

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

**ANÁLISE DE POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS UTILIZANDO
A BIOMASSA DE LENTILHA D'ÁGUA (*Lemna minor*)**

CARLOS TAKASHI OTA YAEKASHI

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVI POMPERMAYER MACHADO

ARARAQUARA - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ANÁLISE DE POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS UTILIZANDO
A BIOMASSA DE LENTILHA D'ÁGUA (*Lemna minor*)

CARLOS TAKASHI OTA YAEKASHI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVI POMPERMAYER MACHADO

ARARAQUARA - SP

2024

Y12a

Yaekashi, Carlos Takashi Ota.

Análise de potencial de produção de biocombustíveis utilizando a biomassa de lentilha d'água (*Lemna minor*) / Carlos Takashi Ota Yaekashi. – Araraquara, 2024.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Levi Pompermayer Machado.

1. Biogás. 2. *Lemna minor*. 3. Biorrefinaria. I. Machado, Levi Pompermayer, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP -
Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise de potencial de produção de biocombustíveis utilizando a biomassa de lentilha d'água (*Lemna minor*)

AUTOR: CARLOS TAKASHI OTA YAEKASHI

ORIENTADOR: LEVI POMPERMAYER MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira do Campus de Registro da Unesp

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras do Campus de Assis da Unesp

Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 09 de setembro de 2024

Resumo

A utilização de biomassas lignocelulósicas na produção de biocombustíveis tem ganhado espaço na pesquisa ao longo dos anos, *Lemna minor*, é uma espécie de macrófita aquática chamada popularmente de lentilha d'água ou Duckweed (erva de pato), com valor econômico citado em artigos para a produção de biocombustíveis, como biogás, bioetanol e biodiesel. O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade de produção de biogás (em específico CH₄ e H₂) e caracterizar os compostos desta biomassa para uma futura produção de bioetanol. Foi utilizada uma biomassa originária de uma lagoa residual de tanques de piscicultura de Registro, município localizado no interior de São Paulo, Brasil, com reprodução e coleta através do laboratório LAFEN- Laboratório de Solo e Planta, da Unesp - FCAVR, Campus Registro. A biomassa apresentou cerca de 18,5% de celulose e 17,6% de lignina total. Através de experimentos realizados com a espécie *Lemna m.* os melhores resultados na produção de metano e hidrogênio foram 78,72% e 42,57%, respectivamente, na composição do biogás. As mesmas amostras demonstraram uma eficiência de 90,85% de DQO removida para o metano e 21,8% de DQO removida para o hidrogênio.

Palavras Chaves: biogás; *Lemna minor*; biorrefinaria.

Abstract

The use of lignocellulosic biomass in the production of biofuels has gained prominence in research over the years. *Lemna minor*, commonly known as duckweed, is an aquatic macrophyte with economic value cited in articles to produce biofuels such as biogas, bioethanol, and biodiesel. The objective of this study was to analyze the feasibility of biogas production (specifically CH₄ and H₂) and characterize the compounds in this biomass for future bioethanol production. The biomass used originated from a residual pond in fish farming tanks in Registro, a municipality located in the interior of São Paulo, Brazil. Reproduction and collection were carried out through the LAFEN Laboratory for Soil and Plant at Unesp - FCAVR, Campus Registro. The biomass presented about 18.5% cellulose and 17.6% total lignin. Through experiments conducted with the species *Lemna minor*, the best results in methane and hydrogen production were 78.72% and 42.57%, respectively, in the biogas composition. The same samples showed an efficiency of 90.85% COD removal for methane and 21.8% COD removal for hydrogen.

Keywords: biogas; *Lemna minor*; biorefinery.

Lista de Figuras

Figura 1 - Potencial da biomassa de lentilhas d'água..	10
Figura 2 - Fluxograma esquematizando as etapas de acidogênese e metanogênese durante o processo de digestão anaeróbia.....	14
Figura 3 - Coleta de biomassa direta da lagoa de tratamento.....	18
Figura 4 - <i>Lemna minor</i> sem tratamento à esquerda e com pré-tratamento hidrotérmico à direita.....	20
Figura 5 - Inóculos para os reatores de digestão anaeróbia.	21
Figura 6 - Reatores após a etapa de montagem com inóculo metanogênico e acidogênico	22
Figura 7 - Bloco digestor para a DQO	24
Figura 8 - Equipamentos para amostragem do biogás.....	25
Figura 9 - Analisador de umidade Shimadzu	27
Figura 10 - Mufla e Cadinhos na preparação das cinzas.	28
Figura 11 - Extrator Soxhlet com extrativos apolar.	30
Figura 12 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de <i>Lemna minor</i> (FTIR).	38
Figura 13 - Análise TG de <i>Lemna minor</i>	40
Figura 14 - Gráfico de difração de raio X.....	41
Figura 15 - Perfil temporal da produção acumulada de metano.	43
Figura 16 - Perfil temporal da produção acumulada de hidrogênio..	44
Figura 17 - Composição do gás durante o experimento do metano.	45
Figura 18 - Composição do gás durante o experimento do Hidrogênio.....	47
Figura 19 - Exemplo do cromatograma do GC-TCD para análise de gases ...	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Vantagens da biomassa de lentilhas d'água.	12
Tabela 2 - Comparação percentual da composição, umidade, cinzas e carbono total da biomassa bruta de <i>Lemna minor</i>	36
Tabela 3 - Identificação das bandas de FTIR de <i>Lemna minor</i>	39
Tabela 4 - Dados dos pontos utilizados para o cálculo de cristalinidade e região amorfa.	41
Tabela 5 - Composição do biogás durante o experimento com CH ₄	46
Tabela 6 - Composição do biogás durante o experimento com H ₂	47
Tabela 7 - DQO removida e eficiência de cada concentração de DQO por reator.	50

Lista de abreviaturas

DQO-	Determinação da demanda química de oxigênio.
DQOr-	Determinação da demanda química de oxigênio removida.
TCD-	Detector de condutividade térmica.
FTIR-	Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier.
HMF-	Hidroximetilfurfural.
ICr-	Índice de cristalinidade.
Iam-	Índice de celulose amorfa.
KHP-	hidrogenoftalato de potássio.
ST-	Sólidos totais.
SV-	Sólidos voláteis.
SF-	Sólidos fixos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1. Características de Lentilhas d'água.....	12
3.2. O uso de <i>Lemna minor</i> para biocombustíveis	13
3.3. Digestão anaeróbica	14
3.4. Influência do material de suporte para produção de hidrogênio.....	15
3.5. Importância do pH	15
3.6. Efeito da temperatura.....	15
3.7. Influência das razões Carbono, Nitrogênio e Fósforo.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Coleta e Processamento da biomassa de <i>Lemna m.</i>	18
4.2 Determinação de micro e macronutrientes	19
4.3. Análise de proteína.....	19
4.4. Preparo do substrato para os biocombustíveis	19
4.5. Micronutrientes adicionados para a produção de biogás	20
4.6. Produção e aquisição dos inóculos	21
4.7. Preparo de reatores em batelada	21
4.8. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO).....	23
4.9. Quantificação do biogás	24
4.10. Sólidos Totais, Voláteis e fixos	25
4.11. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier	26
4.12. Termogravimetria	26
4.13. Análise elementar	27
4.14. Teor de umidade	27
4.15. Teor de cinzas.....	28
4.16. Porcentagem de lipídios	29
4.17. Porcentagem de Extrativos (Extração apolar).....	29
4.18. Determinação de lignina insolúvel (Klason) e solúvel	30
4.19. Determinação do teor de celulose	32
4.20. Teor de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural	33
4.21. Difração de Raios-X	33
4.22. Índice de Cristalinidade.....	34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Caracterização da Biomassa.....	35
5.2. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier	37
5.3. Termogravimetria	39
5.4. Índice de cristalinidade.....	40
5.5.Características dos inóculos: pH; Sólidos Totais (ST); Voláteis (SV) e fixos (SF).....	41
5.6. Produção do biogás - perfil de atividade	42
5.6.1. Metano	42
5.6.2. Hidrogênio	43
5.7. Rendimento do biogás	45
5.7.1. Metano	45
5.7.2. Hidrogênio	46
5.7.3. Remoção de DQO	49
5.7.4. Inibidores da produção de biogás	50
5.8. Perfil inicial para produção bioetanol.....	51
5.9. Análise inicial do potencial econômico do Biogás	52
5.9.1. Cálculo de produção do metano.....	52
5.9.2. Rendimento energético	53
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

