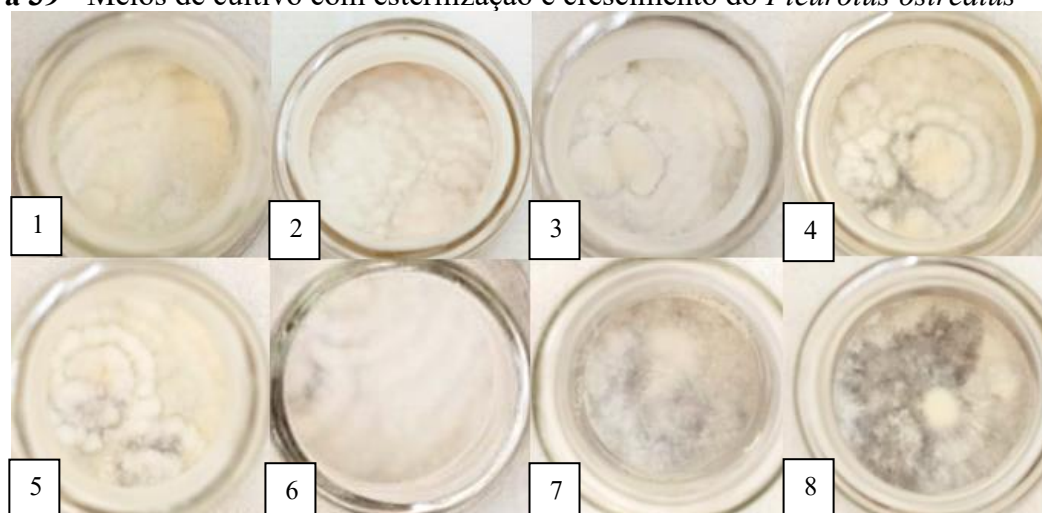
Muitas são as fontes de carbono. A glucose e a frutose podem, assim como a sacarose, ser usadas e a glucose pode substituir com êxito a sacarose em meios específico. Outros carboidratos têm sido testados (lactose, maltose, galactose e amido), no entanto, estes compostos são geralmente inferiores a sacarose ou a glucose como fontes de energia (ZAVATTIERI, 2002). Já o extrato de levedura, é um autolizado desidratado de leveduras, que representa uma excelente fonte de nitrogênio e vitaminas, especialmente de vitaminas hidrossolúveis do grupo B. É usado em formulações de meios de cultura como uma excelente fonte de crescimento. O extrato de levedura é considerado um produto não animal e é usado extensivamente para muitas formulações para cultura de bactérias e fungos (LKP, 2022).

Neste sentido, esperava-se que as condições acrescidas de glucose e extrato de levedura apresentariam melhores desempenhos no crescimento do *Pleurotus ostreatus* e, conseqüentemente, maiores conversões da lignina, tendo em vista a relação destes dois. No entanto, não foi o que ocorreu. Considerando os resultados apresentados na Tabela 39, pode-se

afirmar que todas as condições apresentaram remoção satisfatória de lignina, com maiores deslignificações nos tratamentos A1 (24,39%), D1 (24,14%) e F1 (18,49%). As condições A1 e D1 possuem, em sua composição, extrato de levedura, que é um nutriente importante para produção de lacase, enzima que atua diretamente na lignina da parede vegetal da biomassa. Houve, também, redução da hemicelulose em todos os tratamentos. Da mesma forma que os resultados da Etapa 1 (Tabela 22), os percentuais de celulose aumentaram, justificado não só pela metodologia empregada para esta análise, mas também pela maior disponibilidade deste constituinte.

A Figura 39 apresenta os meios de cultivo do bloco esterilizado após os 14 dias de incubação, sendo que os números se referem aos seguintes tratamentos: 1) Controle 1, 2) A1, 3) B1, 4) C1, 5) D1, 6) E1, 7) F1 e 8) G1.

Figura 39 - Meios de cultivo com esterilização e crescimento do *Pleurotus ostreatus*



CONTROLE 1: Vogel, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

A1: Água, 1% Glucose, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

B1: Vogel, 1% Glucose, Estéril

C1: Água, 1% Glucose, Estéril

D1: Vogel, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

E1: Água, 1,5% Extrato de Levedura, Estéril

F1: Vogel, Estéril

G1: Água, Estéril

Fonte: A autora (2023)

A partir da imagem anterior, nota-se que em todos os tratamentos houve crescimento homogêneo do *Pleurotus ostreatus*. Independente da composição da solução umedecedora, todo o RPU foi tomado pelas hifas do fungo, promovendo maior contato destes e maiores chances da enzima lacase atuar na estrutura lignocelulósica.

Para esta etapa experimental, realizou-se ensaio fatorial 2^3 variando os fatores solução umedecedora (com água e com Vogel), glucose (0% e 1%) e extrato de levedura (0% e 1,5%). Pela ANOVA, tem-se que apenas a interação dos fatores solução umedecedora e glucose foi significativa nos resultados de lignina residual (Tabela 40).

Tabela 40 – Análise de variância para a lignina considerando os fatores avaliados

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Solução umedecedora	1	3,66990	3,66990	0,7872	0,382
Glucose	1	2,61601	2,61601	0,5612	0,4596
Extrato	1	4,70852	4,70852	1,01	0,3229
Solução umedecedora*Glucose	1	22,39611	22,39611	4,8042	0,0363
Solução umedecedora *Extrato	1	3,20601	3,20601	0,6877	0,4135
Glucose*Extrato	1	4,10323	4,10323	0,8802	0,3556
Solução umedecedora*Glucose*Extrato	1	6,68280	6,68280	1,4335	0,2406
Resíduo	30	139,85239	4,66175		
Total	37	187,23498			

Fonte: A autora (2023)

Avaliando a interação significativa entre solução umedecedora e glucose, houve uma diferença significativa apenas para a solução umedecedora quando fixado 0% de glucose, em que a solução umedecedora com meio Vogel gerou maior remoção de lignina quando comparado a solução umedecedora com água.

Os resultados apresentados anteriormente indicam que não houve diferença significativa nos resultados de degradação de lignina ao variar o fator glucose nos níveis da solução umedecedora. Portanto, independente da solução escolhida e/ou composição do nutriente glucose, os resultados de remoção de lignina foram estatisticamente iguais.

Por fim, avaliou-se o efeito simples do fator extrato de levedura (0% e 1,5%) a partir do teste de Tukey, e o resultado indicou que as médias deste fator são estatisticamente iguais. Ou seja, adicionando ou não o nutriente extrato de levedura na composição da solução umedecedora, o resultado remoção de lignina é estatisticamente semelhante.

A partir do exposto, pode-se afirmar que independente da solução umedecedora e dos nutrientes adicionados nesta composição, todos os tratamentos apresentaram crescimento do *Pleurotus ostreatus* e remoção significativa de lignina, tanto que estatisticamente, todos os resultados foram iguais. Desta forma, conclui-se que há a possibilidade de economia financeira no que se refere a compra de consumíveis e insumos, uma vez que a solução umedecedora mais completa (condição ideal) e a mais simples (apenas com água) tiveram desempenhos satisfatórios e equivalentes.

De maneira simplificada, a Tabela 41 apresenta o valor total (em reais) dos custos dos insumos para produção de 1 L de meio Vogel fortificados com os nutrientes glucose e extrato de levedura (1% e 1,5%, respectivamente) e os valores médios dos reagentes (em frasco e proporcional ao volume usado). Ressalta-se que para produção de 100 mL de solução de elementos traços e 50 mL de solução de biotina gasta-se R\$ 0,20, portanto, proporcionalmente, este valor em reais é insignificante.

Tabela 41 – Valor médio para produção de meio de cultivo considerando a condição ideal
1 L de Meio Vogel + 1% de Glucose + 1,5% de Extrato de Levedura

Insumos	Quantidade Usada	Quantidade do Frasco	Valor Médio Frasco (R\$)	Valor Proporcional para o Meio de Cultivo (R\$)
Meio Vogel				
Citrato de Na 5. H ₂ O (g)	150,00	500,00	71,66	21,50
KH ₂ PO ₄ anidro (g)	250,00	500,00	120,36	60,18
NH ₄ NO ₃ anidro (g)	100,00	500,00	99,72	19,94
MgSO ₄ 7. H ₂ O (g)	10,00	500,00	17,73	0,35
CaCl ₂ 2. H ₂ O (g)	5,00	500,00	32,98	0,33
Solução Elementos Traços (mL)	5,00	100,00*	0,20	0,00
Solução de Biotina (mL)	2,50	50,00*	< 0,01	0,00
Glucose (g)	10,00	500,00	33,05	0,66
Extrato de Levedura (g)	15,00	500,00	337,28	10,12
			Valor Total (R\$):	114,49

* Quantidades preparadas previamente: Para 100 mL de Solução de Elementos Traço, utiliza-se 5g de ácido cítrico 1.H₂O, 5g de ZnSO₄ 7.H₂O, 1g de Fe (NH₄) (SO₄)₂ 6.H₂O, 0,25g de CuSO₄ 5.H₂O, 0,25g de MnSO₄ H₂O, 0,05g de H₃BO₃ anidro e 0,05g de Na₂MoO₄ 2.H₂O. Para 50mL de Solução de Biotina, utiliza-se 5mg de biotina.

Fonte: A autora (2023)

Neste contexto, pode-se afirmar que o uso de água como solução umedecedora é financeiramente mais vantajoso do que o uso da solução ideal composta por meio Vogel + 1% de glucose + 1,5% de extrato de levedura (R\$ 114,49 para 1 L), especialmente após as análises indicarem que não há diferença significativa entre as diferentes condições de meio de cultivo no resultado final do pré-tratamento biológico no que se refere a remoção de lignina.

5.3.1 Considerações sobre a Etapa 2A

Em razão das limitações de aplicação do pré-tratamento com o fungo *Pleurotus ostreatus* em larga escala, torna-se necessário a busca por tecnologias capazes de otimizar este pré-tratamento, de forma a estabelecer uma padronização mínima para seu emprego. Por isso, estudar meios para redução dos custos do processo é fundamental para disseminação do pré-tratamento biológico como uma alternativa aplicável e eficaz, uma vez que os gastos com insumos, reagentes e energia podem inibir a utilização desta tecnologia em potenciais produtores de biogás a partir da digestão anaeróbia.

Os resultados obtidos na Etapa 2A mostraram-se satisfatórios no quesito aumento de escala, uma vez que a utilização de água para cultivo e crescimento do *Pleurotus ostreatus* não afetou o desempenho do fungo no aspecto remoção de lignina. Como a Lacase, excretada pelo *Pleurotus ostreatus*, é a principal atuante na estrutura dos resíduos lignocelulósicos, estudos para produção industrial desta enzima podem ser uma alternativa de otimização do processo, bem como redução do tempo demandado para esta etapa prévia à digestão anaeróbia.

5.4 CODIGESTÃO ANAERÓBIA – ETAPA 3

As características dos resíduos utilizados na digestão anaeróbia podem interferir diretamente no processo, desta forma, a caracterização físico-química do inóculo, resíduo alimentar e resíduo de poda urbana utilizados na Etapa 3 é apresentada na Tabela 42.

Tabela 42 - Caracterização físico-química do inóculo e substratos utilizados na Etapa 3

Parâmetro	Unidade	Inóculo	Resíduo Alimentar	Resíduo de Poda Urbana
pH	-	7,12	4,68	6,32
Alcalinidade Total - AT	mg L ⁻¹	2328,80	673,00	125,70
Ácidos Graxos Voláteis - AGV	mg L ⁻¹	153,10	1600,20	390,40
Demanda Química de Oxigênio - DQOt	mgO ₂ L ⁻¹	26486,30	96526,80	96241,70
Sólidos Totais - ST	mg L ⁻¹	57450,00	110450,00	806,00
Sólidos Totais Voláteis - STV	mg L ⁻¹	39675,00	101850,00	731,00
Sólidos Totais Fixos - STF	mg L ⁻¹	17775,00	8600,00	75,00
STV/ST	-	0,69	0,92	0,91
Nitrogênio Kjeldahl Total - NKT	mg L ⁻¹	3370,00	2296,00	13,40*
Nitrogênio amoniacal	mg L ⁻¹	1678,00	185,00	-
Carbono orgânico	mg L ⁻¹	22041,67	56583,33	406,11
Relação Carbono/Nitrogênio - C/N	-	6,54	24,64	30,29
Carboidratos	% ST	-	64,55	-
Lipídios	% ST	-	20,28	-
Proteínas	% ST	10,49	14,35	-

* mg g⁻¹

Fonte: A autora (2023)

Os resíduos utilizados nesta etapa experimental apresentaram características similares aos resíduos usados na Etapa 2 (Ensaio BMP), ainda, apresentam valores próximos aos utilizados nos trabalhos desenvolvidos por Navarro (2020), Bortoloti (2021) e Borth (2021) utilizando os substratos de fonte similar.

O inóculo apresentou pH neutro (7,12), relação STV/ST de 69%, indicativo de parcialmente estabilizado, baixa concentração de AGV (153,10 mg L⁻¹) e elevado poder tamponante (AT de 2328,80 mg L⁻¹). Por sua vez, o RPU apresentou pH próximo da neutralidade (6,32), elevado teor de matéria orgânica (STV/ST de 91%) e relação C/N (30,29) adequada para sua utilização como co-substrato com RA em processos anaeróbios (BORTH, 2021). Ao estudarem a codigestão anaeróbia de resíduo de jardinagem (grama, folhas e pedaços de madeira) e resíduo alimentar, Panigrahi, Sharma e Dubey (2020) obtiveram valores de 89,50% para ST, 87,30% para STV/ST e 45 para relação C/N de resíduo de jardinagem.

Em relação ao RA, nota-se que suas características ácidas (pH 4,68) e baixa alcalinidade (AT de 673,00 mg L⁻¹) não condizem com as faixas indicadas na literatura como

ideais (pH entre 6,0 e 8,0 e AT acima de 1000 mg L⁻¹) para o bom desempenho do processo, segundo Chernicharo (2016) e Metcalf e Eddy (2016). No entanto, o resíduo alimentar apresentou alta concentração de carboidratos (64,55%), o que faz deste um substrato mais degradável e com grande conversão em biogás (LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2011). Pramanik *et al.* (2019) estudaram sobre as características dos resíduos alimentares e relatam que a faixa indicada para carboidratos varia entre 5,70% e 53%, lipídios entre 1,30% e 30,30% e proteínas entre 2,30% e 28,40%. Os teores de lipídios (20,28%) e proteínas (14,35%) estão próximos aos obtidos para RA no estudo de He *et al.* (2012) e dentro dos limites estabelecidos por Pramanik *et al.* (2019).

As concentrações dos macros e micronutrientes podem estimular ou inibir o processo anaeróbio, por isso, a caracterização dos principais macro e micronutrientes do RA utilizado nesta etapa são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43 - Macro e micronutrientes do resíduo alimentar utilizado na Etapa 3

Elemento	Unidade	Resíduo alimentar
Boro (B)	mg kg ⁻¹	5,70
Cálcio (Ca)	mg kg ⁻¹	400,00
Cobre (Cu)	mg kg ⁻¹	16,25
Enxofre (S)	mg kg ⁻¹	400,00
Ferro (Fe)	mg kg ⁻¹	8,30
Fósforo (P)	mg kg ⁻¹	500,00
Magnésio (Mg)	mg kg ⁻¹	0,10
Manganês (Mn)	mg kg ⁻¹	3,42
Molibdênio (Mo)	mg kg ⁻¹	ND
Níquel (Ni)	mg kg ⁻¹	1,89
Potássio (K)	mg kg ⁻¹	500,00
Sódio (Na)	mg kg ⁻¹	1110,00
Zinco (Zn)	mg kg ⁻¹	21,68

Fonte: A autora (2023)

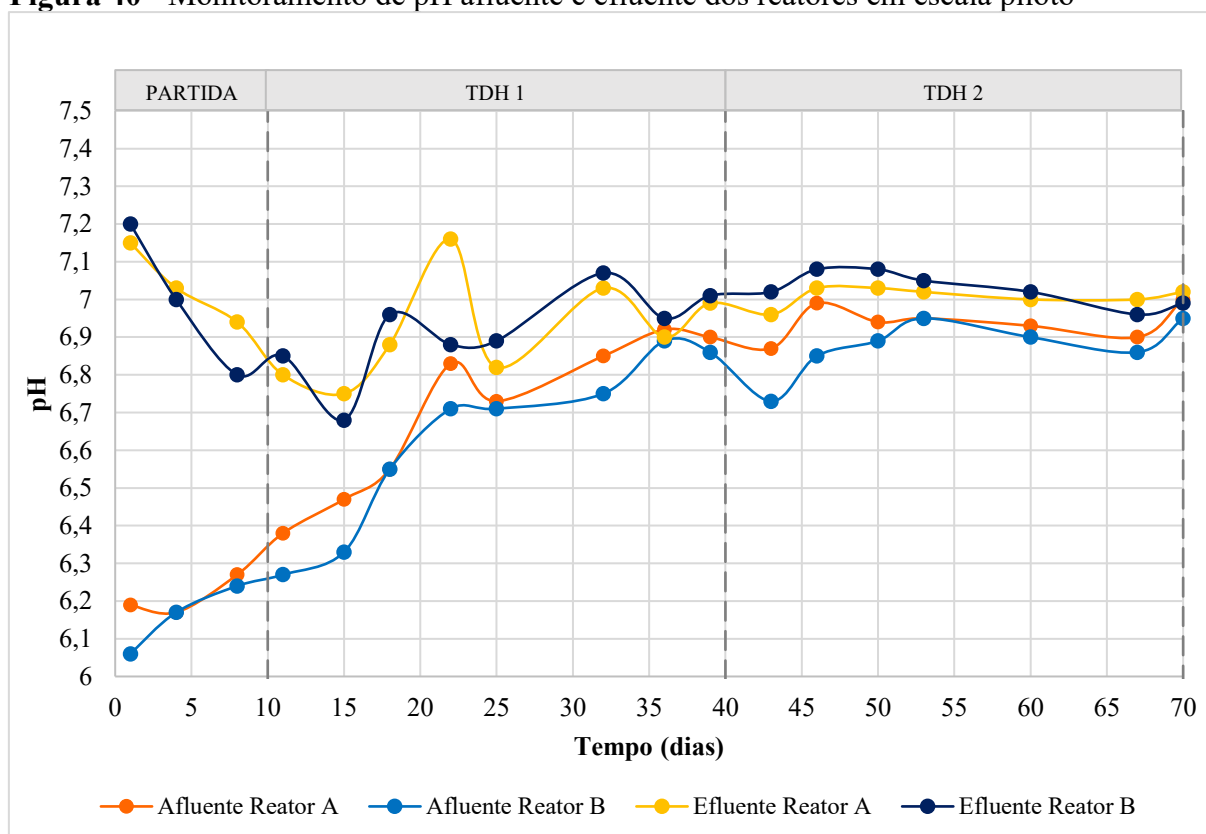
Para evitar a inibição da digestão anaeróbia, baixas concentrações de Na, K, Ca e Mg são requeridas nos substratos, uma vez que nestas condições, há a possibilidade de proliferação das bactérias fermentativas anaeróbias (BORTOLOTTI, 2021). Especificamente em relação ao sódio, em elevadas concentrações podem ocasionar drástico aumento na pressão osmótica e consequente morte celular, inibindo o desenvolvimento das arqueas metanogênicas, em especial as metanogênicas acetoclásticas (BORTH, 2021). Os resultados apresentados indicam quantidades adequadas de macro e micronutrientes, sem interferência no sistema.

5.4.1 Parâmetros de Controle Operacional

Os reatores foram operados simultaneamente por 70 dias, com 10 dias destinados para a aclimação do inóculo em batelada e 60 dias para o regime de alimentação semi-contínuo. A Figura 40 apresenta os valores de pH obtidos durante o monitoramento dos reatores.

Nota-se que para o período de partida de ambos os sistemas houve pequena variação dos resultados afluentes, uma vez que o RA e a equalização com água eram iguais nos dois reatores, diferindo apenas o RPU utilizado. Por sua vez, considerando a grande quantidade de inóculo nesta fase, o pH dos efluentes variou entre 6,8 e 7,2, valores estes próximos a neutralidade e ideais para o adequado desenvolvimento da codigestão anaeróbia.

Figura 40 - Monitoramento de pH afluente e efluente dos reatores em escala piloto



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

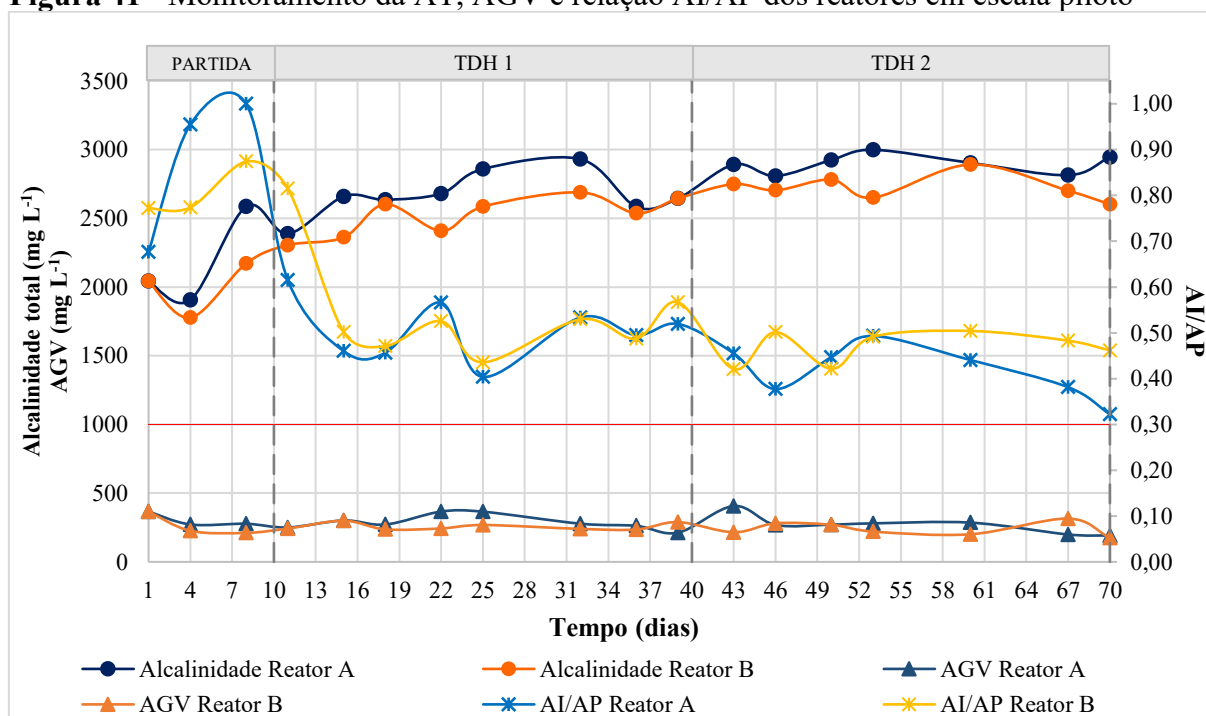
No TDH 1, iniciou-se a utilização do Dsob para diluição dos substratos. A influência desta modificação operacional é verificada no pH afluente de ambos os reatores a partir desta fase, já que tais valores aumentaram com o decorrer do tempo. Challiol (2023) explica que a recirculação do digestato em sistemas anaeróbios com substratos facilmente biodegradáveis contribui com a estabilidade do processo. O pH efluente dos sistemas durante todo o

monitoramento apresentou valores entre 6,75 e 7,16 para o Reator A e entre 6,68 e 7,20 para o Reator B, todos dentro da faixa indicada pela literatura como aceitável para a digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2016).

Malinowsky (2016) afirma que o parâmetro pH está entre as principais dificuldades do tratamento anaeróbio de resíduos alimentares, isso porque este resíduo apresenta elevado teor de matéria orgânica e possibilidade de formação de grande quantidade de ácidos orgânicos voláteis, que podem acumular no reator e, se não consumidos adequadamente, agem diretamente no poder tamponante do meio. No entanto, a utilização de um co-substrato como o RPU contribui com o equilíbrio das características químicas do RA e promove um aumento no pH da mistura, proporcionando benefícios em relação à estabilidade e eficiência do processo (BORTH, 2021).

Na Figura 41 são apresentados os valores de alcalinidade, ácidos graxos voláteis e relação AI/AP dos reatores durante todo monitoramento.

Figura 41 - Monitoramento da AT, AGV e relação AI/AP dos reatores em escala piloto



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

É possível observar que os valores de alcalinidade total variaram de 1905,90 a 2998,80 mgCaCO₃ L⁻¹ para as amostras efluentes do Reator A e de 1776,50 a 2891,60 mgCaCO₃ L⁻¹ para o Reator B. O aumento progressivo da AT pode estar relacionado ao processo de amonificação, uma vez que, conforme aponta Metcalf e Eddy (2016), para cada

1 mg de nitrogênio orgânico amonificado, são gerados $3,57 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Ressalta-se, também, que todos os valores estiveram dentro da faixa ótima reportada pela literatura (entre 1000 e 5000 mg L^{-1}), contribuindo com a manutenção do pH (METCALF; EDDY, 2016).

Durante a DA, especificamente na etapa de acidificação, parte da alcalinidade advinda dos bicarbonatos (AI - alcalinidade intermediária) é convertida em alcalinidade devido aos ácidos orgânicos (AP - alcalinidade parcial). Esta última é capaz de superestimar a quantificação da alcalinidade total, por isso, faz-se necessário o monitoramento da AI e da relação entre ambas (AI/AP). Valores elevados de AI/AP podem indicar maiores concentrações de AGV, com possibilidade de distúrbios no sistema (CHERNICHARO, 2016; HELENAS, 2019; BORTH, 2021). Enquanto Chernicharo (2016) considera 0,3 a relação ideal para AI/AP, Foresti *et al.* (1999) afirmam que é possível ocorrer estabilidade do processo em reatores que apresentam uma relação AI/AP acima de 0,3. Desta forma, é fundamental monitorar tais valores e permanecer alerta à possibilidade de desequilíbrio no processo anaeróbio.

Durante todo o período experimental, os valores de AI/AP estiveram acima do recomendado, com valores próximos a 0,5 para os dois reatores. Mesmo com valores acima de 0,3, não foi identificada nenhuma instabilidade. Verifica-se, ainda, os valores inversamente proporcionais de AT e AI/AP; à medida que os valores de AT aumentaram, a relação AI/AP decresceu, indicativo de estabilidade e manutenção do pH (Figura 40).