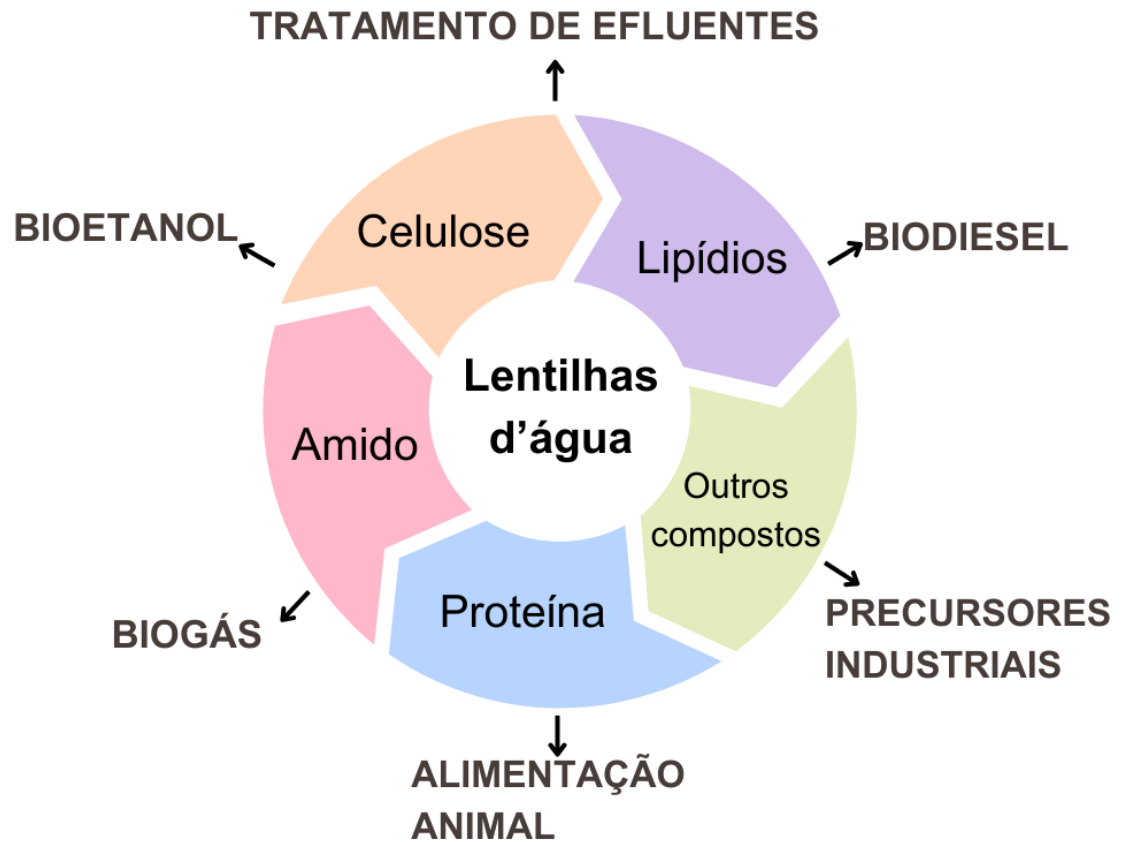
Os biocombustíveis e as biorrefinarias estão diretamente relacionados e oferecem soluções ambientalmente amigáveis e eficazes para combater a crise climática e reduzir a dependência de recursos fósseis. As biorrefinarias utilizam biomassa renovável, como culturas agrícolas, resíduos agrícolas e algas, para produzir uma variedade de produtos sustentáveis, como biocombustíveis, produtos químicos, biomateriais e alimentos (Zuliani *et al.*, 2021). Elas contribuem para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, estimulam o desenvolvimento econômico e rural, valorizam resíduos, promovem a sustentabilidade ambiental e favorecem uma economia de baixo teor de carbono (Khan *et al.*, 2021).

Segundo o Laboratório de Monitoramento Global- NOAA (2023), a média mensal global de emissão de CO₂ está em torno de 420 ppm. Os biocombustíveis, obtidos de fontes biológicas renováveis, como etanol, biodiesel e biogás, oferecem vantagens consideráveis em relação aos combustíveis fósseis, pois reduzem significativamente as emissões de gases de efeito estufa e combatem a poluição do ar.

Duckweed ou lentilha d'água, é o nome popular dado a macrófitas aquáticas da família Araceae. A biomassa de lentilhas d'água é relatada possuindo potencial para tratamento de efluentes (Heitzman *et al.*, 2024), com potencial para alimentação animal por conta de seu teor de proteína (Demann *et al.*, 2022) e para a produção de biocombustíveis por causa de sua composição variada (Chen *et al.*, 2022).

A presença destes itens, associadas a biomassa de lentilhas, está exemplificada na FIGURA 1.

Figura 1 - Potencial da biomassa de lentilhas d'água. Nota: As setas indicam o potencial da biomassa de lentilhas d'água, não estão necessariamente interligadas aos tópicos de cada setor da figura. Os setores indicam alguns dos principais componentes mais citados nos artigos envolvendo lentilhas d'água.



Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2022.

Lemna minor é a espécie de interesse neste trabalho, que está diretamente relacionada ao conceito de biorrefinaria pois ela é uma espécie que não está usualmente presente na alimentação humana, apresenta alto teor de proteína, tem alta taxa de reprodução sem utilizar de terras aráveis e estudos indicam que ela é uma biomassa em potencial para a produção de biogás e bioetanol (Faizal *et al.*, 2021, Kaur *et al.*, 2019, Yadav *et al.*, 2017).

2. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliação do potencial da biomassa de *Lemna minor* para produção de biocombustíveis.

Objetivos específicos

-Avaliação de *Lemna minor* como substrato para a produção de etanol e biogás.

-Avaliação da produção de H₂ utilizando *Lemna minor*;

-Avaliação da produção de CH₄ utilizando *Lemna minor*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Características de Lentilhas d’água

Lentilhas d’água são as menores plantas aquáticas com flores e com maior taxa de reprodução (Les *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010), com tempo de duplicação variando entre 16 horas e 3 dias em condições ideais (Leng *et al.*, 1995). Lentilhas d’água são macrófitas aquáticas com alta capacidade de se sustentar em águas residuais como substrato nutricional (Yadav *et al.*, 2016; Heitzman *et al.*, 2024). As lentilhas possuem pectinas que possibilitam agregar poluentes nessas estruturas (Krzeslowska *apud*; Pagliuso, 2018).

A biomassa possui um conteúdo de carbono de aproximadamente 40%, sendo capaz de sequestrar de 60 a 150 toneladas de CO₂ atmosférico por ha.ano⁻¹, além de possuir nitrogênio na forma de proteína e aminoácidos. E o amido que destaca essa biomassa para a pesquisa em processos fermentativos aplicados a produção de bioenergia (Yadav *apud*; Pagliuso, 2018).

A alta taxa de reprodução seguida de outras vantagens estão demonstradas na TABELA 1.

Tabela 1. Vantagens da biomassa de lentilhas d’água. Os marcadores (X) representam as vantagens que cada espécie possui relacionadas à produção de bioenergia.

Característica	Microalgas	Lentilhas d’água	Plantas terrestres
Rápido Crescimento	X	X	
Maior Biomassa por planta			X
Não competição por terras aráveis	X	X	
Colheita com menos esforço		X	X
Uso de CO ₂ do ar		X	X
Baixo custo de biorrefinaria		X	
Baixo consumo de água		X	

Fonte: Adaptado de Yang 2022.

3.2. O uso de *Lemna minor* para biocombustíveis

A fermentação, a transesterificação e a digestão anaeróbica são exemplos de processos mais conhecidos para a produção de biocombustíveis. As fontes de açúcares necessários para a fermentação alcoólica podem vir de dois componentes principais: a celulose e o amido através de hidrólise ácida e/ou enzimática. A conversão da biomassa lignocelulósica a depender de sua recalcitrância pode ser considerada difícil. A espécie já foi descrita com cerca de 44% de celulose compondo a parede celular (Zhao *et al.*, 2014), mas em um estudo recente realizado por Kaur *et al.* (2019), a parede celular apresentou cerca de 28,8% de celulose, segundo a mesma autora, a espécie tem baixa recalcitrância, descrita com cerca de 4.1% de lignina em sua parede celular.

Landolt e Kandeler (1987 *apud* Appenroth *et al.*, 2021), afirma que o teor de amido pode variar de 3 a 50% do peso seco das lentilhas-d'água. Outros estudos indicaram que as folhas de *Landoltia punctata* contêm aproximadamente 3-5% de amido em relação ao peso seco (Liu *et al.*, 2019), enquanto aquelas de *Lemna aequinoctialis* e *Wolffia arrhiza* apresentam cerca de 10% de amido (Sembada e Faizal, 2019).

O trabalho de Kaur *et al.* (2019), descreve que o teor de amido analisado em *Lemna m.* se encontra na faixa dos 7,2%. Em seu estudo é comprovada a desvantagem do uso de pré-tratamento ácido, pois ele leva a biomassa a produzir HMF(Hidroximetilfurfural) e Furfural quando submetido a altas temperaturas em meio ácido, sendo que estes compostos são potenciais inibidores da digestão anaeróbia e da fermentação.

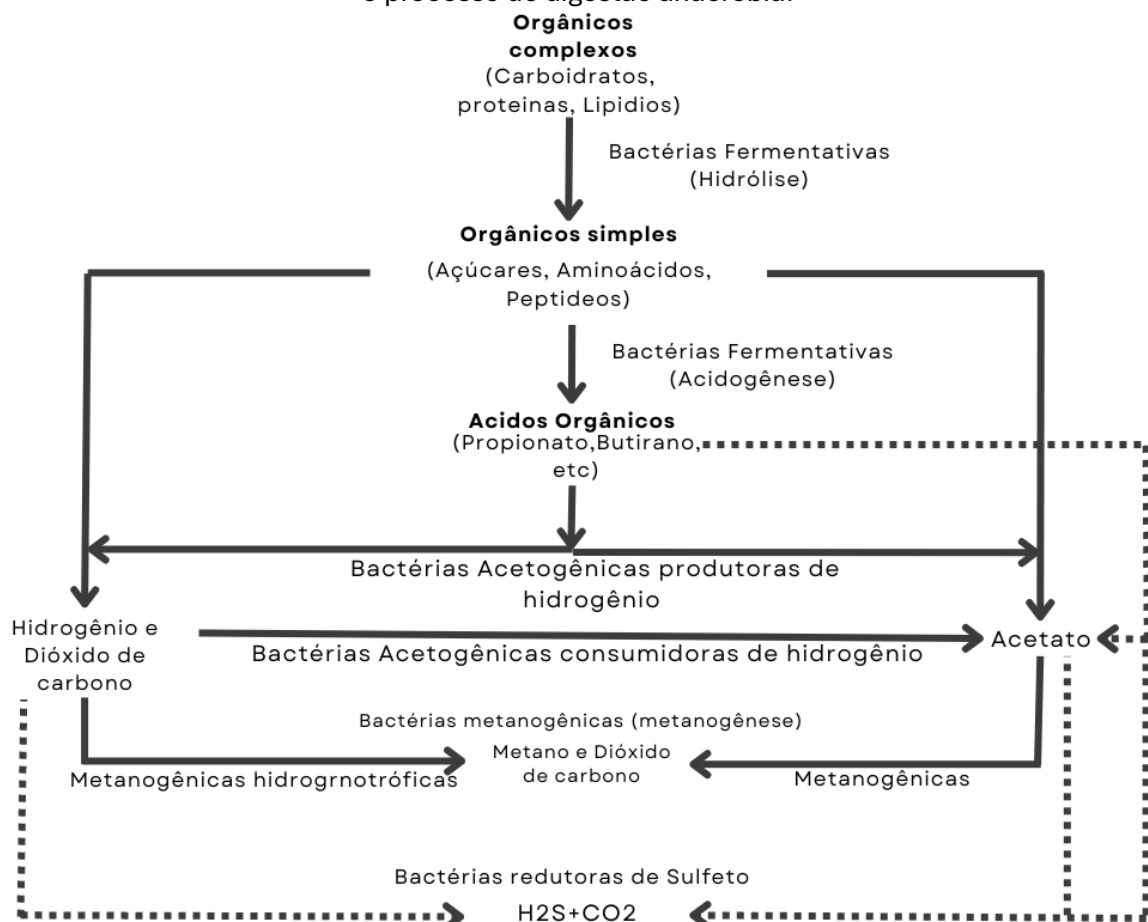
O melhor pré-tratamento observado na literatura segundo Kaur *et al.* (2019), se dá pelo tratamento hidrotérmico, pois é um procedimento mais simples, de baixo custo financeiro, não produz altas concentrações de inibidores, não degrada drasticamente a biomassa. O tratamento mantém uma proporção balanceada de carbono e nitrogênio o que potencialmente melhora o rendimento da digestão anaeróbia e da fermentação alcoólica (Yadav, 2017).

Em relação ao biogás, os principais gases advindos da digestão anaeróbia são o hidrogênio, o metano e dióxido de carbono, as bactérias acidogênicas decompõem substratos para H₂, ácido acético e CO₂ e as bactérias metanogênicas posteriormente convertem H₂ e CO₂ em gás metano (Cooney *apud*; Peixoto *et al.*, 2012).

3.3. Digestão anaeróbica

A digestão anaeróbica é um processo biológico que transforma a matéria orgânica solubilizada ou semissólida em biogás, principalmente composto de gás metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2) (FIGURA 2). O material orgânico complexo é transformado em compostos dissolvidos ou matéria orgânica volátil. Na Acidogênese os compostos são convertidos em ácidos orgânicos voláteis, como fórmico, acético, propiônico, butírico e valérico. Na fermentação acetogênica (acetogênese): Os produtos da subfase anterior são transformados em acetato, hidrogênio e monóxido de carbono. Na Metanogênese, os produtos da acetogênese são principalmente convertidos em metano (CH_4) pelas arqueias metanogênicas, produzindo também CO_2 durante esta etapa.

Figura 2 - Fluxograma esquematizando as etapas de acidogênese e metanogênese durante o processo de digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Peixoto e Zaiat, 2008.

3.4. Influência do material de suporte para produção de hidrogênio

O uso de materiais suporte para adesão da biomassa torna-se importante para manter um ambiente propício aos microrganismos em biorreatores, junto a baixos tempos de detenção hidráulica, isso favorece o crescimento dos microrganismos alvo, o material utilizado como suporte para os reatores foram raspas de polietileno reciclado. Além de servir como suporte para imobilização da biomassa no reator, a escolha do material tem influência para a seleção de consórcios microbianos de interesse. Segundo Silva *et al.* (2006), entre o uso de espuma de poliuretano, carvão vegetal, cerâmica e polietileno de baixa densidade, este último material demonstrou favorecer a colonização por bactérias fermentativas e hidrolíticas. Este mesmo material foi utilizado em outros trabalhos. (Rojas *apud*; Peixoto *et al.* 2011).

3.5. Importância do pH

Para manter a atividade dos microrganismos o pH tem de estar ajustado para o microrganismo/consórcio microbiano a ser utilizado, no caso do inóculo de hidrogênio o pH não deve estar abaixo de 4,7 (Lay, 1999), pois isso acarreta a inibição da atividade do inóculo. Durante a fase de preparo, os reatores de hidrogênio foram ajustados a pH 6 ($\pm 0,2$) para os reatores de metano para pH 7 ($\pm 0,2$), o qual favorece as arqueias metanogênicas.

3.6. Efeito da temperatura

A faixa de temperatura proporciona uma atividade ótima dos microrganismos, podendo estar entre 25 e 40° C, a depender do inóculo metanogênico e/ou acidogênico, está é a faixa de temperatura mais utilizada em trabalhos envolvendo produção de metano e hidrogênio (Li e Fang, 2007; Levin *et al.*, 2004; Zhang e Shen 2006; Kaur *et al.* 2019).

3.7. Influência das razões Carbono, Nitrogênio e Fósforo

A razão entre carbono e nitrogênio pode influenciar diretamente na quantidade e na velocidade de formação do hidrogênio no biogás (Lin e Lay *apud*; Peixoto, 2011). Rojas (2010) investigou como diferentes razões afetam a produção de hidrogênio a partir de água residuária sintética com base em sacarose. Em seu estudo, reatores de leito fixo e fluxo ascendente, contendo polietileno de baixa densidade para adesão da biomassa, foram operados a 25 °C com um tempo de detenção hidráulica de 2 horas, variando a concentração de uréia no meio de alimentação. A razão C/N de 140 produziu os melhores resultados, com 2,2 mol H₂/mol sacarose e 61% de hidrogênio no biogás. Em contraste, a razão C/N de 40, que teve o pior desempenho, produziu apenas 0,6 mol H₂/mol sacarose e 53% de hidrogênio no biogás. O excesso de nitrogênio pode promover o crescimento excessivo da biomassa, reduzindo a produção de hidrogênio, enquanto a falta de nitrogênio controla o crescimento da biomassa e aumenta a produtividade do hidrogênio. Para a produção de biogás, especificamente o hidrogênio, é necessário equilibrar a fonte de carbono com os macronutrientes e considerar os micronutrientes, como o ferro, que em concentrações abaixo de 0,56 mg/L pode limitar o crescimento de *Clostridium pasteurianum*. (Van Ginkel *apud*; Peixoto, 2011).

As menores razões de Carbono/ Nitrogênio e Carbono/ Fósforo proporcionam uma melhor eficiência na produção de hidrogênio, uma vez que menores concentrações de nitrogênio e fósforo são suficientes para o crescimento dos microrganismos anaeróbios. Conforme Argun *et al.* (2008), concentrações excessivas desses nutrientes podem inibir a produção de hidrogênio ao alterar as rotas metabólicas dos microrganismos envolvidos. Em seu estudo, Keanoi (2013) demonstrou que a alta razão C/N possivelmente ocasionará consumo rápido de nitrogênio por microrganismos metanogênicos e não reagirá mais com o conteúdo de carbono restante do material, o que resulta em menor produção de gás. E uma razão C/N baixa pode causar acúmulo de amônia (NH₄), que por sua vez, o NH₄ aumentará o valor do pH do conteúdo no digestor, o que é tóxico para as bactérias metanogênicas e o pH terá valores superiores a 8,5.

Os microrganismos responsáveis pela produção de metano apresentam um crescimento lento, com um tempo de reprodução que pode variar entre 5 até 16 dias. O tipo de substrato e o equilíbrio entre as fontes de carbono e outros nutrientes, como

nitrogênio, fósforo e enxofre, também são cruciais. O substrato deve ser processado de forma gradativa, pois, substratos que se degradam facilmente podem provocar um aumento rápido na acidez. A proporção ideal de carbono para nitrogênio descrita na literatura por Meegoda *et al.* (2018) está entre 16:1 e 25:1. Qualquer variação excessiva nessa proporção pode impactar negativamente a produção de biogás. Além disso, a concentração de sólidos no digestor deve situar-se entre 7% e 9%.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Processamento da biomassa de *Lemna m.*

A biomassa fresca de *Lemna m.* foi produzida e coletada em uma lagoa de tratamento de efluentes advindo de tanques de piscicultura, gentilmente cedidos pelos agricultores proprietários do terreno, localizado no município de Registro, São Paulo, demonstrado na fotografia na FIGURA 3.

Figura 3. Coleta de biomassa direta da lagoa de tratamento.



(Fonte: O autor).

Após a colheita, foi removido o excesso de água na biomassa fresca e transportada para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Registro. O objetivo durante a coleta e processamento, foi obter uma farinha de *L. minor* com o menor número de processos para as análises de qualidade da biomassa seca. A biomassa fresca foi lavada em água corrente com auxílio de uma peneira até a água permanecer límpida e transparente. Foi adicionado 1 kg de biomassa fresca em cada bandeja de inox (47x59cm) e a biomassa foi seca na temperatura de 45°C, durante 24 horas em estufa de circulação e renovação de ar – Teknal®. A biomassa seca em flocos retirada da estufa e triturada utilizando um processador de grãos doméstico – Philips Wallita®, até obter uma farinha de *L. minor*, que posteriormente passou para moagem em moinho de facas para uma melhor padronização.