Os resultados indicaram valores satisfatórios de AGV, entre $191,53$ e $406,46 \text{ mg L}^{-1}$ para Reator A (média de $285,84 \text{ mg L}^{-1}$) e $174,83$ e $366,79 \text{ mg L}^{-1}$ para Reator B (média de $253,44 \text{ mg L}^{-1}$). A necessidade de avaliar os AGV em um sistema está relacionada ao equilíbrio dos microrganismos acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos existentes no processo, uma vez que tais ácidos são os principais substratos e produtos deste consórcio microbiano, ou seja, o acúmulo dos AGV pode indicar ausência de condições ideais para crescimento biológico (limitações cinéticas) ou a grande quantidade de produtos intermediários, que podem provocar inibições termodinâmicas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005; RIBEIRO, 2016).

Para uma visão mais abrangente dos parâmetros de controle do processo, a Tabela 44 apresenta os valores médios dos parâmetros pH, alcalinidade total e ácidos graxos voláteis em cada período de monitoramento dos dois reatores.

Tabela 44 - Valores médios de pH, alcalinidade total e AGV nos períodos de monitoramento

Período	Reator A					
	pH		Alcalinidade Total (mg L^{-1})		AGV (mg L^{-1})	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Partida	$6,25 \pm 0,28$	$6,98 \pm 0,15$	$112,93 \pm 50,15$	$2230,52 \pm 311,49$	$114,33 \pm 13,64$	$291,73 \pm 51,37$
TDH1	$6,75 \pm 0,17$	$6,93 \pm 0,14$	$1665,16 \pm 527,30$	$2713,38 \pm 128,83$	$360,50 \pm 72,27$	$293,90 \pm 55,90$
TDH2	$6,94 \pm 0,26$	$7,01 \pm 0,02$	$1777,87 \pm 560,42$	$2898,02 \pm 68,61$	$343,15 \pm 89,46$	$271,88 \pm 70,82$

Reator B						
Período	pH		Alcalinidade Total (mg L ⁻¹)		AGV (mg L ⁻¹)	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Partida	6,18 ± 0,09	6,96 ± 0,18	84,06 ± 43,31	2073,84 ± 225,26	121,20 ± 12,97	261,66 ± 71,28
TDH1	6,68 ± 0,22	6,92 ± 0,12	1466,37 ± 509,33	2547,04 ± 120,91	388,87 ± 86,06	259,00 ± 26,84
TDH2	6,87 ± 0,17	7,03 ± 0,04	1671,08 ± 525,08	2725,72 ± 94,01	330,98 ± 88,33	239,66 ± 49,91

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente
Fonte: A autora (2023)

Além destes, outro critério usado para avaliar a estabilidade do processo anaeróbio é a relação entre os ácidos graxos voláteis e capacidade de tamponamento do meio (AGV/AT); valores abaixo de 0,4 são considerados ótimos para a DA e valores acima de 0,6 indicam sobrecarga do sistema (BROWN; LI, 2013; ALINO, 2020). Durante todo o período de monitoramento dos reatores, ambos apresentaram relação AGV/AT adequados, com valores médios de 0,2 e 0,1 para Reator A e B, respectivamente.

5.4.2 Parâmetros de Desempenho do Sistema

Um dos principais objetivos da codigestão anaeróbia é a conversão da matéria orgânica, representada pelos STV e DQO, em metano, por meio das reações bioquímicas do processo. A partir dos valores de STV ou DQO adicionados em cada alimentação, avaliou-se as quantidades totais de massa afluente, efluente, acumulada e convertida em biogás para cada fase de operação do reator (Tabela 45).

No período de partida, a taxa de conversão do Reator A foi de 12,25% para STV e 5,21% para DQO e do Reator B foi de 45,41% para STV e 19,14% para DQO. A diferença de resultado entre os dois reatores pode estar relacionada ao co-substrato utilizado: ainda que a mistura adicionada no Reator A tivesse RA (resíduo facilmente biodegradável), parte de sua composição era de difícil degradação em pouco tempo (RPU bruto). Por sua vez, a grande quantidade de microrganismos provenientes do inóculo presente no Reator B, o uso de RA e a adição de um co-substrato previamente hidrolisado (RPU pré-tratado biologicamente), facilitaram a conversão nesta fase.

Tabela 45 - Balanço de massa teórico para cada período de monitoramento dos reatores

Reator A										
Período	STV _{AF} (kg STV)	STV _{RT} (kg STV)	STV _{RMP} (kg STV)	STV _C (kg STV)	TC _{STV} (%)	DQO _{AF} (kg O ₂)	DQO _{RT} (kg O ₂)	DQO _{RMP} (kg O ₂)	DQO _C (kg O ₂)	TC _{DQO} (%)
Partida	0,21	0,17	0,43	0,05	12,25	0,62	0,57	1,28	0,07	5,21
TDH 1	0,51	0,34	0,88	0,56	63,88	2,12	1,04	3,34	2,48	74,32
TDH 2	0,55	0,33	0,87	0,55	63,13	2,06	1,12	2,91	1,80	61,63
Global	1,28	0,82	1,50	1,18	78,59	4,85	2,64	5,51	4,39	79,71

Reator B										
Período	STV _{AF} (kg STV)	STV _{RT} (kg STV)	STV _{RMP} (kg STV)	STV _C (kg STV)	TC _{STV} (%)	DQO _{AF} (kg O ₂)	DQO _{RT} (kg O ₂)	DQO _{RMP} (kg O ₂)	DQO _C (kg O ₂)	TC _{DQO} (%)
Partida	0,21	0,11	0,43	0,19	45,41	0,62	0,49	1,28	0,25	19,14
TDH 1	0,50	0,33	0,73	0,50	68,39	2,21	0,97	3,25	2,44	75,30
TDH 2	0,58	0,28	0,81	0,55	67,79	2,23	1,08	3,03	2,00	66,18
Global	1,30	0,76	1,52	1,26	82,74	5,10	2,50	5,76	4,74	82,21

AF: afluente; RT: retirado; RMP: remanescente ao fim do período; C: convertido em biogás; TC: taxa de conversão; Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Para os TDHs 1 e 2, a taxa de conversão em relação ao STV apresentou-se acima de 60% para ambos reatores, com valores médios de 63,88% no TDH 1 e 63,13% no TDH 2 para Reator A e 68,39% no TDH 1 e 67,79% no TDH 2 para Reator B. Acredita-se que a utilização do DSob para equalização da mistura pode ter influenciado na adaptação/presença dos microrganismos do sistema, possibilitando um ambiente com melhores condições para conversão matéria orgânica em biogás e recirculação de nutrientes favoráveis às atividades da comunidade microbiana.

Considerando que a carga orgânica volumétrica era a mesma por todo o período de monitoramento para os dois sistemas (0,5 kgSTV m³d⁻¹) e que em escala piloto é mais fácil manter um controle operacional, os valores de massa adicionados ficaram próximos, com pequena variação entre si (entre 0,50 e 0,58 kg para STV e 2,06 e 2,23 kgO₂ para DQO).

A quantidade em massa remanescente nos reatores em cada um dos períodos refere-se à matéria orgânica não convertida naquele espaço de tempo. Verifica-se que estes valores foram maiores para o Reator A do que para o Reator B nos TDHs 1 e 2, fato este explicado pelas características do co-substrato RPU que, quando bruto, podem promover certa dificuldade de degradação aos microrganismos devido às maiores concentrações de lignina (Tabela 22).

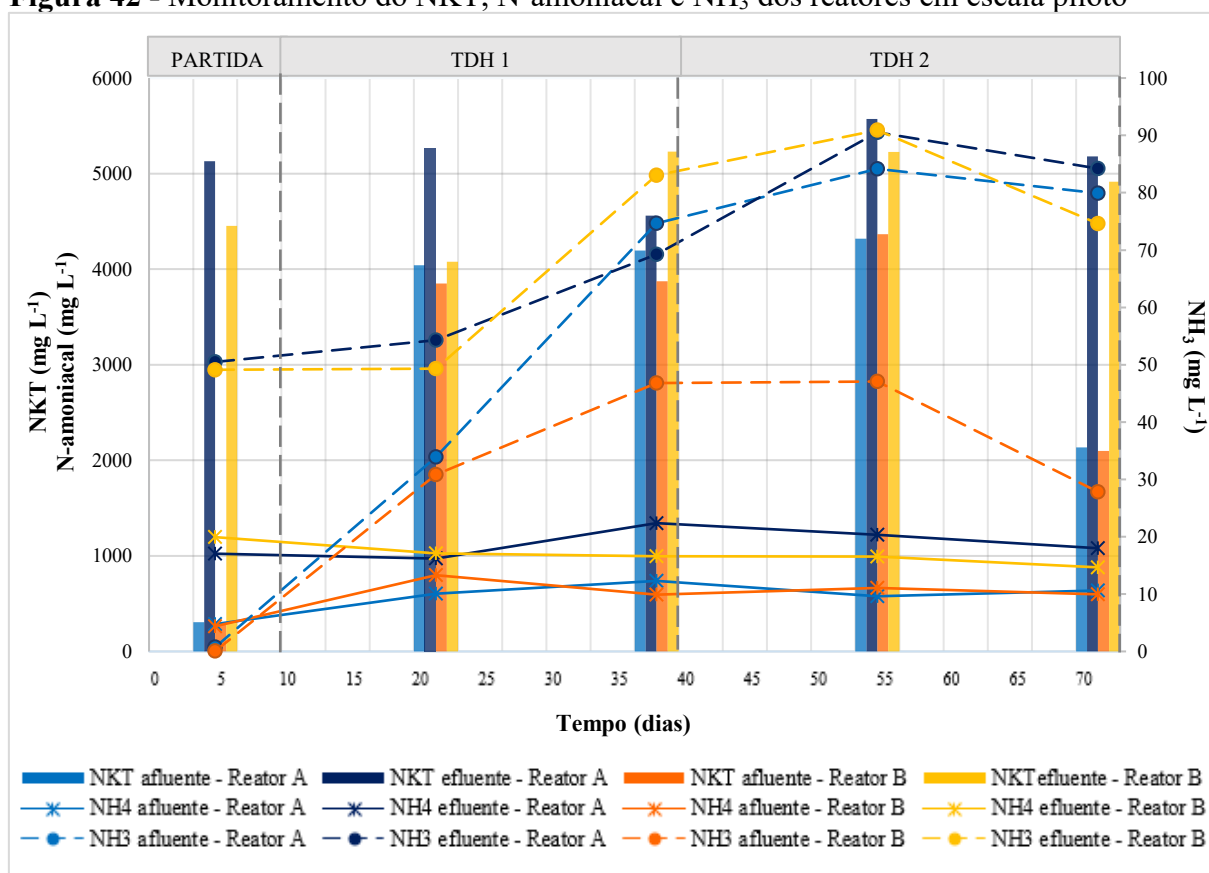
É sabido que no processo de CoDA os microrganismos convertem a matéria orgânica em biogás, biomassa e sólidos fixos, portanto, monitorar a eficiência de remoção dos STV e DQO (representantes da MO presente) é de suma importância. Espera-se que a matéria orgânica seja parcialmente mineralizada, diminuindo os valores de ST e STV e aumentando dos STF (METCALF; EDDY, 2016; CHERNICHARO, 2016; BORTH, 2021).

Em geral, ambos os reatores apresentaram resultados satisfatórios em relação aos parâmetros de desempenho STV e DQO. No entanto, o Reator B apresentou maiores taxas de conversão (82,74% para STV e 82,21% para DQO) quando comparados ao Reator A (78,59% e 79,71%, respectivamente), possivelmente porque o RPU bruto utilizado como co-substrato neste reator apresenta uma estrutura lignocelulósica com compostos de difícil degradação,

como a lignina, demandando mais tempo/energia dos microrganismos para sua conversão (GOMES, 2019).

Como as misturas afluentes de ambos reatores foram produzidas com DSob para equalização dos substratos, torna-se fundamental o monitoramento dos compostos nitrogenados no sistema, uma vez que a recirculação do digestato sobrenadante pode promover acúmulo de amônia e, juntamente com os compostos característicos dos resíduos inseridos, atingir níveis tóxicos aos microrganismos anaeróbios (LIU *et al.*, 2020). A Figura 42 retrata o perfil de nitrogênio total, amoniacal e amônia livre durante o período de monitoramento de ambos os reatores.

Figura 42 - Monitoramento do NKT, N-amoniacal e NH₃ dos reatores em escala piloto



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Durante todo o período de monitoramento, identifica-se menores valores de NKT para as amostras afluente dos reatores quando comparado aos valores efluentes. A concentração afluente de NKT durante a fase de partida foi de 306,62 mg L⁻¹ para Reator A e de 288,19 mg L⁻¹ para Reator B. Nos períodos seguintes houve um acréscimo na concentração

destes, devido as alimentações realizadas com resíduos orgânicos ricos em nitrogênio, atingindo uma média de 3673,16 mg L⁻¹ para Reator A e 3546,66 mg L⁻¹ para Reator B.

Embora os valores efluentes de NKT tenham variado durante os TDHs, nota-se decréscimo nos valores deste composto quando se compara as amostras do meio e do final de cada período, com exceção do TDH 1 para Reator B. Como o nitrogênio é um nutriente essencial na codigestão anaeróbia, a redução indica consumo deste pelos microrganismos (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012b).

Com relação ao nitrogênio amoniacal, observou-se um aumento dos valores efluentes em ambos reatores em relação ao afluente em todos os períodos experimentais, provavelmente relacionado ao processo de amonificação ou, ainda, associado à recirculação do DSob (KOBAYASHI *et al.*, 2012). Durante a partida, os valores do Reator A variaram de 286,06 a 1022,07 mg L⁻¹ e de 263,89 a 1195,90 mg L⁻¹ para Reator B. Nos TDHs 1 e 2, estes valores variaram de 603,59 a 1342,51 mg L⁻¹ e 575,96 a 1218,94 mg L⁻¹, respectivamente, no Reator A. Já no Reator B, estes valores estiveram entre 592,72 e 1026,26 mg L⁻¹ no TDH 1 e 599,00 e 992,75 mg L⁻¹ no TDH 2.

Ressalta-se que a inibição do processo de CoDA por nitrogênio amoniacal ocorre em concentrações superiores a 3.000 mg L⁻¹, sendo que seus efeitos estão diretamente relacionados ao tipo de substrato, inóculo e condições ambientais do meio (pH e temperatura) (PROBIOGAS, 2010; REN *et al.*, 2018; KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019). Mesmo assim, a maior concentração encontrada foi de 1342,51 mg L⁻¹ para o efluente do Reator A no final do TDH 1 e de 1195,90 mg L⁻¹ durante o período de partida do Reator B, valores inferiores aos estabelecidos.

Bortoli, Prá e Kunz (2019) afirmam que o pH e a temperatura influenciam a forma em que o nitrogênio é encontrado no meio. O equilíbrio de dissociação a 25°C entre a amônia livre e o íon amônio ocorre em pH de 9,25, onde observa-se 50% de ambas as formas. Em pH inferior ao ponto de equilíbrio, predomina-se o íon amônio. Por sua vez, em valores de pH superiores a 9,25, o equilíbrio é deslocado para formação de amônia. Como neste estudo o pH dos reatores situou-se próximo a 7, presume-se que a maior parte do nitrogênio amoniacal se encontrava na forma ionizada. Além disso, os valores médios de N-amoniacal afluente e efluente obtidos nos diferentes períodos foram de 568,11 mg L⁻¹ e 1126,79 mg L⁻¹ para Reator A e 583,92 mg L⁻¹ e 1017,88 mg L⁻¹ para Reator B, respectivamente.

Conhecer a concentração de NH₃ no sistema é fundamental para o controle do processo biológico por dois motivos: primeiramente, acredita-se que a amônia livre é um dos principais substratos envolvidos nos processos de oxidação do nitrogênio pelos microrganismos, uma vez

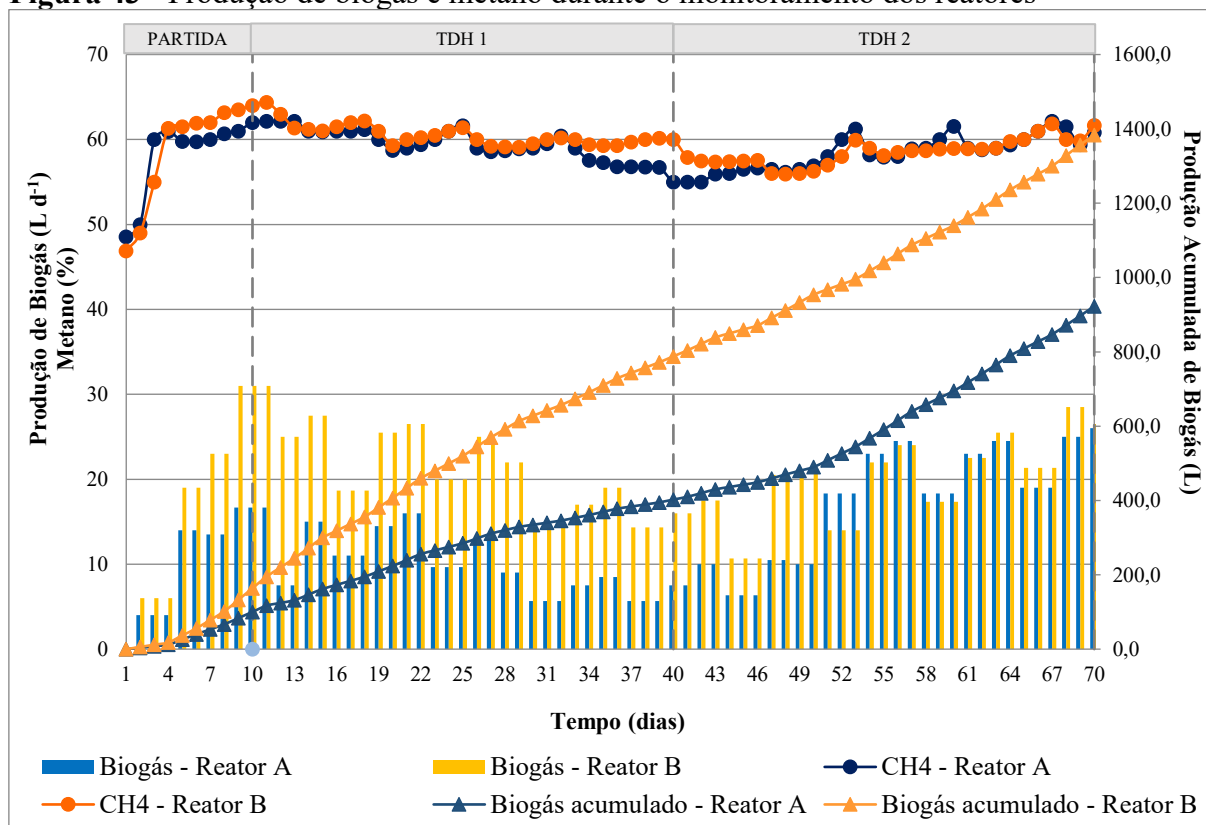
que exigem menos energia para serem transportados para o interior da célula quando comparadas com as formas ionizadas; além disso, esta importância relaciona-se ao potencial tóxico deste composto (BORTOLI; PRÁ; KUNZ, 2019). Borth (2021, p. 36) explica que “a amônia livre é inibitória em concentrações muito menores do que o íon amônio, entre 100 a 250 mg L⁻¹”. Conforme apresentado na Figura 42, durante todo o monitoramento dos Reatores A e B, tanto os afluentes, quanto os efluentes apresentaram valores de amônia livre inferiores às concentrações inibitórias, com valores que variaram de 0,07 mg L⁻¹ a 90,91 mg L⁻¹.

Por fim, Silva *et al.* (2014) destacam que um fator chave para eficiência do processo anaeróbio é a aclimação dos microrganismos na presença da amônia livre. Esta aclimação pode ocorrer pela adaptação das espécies de arqueas metanogênicas presentes no reator ou pela seleção natural da população, sobressaindo-se as espécies resistentes às condições do meio.

5.4.2.1 Geração de biogás e metano

A eficiência do processo de codigestão anaeróbia também foi avaliada em função da produção de biogás, considerando seus aspectos qualitativos e quantitativos. A Figura 43 apresenta o perfil comportamental dos Reatores A e B em relação a produção acumulada e total de biogás e percentuais de metano.

Figura 43 - Produção de biogás e metano durante o monitoramento dos reatores



Fonte: A autora (2023)

No período de partida, o volume acumulado de biogás foi de 100,30 L para o Reator A e de 164,00 L para o Reator B. O aumento de 63,51% do Reator B em relação ao Reator A pode estar relacionado ao RPU utilizado, uma vez para este sistema utilizou-se RPU pré-tratado. Liew *et al.* (2012) afirmam que existe uma relação inversamente proporcional entre o rendimento de biogás e concentração de lignina, e uma relação proporcional entre o rendimento de produção de biogás e a digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica.

Em todos os aspectos avaliados na partida, o Reator B apresentou resultados mais satisfatórios quando comparados ao Reator A: maior produção média de biogás (16,40 L d⁻¹), maior produção específica de biogás (400,70 L kgSTV⁻¹), maior produção média de metano (10,17 L d⁻¹), maior produção específica de metano (235,73 L kgSTV⁻¹) e maior percentual médio de metano (58,83%).

No TDH 1, o maior pico de produção de biogás ocorreu no primeiro dia de operação para os dois reatores (16,7 L para Reator A e 31 L para Reator B), com alta concentração de metano (62,15% e 64,38%, respectivamente). Este fato pode estar relacionado a maior disponibilidade de matéria orgânica e a hidrólise do material de mais fácil biodegradabilidade, justificando a maior conversão em biogás. A diferença de produção média de biogás entre os reatores (49,81% a mais para o Reator B) é justificada pelo maior acesso aos açúcares do RPU previamente tratado pelos microrganismos anaeróbios.

A composição do biogás é um fator fundamental para o monitoramento de sistemas anaeróbios. Quando em desequilíbrio, é possível identificar baixa produção de CH₄ e maiores produções de CO₂ e H₂S (HELENAS, 2019). Para os dois reatores, o TDH 1 foi o que apresentou melhores resultados qualitativos do biogás gerado. Neste período, os percentuais médio e máximo de metano foram de 59,38% e 62,17%, respectivamente, para o Reator A e de 60,50% e 64,38% para Reator B.

Já no TDH 2 é possível verificar uma mudança importante no comportamento do Reator A. Próximo ao dia 50 de operação, a produção de biogás deste (18,3 L) superou a produção do Reator B (14 L). Esta conduta durou cerca de 13 dias, quando o Reator B retomou a frente na produção diária de biogás.

Amaral, Steinmetz e Kunz (2019) explicam tal comportamento: quando a matéria orgânica presente é complexa e de difícil degradação, como é o caso do RPU bruto, a hidrólise tem um papel relevante na velocidade global da degradação, podendo ser considerada uma etapa limitante da velocidade da CoDA. O tempo de duração da hidrólise varia de acordo com as características do substrato e, no caso de resíduos que apresentam lignina em sua composição, sua hidrólise pode ser mais lenta e/ou realizada de maneira incompleta.

Ou seja, a presença de RPU bruto na alimentação do Reator A atrasou sua completa conversão em biogás, uma vez que os microrganismos demandaram mais tempo para hidrolisar o material. Desta forma, enquanto a maior parte ou a totalidade do RPU pré-tratado biologicamente já estava sendo convertido no Reator B, o RPU bruto ainda estava sendo hidrolisado pelos microrganismos, o que justifica o desempenho equivalente do Reator A após um tempo maior, quando comparado ao Reator B. Pode-se afirmar, portanto, que o pré-tratamento biológico otimizou o tempo de codigestão anaeróbia, pois sua conversão ocorreu instantaneamente quando aplicado no sistema.

A Tabela 46 apresenta os valores médios de biogás e metano gerados durante o período experimental. Ao avaliar todo o período de operação simultânea dos reatores, conclui-se que a maior produção de biogás ocorreu no Reator B, com um valor de 624 L, durante o TDH 1. Este valor correspondeu a um aumento de 106,48% na produção cumulativa de biogás, em comparação ao obtido no Reator A, no mesmo TDH (302,20 L).

Em termos de eficiência global, ambos os reatores apresentaram valores satisfatórios para produção específica de metano e percentual médio deste gás (248,80 L kgSTV⁻¹ e 58,85% para Reator A e 376,61 L kgSTV⁻¹ e 59,42% para Reator B). No entanto, o Reator B apresentou 49,89% a mais de biogás acumulado. Isso significa que mesmo com elevados percentuais de metano em todas as fases experimentais, a produção de biogás foi subestimada no Reator A, que poderia apresentar melhores rendimentos em geração de biogás e, conseqüentemente, maiores produções de metano, caso a lignina presente na composição do RPU bruto tivesse sido previamente hidrolisada.

Destaca-se que os percentuais médios de CH₄ durante os 70 dias de monitoramento estão de acordo com a literatura, entre 50 e 70% (WEILAND, 2010; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; FERREIRA, 2015; ANGELIDAKI *et al.*, 2018). Abatzoglou e Boivin (2009) explicam que o grau de pureza e a concentração de metano são os principais fatores a serem considerados em termos de potencial calorífico do biogás, que varia entre 15 e 30 MJ Nm⁻³. Dentre os principais contaminantes que afetam o potencial energético do biogás, destacam-se o sulfeto de hidrogênio (H₂S) e o dióxido de carbono (CO₂).

O CO₂ é um dos principais constituintes do biogás, correspondendo a um volume de 20 a 30% em substratos provenientes de resíduos da agricultura (WELLINGER; MURPHY; BAXTER, 2013). Sua presença pode interferir diretamente no potencial energético do biogás, especialmente por ocupar volume e ser inerte em termos de combustão. O percentual médio de dióxido de carbono no Reator A variou de 30,56 a 38,95%, com uma média de 37,01%. Já para o Reator B, a média global foi de 37,37%, com valores entre 29,86% e 39,39%.

Tabela 46 - Análises quali-quantitativas do biogás gerado por TDH em cada reator

Reator A									
Período	Volume acumulado de biogás	Produção média de biogás	Produção específica de biogás	Produção média de metano	Produção específica de metano	% média CH₄	% máx. CH₄	% média CO₂	ppm média H₂S
	(L)	(L d ⁻¹)	(L kgSTV ⁻¹)	(L d ⁻¹)	(L kgSTV ⁻¹)				
Partida	100,30	10,03 ± 6,27	245,14	6,03 ± 3,86	142,84	58,27 ± 4,81	62,00	30,56 ± 6,19	1674,50 ± 247,51
TDH1	302,20	10,10 ± 3,61	340,74	6,01 ± 2,22	202,33	59,38 ± 1,88	62,17	36,90 ± 1,97	831,69 ± 242,70
TDH2	520,50	17,40 ± 6,72	586,94	10,25 ± 4,12	343,36	58,50 ± 2,05	62,15	38,95 ± 1,95	581,71 ± 100,75
Global	923,00	13,19 ± 6,54	422,83	7,83 ± 3,95	248,80	58,85 ± 2,55	62,17	37,01 ± 3,78	827,55 ± 397,42
Reator B									
Período	Volume acumulado de biogás	Produção média de biogás	Produção específica de biogás	Produção média de metano	Produção específica de metano	% média CH₄	% máx. CH₄	% média CO₂	ppm média H₂S
	(L)	(L d ⁻¹)	(L kgSTV ⁻¹)	(L d ⁻¹)	(L kgSTV ⁻¹)				
Partida	164,00	16,40 ± 11,16	400,70	10,17 ± 7,22	235,73	58,83 ± 6,27	64,00	29,86 ± 8,04	208,50 ± 75,42
TDH1	642,00	20,80 ± 4,92	703,67	12,61 ± 3,11	425,72	60,50 ± 1,24	64,38	37,50 ± 1,87	383,54 ± 66,86
TDH2	595,50	19,90 ± 5,02	671,53	11,65 ± 3,08	393,12	58,54 ± 1,57	61,86	39,39 ± 1,28	421,14 ± 69,07
Global	1383,50	19,76 ± 6,25	633,81	11,85 ± 3,94	376,61	59,42 ± 2,78	64,38	37,37 ± 4,24	377,93 ± 95,59

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

O aumento da concentração de CO₂ no biogás, o aumento do AGV (de 291,73 para 293,90 mg L⁻¹) e a redução dos valores de pH (de 6,98 para 6,93) da partida para o TDH 1 no Reator A, indicam a prevalência das fases acidogênicas e acetogênicas. Zhang *et al.* (2008) explicam que durante a fase ácida, há a formação de ácidos graxos voláteis e consequente queda de pH, o que reduz a atividade dos microrganismos metanogênicos. No entanto, na sequência (do TDH 1 para o TDH 2), o AGV gerado foi consumido durante a fase metanogênica (de 293,90 para 271,88 mg L⁻¹) e o aumento da concentração de AT (de 2713,38 para 2898,02 mg L⁻¹) é devido à presença CO₂ no biogás (média de 38,95%), o que também explica a maior produção média e específica de metano nesta fase (10,25 L d⁻¹ e 343,36 L kgSTV⁻¹) (SCHIRMER *et al.*, 2014).

Beil e Beyrich (2013) relatam que dependendo da composição do substrato utilizado na codigestão anaeróbia, o biogás gerado poderá apresentar variação na concentração de H₂S (entre 100 e 10.000 ppm) e, em situações extremas, até 30.000 ppm. Sua avaliação e controle são fundamentais, pois apesar de ser um gás inflamável que contribuiu no potencial energético do biogás, é um gás tóxico, confere mau odor e sua presença pode causar corrosão nos tanques de armazenamento, tubulações metálicas e motores de combustão, resultando na deterioração da infraestrutura do sistema (SILVA; MEZZARI, 2019).

Neste sentido, a média global de H₂S gerado no Reator A foi de 827,55 ppm, com valores que variaram de 1674,50 ppm na partida até 581,71 ppm no TDH 2. No Reator B, a geração global de H₂S foi 54,33% menor do que no Reator A (377,93 ppm), com valores entre 208,50 e 421,14 ppm durante o período experimental.

Malinowsky (2016), objetivando beneficiar as características de funcionamento de um biodigestor, realizou o tratamento anaeróbio dos resíduos orgânicos (RSO) de restaurante universitário utilizando a co-digestão com resíduos de jardinagem (RJ), alimentação semi-contínua, temperatura mesofílica (35°C) e cargas orgânicas de 1,0, 2,0 e 4,0 kgSTV m⁻³dia⁻¹. Dentre os principais resultados, verificou-se a máxima eficiência de conversão de sólidos em biogás (6,4%), concentração de 64% de metano no biogás, PEM de 0,45LCH₄ gSTV⁻¹ e remoção de DQO superior a 60% para a carga de 2,0 kgSTV m⁻³dia⁻¹. Ao aumentar a COV para 4,0 kgSTV m⁻³dia⁻¹, ocorreu a acidificação do meio (pH = 4).

Navarro (2020), ao monitorar o desempenho de um reator em escala piloto de 60 litros, adotando a CoDA de resíduos alimentares com resíduos vegetais, obteve estabilidade do sistema até o 130º dia de operação, acumulando 2888 L de biogás, com média de 60% de metano ou 1185 LCH₄. A produção de biogás e metano aumentou quando a COV foi elevada de 0,50 para 0,75 kgSTV m⁻³d⁻¹, correspondendo ao acréscimo de 20% de biogás e 15% de metano. No

entanto, o resíduo vegetal não apresentou boa degradação e pode ter sido utilizado na codigestão anaeróbia como material suporte para os microrganismos.

Borth (2021) avaliou a influência da adição de resíduo de poda de grama (RPG) no desempenho da digestão anaeróbia de resíduo alimentar de um restaurante universitário (RRU). Para isso, conduziu um experimento com biodigestores em escala piloto, com volume total de 500 L, operados de modo semi-contínuo com foco em análises do efluente e do biogás gerados. O co-tratamento de RRU e RPG em escala piloto resultou em melhor desempenho na digestão anaeróbia, atingindo 73% de remoção de STV, produção de 86 L d⁻¹ de biogás e 67% de CH₄. No entanto, as imagens de MEV das partículas de RPG indicaram que estas serviram, principalmente, como meio suporte aos microrganismos, os quais se fixaram de diferentes formas ao substrato, formando biofilmes.

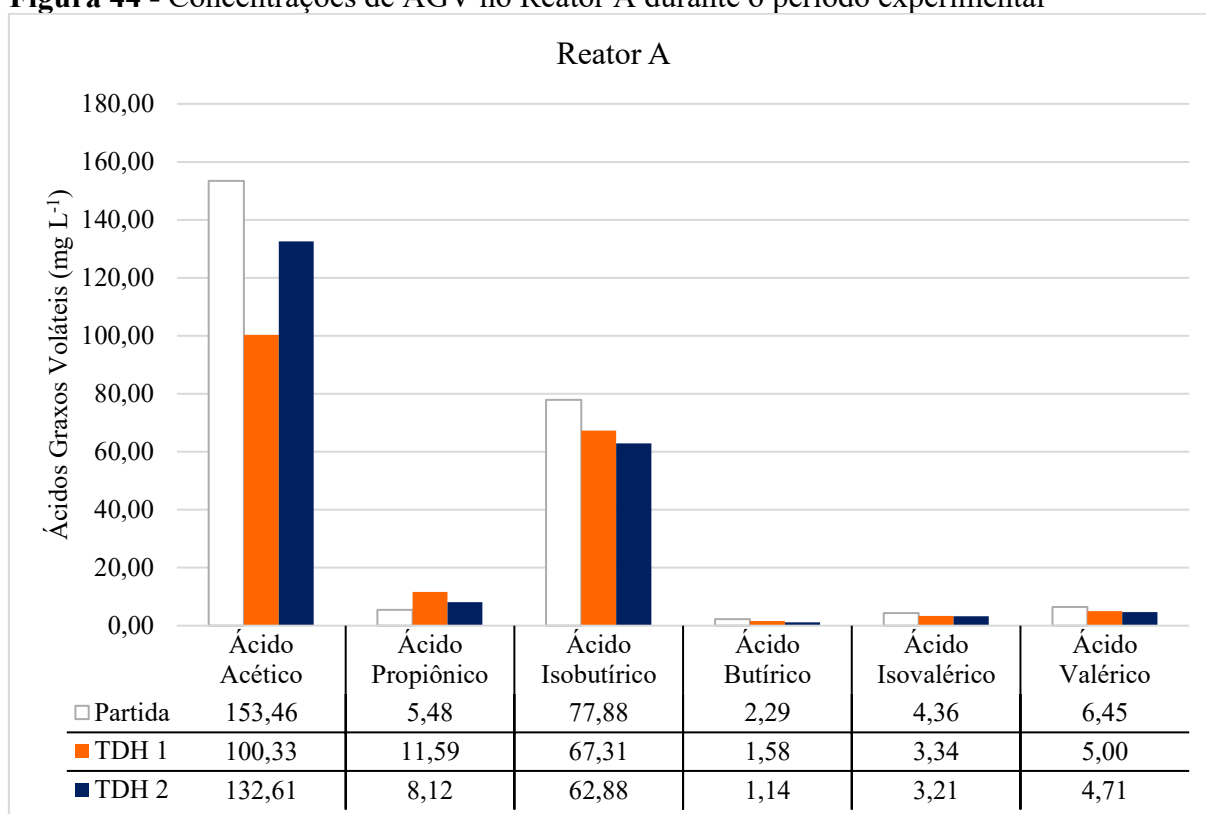
5.4.2.2 Ácidos graxos voláteis

As Figuras 44 e 45 apresentam os resultados das análises cromatográficas referentes às proporções de ácidos orgânicos identificados nas amostras efluentes dos reatores.

Durante o período experimental, é possível identificar oscilação das concentrações médias de ácido acético nos Reatores A e B. No primeiro, estes valores passaram de 153,46 ± 6,90 mg L⁻¹ na partida para 100,33 ± 51,11 mg L⁻¹ no TDH 1 e deste, para 132,61 ± 98,43 mg L⁻¹ no TDH 2, com valor médio de 128,80 ± 70,89 mg L⁻¹. No Reator B, estes valores também foram variados (161,43 ± 4,14 mg L⁻¹, 72,48 ± 47,26 mg L⁻¹ e 98,73 ± 51,23 mg L⁻¹ na partida, TDH 1 e TDH 2, respectivamente), com média de 110,88 ± 51,31 mg L⁻¹.

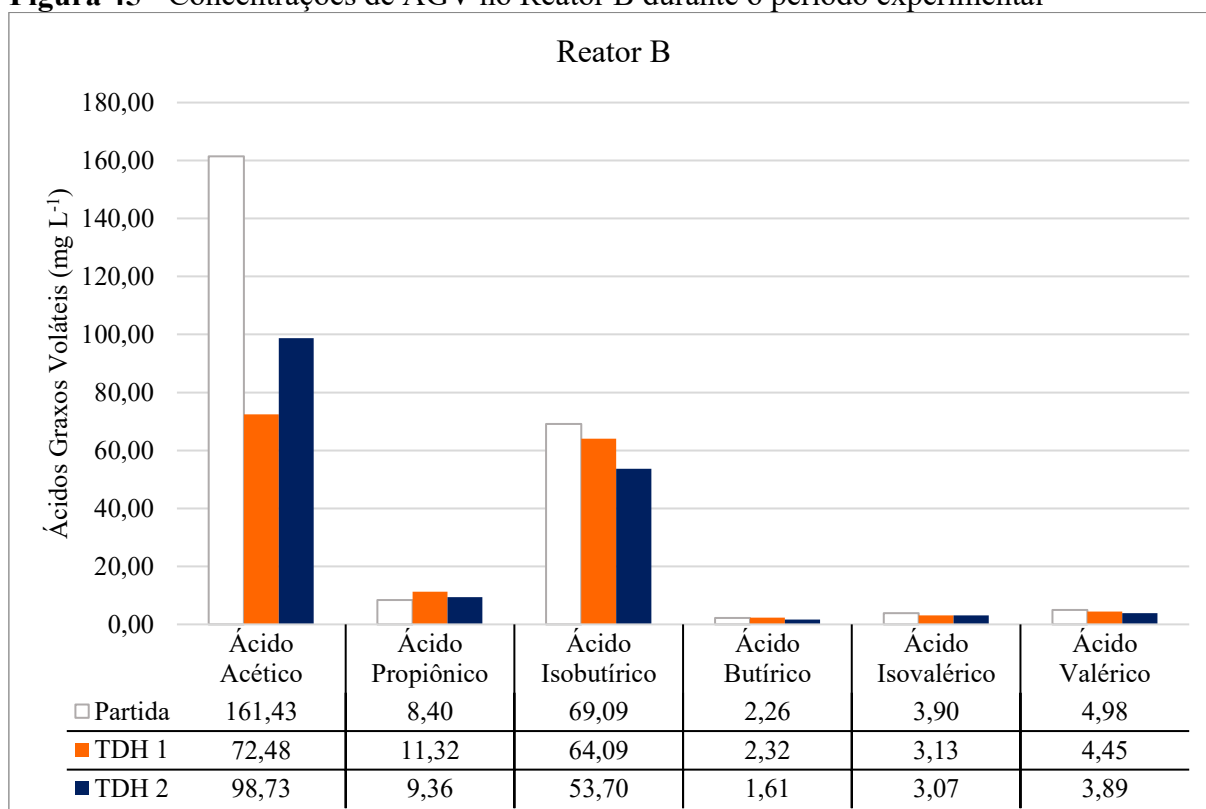
Os valores de desvio padrão obtidos em ambos reatores indicam a grande variância que estes dados apresentaram durante o período de avaliação. Apesar dos dois reatores seguirem o mesmo comportamento, a média de concentração de ácido acético no efluente do Reator B foi 22,01% menor do que no Reator A, indicando maior equilíbrio do consumo de matéria orgânica pelos microrganismos deste sistema.

Ao considerar a partida e o TDH 1, identifica-se que em ambos os reatores as concentrações de acetato reduziram, indício de consumo deste ácido pelos microrganismos, sugerindo a presença de microrganismos acetoclásticos, os quais são responsáveis pela conversão de acetato em metano.

Figura 44 - Concentrações de AGV no Reator A durante o período experimental

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto

Fonte: A autora (2023)

Figura 45 - Concentrações de AGV no Reator B durante o período experimental

Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Por sua vez, quando avaliado os TDHs 1 e 2, nota-se pequeno aumento na concentração de ácido acético. Silvério (2017) explica que o acúmulo de ácido acético em reatores metanogênicos pode estar relacionado a baixa atividade das arqueas metanogênicas. O metabolismo e velocidade de crescimento mais lentos das metanogênicas são fatores de vulnerabilidade intrínseca do sistema para o equilíbrio de geração e consumo de metabólitos. Isso significa que é fundamental que as arqueas hidrogenotróficas consumam hidrogênio e as acetoclásticas consumam acetato em velocidades satisfatórias para evitar o acúmulo de ácido acético no reator.

Tratando-se do ácido propiônico, tanto no Reator A, quanto no Reator B, observa-se aumento de concentração no TDH 1, seguido por recuperação dos reatores, com consumo do mesmo no TDH 2. Os valores na partida, TDH 1 e TDH 2 variaram entre $5,48 \pm 0,29 \text{ mg L}^{-1}$, $11,59 \pm 1,16 \text{ mg L}^{-1}$ e $8,12 \pm 1,46 \text{ mg L}^{-1}$ para Reator A e entre $8,40 \pm 3,84 \text{ mg L}^{-1}$, $11,32 \pm 2,47 \text{ mg L}^{-1}$ e $9,36 \pm 3,30 \text{ mg L}^{-1}$ para Reator B, respectivamente. Reatores que favorecem o crescimento disperso da biomassa não garantem uma efetiva separação das fases acidogênica, acetogênica e metanogênica. Desta forma, o acúmulo de propionato nesses reatores pode ocorrer durante condições de deficiência nutricional, presença de compostos tóxicos ou choques de carga, devido às limitações termodinâmicas causadas pela acumulação de hidrogênio e acetato (CHERNICHARO, 2016).

Outro ácido gerado em grande quantidade nos reatores foi o isobutírico, no entanto, no decorrer do experimento, houve consumo deste por parte dos microrganismos anaeróbios. As concentrações variaram de $77,88 \pm 13,12 \text{ mg L}^{-1}$ para $62,88 \pm 11,15 \text{ mg L}^{-1}$ no Reator A e de $69,09 \pm 25,54 \text{ mg L}^{-1}$ para $53,70 \pm 11,29 \text{ mg L}^{-1}$ no Reator B.

Os AGV com mais de quatro carbonos (como os ácidos butírico, isovalérico e valérico) não são usados diretamente pelos microrganismos metanogênicos, sendo necessário sua conversão preliminar em ácido acético (WANG *et al.*, 1999). Portanto, pode-se afirmar que as menores concentrações destes ácidos podem estar relacionadas à sua prévia conversão em ácido acético, com concentrações remanescentes ao final o pré-tratamento. Para estes ácidos, foram verificados em concentração maiores nas fases de partidas dos reatores e todos foram consumidos nos TDHs seguintes, não sendo identificado acúmulo ao final do monitoramento.

5.4.2.3 Compostos inibidores

Os teores de 2-furfuraldeído (FF), 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos totais foram determinados durante o período experimental em ambos reatores para

monitorar o consumo destes compostos ao longo do experimento. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 47.

Tabela 47 - Compostos inibidores nos reatores durante o período experimental

Reator A			
Período	FF (mg L ⁻¹)	5-HMF (mg L ⁻¹)	Compostos Fenólicos Totais (mg L ⁻¹)
Partida	6,480 ± 1,04 ^a	4,375 ± 0,73 ^a	0,370 ± 0,05 ^d
Metade TDH 1	0,984 ± 0,01 ^b	0,972 ± 0,01 ^b	0,580 ± 0,40 ^c
Final TDH 1	0,028 ± 0,04 ^c	0,485 ± 0,03 ^c	0,340 ± 0,12 ^d
Metade TDH 2	ND	0,096 ± 0,01 ^d	0,810 ± 0,40 ^a
Final TDH 2	ND	ND	0,660 ± 0,51 ^b
Reator B			
Período	FF (mg L ⁻¹)	5-HMF (mg L ⁻¹)	Compostos Fenólicos Totais (mg L ⁻¹)
Partida	ND	0,262 ± 0,01 ^a	0,790 ± 0,55 ^b
Metade TDH 1	ND	ND	0,870 ± 0,34 ^c
Final TDH 1	ND	0,037 ± 0,02 ^b	1,180 ± 0,55 ^b
Metade TDH 2	ND	0,046 ± 0,02 ^b	1,710 ± 0,91 ^a
Final TDH 2	0,048 ± 0,01	ND	1,770 ± 0,39 ^a

ND: não detectado

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente
Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor ≤ 0,05), de acordo com o teste de Tukey

Fonte: A autora (2023)

Ribeiro (2016) afirma que a presença de derivados de furanos (furfural e 5-hidroxiacetilfurfural) e compostos fenólicos no meio podem promover toxicidade aos microrganismos quando em elevadas concentrações. Segundo Aquino e Chernicharo (2005), a presença de compostos tóxicos afeta, principalmente, os microrganismos de crescimento lento, ou seja, os acetogênicos e metanogênicos acetoclásticos, resultando em acúmulo de AGV e baixa produção de metano. Silvério (2017) apresenta que além da redução nos produtos da digestão anaeróbia, a inibição pode se manifestar sob a forma de fase *lag* prolongada.

Diversas classes de compostos fenólicos podem causar efeitos inibitórios na CoDA, especialmente no processo de metanogênese. No entanto, Monlau *et al.* (2014) explicam que o consórcio microbiano pode se adaptar à presença destes compostos, seja tolerando sua presença ou consumindo-os e convertendo-os em biogás. Silvério (2017) afirma que o FF e o 5-HMF apresentam efeitos ao processo metanogênico, inclusive, similares àqueles causados pelos compostos fenólicos.

Durante a partida do Reator A, é possível identificar presença de FF e 5-HMF em concentrações de 6,480 e 4,375 mg L⁻¹, respectivamente. Porém, tais compostos foram consumidos no decorrer do processo anaeróbio, sendo que ao final dos 70 dias de monitoramento, não havia mais resquícios destes no reator. Badshah (2012) afirma que em baixas concentrações (entre 0 e 2000 mg L⁻¹), os inibidores podem ser degradados pelos

microrganismos anaeróbios. Afirmar ainda que o inóculo tem papel importante nesta finalidade, uma vez que sua adaptação e concentração podem influenciar no consumo dos inibidores.

Embora variável, a presença dos compostos fenólicos totais no Reator A não interferiu no processo anaeróbio, uma vez que as concentrações obtidas (entre 0,340 e 0,810 mg L⁻¹) estão abaixo das reportadas na literatura como inibitórias (≥ 1200 mg L⁻¹) (BADSHAH, 2012).

Comportamento diferente foi identificado no Reator B durante o período experimental. Para o composto 2-furfuraldeído, os valores apresentaram-se crescentes, atingindo a concentração de 0,048 mg L⁻¹ ao final do TDH 2. Com concentrações variáveis, os valores obtidos para o composto 5-hidroximetilfurfural passaram de 0,262 mg L⁻¹ na partida para 0,037 mg L⁻¹ ao final do TDH 1 e completamente consumido ao fim do TDH 2. Ressalta-se que mesmo presente no meio, as baixas concentrações não afetaram o processo anaeróbio. Badshah (2012) estabelece que apenas concentrações de 2000 a 3000 mg L⁻¹ de FF e 5-HMF afetam a produção de biogás, demonstrando inibição completa em 6000 mg L⁻¹.

Em relação aos fenólicos totais, houve produção deste no decorrer da codigestão anaeróbia. Os valores foram de 0,790 a 1,770 mg L⁻¹ entre a partida e o fim do TDH 2. Mesmo crescente, a faixa identificada não é capaz de promover toxicidade aos microrganismos e inibição no processo.

Ao avaliar o contexto geral do experimento, nota-se que não foi detectado concentrações de furfural após o pré-tratamento biológico. Porém, durante o monitoramento dos reatores, mesmo em pequenas concentrações, tal composto foi identificado. Foi observado também a presença, consumo e geração de 5-HMF no Reator B. Este comportamento pode estar associado a Reação de Maillard - sequência de reações químicas que ocorrem durante o preparo dos resíduos alimentares (um dos co-substratos presentes nos dois reatores).

De acordo com Francisquini *et al.* (2017), a Reação de Maillard é representada por uma série complexa de reações que surge, principalmente, durante o aquecimento e armazenamento prolongado de produtos alimentícios, resultando em modificações na qualidade dos alimentos e favorecendo a formação de compostos responsáveis pelo aroma, sabor e cor dos alimentos tratados termicamente.

A Reação de Maillard ocorre em três estágios distintos: estágio inicial, intermediário e final. No estágio inicial, há a condensação da carbonila de um aminoácido e de um açúcar redutor, resultando na formação do primeiro composto estável da reação, o produto de Amadori. Quando o aquecimento e/ou armazenamento do alimento é prolongado, inicia-se o estágio intermediário, caracterizado por reações químicas a partir dos compostos de Amadori, gerando compostos dicarbonílicos, redutonas, produtos da degradação de Strecker e derivados do

furfural, como o 5-hidroximetilfurfural. Por fim, o último estágio consiste na reação dos produtos intermediários com outros grupos, formando compostos estáveis, além de reações de fragmentação e polimerização, gerando melanoidinas e estruturas fluorescentes (SHIBÃO; BASTOS, 2011).

Para o contexto apresentado, destaca-se o estágio intermediário (ou segunda fase), especialmente pela formação do produto 5-hidroximetilfurfural. Francisquini *et al.* (2017) apresentam a interferência do 5-HMF em processos biológicos, o qual está relacionado com a inibição do crescimento celular e, conseqüentemente, possibilidade de inibição da digestão anaeróbia caso esteja em grandes concentrações.

Para o experimento em questão, nenhum dos compostos inibidores estiveram presentes em concentrações prejudiciais ao processo, no entanto, ressalta-se a importância de monitorar atentamente a presença destes, seja na sua geração após o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos, ou na utilização de resíduos alimentares que sofreram a Reação de Maillard no seu preparo.

5.4.2.4 Comunidade microbiana

Como os mecanismos da CoDA estão associados ao metabolismo dos microrganismos quando expostos à matéria orgânica, torna-se fundamental compreender a forma em que estes diferentes microrganismos atuam no processo anaeróbio, principalmente porque pequenas variações nas condições operacionais dos reatores podem induzir flutuações na composição e atividade da comunidade microbiana (LI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2021). Chen *et al.* (2019) explicam que a diversidade e abundância dos microrganismos determinam o desempenho das etapas envolvidas (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese) e o equilíbrio entre elas.

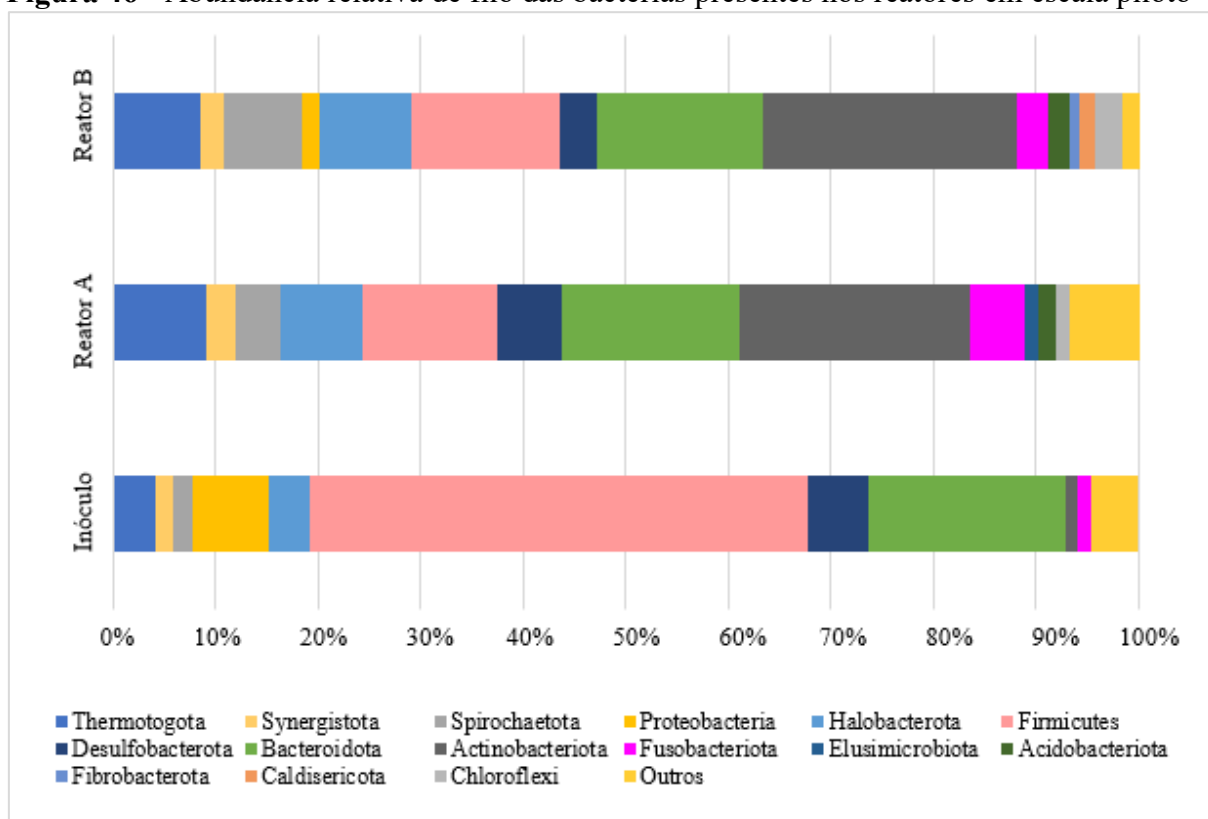
Para avaliar a diversidade microbiana existente e atuante nos reatores da Etapa 3, foram submetidas a análises as amostras do início e fim do processo. O inóculo utilizado na fase de partida foi o mesmo para ambos reatores, portanto, utilizou-se a mesma amostra para identificação inicial. Analisou-se, também, as amostras finais do período experimental (final do TDH 2), sendo elas: Reator A e Reator B.