4.2 Determinação de micro e macronutrientes

As amostras de biomassa seca trituradas foram e enviadas para o Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas – LAFEN, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Registro, sendo determinados os teores de micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn e Zn) e macronutrientes (N; P; K; Ca; Mg e S).

O Nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (1883), o Fósforo por colorimetria, o Enxofre por turbidimetria do sulfato de bário, o Boro por Azometina-H e os nutrientes Potássio, Cálcio, Magnésio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nítrico-perclórica segundo metodologia proposta por Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). Os resultados foram expressos em g do elemento por kg de biomassa seca de *L. minor* (g.kg⁻¹).

4.3. Análise de proteína

Para obter a porcentagem da proteína bruta da biomassa, foi aplicado a metodologia de Kjeldahl (1883), que consiste em utilizar o fator de conversão 6,25 multiplicando o valor total de Nitrogênio da amostra, obtendo o valor de proteína bruta (EQUAÇÃO 1). Considerando assim, que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio (Galvani; Gaertner, 2006).

$$\%PB = NT \times F_N \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

%PB: teor de proteína bruta na amostra;

NT: Nitrogênio da amostra.

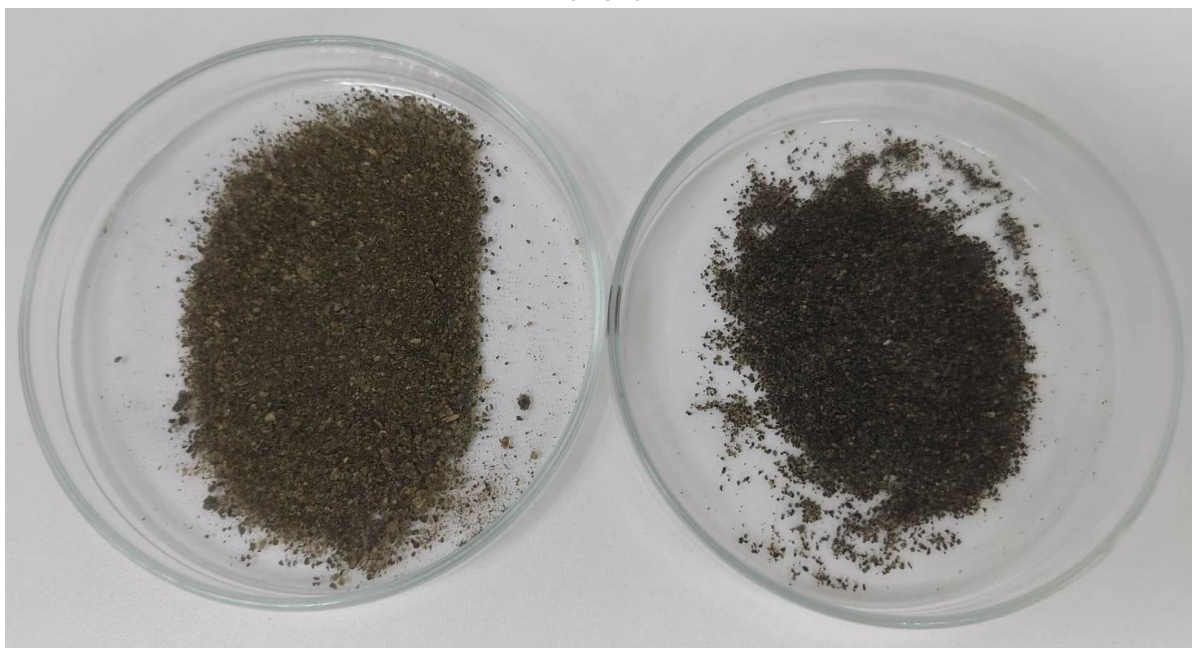
FN: fator de conversão de 6,25.

4.4. Preparo do Substrato para os biocombustíveis

Foi utilizado um tratamento hidrotérmico da biomassa de *Lemna minor* (121° por 15 min) na relação 1:10 (m/v) com água destilada. A parte sólida (FIGURA 4) foi preparada com H₂SO₄ para ser caracterizada em HPLC (itens 4.18, 4.19 e 4.20) enquanto a fração líquida foi congelada a -20° por cerca de 24h para ser utilizada na

montagem dos reatores de biogás. Foram realizados testes de diluição de 10x, 100x, 1000x e 10000x, com o extrato obtido no pré-tratamento hidrotérmico. A diluição escolhida foi a de 100x, pois ela apresentou matéria orgânica em concentração comparável a maior parte dos trabalhos utilizando a mesma metodologia. Foi realizado o preparo de uma curva padrão construída a partir do padrão hidrogenoftalato de potássio que permite que o resultado seja expresso em termos de Demanda Química de Oxigênio.

Figura 4. *Lemna minor* sem tratamento à esquerda e com pré-tratamento hidrotérmico à direita.



Fonte: o autor.

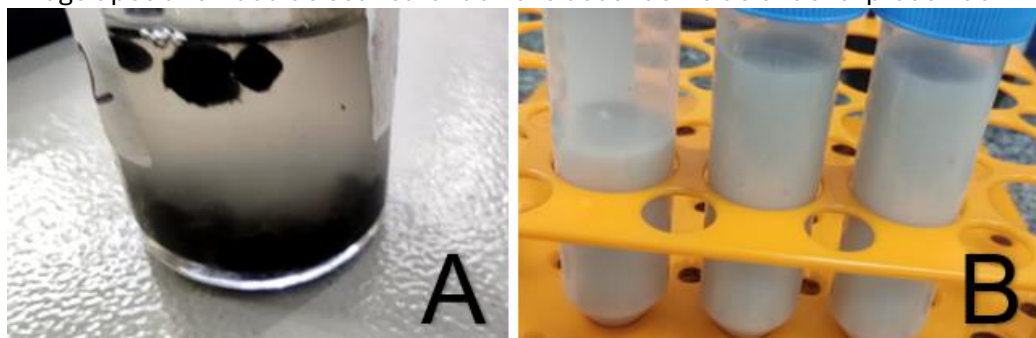
4.5. Micronutrientes adicionados para a produção de biogás

O meio nutricional foi produzido contendo $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (6mg/L), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.15 mg/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.75 mg/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.075 mg/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.012 mg/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.618 mg/L), SeO_2 (0.0108 mg/L), KH_2PO_4 (1.608 mg/L), KHPO_4 (0.39 mg/L), e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.828 mg/L). O meio foi adicionado aos reatores no início das etapas de produção de metano e de hidrogênio, exceto no controle negativo.

4.6. Produção e aquisição dos inóculos

O inóculo metanogênico foi obtido de um reator de lodo anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) tratando águas residuárias de abatedouro de aves localizado no município de Pereiras-SP. O lodo foi retirado da zona de manta do reator. O lodo apresenta flocos de matéria orgânica de cor preta que são facilmente visualizados após a inserção nos reatores (FIGURA 5A e 5B).

Figura 5. Inóculos para os reatores de digestão anaeróbia. A FIGURA 5(A) mostra o lodo metanogênico já inserido no reator para análise da produção de metano, com isso é possível visualizar pequenos flocos de matéria orgânica do lodo. A direita está o lodo acidogênico 5(B) logo após a retirada de seu reator de fluxo ascendente de onde foi produzido.



Fonte: o autor.

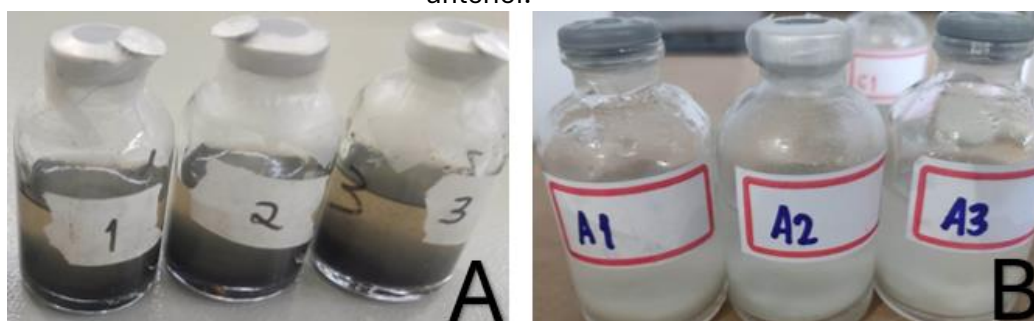
O inóculo acidogênico (para a produção de hidrogênio) foi obtido a partir de um reator anaeróbico de fluxo ascendente contínuo do laboratório da pesquisa, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Araraquara, usado para a produção de hidrogênio a partir de águas residuais sintéticas à base de sacarose (Fernandes 2010), que ficou em operação por cerca de 2 meses, produzindo cerca de 114ml de lodo acidogênico, para a sua extração o reator foi drenado e seu conteúdo foi centrifugado (2000 rpm, a 13°C e por 10 minutos) para recuperar a fração mais densa deste líquido representado na FIGURA 5B.

4.7. Preparo de reatores em batelada

Foram utilizados frascos de vidro industrial com volume total de 38 ml e 18ml de headspace (metano e hidrogênio), conforme mostrado na FIGURA 6. Os frascos foram previamente lavados e primeiramente foi adicionado a solução de 15 ml de *Lemna minor*, onde cada reator possuía sua determinada concentração de matéria

orgânica variando a diluição da solução mãe com água destilada - A(1,3g/L), B(2,6g/L) e C(5,2g/L), que foram previamente determinadas por meio de cálculos da análise de demanda química de oxigênio (DQO). Em seguida foram adicionadas a micronutrição previamente preparada (descrita no item “Meio nutricional”), 5ml do lodo de inóculo em cada reator.