5.4.2.4.1 Bactérias

As Figuras 46 a 50 apresentam os resultados referentes à abundância dos grupos taxonômicos filo, classe, ordem, família e gênero de bactérias presentes no inóculo e efluentes dos reatores no período experimental.

Foram encontrados representantes de quinze filos bacterianos diferentes durante todo o período experimental, além de filos menos expressivos, sendo distribuídos da seguinte maneira: para a amostra inicial (inóculo), os grupos mais relevantes foram *Firmicutes* (48,57%), *Bacteroidota* (19,31%), *Proteobacteria* (7,51%) e *Desulfobacterota* (5,81%). Para a amostra final do Reator A, identificou-se como principais filos *Actinobacteriota* (22,52%), *Bacteroidota* (17,42%), *Firmicutes* (13,57%), *Thermotogota* (9,05%), *Halobacterota* (8,01%), *Desulfobacterota* (6,16%) e *Fusobacteriota* (5,18%). Para o Reator B, a amostra do final do TDH 2 apresentou os seguintes filos predominantes: *Actinobacteriota* (24,91%), *Bacteroidota* (16,13%), *Firmicutes* (14,44%), *Halobacterota* (8,99%), *Thermotogota* (8,54%) e *Spirochaetota* (7,57%).

Figura 46 - Abundância relativa de filo das bactérias presentes nos reatores em escala piloto



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

As espécies bacterianas e suas respectivas predominâncias variam de acordo com as condições ambientais e natureza do meio, principalmente quando considerado os requisitos ambientais de cada espécie. *Firmicutes*, *Bacteroidota* e *Proteobacteria* são filos que apresentam grande abundância e contribuem com a hidrólise na produção de enzimas como celulasas, lipases e proteases, além disso, as *Bacteroidota* e *Proteobacteria* podem contribuir com a etapa de acidogênese (SANTOS *et al.*, 2021).

Integrantes do filo *Firmicutes* foram encontrados em todas as amostras analisadas. Compreende um grupo de bactérias que vivem no rumem e intestino de animais e também podem ser encontradas em reatores anaeróbios com elevada concentração de matéria orgânica. Trata-se de bactérias gram-negativas mesofílicas que produzem enzimas extracelulares, como protease, lipase, hemicelulase e celulase para hidrolisar a matéria orgânica, além de fermentarem glicose e lactato, produzindo como produtos finais os ácidos valérico, propiônico e butírico (LUCENA, 2008; BORTH, 2021).

As bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidota* são metabolicamente diferentes, quimiorganotróficas e capazes de crescer em vários de substratos complexos. São responsáveis produzir ácidos graxos voláteis a partir de processos hidrolíticos de compostos orgânicos macromoleculares e por degradar aminoácidos, glicerol, glicose e outros polissacarídeos. Além disso, podem atuar na degradação de proteínas e desempenhar papéis importantes na estabilização de resíduos semissólidos. As espécies deste filo habitam solos, água doce e ambiente marinho, bem como, sedimentos em temperatura mesófila (LUCENA, 2008; KRIEG *et al.*, 2010; BORTH, 2021). Assim, a presença deste filo nas proporções de 19,31%, 17,42% e 16,13% nas amostras inóculo, Reator A e Reator B, respectivamente, são justificadas.

Os organismos do filo *Proteobacteria* constituem o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, apresentando enorme diversidade de morfologia e metabolismo. Incluem patógenos, fixadores de nitrogênio e organismos fotossintéticos (MOTTERAN, 2013). Por se tratar de um grupo de bactérias hidrolíticas de matéria orgânica, são grandes produtoras de ácidos orgânicos. A produção do ácido acético por estes microrganismos, por exemplo, tem papel importante na produção de metano por metanogênicas acetoclásticas (BORTH, 2021).

O filo *Actinobacteriota* representou o maior grupo encontrado nos Reatores A e B. Pertencem a este grupo bactérias que têm importante papel na decomposição da matéria orgânica e no ciclo do carbono. Refere-se a um grupo capaz de sintetizar enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas encontradas nos solos, como proteínas, amido, quitina, húmus, celulose e lignocelulose. A abundante presença deste filo nos reatores pode estar relacionada à presença de RPU como co-substrato, seja bruto ou pré-tratado. Em geral, as

Actinobactérias estão presentes na rizosfera (região do solo onde as raízes das plantas crescem e conseguem água, sais minerais e nutrientes); assim, são parte fundamental deste ambiente, especialmente por suas interações com os resíduos lignocelulósicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SIDDHARTHAN *et al.*, 2022).

Os filós *Thermotogota*, *Halobacterota*, *Desulfobacterota*, *Fusobacteriota* e *Spirochaetota* foram identificados em menores proporções. Importante destacar que o filo *Spirochaetota* foi encontrado apenas no Reator B (7,57%) e é capaz de converter ácido propiônico, butírico, valérico e outros compostos orgânicos simples em ácido acético, H₂ e CO₂. A presença deste filo é benéfica ao sistema, pois o ácido acético pode ser utilizado pelas arqueas para a produção de metano. Com isso, o filo *Spirochaetota* tem papel importante na estabilidade do sistema e geração de metano (SHEN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019; BORTH, 2021). A presença destes microrganismos no Reator B pode ter contribuído para um melhor balanço entre acidogênese e metanogênese e, conseqüentemente, maior produção de metano.

Dentre as mais de vinte classes de bactérias identificadas nas amostras analisadas (Figura 47), destacam-se as classes *Clostridia* (43,12%), *Bacteroidia* (19,48%) e *Gammaproteobacteria* (7,51%) para o inóculo; *Actinobacteria* (22,22%), *Bacteroidia* (17,58%) e *Clostridia* (10,55%), *Thermotogae* (9,05%), *Methanosarcinia* (7,68%) e *Fusobacteriia* (5,18%) para o Reator A; e *Actinobacteria* (24,50%), *Bacteroidia* (15,56%) e *Clostridia* (11,88%), *Thermotogae* (8,54%) e *Methanosarcinia* (8,35%) para o Reator B.

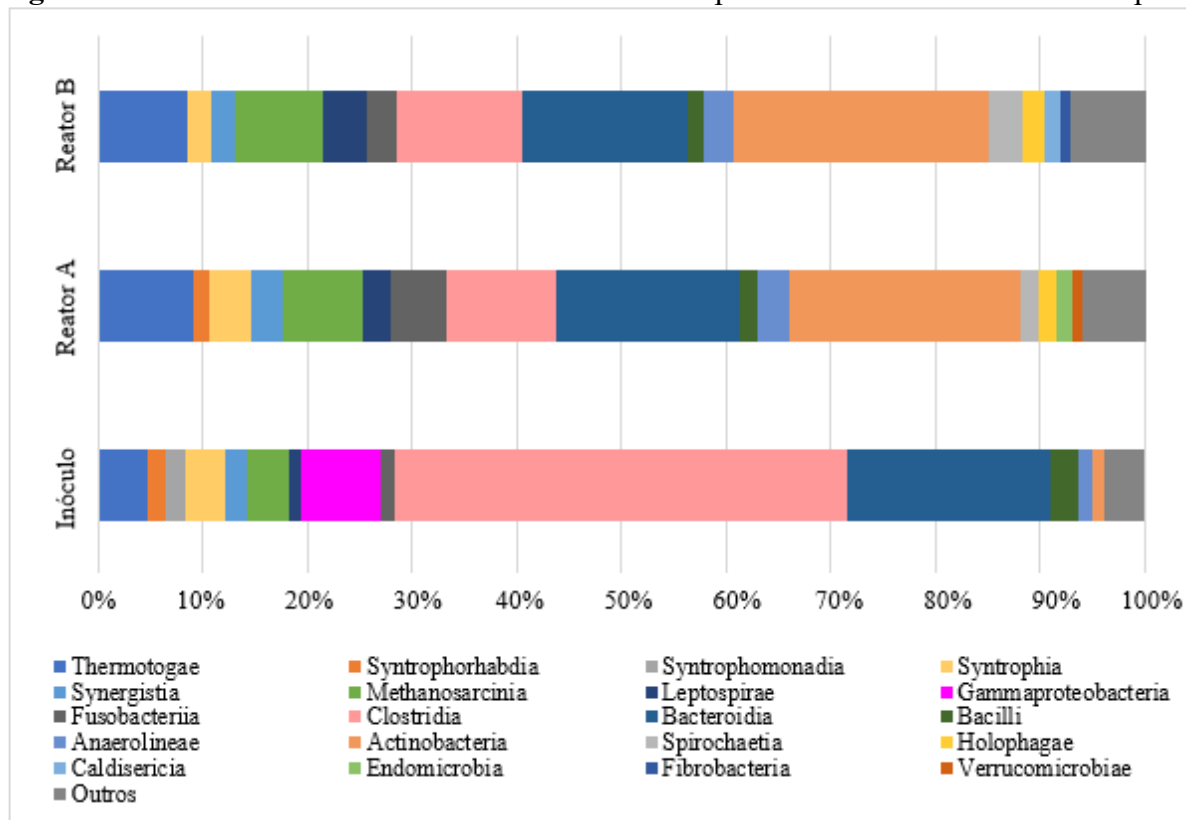
Na amostra do inóculo, a classe *Clostridia*, pertencente ao filo *Firmicutes*, dominou a abundância relativa, seguido pela classe *Bacteroidia*, pertencente ao filo *Bacteroidota*. Somente nesta amostra foi identificado a classe *Gammaproteobacteria* pertencente ao filo *Proteobacteria*.

Para as amostras referentes ao final do experimento (Reator A e B), observa-se a dominância de *Actinobacteria*, pertencente ao filo *Actinobacteriota*. Na seqüência, as classes com maior dominância foram *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Thermotogae* e *Methanosarcinia* em ambos reatores. A maior quantidade de *Actinobacterias* nos reatores, principalmente no Reator B, pode estar relacionada à utilização de RPU como co-substrato, uma vez que esta classe apresenta afinidade com resíduos lignocelulósicos, especialmente se pré-tratado.

Bactérias da classe *Thermotogae* são de grande interesse do ponto de vista biotecnológico, pois apresentam estabilidade a altas temperaturas e capacidade de utilizar vários carboidratos complexos, como celulose e xilanas, para produção de biogás e hidrogênio (GUPTA; BHANDARI, 2011). As maiores abundâncias desta classe nos reatores relacionam-se às características do RPU, que podem conter compostos fenólicos como ácidos tânico e húmico,

carotenoides, clorofila, antocianinas, betalaínas, riboflavinas, quinonas, caramelos (KASTER *et al.*, 2011).

Figura 47 - Abundância relativa de classe das bactérias presentes nos reatores em escala piloto



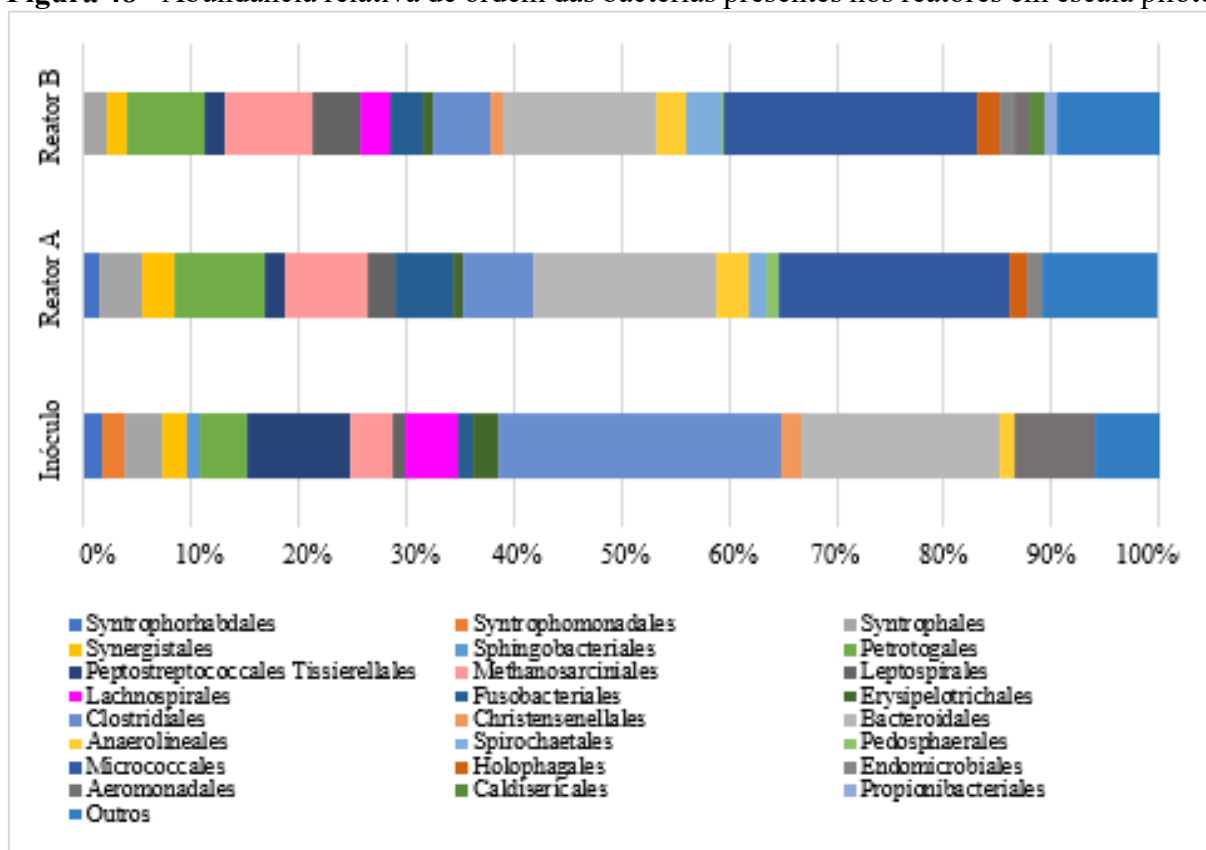
Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Apenas bactérias da classe *Bacteroidia* estiveram presentes em todas as amostras. Ressalta-se que esta classe é composta por bactérias que estão envolvidas nas etapas de hidrólise e acidogênese da digestão anaeróbica, sendo importantes na degradação de polímeros complexos (DIAS *et al.*, 2016; JABARI *et al.*, 2016).

Conclui-se que a presença das classes pertencentes aos filos *Firmicutes*, *Bacteroidota* e *Thermotogae* é de grande relevância para o processo, uma vez que são responsáveis pela degradação de compostos orgânicos complexos, de modo que a abundância desses filos nos Reatores A e B indicam que microrganismos capazes de degradar estes compostos estavam presentes na CoDA dos resíduos alimentares e, principalmente, resíduos de poda urbana, contribuindo com a estabilidade do sistema e alta produção de metano (BARROS, 2017).

Para as amostras analisadas, pode-se observar uma diversidade referente à ordem das bactérias (Figura 48). As ordens de bactérias predominantes na amostra do inóculo foram *Clostridiales* (26,33%), *Bacteroidales* (18,37%), *Peptostreptococcales Tissierellales* (9,46%) e *Aeromonadales* (7,51%).

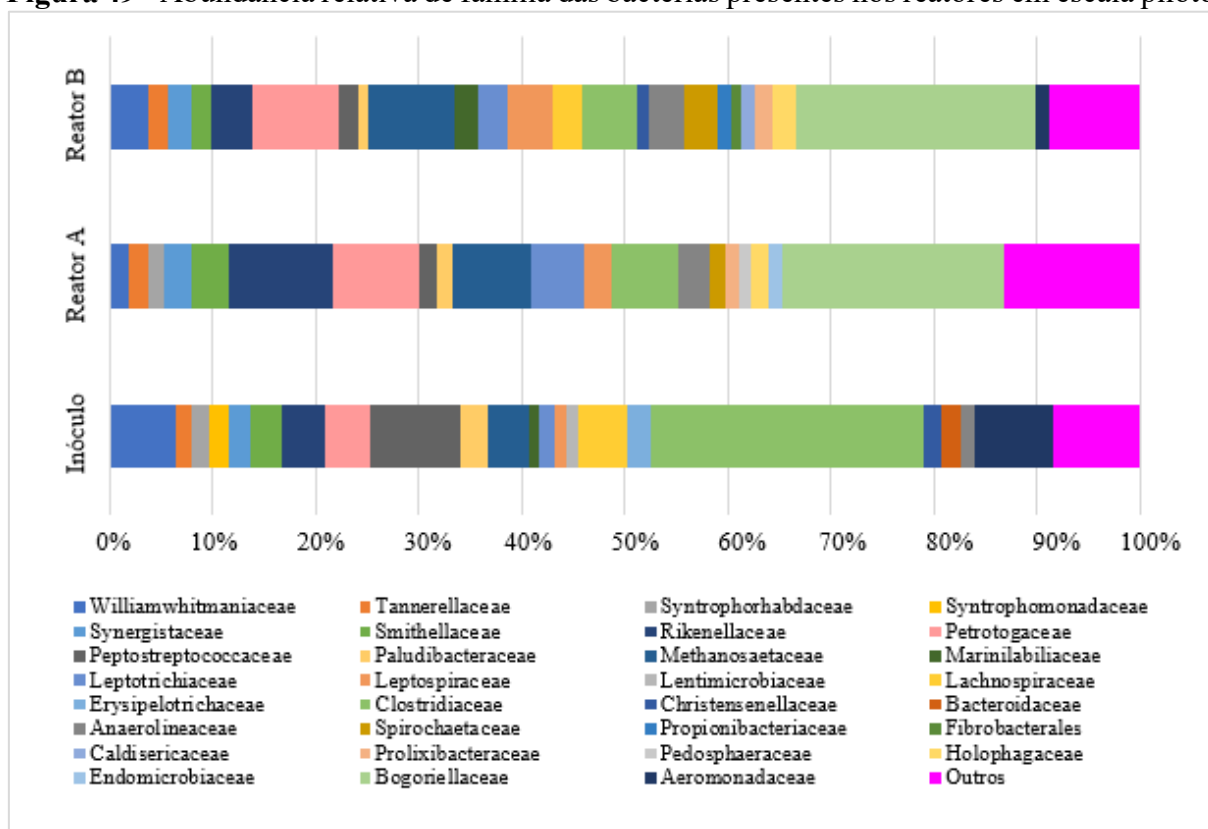
Figura 48 - Abundância relativa de ordem das bactérias presentes nos reatores em escala piloto

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Para os Reatores A e B, as principais ordens de bactérias identificadas foram: *Micrococcales* (21,39% e 23,34%), *Bacteroidales* (17,12% e 14,33%), *Petrotogales* (8,34% e 7,13%), *Methanosarciniales* (7,68% e 8,35%) e *Clostridiales* (6,42% e 5,26%), respectivamente. Somente no Reator A foi identificado a ordem *Fusobacteriales* (5,18%). Nas ordens identificadas em todas as amostras (*Clostridiales* e *Bacteroidales*), houve redução do início (inóculo) ao final do processo de 75,62% e 6,81% para Reator A e 80,02% e 21,99% para Reator B, respectivamente.

Foram identificadas, ao menos, trinta famílias nas amostras avaliadas (Figura 49). Dentre as mais abundantes, destacam-se no inóculo *Clostridiaceae* (26,33%), *Peptostreptococcaceae* (8,77%), *Aeromonadaceae* (7,51%) e *Williamwhitmaniaceae* (6,38%). A família *Clostridiaceae* possui bactérias que podem metabolizar vários compostos, como carboidratos, aminoácidos, álcoois e purinas. Os ácidos butírico, acético, ácido lático e/ou etanol, propanol ou butanol são produtos da fermentação de suas espécies (MAUNE; TANNER, 2012; ALOU *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2021).

Figura 49 - Abundância relativa de família das bactérias presentes nos reatores em escala piloto

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Para Reator A, as famílias abundantes foram *Bogoriellaceae* (21,39%), *Petrotogaceae* (8,35%), *Methanosaetaceae* (7,68%), *Clostridiaceae* (6,43%) e *Leptotrichiaceae* (5,18%). Já para Reator B foram *Bogoriellaceae* (23,34%), *Petrotogaceae* (8,37%), *Methanosaetaceae* (8,35%) e *Clostridiaceae* (5,26%).

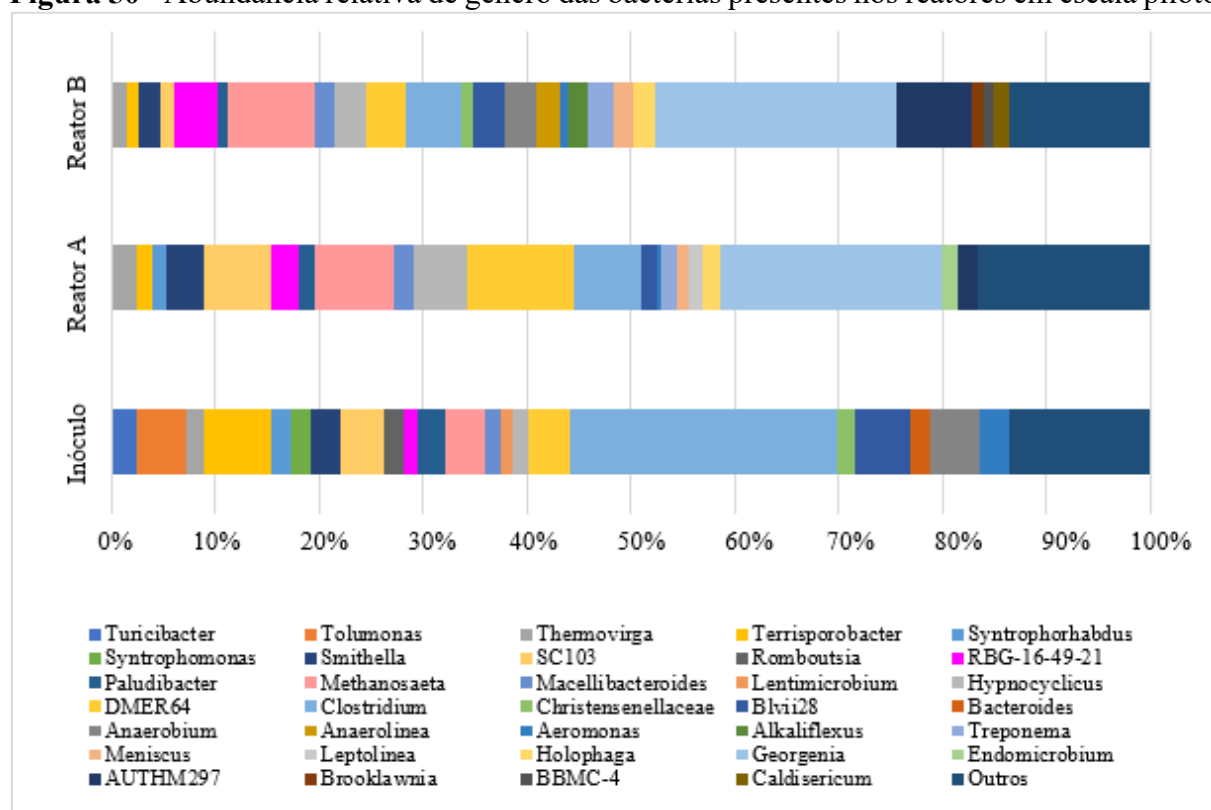
A abundância relativa ao gênero das bactérias no inóculo e final de monitoramento dos Reatores A e B são apresentados na Figura 50. No inóculo, destacam-se *Clostridium* (25,64%), *Terrisporobacter* (6,59%) e *BLVII28* (5,39%). No Reator A, apresentam-se *Georgenia* (21,39%), *Methanosaeta* (7,68%), *SC103* (6,53%), *Clostridium* (6,43%) e *Hypnocyclicus* (5,18%). Por sua vez, no Reator B destacam-se os gêneros *Georgenia* (23,34%), *Methanosaeta* (8,35%) e *Clostridium* (5,26%).

O gênero *Clostridium*, mais abundante no inóculo, abriga microrganismos versáteis metabolicamente. Embora a maioria das espécies de *Clostridium* sejam quimiorganotróficas, algumas apresentam-se como quimioautotróficas ou quimiolitotróficas; também são bactérias anaeróbias estritas, embora a tolerância ao oxigênio já tenha sido detectada em várias espécies; e, por fim, produzem ácidos orgânicos a partir de açúcares ou proteínas. *Clostridium* também

participa da degradação anaeróbia de compostos tóxicos e recalcitrantes (MOTTERAN, 2013). Desta forma, a presença de *Clostridium* é bem justificada nas amostras analisadas.