Figura 6. Reatores após a etapa de montagem com inóculo metanogênico 6(A) e acidogênico 6(B). Nota: O lodo metanogênico a esquerda advém de um reator de abatedouro de aves. O lodo acidogênico foi sintetizado em um reator de fluxo contínuo, citado no tópico anterior.



Fonte: o autor.

O pH de cada reator foi ajustado para 7 na etapa de produção do gás metano e para 6 na etapa de produção do gás hidrogênio, utilizando bicarbonato de sódio ou ácido clorídrico para o ajuste. Para manter o ambiente anaeróbico, cada frasco foi mantido a um fluxo contínuo com nitrogênio por cerca de 1 minuto antes de ser lacrado (o mesmo gás pode ser monitorado durante o período de amostragem, oferecendo um controle para observar os possíveis vazamentos de cada frasco). Para a finalização do preparo dos reatores em batelada, a vedação foi realizada com papel Parafilm® na junção dos septos de borracha com os lacres de alumínio, próprios para estes frascos usando um alicate recravador para lacres de alumínio.

O controle positivo para ambos os experimentos de produção de biogás (CH_4 e H_2) foi montado com a concentração de 2,6g/L de DQO. As concentrações de 1,3 g/L (A), 2,6 g/L(B) e 5,2 g/L(C) foram empregadas em triplicata. Foi utilizado somente 1 frasco para o controle negativo, o qual continha somente o inóculo de microrganismos mais 15 ml de água de abastecimento, para totalizar os 20 ml de volume útil dentro do frasco. Houve um total de 13 frascos montados para a produção de CH_4 e 13 frascos para a produção de H_2 . A montagem para a produção de cada gás se diferenciou pelo uso dos inóculos diferentes e do ajuste do pH inicial. Os

frascos (FIGURA 6) foram mantidos em incubadora shaker a 120 RPM e 37° até a estabilização da produção de ambos os gases. O período de amostragem durou cerca de 610h para o metano e cerca de 60h para hidrogênio.

4.8. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

A quantificação da matéria orgânica em termos de DQO foi determinada conforme descrito em Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). O método foi utilizado para determinar a concentração de matéria orgânica das amostras, foi utilizado para comparar as concentrações iniciais de cada triplicata e também para medir o índice de DQO removida (DQOr), que é usado para avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica em cada reator ao final do período de amostragem.

Foram realizados testes de diluição para que os valores de DQO não ultrapassassem valores superiores a concentração máxima (0,800 mg/L) da curva ($y=0,2948x+0,0132$ $R_2=0,986$) com massa de KHP 425,6 (mg), utilizou-se a diluição (100x) do líquido concentrado advindo do tratamento hidrotérmico (fração líquida filtrada com papel filtro). Em seguida, 2,5 ml da amostra diluída 100 vezes, juntamente da solução de dicromato e solução de ácido sulfúrico, foram transferidos para tubos de ensaio específicos para a análise de DQO. O branco foi preparado utilizando-se 2,5 mL de água deionizada. Em seguida, os tubos foram fechados e homogeneizados. Após o bloco digestor atingir 150°C, os frascos foram colocados no bloco digestor (FIGURA 7), e submetidos a 120 minutos de aquecimento. Posteriormente os frascos foram removidos e colocados para resfriar em estante metálica coberta para evitar a incidência da luz. Assim que os tubos atingiram a temperatura ambiente, efetuou-se a leitura utilizando o espectrofotômetro com leitura na faixa de 620nm.



Figura 7. Bloco digestor para a DQO (150° 2H). Fonte: o autor.

4.9. Quantificação do biogás

A composição de biogás (H_2 , N_2 , CO_2 e CH_4) foi determinada por cromatografia gasosa (GC2014 Shimadzu®, observado na FIGURA 8) usando detector de condutividade térmica (TCD), coluna Carboxen 1010 PLOT – Supelco e injeção manual, com o uso de uma seringa gas-tight para gases 250uL da marca Hamilton, seguindo o método com temperatura de injeção de 220°C, detector a 230°C, forno 130-135°C, com tempo de retenção de 6 minutos e argônio como gás de arraste, descrito por Adorno e Tomita (2014). A medição da pressão interna dos frascos foi feita com um manômetro de precisão DM8200, General®, cujas pressões aferidas foram utilizadas para calcular o volume dos gases produzidos ao longo do tempo, usando a equação de estado dos gases (EQUAÇÃO 2). Um cilindro de gases mistos, contendo H_2 , N_2 , CH_4 e CO_2 , foi utilizado como padrão para aferir os tempos de retenção e áreas dos gases que seriam analisados antes dos experimentos.

$$PV = nRT \text{ (Equação 2)}$$

Sendo:

P = pressão;

V = volume;

n = número de mols;

T = temperatura;

R = constante do gás

Figura 8. Equipamentos para amostragem do biogás. A esquerda o cromatógrafo a gás com coluna TCD e a direita o manômetro e a seringa específica para medição de gases.



Fonte: o autor.

4.10. Sólidos Totais, Voláteis e fixos

Para a determinação de M_0 (massa da cápsula vazia), cadinhos de porcelana foram previamente marcados e calcinados em mufla a 550°C ($\pm 50^{\circ}\text{C}$) durante 15 minutos. Após aguardar o resfriamento (até temperatura abaixo de 150°C) a mufla foi ajustada a 105°C . Após alguns minutos, com a estabilização da temperatura, foram transferidos para um dessecador, para resfriamento em atmosfera seca, até temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 3^{\circ}$), em seguida foram pesados para determinar a massa da cápsula vazia – M_0 .

Para a determinação de M_1 . As amostras foram homogeneizadas, e com o auxílio de uma proveta, foram transferidos 20 ml de amostra para cada cadinho (volume referente a cada reator de biogás, pós-produção). A água foi evaporada em estufa a $103\text{-}105^{\circ}\text{C}$, até a massa constante (por aproximadamente 30 horas). Os cadinhos foram colocados em dessecador para esfriar até a temperatura ambiente, com este material foi determinada a massa M_1 (EQUAÇÃO 3), correspondente ao cálculo da concentração dos sólidos totais (mg/L).

$$\text{mg/L sólidos totais} = \frac{(M1 - M0).1000}{\text{volume amostra (L)}} \quad \textbf{(Equação 3)}$$

Após determinação de M1, os cadinhos contendo as amostras secas foram colocados no forno mufla a 550°C por um período de 2 horas. Após aguardar resfriamento de segurança (abaixo de 150°C) e transferir a cápsula para a estufa a 105 °C, foram transferidos para o dessecador, até atingir a temperatura ambiente. Sua pesagem foi utilizada para determinar a massa M2. Com isso foi possível determinar os sólidos voláteis (EQUAÇÃO 4) e sólidos fixos (EQUAÇÃO 5) dos inóculos. As análises foram executadas segundo os procedimentos descritos em APHA (2001).

$$\text{mg/L sólidos voláteis} = \frac{(M1 - M2).1000}{\text{volume amostra (L)}} \quad \textbf{(Equação 4)}$$

$$\text{mg/L sólidos totais fixos} = \frac{(M2 - M0).1000}{\text{volume amostra (L)}} \quad \textbf{(Equação 5)}$$

4.11. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier

Esta técnica foi utilizada para permitir a identificação de grupos funcionais e diferentes estruturas químicas das amostras. O equipamento opera mediante a técnica de transformada de Fourier. Os espectros foram registrados na região entre 400 a 4000 cm⁻¹, com 4cm⁻¹ de resolução, 32 varreduras por amostra, pelo método ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR – Platinum ATR Alpha / BRUKER; fonte: Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS), localizado no laboratório do departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

4.12. Termogravimetria

A estabilidade térmica das amostras foram avaliadas utilizando o equipamento SDT de TA Instruments do Departamento de Físico Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. As condições de análise foram as seguintes: atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 100 mL.min⁻¹, em uma rampa de aquecimento de 10

°C.min⁻¹, com intervalo de temperatura de 25°C a 600 °C, a massa da amostra foi de 5 a 7 mg colocadas em cadinho de alumínio.

4.13. Análise elementar

A análise elementar foi realizada preparando 1g de biomassa seca, moída em moinho de facas e triturada em almofariz de porcelana até um pó fino e em seguida colocada em estufa a 40° para retirada da umidade. Após o preparo da amostra, ela foi analisada no laboratório do Instituto de química de São Carlos -Central de análises químicas instrumentais (CAQI), através da técnica de análise CHNSO em um analisador elementar da marca Thermo Scientific, modelo Flash Smart.

4.14. Teor de umidade

Foi utilizado um analisador de umidade da marca Shimadzu modelo MOC63u (FIGURA 9). Que faz suas análises de umidade através de infravermelho, permitindo a determinação da massa seca de materiais, que podem ser programados para leituras em diferentes temperaturas.

Figura 9. Analisador de umidade Shimadzu mod. MOC63u.



Fonte: o autor.

4.15. Teor de cinzas

Cadinhos de porcelana foram colocados no forno de mufla (FIGURA 10) a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ por 3h utilizando uma rampa de aquecimento pré-programada. Após o término de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Então, os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento à temperatura de 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados. Posteriormente, foram pesados aproximadamente 1g (dados em base seca) das amostras, colocadas nos cadinhos (previamente secos e pesados) e levados ao forno de mufla novamente, o qual foi aquecido seguindo a mesma rampa de aquecimento utilizada anteriormente. Os cadinhos permaneceram no forno de mufla por 3h após a temperatura atingir $575 \pm 25^\circ\text{C}$. Após o período de 3h, os cadinhos foram mantidos no forno de mufla até a temperatura atingir aproximadamente 105°C . Os cadinhos foram retirados do forno de mufla e colocados em um dessecador com sílica para o resfriamento à 25°C . Após 1h (aproximadamente) os cadinhos foram pesados.