Importante destacar que embora não sejam capazes de invadir células, as bactérias do gênero *Clostridium* produzem toxinas e enzimas que podem causar doenças tanto intestinais (relacionadas com alimentos), quanto musculares (relacionadas com infecção de feridas). Em seres humanos, estas bactérias fazem parte da microbiologia natural do intestino, porém, em certas circunstâncias, podem se tornar patogênicas. As formas patogênicas mais comuns em humanos são toxinfecção alimentar, enterite necrosante e gangrena gasosa, sendo as duas primeiras relacionadas ao consumo de alimentos contaminados e a última está associada a não-desinfecção de feridas profundas (SOUZA, 2017). Ainda que a abundância deste gênero tenha reduzido durante o período experimental em ambos reatores, o percentual existente no efluente, se descartado incorretamente e/ou não for utilizado em sua totalidade como DSob, pode torná-lo patogêno ao ambiente e sociedade.

Figura 50 - Abundância relativa de gênero das bactérias presentes nos reatores em escala piloto



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

As principais características dos membros do gênero *Georgenia*, predominantes nos Reatores A e B, são: Gram-positivos, móveis ou não móveis, não formadores de endósporos,

aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase e catalase positiva. Esse grupo tem como principal função garantir a sobrevivência por períodos de estresse ambiental (PRESCOTTI, 1993; PATEL; RAKHASHIYA; THAKER, 2015), justificando a maior abundância destes indivíduos nos reatores em que o meio apresentava concentrações significativas, embora não tóxicas, de nitrogênio amoniacal.

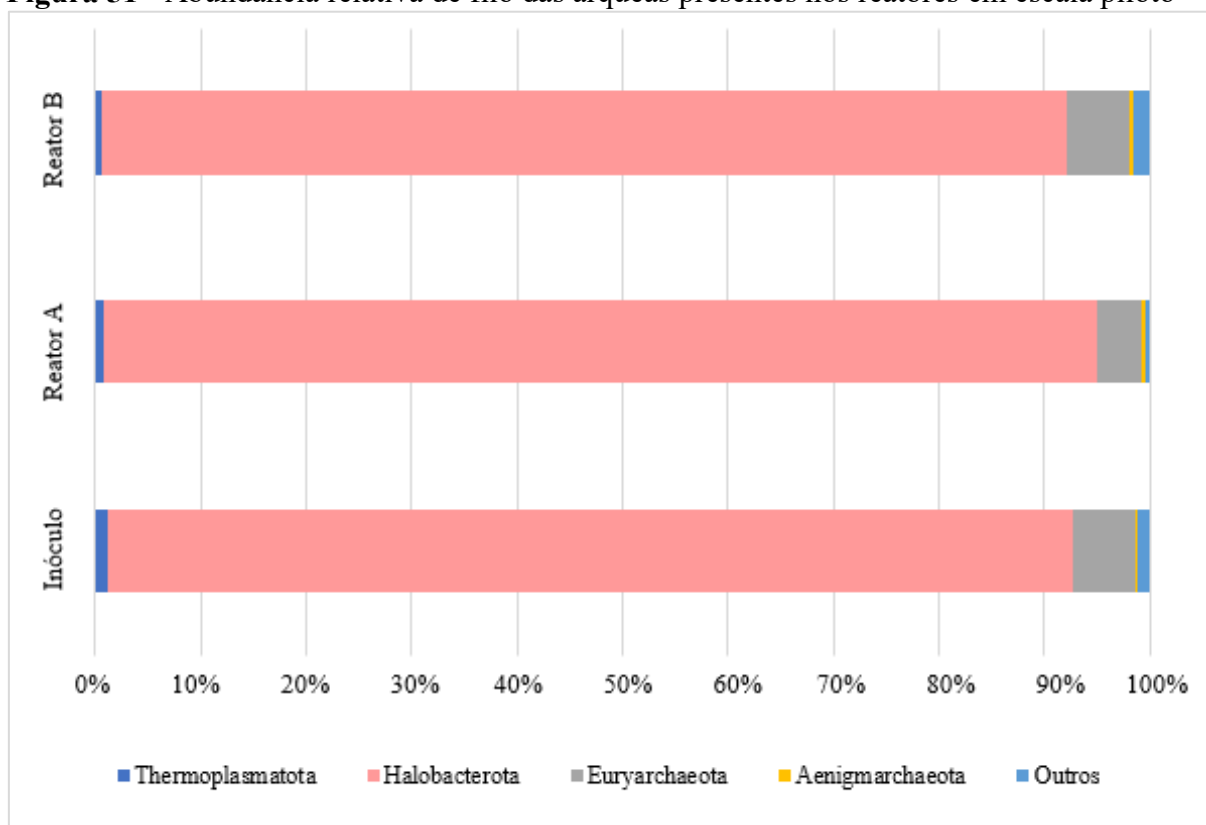
Considerando as análises realizadas, pode-se afirmar que todos os filos que colonizam o trato gastrointestinal do homem (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*) estão presentes nas amostras analisadas (inóculo, Reator A e Reator B). Assim, o desequilíbrio ocasionado por fatores internos ou externos (como alimentação, o uso de antibióticos, de prebióticos e de probióticos, fatores genéticos, idade, estresse, meio ambiente, entre outros), pode refletir na modificação desta microbiota nos seres humanos, ocorrendo diminuição de bactérias benéficas e aumento de patógenos, caracterizando um quadro de disbiose. A disbiose pode provocar sintomas como gases, diarreia ou constipação e está relacionada com doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas e desordens do sistema nervoso central (SOUZA, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2019). Portanto, torna-se fundamental a identificação da comunidade microbiana dos sistemas anaeróbios, seja para sua reutilização no sistema (DSob) ou para seu descarte correto no ambiente.

5.4.2.4.2 *Arqueas*

Nas Figuras 51 a 55 são apresentados os resultados referentes à abundância dos grupos taxonômicos filo, classe, ordem, família e gênero das arqueas, encontrados no inóculo e efluentes dos reatores. Entre as amostras analisadas, pode-se observar que os filos de arqueas predominantes foram *Halobacterota* (91,60%) e *Euryarchaeota* (5,96%), *Thermoplasmatota* (1,14%) e *Aenigmarchaeota* (0,09%) para inóculo; *Halobacterota* (94,18%), *Euryarchaeota* (4,23%), *Thermoplasmatota* (0,75%) e *Aenigmarchaeota* (0,52%) para Reator A; e *Halobacterota* (91,53%), *Euryarchaeota* (5,95%), *Thermoplasmatota* (0,55%) e *Aenigmarchaeota* (0,34%) para Reator B.

O filo *Halobacterota* têm uma gama de indivíduos mais diversificada e incluem membros hidrogenotróficos, acetoclásticos e metilotróficos (LYU *et al.*, 2018). Por sua vez, no grupo *Euryarchaeota* - conhecidos pela produção de biogás - predominam espécies tolerantes a condições ambientais adversas, sendo representado por arqueias metanogênicas, halófilas extremas e termoacidófilas (GARCIA, 2014; YANG *et al.*, 2019).

Figura 51 - Abundância relativa de filo das arqueas presentes nos reatores em escala piloto

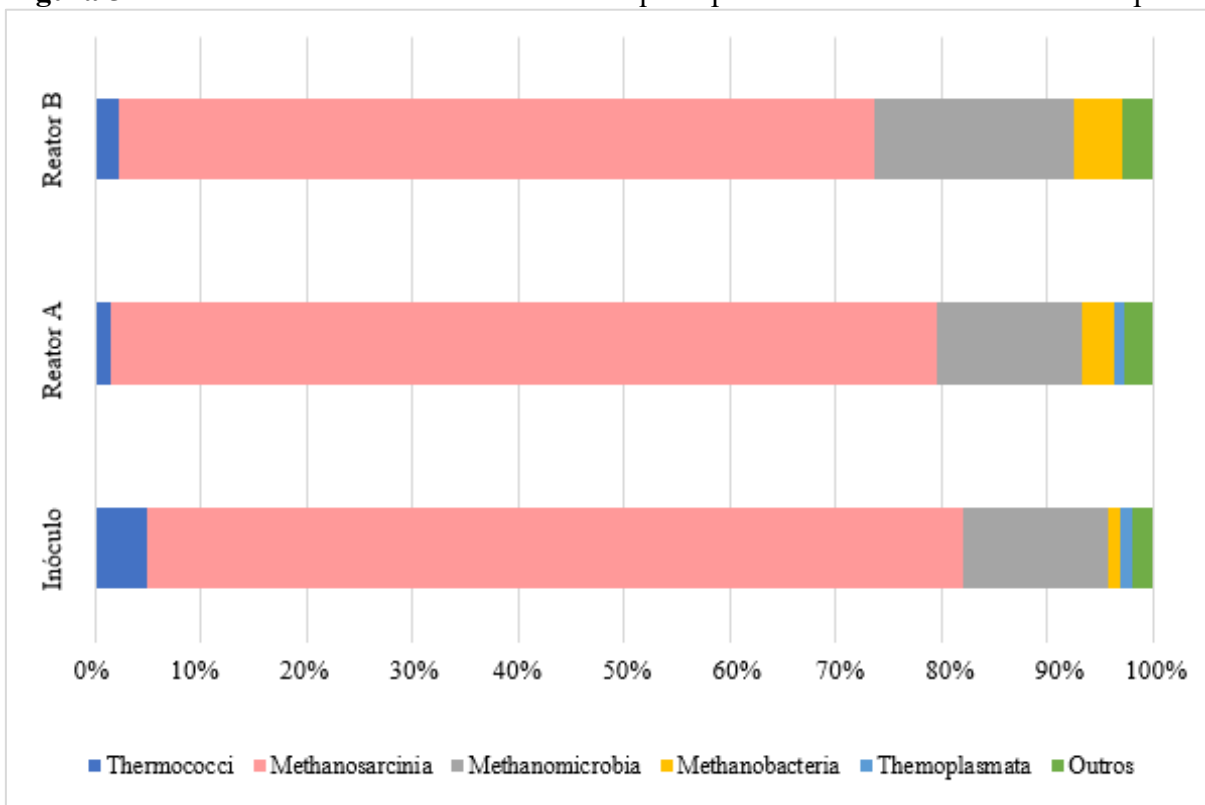


Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente
Fonte: A autora (2023)

As classes de arqueas encontradas no inóculo foram *Methanosarcinia* (77,20%), *Methanomicrobia* (13,60%), *Thermococci* (4,95%), *Methanobacteria* (1,20%) e *Themoplasmata* (1,14%).

Para os Reatores A e B, as mesmas classes foram identificadas, porém, em proporções diferentes. Para o Reator A, os valores foram de *Methanosarcinia* (78,20%), *Methanomicrobia* (13,60%), *Thermococci* (1,46%), *Methanobacteria* (3,05%) e *Themoplasmata* (1,01%), já para o Reator B os valores foram de 71,50%, 18,90%, 2,16% e 4,47%, respectivamente, sem presença da classe *Themoplasmata*.

A classe predominante, do começo ao fim do experimento em ambos reatores foi a *Methanosarcinia*, com aumento de 1,29% em sua abundância no Reator A e redução de 7,38% em sua proporção no Reator B.

Figura 52 - Abundância relativa de classe das arqueas presentes nos reatores em escala piloto

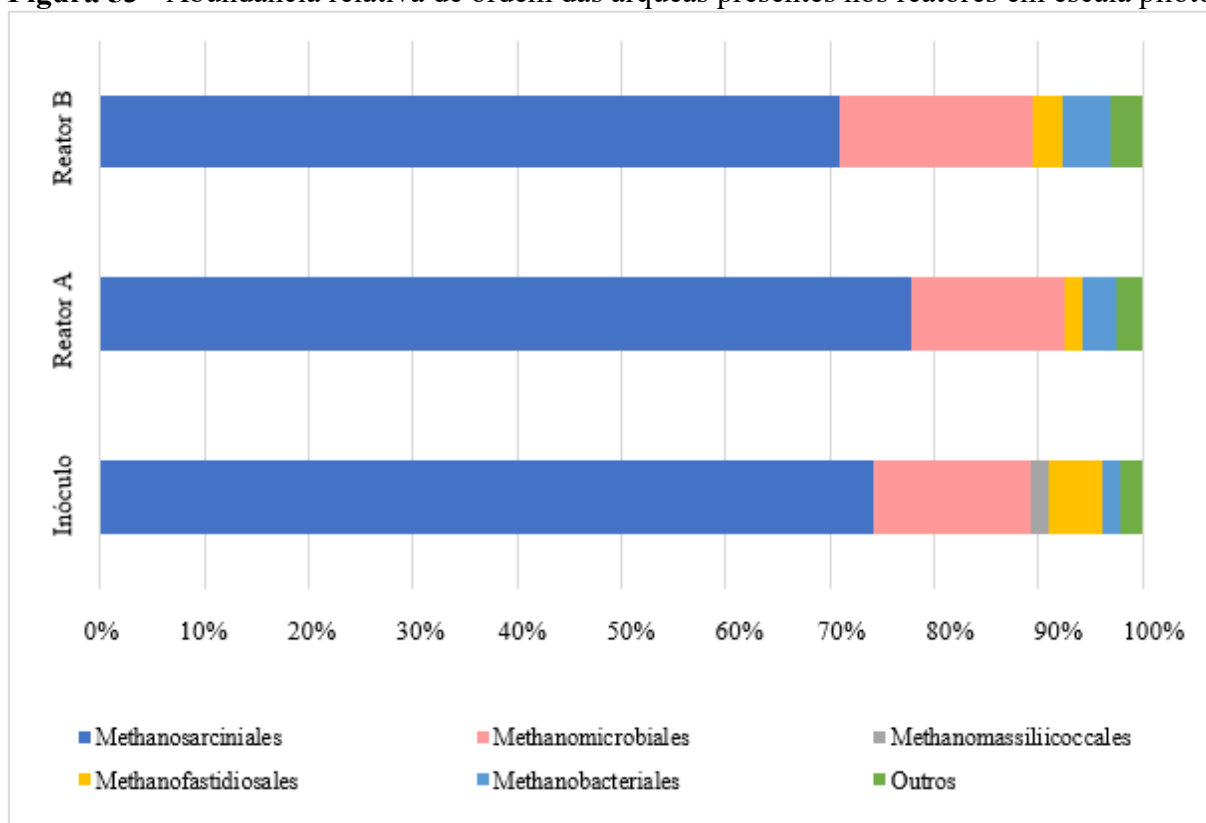
Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Dentre as ordens identificadas nas amostras, destacam-se os grupos *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanofastidiosales* e *Methanobacteriales* (Figura 53). No inóculo, a abundância destas foi de 74,26%, 15,03%, 5,22% e 1,78%, respectivamente. Para os Reatores A e B, os valores variaram em 77,90% e 70,90% para *Methanosarcinales*, 14,60% e 18,60% para *Methanomicrobiales*, 1,69% e 2,80% para *Methanofastidiosales* e 3,34% e 4,60% para *Methanobacteriales*. Apenas o inóculo apresentou a ordem *Methanomassiliicoccales* de arquear, com abundância de 1,63%.

Em todas as amostras, a maior abundância de arqueas ocorreu na ordem *Methanosarcinales*; estas são capazes de utilizar grande quantidade de substratos orgânicos para a metanogênese (incluindo as metilaminas), podendo percorrer as vias hidrogenotrófica, metilotrófica e acetoclástica de degradação. No entanto, enquanto algumas espécies usam apenas uma das vias metabólicas, outras são capazes de utilizar as três vias. Em relação à sua morfologia, as células são estritamente anaeróbias e obtêm energia com a concomitante produção de metano (VICH, 2010).

Por sua vez, a ordem *Methanomicrobiales* - segundo grupo mais abundante nas amostras e presente em maior quantidade no Reator B - é formada por arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (BORTH, 2021).

Figura 53 - Abundância relativa de ordem das arqueas presentes nos reatores em escala piloto

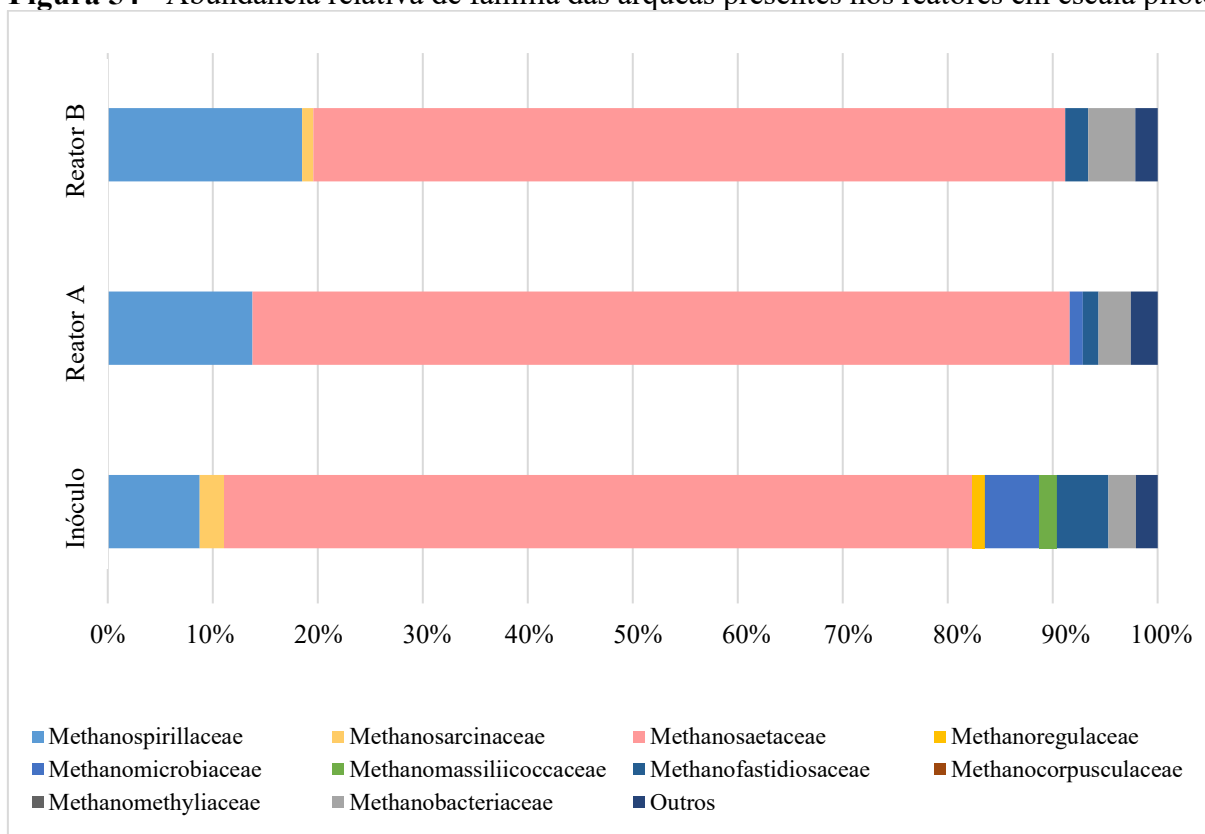
Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Ao nível de família, foram identificadas no inóculo *Methanosaetaceae* (71,30%), *Methanospirillaceae* (8,75%), *Methanomicrobiaceae* (5,20%), *Methanofastidiosaceae* (4,90%), *Methanobacteriaceae* (2,64%), *Methanosarcinaceae* (2,34%) e *Methanomassiliicoccaceae* (1,65%). No Reator A, identificou-se *Methanosaetaceae* (77,82%), *Methanospirillaceae* (13,80%), *Methanomicrobiaceae* (1,26%), *Methanofastidiosaceae* (1,49%) e *Methanobacteriaceae* (3,09%). No Reator B, as famílias identificadas foram *Methanosaetaceae* (71,62%), *Methanospirillaceae* (18,53%), *Methanofastidiosaceae* (2,18%), *Methanobacteriaceae* (4,50%) e *Methanosarcinaceae* (1,06%).

Vich (2010) apresenta algumas características da família *Methanosaetaceae*, a mais abundante em todas as amostras: bacilos embainhados; acetato é o único substrato catabólico; e os habitats incluem sedimentos anaeróbios e digestores de lodo anaeróbios.

Destaca-se que em ambos reatores o percentual de *Methanosaetaceae*, *Methanosaetaceae* e *Methanobacteriaceae* aumentou. Por sua vez, as demais famílias identificadas tiveram comportamento diferente, com redução em sua abundância no decorrer do período experimental.

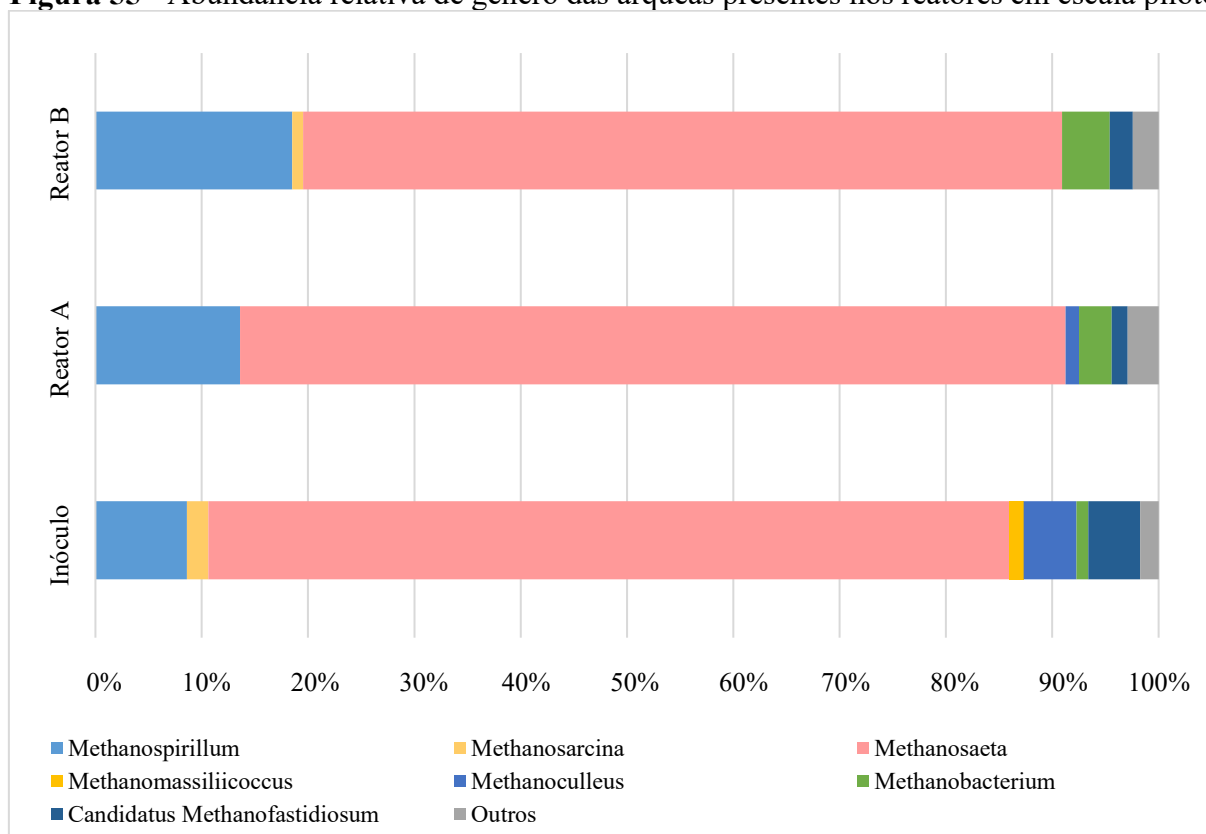
Figura 54 - Abundância relativa de família das arqueas presentes nos reatores em escala piloto

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Para as amostras avaliadas, foram identificados pelo menos sete gêneros de arqueas diferentes (Figura 55). Tanto no inóculo, quanto nos reatores, destacam-se os gêneros *Methanosaeta* e *Methanospirillum*, com abundâncias superiores a 70% e 8%, respectivamente. Também foram encontrados os seguintes gêneros: *Methanoculleus* (4,99%), *Candidatus Methanofastidiosum* (4,89%), *Methanosarcina* (2,02%), *Methanomassiliicoccus* (1,33%) e *Methanobacterium* (1,10%) no inóculo; *Methanoculleus* (1,26%), *Candidatus Methanofastidiosum* (1,49%) e *Methanobacterium* (3,09%) no Reator A; e *Candidatus Methanofastidiosum* (2,16%), *Methanosarcina* (1,04%), (1,33%) e *Methanobacterium* (4,48%) no Reator B.

As *Methanosaetas* e *Methanosarcinas* referem-se às arqueas metanogênicas acetoclásticas, capazes de converter o acetato em metano. Por sua vez, *Methanobacterium* são as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (CHEN *et al.*, 2020). Nas amostras analisadas, o gênero *Methanosaeta* foi dominante, com baixo percentual de *Methanobacterium*. Assim, pode-se afirmar que a maior parte do metano gerado no processo foi devido à conversão de acetato.

Figura 55 - Abundância relativa de gênero das arqueas presentes nos reatores em escala piloto

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

As arqueas do gênero *Methanospirillum* são hidrogenotróficas, utilizam $H_2 + CO_2$ e algumas cepas são capazes de usar 2-propanol e 2-butanol como doadores de hidrogênio para a metanogênese, a partir de CO_2 (BORTH, 2021).

Como as *Methanosarcinas* são capazes de crescer em agregados e formar grupos irregulares de células, sua presença pode ser um favorável para uma maior tolerância a variações no pH e elevadas concentrações de agentes iônicos tóxicos. Considerando suas características morfológicas e flexibilidade, um reator com abundância de *Methanosarcina* possui potencial de atingir estabilidade na metanogênese (GUO *et al.*, 2014; YI *et al.*, 2014).

O gênero *Methanoculleus*, identificado nas amostras do inóculo e Reator A, é composto por espécies mesofílicas hidrogenotróficas. Este é geralmente encontrado em grande proporção em reatores anaeróbios, porém, sua proporção populacional pode ser afetada pelo TDH, COV ou concentração de AGV (BORTH, 2021).

A Tabela 48 apresenta uma correlação entre as condições operacionais de cada Reator e a comunidade microbiana encontrada para os filós das bactérias e arqueas.