Figura 10. Mufla e Cadinhos na preparação das cinzas.



Fonte: o autor.

O cálculo do teor de cinzas nas amostras em estudo foi realizado segundo a EQUAÇÃO 6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$C = \frac{w_f}{w_i} * 100\% \text{ (Equação 6)}$$

Onde:

C=porcentagem de massa de cinzas na amostra (%)

Wi=massa seca inicial das amostras antes do procedimento da mufla(g)

Wf=massa seca final após o procedimento da mufla(g)

4.16. Porcentagem de lipídios

Aproximadamente 2 g (dados em base seca) das amostras não tratadas foram submetidas à extração com solvente apolar: Hexano (99%), até o solvente ficar com cor mais clara, por aproximadamente 6h em aparelho Soxhlet, com 2 ciclos por hora. A massa de lipídeos extraída foi calculada com base na diferença entre a massa seca inicial menos a massa seca final após a extração (EQUAÇÃO 7). O experimento foi realizado em triplicata.

$$E = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \text{ (Equação 7)}$$

Onde:

E = porcentagem mássica de lipídeos do material não tratado (%).

mi = massa seca inicial do material não tratado (g)

mf = massa seca final do material após extração com hexano (g).

4.17. Porcentagem de Extrativos (Extração apolar)

Para a determinação do teor de extrativos, cerca de 2 g (dados em base seca) de biomassa, previamente triturado, foram colocados em cartuchos de papel de filtro e em seguida foram inseridos em um extrator tipo Soxhlet e extraídos com água destilada (210ml), 100° por cerca de 13 h, cerca de 6 ciclos de extração (FIGURA 11). Os cartuchos contendo o material extraído foram secos à temperatura de 40 °C para evaporação do solvente até à massa constante, em seguida o material foi pesado em balança analítica. O material obtido foi armazenado em sacos plásticos fechados até o momento do uso. O percentual de extrativos foi determinado segundo a EQUAÇÃO 8.

$$E = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \text{ (Equação 8)}$$

Onde:

E = porcentagem mássica de extrativos do material não tratado (%).

m_i = massa seca inicial do material não tratado (g)

m_f = massa seca final do material pós-extração com água destilada (g).

Figura 11. Extrator Soxhlet com extrativos apolar



Fonte: O autor.

4.18. Determinação de lignina insolúvel (Klason) e solúvel

O material bruto e o material pós extração soxhlet foram analisados quanto ao teor de lignina Klason (insolúvel). Para isso, cerca de 300 mg (dados em base seca) de cada amostra foram tratadas com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (massa/massa) em banho-maria por 1 h a 30 °C, sendo a mistura agitada em intervalos de 15 min com auxílio de um bastão de vidro. Após 1 h os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos quantitativamente para Erlenmeyers de 250 mL com auxílio de 79 mL de água destilada. Para a hidrólise completa dos oligômeros restantes, os Erlenmeyers

foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 1 h. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram resfriados à temperatura de 25 °C e em seguida foram filtrados em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 de 30 mL (Schott, Alemanha) (previamente secos em estufa a 105 °C por 1,5 h e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água destilada e seco em estufa até a massa constante. Esse resíduo correspondeu à lignina insolúvel em ácido (lignina Klason). A determinação da lignina Klason foi calculada segundo a EQUAÇÃO 9. O cálculo foi realizado através da massa dos filtros de vidro sinterizados vazios e a massa dos filtros sinterizados contendo o material retido após a filtração.

$$L_1 = m_{(\text{filt}+\text{res})} - m_{(\text{filt})} \text{ (Equação 9)}$$

Onde:

L_1 = lignina Klason da amostra (g).

$m_{(\text{filt}+\text{res})}$ = massa do filtro sinterizado seco contendo a lignina Klason(g).

$m_{(\text{filt})}$ = massa do filtro sinterizado seco vazio(g).

Os filtrados foram avolumados a 100 mL em balão volumétrico e o teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura de absorbância do filtrado obtido em um espectrofotômetro UV-visível a 205 nm (Marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis). Para a determinação das concentrações de lignina solúvel, foi utilizado o coeficiente de extinção de 105 L.g⁻¹.cm⁻¹. O cálculo da concentração da lignina solúvel foi realizado conforme a EQUAÇÃO 10. Após o cálculo da concentração de lignina solúvel em g.L⁻¹ o valor foi multiplicado pelo fator de diluição para a determinação real da lignina solúvel. Então, a concentração de lignina solúvel real foi multiplicada por 0,1.

$$C_{\text{lig}} = ((A_{\text{hid}}/C_e) * \text{diluição} * 0,1) \text{ (Equação 10)}$$

Onde:

C_{lig} = Massa de lignina solúvel(g)

A_{hid} = Absorbância do hidrolisado em 205 nm.

C_e = 105(coeficiente de extinção)

O teor de lignina total (Lt) foi calculado segundo a EQUAÇÃO 11. As massas de lignina solúvel e insolúvel foram somadas e multiplicadas por 100, o resultado foi dividido pela massa inicial do subproduto (dados em base seca) do processo de hidrólise ácida. Desta forma o resultado final do teor de lignina foi expresso em porcentagem (grama de lignina por 100 gramas de subproduto, dados em base seca).

$$L_t(\%) = ((L_{sol} + L_{insol}) * 100) / (M_i) \text{ (Equação 11)}$$

Onde:

Lt= Lignina Total (%)

Lsol= teor de lignina solúvel em meio ácido(g).

Linsol= teor de lignina Klason em meio ácido(g).

Mi= massa inicial seca do produto do processo de hidrólise ácida.

4.19. Determinação do teor de celulose

O líquido filtrado e adquirido pelo método de lignina Klason na etapa anterior foi utilizado para a determinação dos teores de açúcares monoméricos (glicose, xilose, arabinose), através da técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de cartuchos do tipo SEP-PACK C18 para a retenção de compostos fenólicos. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU) nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura do forno: 60 °C; eluente: H₂SO₄ 5 mM com fluxo 0,6 mL.min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 60 °C (SHIMADZU, modelo RID- 20A) com um tempo de análise de 20 min. As concentrações dos açúcares, arabinose e ácido acético foram determinadas através de curvas analíticas preparadas com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo.

Os teores de celulose, xilana e grupos arabinosil foram calculados segundo a EQUAÇÃO 12. As massas de glicose, xilose e arabinose foram determinadas através de suas concentrações (em um volume final de 100 mL). As massas de glicose, xilose e arabinose foram multiplicadas pelos seus respectivos fatores de hidrólise. O resultado foi multiplicado por 100 e dividido pela massa inicial do subproduto do processo de hidrólise ácida. Desta forma os resultados finais dos teores de celulose,

xilana e grupo arabinosil foram expressos em porcentagem (grama de componente por 100 gramas de subproduto, dados em base seca).

$$C(\%) = (Mf \times f) * 100 / (Mi) \text{ (Equação 12)}$$

Onde:

C = teor de celulose, xilana ou arabinose (%).

Mf = massa de glicose, xilose, arabinose (g).

f = fator de hidrólise para celulose, xilana ou arabinose.

Mi = massa inicial seca do subproduto do processo de hidrólise ácida (g).

4.20. Teor de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural

Para a quantificação de hidroximetilfurfural (HMF) utilizou-se o filtrado obtido após a hidrólise ácida das amostras em estudo. Para a detecção de HMF uma pequena alíquota do filtrado foi passada através de membranas de 0,45µm. Então, o filtrado foi injetado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Perkin-Elmer, modelo Flexar), equipado com uma coluna C18 de 250mm de comprimento e 4mm de diâmetro externo (Hypersil; Thermo- Scientific) utilizando como eluente acetonitrila:água (1:8) com 1%(%volume/volume) de ácido acético com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ (15,20). A análise foi realizada a 25°C. O HMF foi detectado a 276 nm por meio de um detector UV-Visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para os cálculos foi elaborada uma curva de calibração com padrão de HMF (W501808-25G-K, Lot# STBD9762V, Sigma).

4.21. Difração de Raios-X

Os difratogramas das amostras LN, Lavado e PH, foram obtidos à temperatura ambiente dentro de uma variação de 2θ entre 5° a 70° e uma velocidade de varredura de 5° min⁻¹, com passo/tempo de 0,02°/2s. O equipamento utilizado foi um difratômetro Rigaku modelo Rint 2000, do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, operando a uma potência de 40 kV com uma corrente de 20 mA sendo a radiação Kα do Cu (λ=1,5406 Å). Antes de realizar as análises de DRX, todas as amostras foram secas a 50 °C durante 12 horas em uma estufa de ar circulante.

4.22. Índice de Cristalinidade

O método adotado para determinação dos índices de cristalinidade foi realizado através da EQUAÇÃO 13, sugerido por Segal *et al.* (1959). De acordo com este método o percentual de celulose cristalina é determinado pela diferença da intensidade entre o pico de maior intensidade (pico cristalino) e o pico de menor intensidade (porção amorfa).

Onde:

$$\%IC = \left(\frac{I-i}{I} \right) * 100 \text{ (Equação 13)}$$

%IC = Índice de cristalinidade;

I = Pico de maior intensidade (pico cristalino);

i = Pico de menor intensidade (porção amorfa).