Tabela 48 - Correlação entre a comunidade microbiana e as condições operacionais

Parâmetros	Inóculo (início Reator A e Reator B)	Reator A	Reator B
Tempo de operação (dias)	-	70	70
COV (kgSTV m ⁻³ d ⁻¹)	-	0,5	0,5
Ácido acético (mg L ⁻¹)	12,95	128,8	110,88
Ácido propiônico (mg L ⁻¹)	5,69	8,4	9,69
Ácido isobutírico (mg L ⁻¹)	87,16	69,36	62,29
Taxa de conversão STV (%)	-	78,59	82,74
PEM (m ³ kgSTV ⁻¹)	-	248,8	376,61
CH ₄ (% médio)	-	58,72	59,29
Bactérias predominantes (filó)		<i>Actinobacteriota</i> (22,52%)	<i>Actinobacteriota</i> (24,91%)
		<i>Firmicutes</i> (48,57%)	<i>Bacteroidota</i> (16,13%)
		<i>Bacteroidota</i> (19,31%)	<i>Firmicutes</i> (13,57%)
		<i>Proteobacteria</i> (7,51%)	<i>Thermotogota</i> (9,05%)
		<i>Desulfobacterota</i> (5,81%)	<i>Halobacterota</i> (8,99%)
Arqueas predominantes (filó)		<i>Halobacterota</i> (8,01%)	<i>Thermotogota</i> (8,54%)
		<i>Desulfobacterota</i> (6,16%)	<i>Spirochaetota</i> (7,57%)
		<i>Halobacterota</i> (91,60%)	<i>Halobacterota</i> (94,18%)
		<i>Euryarchaeota</i> (5,96%)	<i>Euryarchaeota</i> (4,23%)
		<i>Thermoplasmata</i> (1,14%)	

Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Fonte: A autora (2023)

Nota-se variação na predominância da comunidade microbiana entre as amostras analisadas, principalmente no que se refere aos filó das bactérias. A adição dos substratos (resíduo alimentar e resíduo de poda urbana – bruto e pré-tratado) foi determinante para o aumento da comunidade microbiana nos reatores quando comparado à amostra inicial (inóculo), permitindo que grupos menores de organismos pudessem utilizar os compostos favorecendo a taxa de crescimento bacteriano.

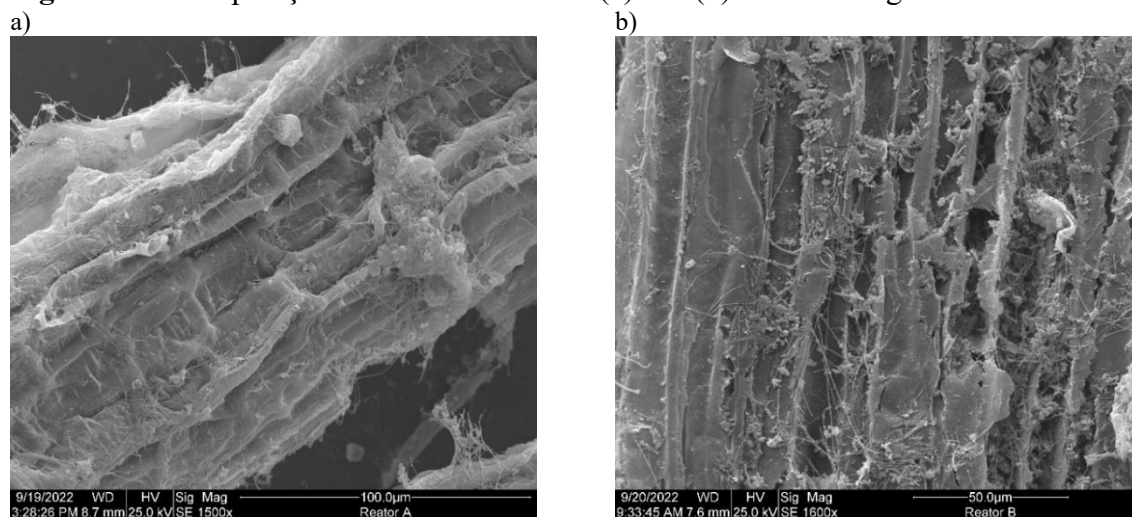
A concentração dos ácidos graxos voláteis, especialmente acético, propiônico e isobutírico, podem ter influenciado na comunidade microbiana existente em cada reator. A utilização de RPU diferente em cada reator pré-tratado parece ter influenciado na abundância dos filó *Halobacterota* e *Euryarchaeota*, sendo o RPU bruto favorável para o primeiro grupo e o RPU pré-tratado para o segundo.

5.4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada ao final do monitoramento dos reatores. Buscou-se verificar nas imagens se havia microrganismos fortemente aderidos nas partículas de grama, comparando-se o Reator A (RPU bruto) e Reator B (RPU pré-tratado biologicamente).

A Figura 56 apresenta a comparação estrutural do resíduo lignocelulósico presente nas amostras dos Reatores A e B ao final do período experimental.

Figura 56 - Comparação entre os Reatores A (a) e B (b): estrutura lignocelulósica

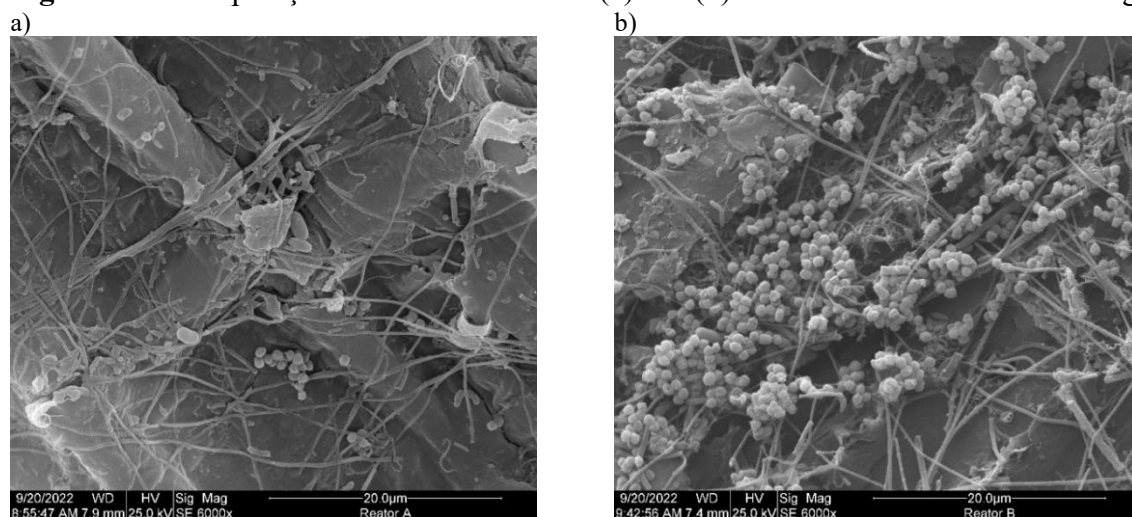


Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

É possível verificar diferentes estágios de degradação das amostras. A menor degradação demonstrada na imagem do Reator A pode ser explicada pela dificuldade de conversão de compostos lignocelulósicos pelos microrganismos, como lignina. Já o RPU pré-tratado biologicamente (Reator B), apresenta maiores indícios de degradação, justificado pela prévia hidrólise do RPU e, portanto, maior e mais rápida conversão do co-substrato.

Verifica-se na Figura 57 uma comparação entre os biofilmes formados e os microrganismos aderidos em cada um deles nas amostras dos Reatores A e B ao final do período experimental.

Figura 57 - Comparação entre os Reatores A (a) e B (b): biofilme e adesão microbiológica



Reator A: inóculo + RA + RPU bruto; Reator B: inóculo + RA + RPU pré-tratado biologicamente

Pode-se verificar a formação de biofilmes nos orifícios degradados do RPU, com diferentes microrganismos aderidos. Afirma-se, portanto, que as partículas do RPU (bruto ou pré-tratado) serviram como meio suporte aos microrganismos, os quais se fixaram de diferentes formas ao substrato.

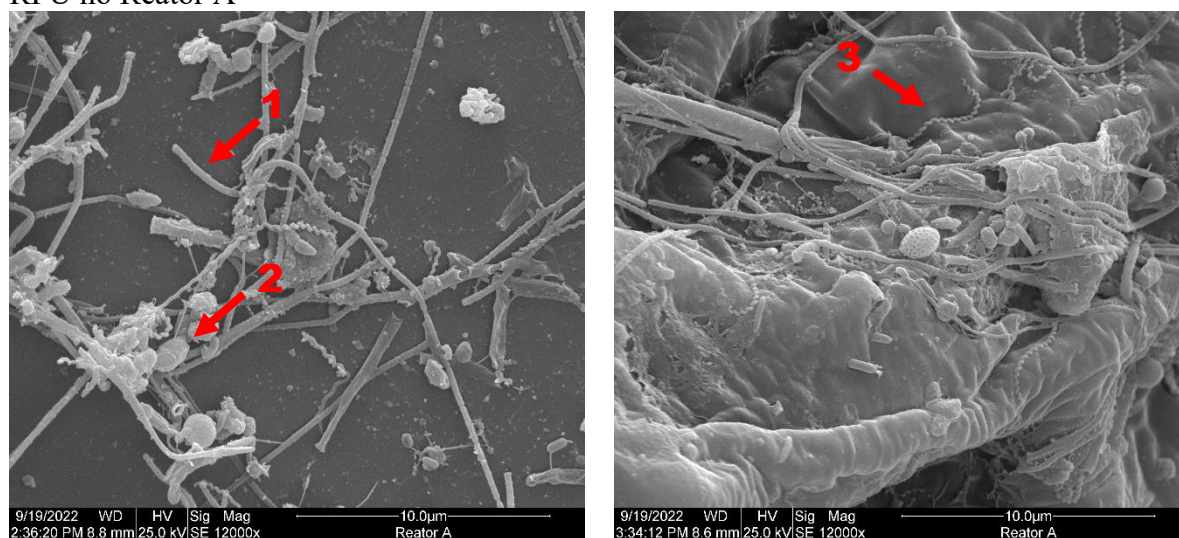
Os biofilmes são estruturas com agregados de microrganismos, matéria orgânica e inorgânica mantidos juntos por polissacarídeos extracelulares. O biofilme promove a formação de um ecossistema microbiano com características diferenciadas. Entre os benefícios da formação de biofilme, pode-se citar a complementação de nichos funcionais, maior diversidade de organismos e maior estabilidade. Dentro de um único reator, as comunidades de biofilme podem ser diferentes da biomassa suspensa (GAGLIANO *et al.*, 2017; BORTH, 2021).

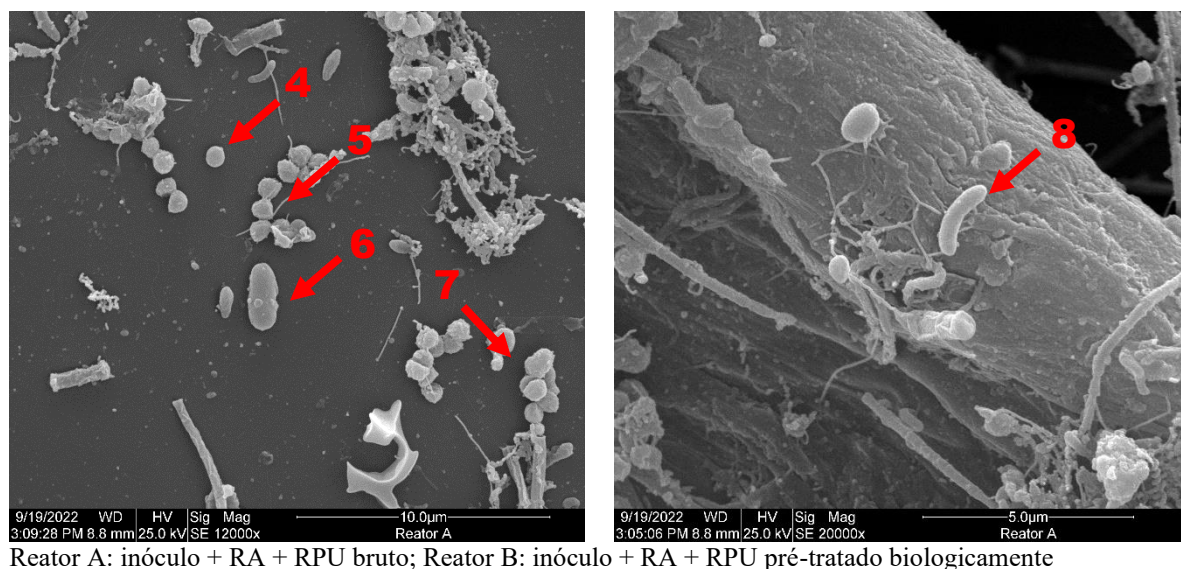
Embora notória a presença de biofilme e microrganismos em ambas imagens, é evidente que a estrutura do RPU pré-tratado promoveu maior formação de biofilme no Reator B, garantindo maior adesão das bactérias no sistema, com maior quantidade de microrganismos agrupados.

Uma vez que o processo de preparo das amostras envolve lavagens e centrifugação, considera-se que os microrganismos encontrados estavam fortemente aderidos às partículas de RPU, ou seja, as imagens de MEV não refletem a realidade e totalidade de microrganismos presentes nas amostras. Mesmo assim, foi constatada grande diversidade de microrganismos, sejam isolados ou em colônias.

Na Figura 58 são apresentadas imagens dos microrganismos encontrados na análise de MEV do Reator A.

Figura 58 - Imagens de MEV da diversidade de microrganismos aderidos na superfície do RPU no Reator A

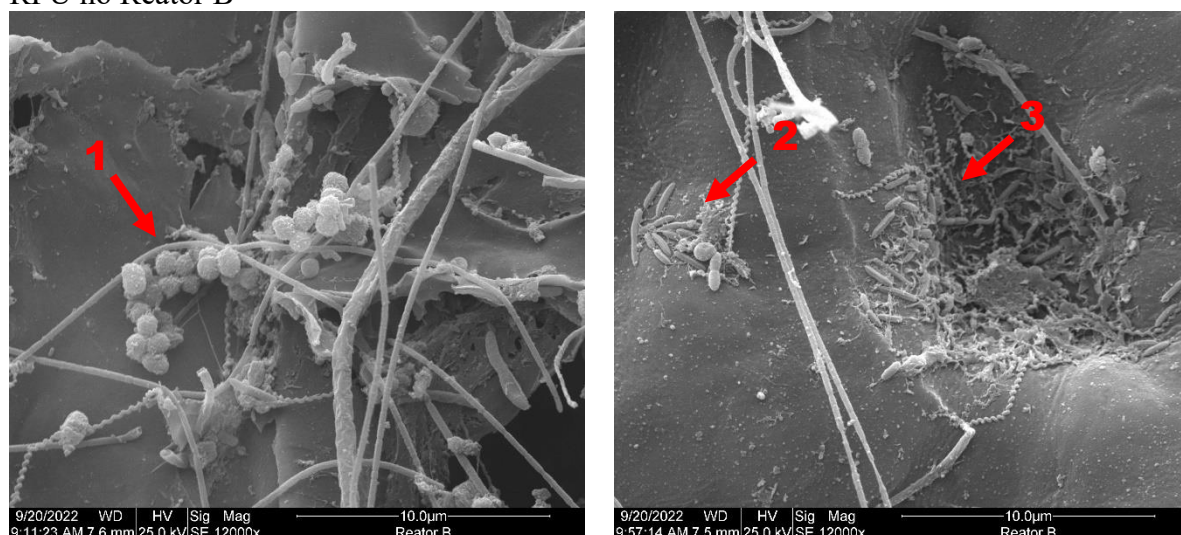


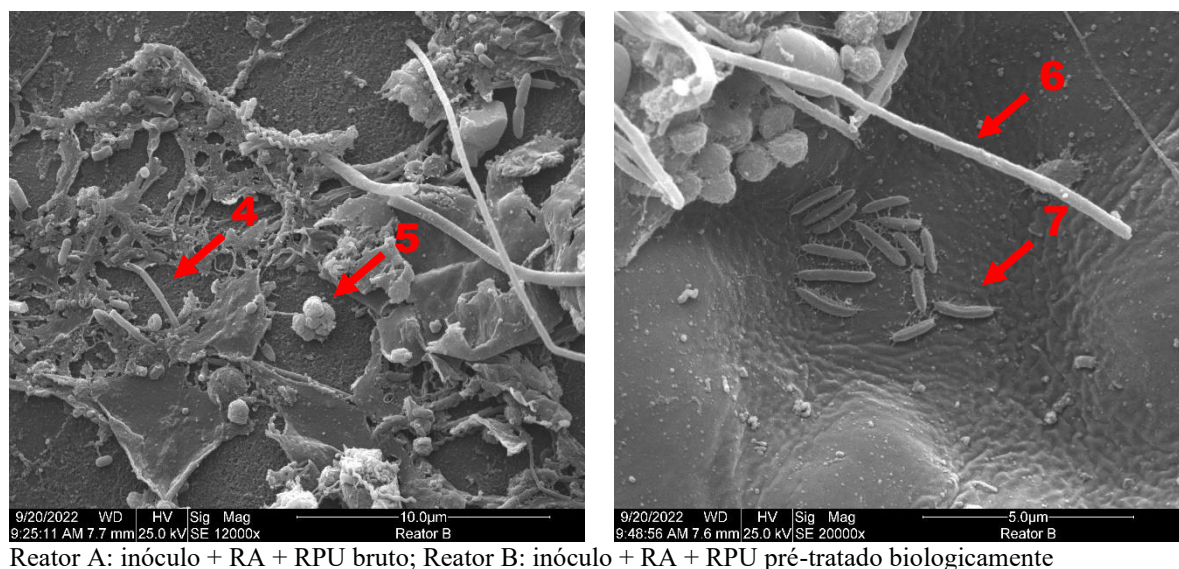


Verifica-se a presença de microrganismos em variadas formas, como espirilos (seta 1), cocobacilos (seta 2), espiroquetas (seta 3), cocos (seta 4), estreptococos (seta 5), vibrião (seta 6), sarcinas (seta 7) e bacilos (seta 8). De maneira geral, os microrganismos presentes no Reator A apareceram majoritariamente isolados, com pequenas formações de colônias.

Na Figura 59 são apresentadas imagens dos microrganismos encontrados na análise de MEV do Reator B.

Figura 59 - Imagens de MEV da diversidade de microrganismos aderidos na superfície do RPU no Reator B





Dentre as diversas formas de microrganismos existentes, pode-se notar maior formação de colônias no Reator B. Uma possível explicação para este fato é a formação de biofilme nas partes mais profundas dos orifícios de RPU, que pode ter favorecido o desenvolvimento e crescimento de algumas espécies, uma vez que nestes locais há menor impacto de alterações externas, como a agitação mecânica ou alterações do meio. Este fato pode ter influenciado também no melhor desempenho do Reator B, por favorecer o desenvolvimento de alguns microrganismos.

Os microrganismos encontrados no Reator B foram como estafilococos (seta 1), bacilos (seta 2), espiroquetas (seta 3), espirilos (seta 4), sarcinas (seta 5), filamentosas (seta 6), vibrião (seta 7), entre outros.

A variação na diversidade microbiana entre os dois reatores pode estar relacionada ao tipo de substrato utilizado em cada alimentação. O Reator B, com RPU pré-tratado biologicamente, pode ter favorecido a presença de microrganismos isolados e maior quantidade colônias, haja vista a fácil degradação do material lignocelulósico adicionado, considerando a hidrólise prévia realizada pela enzima lacase excretadas pelo *Pleurotus ostreatus* na etapa de pré-tratamento.

5.4.3 Considerações sobre a Etapa 3

Com base nos resultados apresentados para esta etapa experimental, pode-se afirmar que o uso do DSob para equalizar as misturas de RA e RPU nas alimentações dos reatores provou que, além ser uma alternativa para reduzir o consumo de água, promover maior alcalinidade ao sistema e, conseqüentemente, auxiliar na estabilidade e manutenção do pH

afluente e efluente, é uma estratégia eficaz para garantir melhores condições ambientais para os microrganismos envolvidos no processo converterem o material orgânico em AGV, otimizando a geração de biogás e metano ao final do processo.

Diante da notória característica de que o pré-tratamento é o gargalo para o desenvolvimento de bioprocessos lignocelulósicos, muitas tecnologias têm sido estudadas como soluções para este entrave. Dentre os métodos, o pré-tratamento biológico se destaca por ser uma solução eficiente para conversão de açúcares provenientes da estrutura lignocelulósica destes materiais, uma vez que na codigestão anaeróbia com resíduo alimentar, o uso do RPU pré-tratado promoveu maior produção acumulada de biogás (1383,50 L) e específica de metano ($376,61 \text{ m}^3 \text{ kgSTV}^{-1}$).

A comunidade microbiana das amostras apresentou grande variedade durante todo o experimento, porém, identificou-se a dominância das metanogênicas acetoclásticas (*Methanosaeta*) em ambos reatores, sendo que as bactérias do filo *Actinobacteriota* e as arqueas do filo *Halobacterias* foram as que apresentaram maior abundância relativa e ao final do monitoramento.

6 CONCLUSÕES

Com as condições do estudo e os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se:

6.1 PRÉ-TRATAMENTO DA PODA URBANA - ETAPA 1

Ao avaliar diferentes pré-tratamento do resíduo de poda urbana, tem-se que:

- Para o pré-tratamento químico com ácido sulfúrico, avaliando-se os fatores tempo de residência (3, 8, 15, 22 e 27 minutos), temperatura (31, 55, 90, 125 e 149 °C) e concentração de ácido (0,3, 1, 2, 3 e 3,7% v/v), a condição experimental mais favorável foi 3%, 125 °C e 22 minutos, com um rendimento do processo de 91,54% e deslignificação de 39,83%.
- Para o pré-tratamento químico com hidróxido de sódio, variando-se os fatores tempo de residência (2, 7, 15, 23 e 28 horas), temperatura (36, 50, 70, 90 e 104 °C) e concentração de base (1,3, 3, 5,5, 8 e 9,7% v/v), a condição experimental mais favorável foi 5,5%, 104 °C e 15 horas com 92,47% de rendimento do processo e 52,97% de deslignificação
- Para o pré-tratamento físico por auto-hidrólise, fixando-se a temperatura da autoclave em 121 °C e a pressão em 1 atm e variando apenas os tempos de residência em 5, 10 e 15 minutos, a condição experimental mais favorável foi 15 minutos, com elevado rendimento do processo (92,83%) e deslignificação (32,58%).
- Para o pré-tratamento biológico com o fungo *Pleurotus ostreatus*, os fatores avaliados foram tempo de incubação (4, 7, 14, 21 e 24 dias) e temperatura (24, 25, 28, 31 e 32 °C) e a condição experimental mais favorável foi 28 °C e 14 dias, com 92,11% de rendimento do processo e 37,98% de deslignificação.
- Ao avaliar a produção da enzima lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* após o pré-tratamento biológico nas condições estudadas, verificou-se que todos os cultivos realizados alcançaram atividades de lacase mais altas do que seus controles. Além disso, os resultados confirmam que a temperatura pode apresentar influência na produção de lacase e, conseqüentemente, na remoção de lignina.
- Em todas as condições experimentais selecionadas, houve elevada conversão de açúcares totais e redutores, remoção dos teores de hemicelulose e aumento nas concentrações de celulose.

- As análises do FTIR confirmaram mudanças na estrutura química do resíduo de poda urbana após as melhores condições de cada um dos pré-tratamentos e em todas as condições foram encontradas evidências da remoção da lignina e hemicelulose no RPU bruto.
- As imagens obtidas após as análises do MEV permitiram concluir que todos os pré-tratamentos provocaram mudanças significativas na estrutura e morfologia do RPU. Identificou-se formação de fissuras e abertura de fendas na estrutura lignocelulósica, aumentando sua área superficial para posterior conversão.
- A partir das análises cromatográficas de AGV, verificou-se que o pré-tratamento com maior formação de ácido acético, precursor direto dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, foi o pré-tratamento biológico, com valor de 2229,59 mg L⁻¹.
- Em relação aos compostos inibidores, mesmo que as maiores concentrações de FF tenham sido obtidas no pré-tratamento alcalino (13,79 mg L⁻¹), de 5-HMF no pré-tratamento biológico (5,82 mg L⁻¹) e de compostos fenólicos no pré-tratamento por auto-hidrólise (31,70 mg L⁻¹), verificou-se que em todas as condições avaliadas, as concentrações de apresentaram-se abaixo dos limites de inibição estabelecidos em literatura.

6.2 ENSAIO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO - ETAPA 2

Ao avaliar a produção específica de biogás e metano do resíduo alimentar e das condições de pré-tratamento do resíduo de poda urbana mais favoráveis, a partir do Ensaio do Potencial Bioquímico de Metano, em escala de bancada, variando-se o processo em monodigestão e codigestão anaeróbia, sendo esta última avaliada em função da substituição do STV de RA por RPU em 10% e 30%, tem-se:

- A condição com maior remoção de STV (55,37%) e DQO (58,53%) foi a codigestão anaeróbia entre inóculo, RA e 30% de RPU pré-tratado alcalino.
- Os maiores volumes de biogás acumulado (981,01 NmL) e produção específica de biogás (298,59 NmL gSTV⁻¹) foram obtidos no tratamento de codigestão anaeróbia entre inóculo, RA e 30% de RPU pré-tratado ácido.
- Em relação a produção específica de metano, as condições com maiores valores e sem diferença significativa entre si foram: CoDA entre inóculo, RA e 30% de RPU pré-tratado ácido (137,23 NmL gSTV⁻¹), CoDA entre inóculo, RA e RPU pré-tratado

biologicamente ($135,64 \text{ NmL gSTV}^{-1}$) e CoDA entre inóculo, RA e 30% de RPU pré-tratado alcalino ($133,09 \text{ NmL gSTV}^{-1}$).

- Considerando os resultados obtidos, selecionou-se a codigestão anaeróbia de RA com RPU pré-tratado biologicamente para estudo mais aprofundado, especialmente por seu resultado satisfatório frente aos experimentos, bem como vantagens como o não uso de compostos químicos, a geração de um efluente passível de ser lançado ao ambiente, menores gastos com insumos e condições mais brandas de tratamentos.