O cálculo do índice de amorficidade foi realizado através da EQUAÇÃO 14 (SUN *et al.*, 2008).

$$IAm(\%) = 100\% - IC(\%) \text{ (Equação 14)}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Biomassa

Observando os resultados obtidos na análise elementar, de macronutrientes e de micronutrientes (TABELA 2), a biomassa deste trabalho foi caracterizada com cerca de 3% de nitrogênio, valor menor que o indicado por Kaur *et al.* 2019 (5,5%). O carbono total compõe cerca de 49,5% da composição da biomassa, valor menor que o descrito por Kaur *et al.* 2019 com 82% de carbono e foi observado uma variação em seu segundo trabalho do mesmo ano de publicação, no qual a biomassa continha 62% de carbono determinado. O valor detectado de fósforo foi de cerca 0,28% na biomassa do atual estudo.

Na análise composicional (TABELA 2) a celulose (18,5%) determinada foi menor que a celulose encontrada nos 2 artigos publicados por Kaur *et al.* 2019 que estava entre 23,5 a 28,8%, a hemicelulose é descrita estar em torno de 22,3 a 26,2%, a lignina descrita está em torno de 3,5 a 4,1%, mas na pesquisa atual a lignina foi determinada somando a lignina solúvel e insolúvel em ácido, 5,7% e 11,9% respectivamente, totalizando a lignina total de 17,6%. Os lipídios determinados via extrator soxhlet apresentou teor de 5,61%, valor menor se comparado ao valor de Kaur *et al.* 2019, que obteve uma variação de 7% e 12,6%. Os extrativos foram determinados via extrator soxhlet e a biomassa apresentou cerca de 28,66% de extrativos, valor superior ao encontrado na literatura que foi descrita com 8,1% e 15,2%. Aplicando a metodologia de Kjeldahl (1883) com o fator de conversão 6,25 ao valor de N (30 g/kg), obtivemos o valor de proteína bruta de 18%, porcentagem que se aproxima do valor descrito por Kaur *et al.* 2019 (15,6 - 16,9% de proteína) presente na biomassa. A biomassa de *Lemna minor* possui 7 a 7,2% de amido, valores que estão descritos nos trabalhos de Kaur *et al.* 2019.

Tabela 2. Comparação percentual da composição, umidade, cinzas e carbono total da biomassa bruta de *Lemna minor*. Os resultados de macronutrientes e micronutrientes foram expressos em teores de g do elemento por kg de biomassa seca (g/kg-1). Análise elementar realizada em triplicata, com valor médio expresso em porcentagem. Análises composicionais realizadas em triplicatas com valor médio expresso em porcentagem, seguindo protocolos de caracterização de materiais lignocelulósicos dos laboratórios NREL. nd – Teores ou análises não determinadas.

Análises	<i>Lemna m.</i>¹	<i>Lemna m.</i>²	<i>Lemna m.</i>³	<i>Eichhornia crassipes</i>³
Macronutrientes (g/kg⁻¹)				
P	2,8	nd	nd	nd
K	4	nd	nd	nd
Ca	12	nd	nd	nd
Mg	2,4	nd	nd	nd
Micronutrientes (g/kg⁻¹)				
B	156	nd	nd	nd
Cu	6,1	nd	nd	nd
Fe	826	nd	nd	nd
Mn	521	nd	nd	nd
Zn	42	nd	nd	nd
Análise elementar (%)				
C	49,5	82	62	53,4
N	3	5,53	5,56	2,13
H	5,43	5,56	5,56	7,3
S	0,12	2,68	1,68	0,38
Análise composicional (%)				
Celulose	18,5	23,5	28,8	35
Hemicelulose	nd	26,2	22,3	24,8
Lignina	17,6	3,5	4,1	7,72
Lipídios	5,61	7	12,6	6,2
Extrativos	28,66	15,2	8,1	18,8
Proteína	18,75	15,60	16,90	17,48
Amido	nd	7	7,2	nd
Umidade	11,38	12,05	12,05	11,5
Cinzas	7	7,20	7,20	13,3

Fontes: O autor¹, Kaur et al. 2019, artigo “An integrated approach for efficient conversion of *Lemna minor* to biogás”², Kaur et al. 2019, artigo “A sustainable biorefinery approach for efficient conversion of aquatic weeds into bioethanol and biomethane”³.

5.2. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier

Guzman *et al*, 2013, fez uma análise de FTIR em duas espécies de lentilha (*Eichhornia crassipes* e *Lemna minor*). As bandas entre as espécies são semelhantes, entre o alcance de 3402–3344 cm^{-1} estão descritos como estiramento de ligações O–H de compostos poliméricos, em 2858 cm^{-1} é a vibração simétrica de –CH₂ e entre 1740–1725 cm^{-1} é a vibração de alongamento de COO–, C – O. A banda em 1538 cm^{-1} está esticando a vibração de C – N da ligação peptídica de proteínas, 1423– 1417 cm^{-1} é de estiramento fenólico -O-H e C-O de carboxilatos, a banda de 1233 cm^{-1} é vibração de ácidos carboxílicos, 1130–1000 cm^{-1} é a vibração de C – O – C e O – H de polissacarídeos. Entre as duas espécies Guzman, 2013, ressalta que ambas apresentam grupos carboxílicos, grupos fosfato, amida, tiol e de hidróxido.

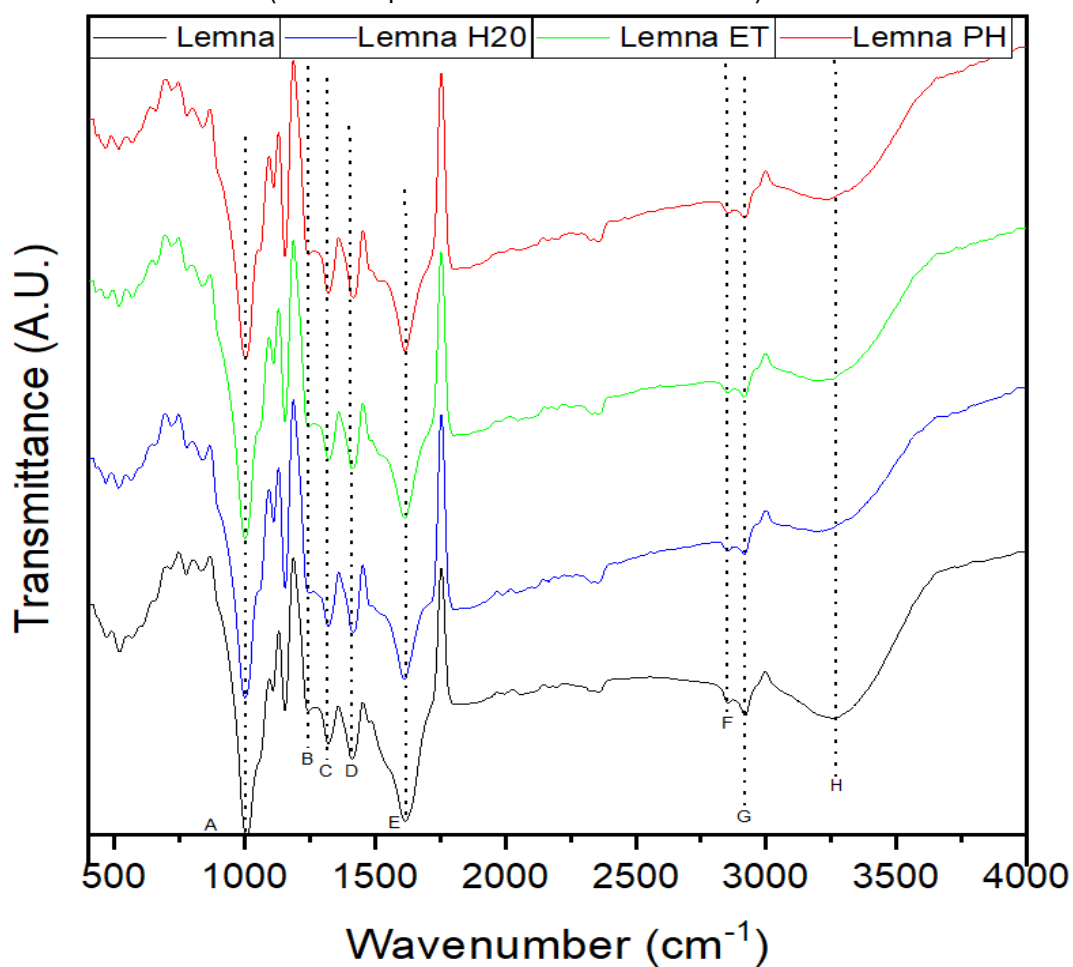
Observando espectro FTIR realizado por YADAV *et al*, 2016, em sua pesquisa sobre lentilhas d'água foi demonstrado um estiramento da estrutura aromática e vibração da biomassa em 1458-1595 cm^{-1} . Grupos funcionais contendo oxigênio: OH (em 3600-3200 cm^{-1}), COOH (em cerca de 2600 cm^{-1}), C-O-(C) (~1158 cm^{-1}) e CeOe(H) (~1058 cm^{-1}). Diferentes picos foram propostos para representação de caracteres cristalinos e amorfos, atribuídos principalmente a moléculas de celulose em dois comprimentos de onda (~1428 cm^{-1} para cristalino e 893 cm^{-1} para amorfo) (Ciolacu *et al.*, 2011). O pico representativo da celulose cristalina (1428 cm^{-1}) apresenta intensidade baixa, no caso de lentilha-d'água, o que indica sua natureza de baixa cristalinidade. Na banda de 893 cm^{-1} Yadav atribui este comprimento de onda à celulose amorfa que é maior a celulose cristalina, o que é indicativo da disponibilidade de celulose biodegradável e, portanto, de melhor produção de biogás.

Sadhukhan 2016, demonstrou picos semelhantes em sua análise FTIR da espécie *Lemna major*, com picos referentes aos grupos funcionais C-O (1046 cm^{-1}), N=O (1319 cm^{-1}) e C=O (1605 cm^{-1}).