6.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *PLEUROTUS OSTREATUS* - ETAPA 2A

Ao avaliar diferentes meios de cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus*, fixando-se o tempo de incubação (14 dias) e a temperatura ($28 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e variando a solução umedecedora (com água e com meio Vogel), os nutrientes (1% de glucose e 1,5% de extrato de levedura) e a esterilização (com e sem), tem-se:

- A etapa de esterilização da solução umedecedora é fundamental para que esta fique livre de qualquer interferente e pronta para receber a hifa específica para crescimento e desenvolvimento, uma vez que os testes indicaram crescimento de outras culturas (fungos e bactérias) e/ou o não crescimento do *Pleurotus ostreatus*.
- Em todos os tratamentos houve remoção de lignina e hemicelulose, com taxas de deslignificação satisfatórias. Porém, a condição que promoveu melhores remoções de lignina foi a condição com solução umedecedora de água, 1% glucose, 1,5% extrato de levedura e estéril (24,39%).
- A partir das análises estatísticas, não houve diferença significativa em relação aos valores finais de lignina nos tratamentos estudados. Ou seja, embora uma condição específica tenha indicado maior remoção - numérica - de lignina, todos os tratamentos foram satisfatórios para este fim.
- Esta etapa indicou que é possível obter economias financeiras no que diz respeito a preparo de meios de cultivo para desenvolvimento do *Pleurotus ostreatus*, se a finalidade for crescimento deste para remoção de lignina de RPU, uma vez que a solução umedecedora composta apenas por água e a com condições ideais promoveram resultados semelhantes neste quesito.

6.4 CODIGESTÃO ANAERÓBIA - ETAPA 3

Ao avaliar o desempenho da codigestão anaeróbia de RA com RPU bruto e pré-tratado biologicamente, em reatores de escala piloto de 0,05 m³, comparando aspectos quali-quantitativos do biogás e efluente gerados, bem como comunidade microbiana, tem-se:

- Os parâmetros de controle operacional, como pH, AGV e alcalinidade, estiveram dentro dos limites considerados adequados para o bom desempenho de sistemas anaeróbios.
- Quando avaliados os parâmetros de desempenho STV e DQO, ambos os reatores apresentaram resultados satisfatórios. No entanto, o Reator B apresentou maiores taxas de conversão (82,74% para STV e 82,21% para DQO) quando comparados ao Reator A (78,59% e 79,71%, respectivamente).
- Os resultados de NTK, N-amoniaco e amônia livre apresentaram variação durante o período experimental, mas não ultrapassaram os valores estabelecidos como limite para um processo anaeróbio estável.
- Ao comparar os dois sistemas, conclui-se que o Reator B apresentou resultados mais satisfatórios: maior produção média diária de biogás (19,76 L d⁻¹), maior produção específica de biogás (633,81 kgSTV⁻¹), maior produção média diária de metano (11,85 L d⁻¹), maior produção específica de metano (376,61 L kgSTV⁻¹) e maior percentual médio de metano (59,42%). Estes resultados indicam que o desempenho global do Reator B foi maior que o Reator A em 49,81% para produção média diária de biogás, 49,90% para produção específica de biogás, 51,34% para produção média diária de metano e 51,37% para produção específica de metano.
- A análise de AGV nos reatores indicaram oscilação das concentrações médias de ácido acético nos reatores, com indicativo de consumo deste ácido pelos microrganismos, sugerindo a presença de microrganismos acetoclásticos. Identificou-se, também, acúmulo de ácido propiônico nos sistemas, indicando possibilidade de períodos de instabilidade. Para os demais ácidos (isobutírico, butírico, isovalérico e valérico), os resultados mostraram consumo pelos microrganismos no decorrer do monitoramento.
- Identificou-se a presença de FF e 5-HMF no início do processo do Reator A em concentrações de 6,480 e 4,375 mg L⁻¹, respectivamente, com consumo destes ao final dos 70 dias de experimento. Em relação aos fenólicos totais, houve presença destes no

decorrer da CoDA, no entanto, as concentrações identificadas não são capazes de promover toxicidade aos microrganismos e inibição no processo.

- O grupo de microrganismos metanogênicos acetoclásticos foi dominante em todo o período de monitoramento. As bactérias do filo *Actinobacteriota* e as arqueas do filo *Halobacterias* foram as que apresentaram maior abundância relativa ao final do processo.
- A análise de microscopia eletrônica de varredura permitiu identificar diferença relevante nos estágios de degradação das amostras dos Reatores A e B, sendo que no primeiro as estruturas estavam menos danificadas – possivelmente pela maior dificuldade de degradação dos componentes do RPU. Verificou-se, também, maior formação de biofilme no Reator B, garantindo maior adesão das bactérias no sistema. Por fim, diferentes formas de microrganismos foram identificadas nas amostras avaliadas, sugerindo diversidade microbiológica nos sistemas.

6.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO ESTUDO

Associar os resíduos alimentares e resíduos de poda urbana no processo de codigestão anaeróbia pode ser uma alternativa eficaz na gestão dos resíduos sólidos urbanos, reduzindo o volume de resíduos encaminhados aos aterros ou lixões a céu aberto e promovendo a geração de energia a partir do biogás.

Considerando os aspectos estruturais dos RPU, torna-se fundamental a aplicação de tecnologias de pré-tratamento para otimização de sua atuação na CoDA, especialmente se desenvolvido o pré-tratamento biológico com o fungo *Pleurotus ostreatus*. Além de garantir produções de biogás e metano satisfatórias, fornecem ao sistema uma biomassa fúngica (inativa) capaz de ser utilizada como matéria orgânica aos microrganismos anaeróbios. Para desenvolvimento em grande escala, pode-se estudar o cultivo do fungo em água, garantindo desempenhos equivalentes às soluções umedecedoras enriquecidas com nutrientes e economia financeira relativa a insumos, reagentes e energia.

7 RECOMENDAÇÕES

- Comparar o desempenho da codigestão anaeróbia de resíduo alimentar e resíduo de poda urbana bruto e pré-tratado biologicamente, aumentando gradativamente a COV do sistema, de forma a identificar a influência da biomassa lignocelulósica na estabilidade dos processos.
- Estudar a influência das diferentes soluções umedecedoras de RPU para crescimento do *Pleurotus ostreatus*, avaliando o potencial de geração de biogás e metano em Ensaio BMP e escala piloto.
- Avaliar a influência dos demais pré-tratamentos na eficiência dos processos de codigestão anaeróbia de RA e RPU (bruto e pré-tratado), a partir de análises básicas (pH, série de sólidos, DQO, alcalinidade, série nitrogenada) e específicas (AGV e microbiologia).
- Estudar a possibilidade de produção laboratorial da lacase para a aplicação em maior escala do pré-tratamento biológico, sem necessidade de cultivo do *Pleurotus ostreatus*, garantindo a mesma eficiência da produção pelos fungos.

BIBLIOGRAFIA

ABATZOGLOU, N.; BOIVIN, S. A review of biogas purification processes. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 3, n. 1, p. 42-71, 2009.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA - ANEEL. **Sistema de Informações de Geração da ANEEL**. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://bityli.com/ObWtP>. Acesso em: novembro de 2021.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309–318, 2002.

ALINO, J. H. L. **Codigestão de resíduos de aparado de grama, resíduos de frutas e vegetais e esgoto sanitário: efeito do pré-tratamento e recirculação do digestato**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2020.

ALOU, M. T.; NDONGO, S.; FRÉGÈRE, L. LABAS, N.; ANDRIEU, C.; RICHEZ, M.; COUDERC, C.; BAUDOIN, J. P.; ABRAHÃO, J.; BRAH, S.; DIALLO, A.; SOKHNA, C. CASSIR, N.; LA SCOLA, B.; CADORET, F.; RAOULT, D. Taxonogenomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: ‘*Clostridium amazonitimonense*’, ‘*Clostridium merdae*’, ‘*Clostridium massilielmoense*’ and ‘*Clostridium nigeriense*’. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 128–139, 2018.

ALVES, K. J. **Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos diferentes dos solos da Amazônia**. 2018. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2018.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMANI, T.; NOSRATI, M.; SREEKRISHNAN, T. R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. **Environmental Reviews**, n. 18, p. 255-278, 2010.

AMARAL, A. C.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A. O processo de biodigestão. In: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019, p. 13 - 26.

ANDRADE, W. R.; SANTOS, T. M. B.; ARRUDA, L. D. O.; ROSA, E. M.; CAPPI, N. Biogas production from dairy cattle manure Subjected to chemical pre-treatment. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 12, n. 1, p. 91-100, 2018.

ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P.; LIER, J. B. VAN. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science & Technology**, v. 59, p. 927-934, 2009.

ANGELIDAKI, I.; TREU, L.; TSAPEKOS, P.; LUO, G.; CAMPANARO, S.; WENZEL, H.; KOUGIAS, P. G. Biogas upgrade and utilization: Current status and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 452-466, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Denver. e. 23, 2017.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas estratégicas de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 151-161, 2005.

ARAÚJO, D. G. S.; VASCONCELOS, L. P. F.; LIMA, A. K. B. S.; MARTINS, A. M.; SOUSA, E. E.; VASCONCELOS, G. M. S. Alteração da microbiota intestinal e patologias associadas: importância do uso de prebióticos e probióticos no seu equilíbrio. **Temas em Saúde**, v. 19, n. 4, p. 8-26, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS - ABRELPE. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil – 2020**. 52 p., 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS - ABRELPE. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil – 2021**. 54 p., 2021.

ASSUMPÇÃO, S. M. N. **Pré-tratamento químico combinado do bagaço de cana visando a produção de etanol de segunda geração**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, Salvador, 2015.

ATELGE, M., R.; ATABANI, A. E.; BANI, A. E.; KRISA, D.; KAYA, M.; ESKICIOGLU, C.; KUMAR, G.; LEE, C.; YILDIZ, Y. S.; UNALAN, S.; MOHANASUNDARAM, R.; DUMAN, F. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117 – 494, 2020.

BADSHAH, M. **Evaluation of process parameters and treatments of different raw materials for biogas production**. 2012. 158 f. Dissertation (Composite: Department of Water and Environmental Studies) - Linköping University, Sweden, 2012.

BAÊTA, B. E. L. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana- de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria**. 2016. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; ADARME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p.137–146, 2016.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion And Mangement**, v. 52, n. 2, p.858-875, 2011.

BARROS, V. G. **Produção de metano de vinhaça com suplementação de torta de filtro em reatores UASB em série, mesofílicos e termofílicos: desempenho do processo e diversidade microbiana**. 2017. 162 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2017.

BASTOS, J. A. **Produção de biogás em resposta ao pré-tratamento químico e reuso do licor negro aplicado aos resíduos de aparas de grama**. 2020. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2020.

BEIL, M.; BEYRICH, W. Biogas upgrading to biomethane. *In*: WELLINGER, A., MURPHY, J., BAXTER, D. (Ed.) **The biogas handbook: science, production and applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. p. 342–377.

BIDONE, F.R.A.; POVINELLI, J. **Conceitos básicos de resíduos sólidos**. São Paulo: EESC/Universidade de São Paulo. 120p. 1999.

BORTH, P. L. B. **Influência da adição de resíduo lignocelulósico no desempenho da digestão anaeróbia de resíduos alimentares**. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

BORTH, P. L. B.; PERIN J. K. H.; TORRECILHAS, A. R.; PAN, N. C.; KURODA, E. K.; FERNANDES, F. Biochemical methane potential of food and garden waste co-digestion with variation in solid content and inoculum:substrate ratio. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 23, p. 1974–1983, 2021.

BORTH, P. L. B.; PERIN, J. K. H.; TORRECILHAS, A. R.; LOPES, D. D.; SANTOS, S. C.; KURODA, E. K.; FERNANDES, F. Pilot-scale anaerobic co-digestion of food and garden waste: Methane potential, performance and microbial analysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 157, 106331, 2022.

BORTOLI, M.; PRÁ, M. C.; KUNZ, A. Tratamento do digestato - Remoção do nitrogênio. *In*: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019, p. 129 - 182.

BORTOLOTI, M. A. **Digestão anaeróbia de resíduos orgânicos em reator de escala real e aplicação do lodo efluente na compostagem de resíduos vegetais**. 2021. 207 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Qualidade Ambiental. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos - Planares** [recurso eletrônico] / coordenação de André Luiz Felisberto França... [et. al.]. – Brasília, DF: MMA, 2022. 209 p.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus spp.* para a produção de bioetanol.** 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A Simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation, **Econometrica**, v. 47, n. 5, p. 1287-1294, 1979.

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v.104, p.271-280, 2017.

CALLAGHAN, F. J.; WASE, D. A. J.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C. F. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, p. 71–77, 2002.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 989572, 2012.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, J. C.; SANTOS, V. B. FÉLIX, K. C. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytilidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 199-200, 2007.

CARRILHO, N. F. Q. **Valorização de Bio-Resíduos Alimentares por Digestão Anaeróbia Descentralizada – Caso de Estudo: Campus da FCT/UNL.** 2012. 126 f. Dissertação (Mestre em Energia e Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

CARVALHO, C. B. M.; MACAMBIRA, G. M.; SANTOS, NA. C. F.; OLIVEIRA, H. S. H.; DA SILVA, D. A.; RIBEIRO, A. G.; SILVA, G. D.; PESSOA, D. V.; MACIEL, M. S.; MARINHO, J. B. M.; MEDEIROS, A. S.; SOARES, G. S. C.; SALES, T. B.; DA SILVA, P. H. F.; SILVA, G. K. F. Métodos de análise da composição química e valor nutricional de alimentos para ruminantes. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e523101019047, 2021.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researcher. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70. p. 181-184, 1967.

CASTILHOS JUNIOR, A. B. **Simulação do comportamento de um resíduo modelo em aterro sanitário e estudo da evolução bio-físico-química.** INSA de Lyon - France, 2000.

CHALLIOL, A. Z. **Utilização de digestato sobrenadante na digestão anaeróbia de resíduos alimentares: Aplicação em escalas piloto e real.** 287 páginas. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. **Applied Energy**, v. 94, p. 129-140, 2012a.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462–1476, 2012b.

CHEMMÉS, C.S; SILVA, F. C.; SOUZA, L. S.; AZEVEDO JUNIOR, R. A.; CAMPOS, L. M. A. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. *In*: SEPA - SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, UNIFACS, 12., **Anais...** Salvador, BA, 2013.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. **Inhibition of anaerobic digestion process: a review.** **Biorecource Tecnology**, v. 99, p. 4044-4064, 2008.

CHEN, J. L.; STEELE, T. W. J.; STUCKEY, D. C. The effect of Fe₂NiO₄ and Fe₄NiO₄Zn magnetic nanoparticles on anaerobic digestion activity. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 276-284, 2018.

CHEN, S., TAO, Z., YAO, F., WU, B., HE, L., HOU, K., YANG, Q. Enhanced anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste by sulfidated microscale zerovalent iron: Insights in direct interspecies electron transfer mechanism. **Bioresource Technology**, v. 316, p. 123901, 2020.

CHEN, Y.; ZHU, R.; JIANG, Q.; SUN, T.; LI, M.; SHI, J.; CHAI, H.; GU, L.; AI, H.; HE Q. Effects of green waste participation on the co-digestion of residual sludge and kitchen waste: A preliminary study. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 838-849, 2019.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Reatores Anaeróbios.** v. 5. 2 ed. ampl. e atual. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016. 379 p.

CHYNOWETH, D.P.; TURICK, C.E.; OWENS, J.M.; JERGER, D.E.; PECK, M.W. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.5, n.1, p. 95-111, 1993.

CLARK, J. H.; LUQUE, R.; MATHARU, A. S. Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, p.183-207, 2012.

CORTEZ, L. A. B., LORA, E. S. **Tecnologia de Conversão Energética da Biomassa. Série Sistemas Energéticos II**, Cap. X, Biodigestão, EDUA/EFEI Manaus, p. 401-459, 1997.

COSTA, A. G. **Estratégias de pré-tratamentos para a produção de metano a partir dos resíduos lignocelulósicos dos biocombustíveis.** 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

COSTA, A. G.; PINHEIRO, F. G. C.; PINHEIRO, G. C.; DOS SANTOS, A. B.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, n.194, p.36-51, 2014.

COSTA, A. G.; PINHEIRO, G. C.; PINHEIRO, F. G. C.; DOS SANTOS, A. B.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 363–372 2014.

CROVADOR, M.I.C. **Potencial de geração de biogás a partir da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos**. 2014. 119 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO. Irati, 2014.

DAVID, A.; GOVIL, T.; TRIPATHI, A. K.; MCGEARY, J.; FARRAR, K.; SANI, R. K. Thermophilic Anaerobic Digestion: Enhanced and Sustainable Methane Production from Co-Digestion of Food and Lignocellulosic Wastes. **Energies**, v. 11, p. 1-13, 2018.

DAVIES, F. D.; STULP, S. Determinações de gás metano (CH₄) gerado em estação de tratamento de efluentes, com avaliação do poder calorífico para queima em caldeira. **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 8, n. 4, p. 230-244, 2016.

DENG, C.; LIN, R.; CHENG, J.; MURPHY, J. D. Can acid pre-treatment enhance biohydrogen and biomethane production from grass silage in single-stage and two-stage fermentation processes? **Energy Conversion and Management**, v. 195, p. 738–747, 2019.

DEODATO, A. M. **Otimização da Produção de Biogás por Co-digestão Anaeróbia**. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energias Renováveis) - Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2019.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogás from waste and renewable resources: an introduction**. 2nd Ed., Weinheim: WILEY-VCH, 2011.

DIAS, M. F.; COLTURATO, L. F.; OLIVEIRA, J. P.; LEITE, L. R.; OLIVEIRA, G.; CHERNICHARO, C. A.; ARAÚJO, J. C. Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 58-66, 2016.

DILALLO, R.; ALBERTISON, O.E. Volatile Acids by Direct Titration. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 33, p. 356-365, 1961.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUTRA, J. C. F. **Avaliação de pré-tratamentos físico-químicos em macrófitas aquáticas na produção de energia**. 2018. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

EDWIGES, T. **Biodigestão anaeróbia de resíduos vegetais provenientes de central de abastecimento**. 2017. 81 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

EL ACHKAR, J. H.; LENDORMI, T.; HOBAIKA, Z.; SALAMEH, D.; LOUKA, N.; MAROUN, R. G.; LANOISELLÉ, J. L. Anaerobic digestion of grape pomace: Biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters. **Waste Management**, v.50, p.275-282, 2016.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. **O Compromisso do Brasil no Combate às Mudanças Climáticas: Produção e Uso de Energia**. 2016. 97 f. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/sala-de-imprensa/noticias/Documents/NT%20COP21%20iNDC.pdf>. Acesso em: jun. 2021.

EPE/MME. **Atlas da Eficiência Energética - Brasil/2020 - Relatório de Indicadores**. Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Ministério de Minas e Energia (MME), Brasília, DF, 2020.

EPE/MME. **Nota Técnica - Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2020**. Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Ministério de Minas e Energia (MME), Brasília, DF, 2021.

ESTEVEZ, P. J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto por vapor direto**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

FANG, H. H. P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 683–692, 2006.

FARIAS, J. S.; QUEIROZ, L. O.; SANTOS, G. R. A.; FAGUNDES, J. L.; SILVA, M. A. Avaliação de tecidos e equipamentos alternativos na análise de fibras em detergente neutro e de fibra em detergente ácido. **Boletim de Indústria Animal**, v. 72, n. 3, p. 229–233, 2015.

FERREIRA, B. O. **Avaliação de um sistema de metanização de resíduos alimentares com vistas ao aproveitamento energético do biogás**. 2015. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FERREIRA, L.C., DONOSO-BRAVO, A., NILSEN, P.J., FDZ-POLANCO, F., PÉREZ-ELVIRA, S.I. Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 251–257, 2013.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A. C.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. *In*: CAMPOS, J. R. (org). Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: **PROSAB**, 1999, p. 29-52.

FRANCISQUINI, J. A.; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F.; SCHUCK, P.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Reação de Maillard: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48-57, 2017.

FRANCO, P. C. I. **Otimização da produção de lacase pelo *Pleurotus ostreatus* na presença de lignina e análise de metabólitos por CLAE**. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana/Londrina, 2019.

FREITAS, S. S. **Avaliação de pré-tratamentos em resíduo oriundo cultivo do milho**. 2011, 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju, 2011.

GAGLIANO, M.; ISMAIL, S.; STAMS, A.; PLUGGE, C.; TEMMINK, H.; VAN LIER, J. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. **Water Research**, v. 121, p. 61-71, 2017.

GALBE, M.; ZACCHI, G. **Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos**. In: Cortez (Ed.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade. – São Paulo: Blucher, p. 697-716, 2010.

GARCIA, G. P. P. **Estudo do desempenho e da comunidade microbiana de biorreatores tratando efluente anaeróbio contendo sulfeto**. 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

GARCIA-ARRIAGA, V.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; AMAYA, M.; SOSA, E. H₂S and O₂ influence on the corrosion of carbon steel immersed in a solution containing 3M diethanolamine. **Corrosion Science**, v. 52, p. 2268–2279, 2010.

GEHLEN, L. R. **Quantificação dos teores de conversão de fibras em açúcares redutores de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisados com catalisadores ácidos**. 2013. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.

GERARDI, M. H. **The Microbiology of Anaerobic Digesters**. Hoboken, New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2003.

GILL, P.; ARORA, D. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 28-33, 2003.

GODINHO, E. Z., PERIN, A. A., BAUMGARTNER, T. R. S.; HASAN, S. D. M. Pré-tratamento hidrotérmico alcalino e alcalino oxidativo sobre os teores de celulose e lignina em biomassa de capim elefante BRS Capiaçú. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 6, n. 3, p. 51-65, 2019.

GOMES, M. C. **Produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido cítrico diluído**. 2019. 215 f. Tese (Doutorado em Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

GOMEZ, D. K. V.; CASTAÑEDA, P. B.; ROSALES, J. J. M.; RODRÍGUEZ, L. M. G. Anaerobic digestion of bean straw applying a fungal pre-treatment and using cow manure as cosubstrate. **Environmental Technology**, v. 41, n. 22, p. 2863-2874, 2020.

GOMPERTZ, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 115, p. 513–583, 1825.

GONG, C. S.; CAO, N.J.; TSAO, G. T. Ethanol production from renewable resources. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**. v. 65, p. 207-241, 1999.

GRAVITIS, J.; SUZUKI, M. Biomass refinery - a way to produce value added products and base for agricultural zero emissions system. *In: Proceedings of 99 International Conference on Agricultural Engineering*, Beijing, China, v. 3, p. 9-22, 1999.

GUEDES, R. C. **Estudo da influência de pré-tratamentos de dois resíduos lignocelulósicos (bagaço do pedúnculo de caju e casca de coco) utilizados como substrato na indução à síntese de enzimas celulolíticas**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2010.

GUELFO, F.L.A.; ÁLVAREZ, C.; SALES, D.; GARCÍA, L.I. Determination of critical and optimum conditions for biomethanization of OFMSW in a semi-continuous stirred tank reactor. **Journal Chemical Engineering**. v.171, p. 418– 424, 2011.

GUERI, M. V. D. **Avaliação do processo de digestão anaeróbia de resíduos alimentares em reatores batelada e semi-contínuo**. 2017. 82 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Cascavel, 2017.

GUO, X.; WANG, C.; SUN, F.; ZHU, W.; WU, W. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 420–428, 2014.

GUPTA, R. S.; BHANDARI, V. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 1–34, 2011.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. 291 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HANSEN, T.L.; SCHMIDT, J.E.; ANGELIDAKI, I.; MARCA, E.; JANSEN, J.C.; MOSBAEK, H.; CHRISTENSEN, T.H. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. **Waste Management**, v.24, p.393-400, 2004.

HE, M.; SUN, Y.; ZOU, D.; YUAN, H.; CHU, B.; LI, X.; YUNZHI, P. Influence of temperature on hydrolysis acidification of food waste. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 85-94, 2012.

HELENAS, J. K. **Biodigestão anaeróbia de resíduos alimentares visando a produção de metano**. 2019. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

HENDRICKSON, R. G.; CHANG, A.; HAMILTON, R. J. Co-Worker fatalities from hydrogen sulfide. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 45, p. 346–350, 2004.

HENDRIKS, A. T. W. M.; VAN LIER, J. B.; KREUK, M. K. Growth media in anaerobic fermentative processes: The underestimated potential of thermophilic fermentation and anaerobic digestion. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2018.

HENDRIKS, A. T.W.M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Springer Verlag, London, 1997.

HINDRICHSEN, I. K.; KREUZER, M.; MADSEN, J.; BACH KNUDSEN, K. E. Fiber and lignin analysis in concentrate, forage, and feces: Detergent versus enzymatic-chemical method. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2168–2176, 2006.

HOLLIGER, C.; ALVES, M.; ANDRADE, D.; ANGELIDAKI, I.; ASTALS, S.; BAIER, U.; BOUGRIER, C.; BUFFIERE, P.; CARBALLA, M.; DE WILDE, V.; EBERTSEDER, F.; FERNANDEZ, B.; FICARA, E.; FOTIDIS, I.; FRIGON, J.-C.; DE LACLOS, H.F.; GHASIMI, D.S.M.; HACK, G.; HARTEL, M.; HEERENKLAGE, J.; HORVATH, I.S.; JENICEK, P.; KOCH, K.; KRAUTWALD, J.; LIZASOAIN, J.; LIU, J.; MOSBERGER, L.; NISTOR, M.; OECHSNER, H.; OLIVEIRA, J.V.; PATERSON, M.; PAUSS, A.; POMMIER, S.; PORQUEDDU, I.; RAPOSO, F.; RIBEIRO, T.; RUSCH PFUND, F.; STROMBERG, S.; TORRIJOS, M.; VAN EEKERT, M.; VAN LIER, J.; WEDWITSCHKA, H.; WIERINCK, I.; Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**. v.74. p. 2515-2522, 2016.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Coordenação Geral de Acreditação**. DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, jul. 2011, Revisão no 04, 2011.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISIKHUEMHEN, O. S.; MIKIASHVILLI, N. A. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1353-1362, 2009.

JABARI, L.; GANNOUN, H.; KHELIFI, E.; CAYOL, J. L.; GODON, J. J.; HAMDI, M.; FARDEAU, M. L. Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 73–84, 2016.

JAIN, S.; JAIN, S.; WOLF, I. T.; LEE, J.; TONG, Y. W. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 142–154, 2015.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 692-709, 2017.

JEON, T.; ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; JOHNSON, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112–122, 2007.

JIMNEZ, E. I.; GARCIA, V. P. Relationships between Organic Carbon and Total Organic Matter in Municipal Solid Wastes and City Refuse Composts. **Bioresource Technology**, v. 41, p. 265–272, 1992.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. **Agricultural. Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

KADAM, R.; PANWAR, N. L. Recent advancement in biogas enrichment and its applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 892–903, 2017.

KAFLE, G. K.; KIM, S. H.; SUNG, K.Y. Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of Biochemical Methane Potential (BMP) and kinetics. **Bioresource Technology**, v. 127, p.326-336, 2012.

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUDA, V. V. A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. **Process Biochemistry**, v. 84, 9. 81-90, 2019.

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUDA, V. V.; GOEL, R. Fungal pretreatment and associated kinetics of rice straw hydrolysis to accelerate methane yield from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 286, 121268, 2019.

KASTER, A. K.; GOENRICH, M.; SEEDORF, H.; LIESEGANG, H.; WOLLHERR, A.; GOTTSCHALK, G.; YHAUER, R. K. More Than 200 Genes Required for Methane Formation from H₂ and CO₂ and Energy Conservation Are Present in *Methanothermobacter marburgensis* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Archaea*, v. 2011, n. 1, p. 1-23, 2011.

KAZANCOGLU, Y.; EKINCI, E.; OZEN, Y. D. O.; PALA, M. O. Redução do desperdício de alimentos por meio de operações sustentáveis e enxutas: estudo de caso do setor avícola. **Revista de Administração de Empresas – RAE**, v. 61, n. 5, p. 8 – 25, 2021.

KELLEHER, B. P.; LEAHY, J. J.; HENIHAN, A. M.; O'DWYER, T. F.; SUTTON, D.; LEAHY, M. J. Advances in poultry litter disposal technology- a review. **Bioresource Technology**. v. 83, n. 1, p. 27-36, 2002.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, p. 1737–1744, 2011.

KHAN, M. U.; USMAN, M.; ASHRAF, M. A.; DUTTA, N.; LUO, G.; ZHANG, S. A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations. **Chemical Engineering Journal Advances**, v. 5, 100263, 2022.

KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, v. 23, n. 309, p. 1-21, 2018.

KIM, I.; HAN, J-I. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. **Biomass bioenergy**, v. 4, n. 6, p. 210-217, 2012.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbiol degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**, p. 273-307, 1998.

KITTELMANN, S.; SEEDORF, H.; WALTERS, W. A.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I.; JANSSEN, P. H. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. 847-879, 2013.

KOBAYASHI, T.; XU, K. Q.; LI, Y. Y.; INAMORI, Y. Effect of sludge recirculation on characteristics of hydrogen production in a two-stage hydrogen–methane fermentation process treating food wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37, p. 5602-5611, 2012.

KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; EUZÉBY, J.; WHITMAN, W. B. Bacteroidetes phyl. nov. *In*: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2 ed. New York: Springer. v. 4, 2010, p.25-470.

KUGELMAN, I.J., MCCARTY, P.L. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. **Journal of the Water Pollution Control Federation**. 37, 97–116. 1964.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass:biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera - Embrapa Suínos e Aves, 2019. 209 p.

LABATUT, R. A.; ANGENENT, L. T.; SCOTT, N. R. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2255–2264, 2011.

LANGE, J. P.; PRICE, R.; AYOUB, P. M.; LOUIS, J.; PETRUS, L.; CLARKE, L.; GOSELINK, H. Valeric Biofuels: A Platform of Cellulosic Transportation Fuels. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 26, p.4479-4483, 2010.

LEITÃO, R. C.; PINHEIRO, F. G. C.; SOARES, A. K. L.; ALBUQUERQUE, M. E. P.; MARQUES NETO, F. P.; VALE, M. S.; SOUZA FILHO, M. S. M.; ROSA, M. F.; SANTAELLA, S. T. Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar por explosão a vapor visando à extração de lignina pelo processo acetosolv. **Comunicado Técnico 226**, Embrapa: Fortaleza, 2016.

LEITE, V. D.; LOPES, W. S.; SOUSA, J. T.; PRASAD, S. Tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos com baixa concentração de sólidos. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 280-284. 2004.

LI, L.; PENG, X.; WANG, X.; WU, D. Anaerobic digestion of food waste: A review focusing on process stability. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 20–28, 2018.

LI, K.; WAN, J.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J. Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 414–422, 2016.

LIAO, W., LIU, S., CHEN, S. Optimizing dilute acid hydrolysis of hemicellulose in a nitrogen-rich cellulosic material-dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 33 – 41, 2004.

LIEW, L.N.; SHI, J.; LI, Y. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.125–132, 2012.

LIMA, D. R. S. **Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar**. 2018. 275 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIU, J.; ZHENG, J.; NIU, Y.; ZUO, Z.; ZHANG, J.; WEI, Y. Effect of zero-valent iron combined with carbon-based materials on the mitigation of ammonia inhibition during anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v.311, 123503, 2020.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 171–189, 2008.

LKP. LKP Produtos para Diagnósticos. 2022. **Extrato De Levedura. Frasco 500g.**

Disponível em: <https://www.lkpdagnosticos.com.br/meios-de-cultura/k25-611005-extrato-de-levedura-frasco-500g>. Acesso em: julho de 2022.

LONGUE JUNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 541-550, jul.-set., 2011.

LÓPEZ-LINARES, J.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; LUCAS, S.; GONZÁLEZBENITO, G.; COCA, M. Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 368, p. 1045-1055, 2019.

LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis: volume 1 e 2**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

LU, J. Optimization of Anaerobic Digestion of Sewage Sludge Using Thermophilic Anaerobic Pre-Treatment. **Measurement**, v. 50, p. 19-28, 2007.

LU, H., GUI, Y., ZHENG, L., LIU, X., Morphological, crystalline, thermal and physicochemical properties of cellulose nanocrystals obtained from sweet potato residue. **Food Research International**, v. 50, p. 121-128, 2013.

LUCENA, R. M. **Identificação molecular da diversidade microbiana em reator UASB de Estação de Tratamento de Esgoto**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

LYU, Z.; SHAO, N.; AKINYEMI, T.; WHITMAN, W. B. Methanogenesis. **Current Biology**, v. 28, n. 13, p. 727-732, 2018.

MACHADO, D. S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

MACIEL, F. J.; JUCÁ, J. F. T. Evaluation of landfill gas production and emissions in a MSW large-scale Experimental Cell in Brazil. **Waste Management**. v. 31, p. 966-977, 2011.

MAGALHÃES, G. V. V. **Avaliação da biodigestão anaeróbia de resíduos orgânicos: ensaios de potencial bioquímico de metano (bmp) e projeto piloto de um biodigestor em escala real**. 2018. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MALINOWSKY, C. **Tratamento dos resíduos sólidos orgânicos da UFSC através de biodigestor anaeróbio**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MANOCHIO, C.; ANDRADE, B. R.; RODRIGUEZ, R. P.; MORAES, B. S. Ethanol from biomass: a comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p.743-755, 2017.

- MAUNE, M. W.; TANNER, R. S. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 832–838, 2012.
- McCARTY, P. L. **Anaerobic waste treatment fundamentals** – Part Four- Process Design. Public Works, 95-99, 1964.
- MEIRA, A. M. **Gestão de resíduos da arborização urbana**. 2010. 178p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.
- MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; MORAES, C. P. Teores de lignin e cellulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores. **Planta Daninha**, v.30, n.1, p.121-127, 2012.
- METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5ª edição. Porto Alegre, RS: McGraw-Hill Educação, 1980 p., 2016.
- MIN, K.L. KIM, Y. H.; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279-286, 2001.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1430–1442, 2012.
- MONLAU, F.; AEMIG, Q.; BARAKAT, A.; STEYER, J-P.; CARRÈRE, H. Application of optimized alkaline pretreatment for enhancing the anaerobic digestion of different sunflower stalks varieties. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13-16, p. 2155-2162, 2013.
- MONLAU, F.; SAMBUSITI, C.; BARAKAT, A.; QUÉMÉNEUR, M.; TRABLY, E.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934 – 951, 2014.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- MORAIS, A. P. S.; BROETTO, F. Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. **Revista Energia na Agricultura**, v. 27, n.4, p. 1-12, 2012.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. DO; MELO, D. C. DE. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461–470, 2005.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- MOTTA, F. S. **Produza Sua Energia: Biodigestores Anaeróbios**. Recife Gráfica Editora: Recife, 1986.

MOTTERAN, F. **Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL)**. 2013. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências – Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

MUSSOLINE, W.; ESPOSITO, G.; GIORDANO, A.; LENS, P.N.L. The anaerobic digestion of rice straw: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 895–915, 2013.

MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; SHENG, K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 180, p. 661-671, 2016.

MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; XIA, Y.; SHENG, K. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 174–182, 2017.

NAVARRO, B. L. **Digestão anaeróbia de resíduos alimentares e vegetais em escala de bancada e piloto para produção de metano**. 2020. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

NI, J.-Q.; HEBER, A. J.; DIEHL, C. A.; LIM, T. T.; DUGGIRALA, R. K.; HAYMORE, B. L. Burst releases of hydrogen sulfide in mechanically ventilated swine buildings. **Proceedings of the Water Environment Federation**, v. 2000, n. 3, p. 564–574, 2000.

NOVO, L. P. **Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-deaçúcar**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OLIVEIRA, M. G. **Tratamento da água residuária de suinocultura utilizando processos biológicos anaeróbios e microaeróbios em reatores de alta taxa**. 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

OLIVEIRA, M. M. **Estudo da inclusão de compartimentos em reatores modelo canadense**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

OLIVEIRA, R. D. **Geração de energia elétrica a partir do biogás produzido pela fermentação anaeróbia de dejetos em abatedouros e as possibilidades no mercado de carbono**. 2009. 98 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Elétrica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

OLIVEIRA, J. S.; GATTAMORTA, M. A. Avaliação de resíduos sólidos orgânicos em feiras livres na região metropolitana de São Paulo e potencialidade de geração de metano e energia

elétrica – Um estudo de caso. **INOVAE - Journal of Engineering, Architecture and Technology Innovation**, v. 9, p. 468-489, jan.-dez., 2021.

O-THONG, S.; BOE, K.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic anaerobic co-digestion of oil palm empty fruit bunches with palm oil mill effluent for efficient biogas production. **Applied Energy**, v. 93, p. 648-654, 2012.

OWEN, W. F., STUCKEY D. C., HEALV JR., J. B., YOUNG, L. Y., MCCARTY, P. L. Bioassay for monitoring Biochemical Methane Potential and anaerobic toxicity. **Water Research**, v. 13, p. 485-492, 1979.

PANIGRAHI, S.; SHARMA, H. B.; DUBEY, B. K. Anaerobic co-digestion of food waste with pretreated yard waste: A comparative study of methane production, kinetic modeling and energy balance. **Journal of Cleaner Production**, v. 243, 118480, 2020.

PARAJULI, R.; DALGAARD, T.; JØRGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P. S.; KNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; GYLLING, M.; SCHJØRRING, J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 244-263, 2015.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T. S. A.; STANGE, F.; MÜLLER, R. A.; KÖSER, H. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment - A Review. **Engineering in Life Sciences**. v. 7, n. 1, p. 13-25, 2007.

PATEL, P P.; RAKHASHIYA, P M.; THAKER, V S. Genomic analysis of novel phytopathogenic *Georgenia* sp. strain SUB25. **Genomics Data**, v. 5, p. 320-322, 2015.

PATINVOH, R. J.; OSADOLOR, O. A.; CHANDOLIAS, K.; SÁRVÁRI-HORVÁTH, I.; TAHERZADEH, M. J. Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 13–24, 2017.

PEREIRA, M. G.; CAMACHO, C. F.; FREITAS, M. A. V.; SILVA, N. F. The renewable energy market in Brazil: Current status and potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3786-3802, 2012.

PÉREZ-CHÁVEZ, A. M.; MAYER, L.; ALBERTO, E. Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources. **Energy for Sustainable Development**, v. 50, p. 50-60, 2019.

PERIN, J. K. H.; BORTH, P. L. B.; TORRECILHAS, A. R.; CUNHA, L. S.; KURODA, E. K.; FERNANDES, F. Optimization of methane production parameters during anaerobic co-digestion of food waste and garden waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 272, p. 1-7, 2020.

PHUTTARO, C.; SAWATDEENARUNAT, C.; SURENDRA, K. C.; BOONSAWANG, P.; CHAIPRAPAT, S.; KHANAL, S. K. Anaerobic digestion of hydrothermally-pretreated lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperatures, inhibitors and soluble organics on methane yield. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 128-138, 2019.

PIERRE, G.; SANNIER, F.; GOUDE, R.; NOUVIAIRE, A.; MAACHE-REZZOUG, Z.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from brewers' spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 305-310, 2011.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 67 f. (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

PINTO, C. P. **Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

PITARELLO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2013.

PORPINO, G.; ANTONIOLI, V. **Sem Desperdício: diálogos sobre consumo sustentável**. Relatório de projeto de cooperação. Brasília: Diálogos Setoriais União Europeia - Brasil, 2020.

POTTMAIER, D.; MELO, C. R.; SARTOR, M. N.; KUESTER, S.; AMADIO, T. M.; FERNANDES, C. A. H.; MARINHA, D.; ALARCON, O. E. The Brazilian energy matrix: From a materials science and engineering perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 678-691, 2012.

PRAMANIK, S. K.; SUJA, F. B.; ZAIN, S. M.; PRAMANIK, B. K. The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports**, v. 8., 100310, 2019.

PRATS, C; GIRÓ, A.; FERRER, J.; LÓPEZ, D.; VIVES-REGO, J. Analysis and IBM simulation of the stages in bacterial lag phase: Basis for an updated definition. **Journal of Theoretical Biology**, v. 252, n. 1, p. 56-68, 2008.

PRESCOTT, L. **Microbiology**. Wm. C. Brown Publishers, 1993.

PROBIOGÁS - Projeto Brasil Alemanha de Fomento ao Aproveitamento Energético do Biogás. **Biometano como combustível veicular**. Coletânea de publicações do PROBIOGÁS. Série Desenvolvimento do Mercado de Biogás. 1ª Edição. Ministério das Cidades, Brasília, 2016, 101 p.

PROBIOGÁS - Projeto Brasil Alemanha de Fomento ao Aproveitamento Energético do Biogás. **Guia prático do Biogás: Geração e utilização**. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, 2010. 236 p.

PROSAB, 2003. **Resíduos sólidos urbanos: aterro sustentável para municípios de pequeno porte**. Coordenador: Armando Borges de Castilhos Junior. Rio de Janeiro, ABES, 2003. 294 p.

QUADROS, T. C. F. **Codigestão anaeróbia de resíduos de frutas, vegetais e de galinha de postura com aplicação de materiais aditivos e uso de pré-carregamento com microrganismos.** 2023. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

QUINELATO, C. **Métodos de extração da lignina do bagaço da cana-de-açúcar da região noroeste do estado de São Paulo.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, São José do Rio Preto, 2016.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2021. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 414 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABELO, S.C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7887–7895, 2011.

RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D.I.; SINGH, G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 632–641, 2013.

RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; KUSUM LATA; KISHORE, V.V.N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 135-156, 2000.

RAPOSO, F.; LA RUBIA, M. A. DE; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; BORJA, R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 861–877, 2011.

REGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin valoration: improving lignina processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, p. 709-720, 2014.

REILLY, M.; DINSDALE, R.; GUWY, A. Enhanced biomethane potential from wheat straw by low temperature alkaline calcium hydroxide pre-treatment. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 258-265, 2015.

REIS, A. S. **Tratamento de resíduos sólidos orgânicos em biodigestor anaeróbio.** 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Caruaru, 2012.

REN, Y., YU, M., WU, C., WANG, Q., GAO, M., HUANG, Q., LIU, Y. A comprehensive

review on food waste anaerobic digestion: research updates and tendencies. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1069–1076, 2018.

REZENDE, M. I. **Comparação da Produção de Lacases pelo *Pleurotus ostreatus* e pelo *Botryosphaeria sp* na Presença do Herbicida Scepter (imazaquin)**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Rio Claro, 2002.

RIBAS, M. M. F.; MORAES, E. M.; FORESTI, E. Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade e bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbicos. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 12, n. 3, p. 240-246, 2007.

RIBEIRO, F. R. **Produção de biogás a partir de hidrolisados gerados no pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP. Ouro Preto, 2016.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

RODRIGUES, R. M. M.; CEBALLOS, B. S. O.; LOPES, W. S. Validação de método para determinação de ácidos graxos voláteis em efluentes de biorreatores anaeróbios por meio de cromatografia gasosa. **Revista DAE**, v. 67, 2018.

ROSSI, E. **Pré-tratamentos e digestão anaeróbia da palha de cana-de-açúcar**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2015.

ROUCHES, E.; HERPOEL-GIMEBERT, J I.; STEYER, P.; CARRERE, H. **Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: a review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 59, p. 179-198, 2016.

RÜHL C.; APPLEBY, P.; FENNEMA, J.; NAUMOV, A.; SCHAFFER, M. Economic development and the demand for energy: A historical perspective on the next 20 years. **Revista Energy Policy**, v. 50, p. 109-116, 2012.

RUIZ, H. A.; THOMSEN, M. H.; TRAJANO, H.L. **Hydrothermal processing in biorefineries: production of bioethanol and high added-value compounds of second and third generation biomass**. Editora Springer. 511 p. 2017.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z. Pretreatment methods of organic wastes for biogas production. **Journal of Applied Sciences**, v. 16, p. 124–137, 2016.

SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Benefit of sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage on the anaerobic reactor stability and methane production. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 149–155, 2013.

SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; ROLLINI, M.; MANZONI, M.; MALPEI, F. Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 11, p. 2447–2452, 2012.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, L.C. **Produção de biogás (metano e hidrogênio) a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado no pré-tratamento oxidativo de cascas de café.** 2017. 137 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2017.

SANTOS, G. M. M.; BARBOSA, M. S.; PORTO, M. M. M.; CHONG, N. S. R.; LUZ, M. V. S.; SANTOS, R. S. S.; SIVLA, A. S.; MOREIRA, I. T. A. Uso de microrganismos no tratamento anaeróbio de efluentes ricos em nitrogênio e fósforo tendo em vista a economia circular. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e525101119952, 2021.

SANTOS, P. H. A.; MARTINS, R. A. Sistemas de medição de desempenho e desperdício de alimentos: revisão sistemática da literatura. **Revista de Administração de Empresas – RAE**, v. 61, n. 5, p. 45 – 68, 2021.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SAYARA, T.; SANCHÉZ, A. A Review on Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Wastes: Pretreatments and Operational Conditions. **Applied Sciences.**, v. 9, n. 21, p. 46-55, 2019.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.

SCHOMMER, V. A. **Co-digestão anaeróbia de dejetos de suínos e penas de frango pré-tratadas para a produção de metano.** 2019. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2019.

SCHULZ, F. **Biodigestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos.** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2015.

SCHULTZ, E. L.; RODRIGUES, A.; MENDES, T. D.; FILARDI, L. M. C.; CAMPANHA, R. B.; PACHECO, T. F.; RODRIGUES, D. de S.; RODRIGUES, C. M.; DAMASO, M. C. T. Otimização de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis. *In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ*, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 19 a 22 de outubro de 2014.

SELLA, M. R.; TORRECILHAS, A. R.; CARDOSO, M. A. P.; SELLA, M. L. M.; VEDOVATTE, R. M. Utilização de resíduos alimentares em processos biotecnológicos como perspectiva de fonte de energia e redução do impacto ambiental. *In: XXXIX Encontro*

Nacional De Engenharia De Produção – ENEGEP. Santos, São Paulo, Brasil, 15 a 18 de outubro de 2019.

SGORLON, J. G.; RISK, M. C.; BERGAMASCO, R.; TAVARES, C. R. G. Avaliação da DQO e da relação C/N obtidas no tratamento anaeróbio de resíduos fruti-hortícolas. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 421-424, 2011.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, p. 591-611, 1965.

SHEN, F., LI, H., WU, X., WANG, Y., ZHANG, Q. Effect of organic loading rate on anaerobic co-digestion of rice straw and pig manure with or without biological pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 155–162. 2018.

SHIBÃO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 895 – 904, 2011.

SHIRKAVAND, E.; BAROUTIAN, S., GAPES, D. J., & YOUNG, B. R. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 217-234, 2016.

SIDDHARTHAN, N.; SANGEETHA, M.; ASOKAN, N.; BALAGURUNATHAN, R.; HEMALATHA, N.; Actinobacterial enzymes - An approach for engineering the rhizosphere microorganisms as plant growth promoters. **Rhizosphere Engineering**, p. 273-292, 2022.

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624–631, 2015.

SILVA, W. R. **Estudo cinético do processo de digestão anaeróbia de resíduos sólidos vegetais.** 2009. 201 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SILVA, M. L. B.; CANTAO, M. E.; MEZZARI, M. P.; MA, J.; NOSSA, C. W. Assessment of Bacterial and Archaeal Community Structure in Swine Wastewater Treatment Processes. **Microbial Ecology**, v. 86, p. 106-112, 2014.

SILVA, M. L. B.; MEZZARI, M. P. Tratamento e purificação do biogás. *In*: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato.** Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019, p. 69 – 90.

SILVÉRIO, M. S. **Digestão anaeróbia de vinhaça 2G para produção de biogás.** 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D. J. Espectrometria no Infravermelho. *In*: SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7ª ed., LTC, 2006.

SIMÕES, A. L. G. **Estudo da aclimação de lodos anaeróbios como estratégia de inoculação para partida de biometanizadores alimentados com fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos.** 2017. 288 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 2017

SINGH, P.; SUMAN, A.; TIWARI, P.; ARYA, N.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 667-673, 2008.

SOUSA, L. D.; CHUNDAWAT, S. P.; BALAN, V.; DALE, B. E. ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 203, p. 339–347, 2009.

SOUZA, L. T. ***Clostridium perfringens: uma revisão.*** 2017. 48 f. Monografia (Especialização em Microbiologia Aplicada) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SOUZA, C. F., CAMPOS, J. A., SANTOS, C. R., BRESSAN, W. S., MOGAMI, C. A. Produção volumétrica de metano – dejetos de suínos. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 219-224, 2008.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.** 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2016.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters.** Nashville: Archae Press, 1996. 394 p.

STRÖMBERG, S.; NISTOR, M.; LIU, J. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. **Waste Management**, v. 34, p.1939-1948, 2014.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A review of its past and future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 373-434, 2011.

TAHA, M., FODA, M., SHAHSAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; ADETUTU, E.; BOLA, A. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 190-197, 2016.

TAHERDANAK, M.; ZILOUEI, H.; KARIMI, K. The influence of dilute sulfuric acid pretreatment on biogas production from wheat plant. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 11, p. 1129-1134, 2016.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal Of Biomedical Sciences**, v. 100, p. 637-643, 2005.

TEIXEIRA, S. L.; SOUSA, R. T. S.; TEIXEIRA, M. T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, v. 52, n. 302, p. 499-507, 2005.

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 2–12, 2016.

TURUMTAY, H. Cell wall engineering by heterologous expression of cell walldegrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. **BioEnergy Research**, v.8, n.4, p.1574-1588, 2015.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION – UNESCO. **Relatório de Ciências da UNESCO: A corrida contra o tempo por um desenvolvimento mais inteligente – Resumo executivo**. Paris: UNESCO Publishing, 2021.

VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science**, v. 23, n. 3, p. 838-845, 1964.

VANWONTERGHEM, I.; EVANS, P. N.; PARQUES, D. H.; JENSEN, P. D.; WOODCROFT, B. J.; HUGENHOLTZ, H.; TYSON, G. W. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. **Nature Microbiology**, v. 1, 16170, 2016.

VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE. **VDI 4630: Fermentation of organic materials characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests**. Düsseldorf. p. 92, 2006.

VICH, D. V. **Comunidade microbiana e produção de metano em reator anaeróbio em batelada com metilamina como fonte de carbono**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências – Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

VICTORINO, A. **Potencial da digestão anaeróbia na gestão de resíduos e produção de energia renovável: um estudo de caso**. 2017. 154 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1447-1457, 2012.

WANG, K.; CHEN, J.; SUN, S.; SUN, R. Steam Explosion. Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies, **Elsevier**, p. 75-104, 2015.

WANG, Q.; KUNINOBU, M.; OGAWA, H.I; KATO, Y. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**. n.16, p. 407–416, 1999.

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

WELLINGER, A.; MURPHY, J.; BAXTER, D. (Ed.) **The biogas handbook: science, production and applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013.

WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G. M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1175-1184, 2008.

WON, K. Y.; KIM, Y. S.; OH, K. K. Comparison of bioethanol production of simultaneous saccharification & fermentation and separation hydrolysis & fermentation from cellulose-rich barley straw. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 1341-1346, 2012.

WU, M.; YAN, Z. Y.; ZHANG, X. M.; XU, F.; SUN, E. C. Integration of mild acid hydrolysis in γ -valerolactone/water system for enhancement of enzymatic saccharification from cotton stalk. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 23-28, 2016.

ZAVATTIERI, A. **Biotecnologia Vegetal: Métodos e Técnicas Laboratoriais em Biologia**, Universidade de Évora. 2002. Disponível em: <https://home.uevora.pt/~zavattieri/Meios.pdf>. Acesso em: julho de 2022.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 142-148, 2015.

ZHANG, B.; HUANG, H. J.; RAMASWAMY, S. Reaction kinetics of the hydrothermal treatment of lignin. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.147, n.1-3, p.119-31, 2008.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p.797-824, 2004.

ZHANG, L.; LO, K.; ZHANG, J. Food waste enhanced anaerobic digestion of biologically pretreated yard waste: Analysis of cellulose crystallinity and microbial communities. **Waste Management**, v. 79, p. 109-119, 2018.

ZHANG, J.; ZANG, L. Enhancement of biohydrogen production from brewers' spent grain by calcined-red mud pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 73-79, 2016.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., LI, Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014.

YANG, H.; DENG, L.; WANG, L.; ZHENG, D.; LIU, Y.; WANG, S.; HUANG, F. Comparison of three biomass-retaining reactors of the ASBR, the UBF and the USR treating swine wastewater for biogas production. **Renewable Energy**, v. 138, p. 521-530, 2019.

YANG, L.; XU, F.; GE, X.; LI, Y. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 824-834, 2015.

YI, J.; DONG, B.; JIN, J. Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: performance and microbial characteristics analysis. **PLoS ONE** **9**, e102548, v. 09, p. 01-10, 2014.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; SEAK, A.; CHUA, M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YU, Q., LIU, R., LI, K., MA, R. A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 51–58, 2019.

YUAN, H.; ZHU, N. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy**. v. 58, p. 429-438, 2016.

XIE, S.; FROST, J. P.; LAWLOR, P. G.; WU, G.; ZHAN, X. Effects of thermo-chemical pretreatment of grass silage on methane production by anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8748–8755, 2011.

XU, X.; XU, Z.; SHI, S.; LIN, M. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 415-423, 2017.