Imron *et al*, 2021 apresentou um dos trabalhos mais recentes envolvendo análise FTIR envolvendo a espécie *Lemna minor*. A FIGURA 12 demonstra as 4 amostras utilizadas para este trabalho na análise de FTIR e na TABELA 3 podemos ver as identificações das bandas. Foram utilizados a amostra sem tratamento (*Lemna*), amostra lavada com água (*Lemna* H2O), amostra pós extração soxhlet, para remoção de lipídios e extrativos (*Lemna* ET) e amostra pós-tratamento hidrotérmico (*Lemna* PH), apesar das amostras terem sido submetidas a diferentes situações os

picos mais acentuados não mudaram e somente alguns pontos apresentaram ruídos ou picos não identificados.

Figura 12. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de *Lemna minor* (FTIR). As letras (de A até H) estão identificando cada região analisada em transmitância identificada na literatura e a análise foi realizada com o comprimento de onda entre 400 a 4000. *Lemna* (material bruto), *Lemna* H2O (*Lemna* lavado com água), *Lemna* ET (lavado com etanol) e *Lemna* PH (material pós-tratamento hidrotérmico).



Fonte: o autor.

Tabela 3. Identificação das bandas de FTIR de *Lemna minor*. Os comprimentos de ondas demonstram onde cada tipo de grupos funcionais e diferentes estruturas químicas se localizam em determinada amostra durante a análise FTIR. As bandas de identificação também foram detectadas pelos autores das referências citadas na tabela.

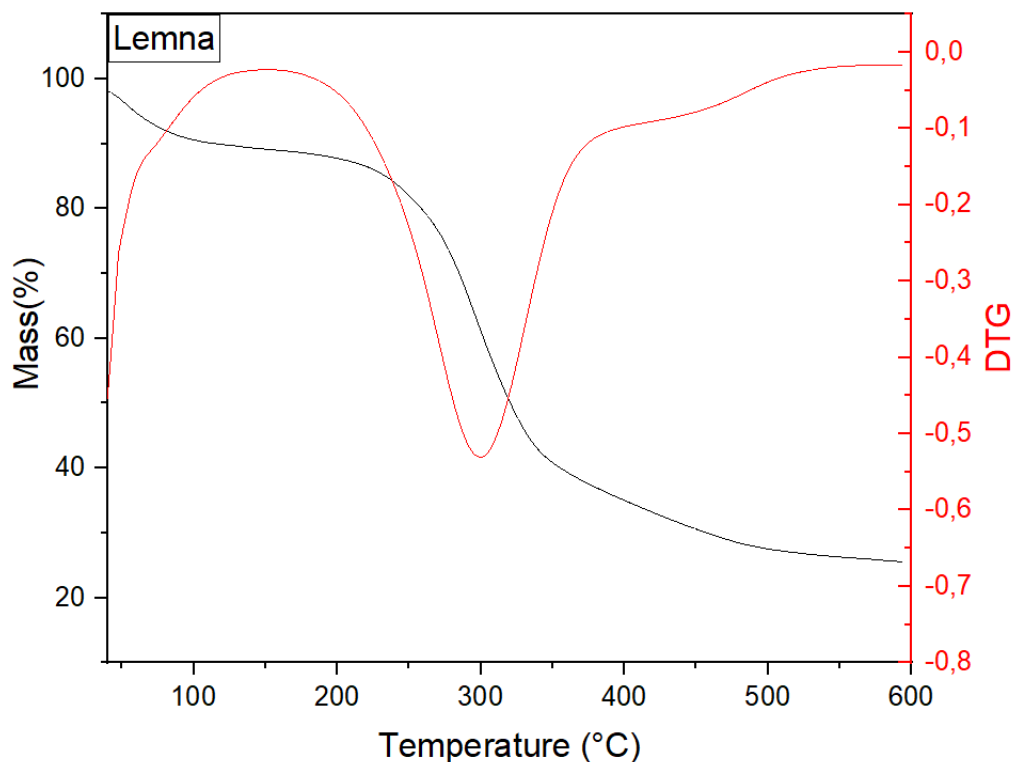
Comprimento de Onda (cm ⁻¹)	Identificação das bandas de absorção	Referências*	Letras que identificam as bandas
1000-1130	C –O (Alongamento); C–O–C (Vibração); O–H de polissacarídeos.	1,2,3,4	A
1239	Vibração de Ácidos carboxílicos.	2	B
1320	N=O (alongamentos).	3	C
1423-1417	O–H fenólico (dobras); C–O alongamento de carboxila.	1,2	D
1620	C=O, C=C (alongamento).	1,3	E
2852	CH ₂ (vibração).	2	F
2922	C–H (dobra).	1,2	G
3264	O–H (alongamento).	1,2,3,4	H

Fontes: *Adaptado de ¹Imron *et al*, 2021; ²Guzman *et al*, 2013; ³Sadhukhan *et al*, 2016; ⁴Yadav *et al*, 2016.

5.3. Termogravimetria

Em sua pesquisa, Guzmán et.al (2013), realizou uma análise próxima do observado na análise de termogravimetria de *Lemna minor* deste trabalho (FIGURA 13). O primeiro estágio abaixo de 250°C é a perda de água adsorvida e alguma desidratação das unidades estruturais de celulose. O segundo estágio entre 250 e 400°C supõe-se que seja a decomposição térmica de hemicelulose e celulose de ligações b-(1 → 4)-glicosídica. Acima de 400°C provavelmente envolve a decomposição da celulose e lignina restante. A principal perda de peso ocorreu próxima à temperatura de 300°.

Figura 13. Análise TG de *Lemna minor*. A esquerda o gráfico apresenta a perda mássica em porcentagem. DTG refere-se a derivada da primeira curva termogravimétrica. As condições de análise foram as seguintes: atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 100 mL.min⁻¹, em uma rampa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, massa da amostra de 5 a 7 mg.

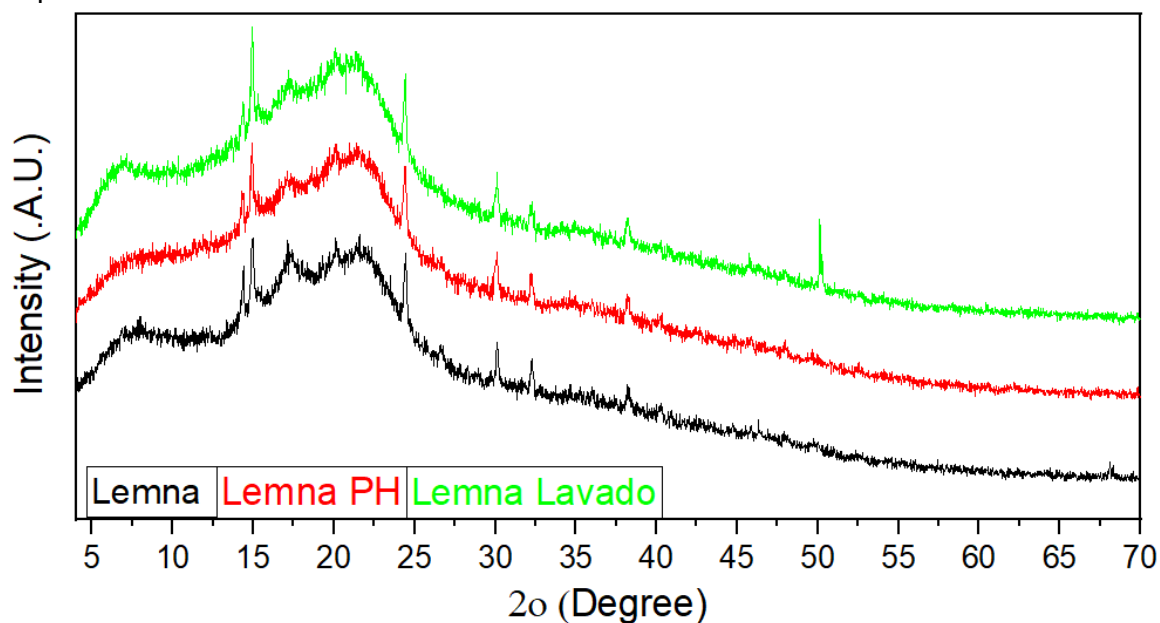


Fonte: o autor.

5.4. Índice de cristalinidade

Yadav *et al.* 2016, realizou uma digestão anaeróbica com esterco de gado para produção de metano, em seu trabalho é descrito que quanto maior índice de celulose amorfa, melhor o rendimento dos microrganismos para a degradação da matéria biodegradável. No mesmo estudo foi identificado em uma análise de FTIR, picos que demonstraram que o pico de celulose cristalina é menor que o pico de celulose amorfa. No atual trabalho foi identificado maior índice de celulose cristalina em relação a celulose amorfa analisado na FIGURA 14 e TABELA 4 de Difração de raio X (XRD) através do método descrito por Terinte *et al.* (2011). A celulose cristalina é maior que a celulose amorfa (65% e 34%, respectivamente), apesar do menor valor de celulose amorfa, a produção de metano foi viável com o inóculo utilizado.

Figura 14. Gráfico de difração de raio X. Cada amostra foi identificada com sua respectiva cor.



Fonte: o autor.

Tabela 4. Dados dos pontos utilizados para o cálculo de cristalinidade e região amorfa. I₀₀₂: representa o pico mais alto do gráfico de XRD referente ao pico cristalino. I_{am}: representa o vale mais baixo do gráfico de XRD referente ao ponto amorfo.

Amostra	I ₀₀₂	I _{am}	I _{cr} %	I _{am} %
Lemna	4009,62	1397,85	65,14	34,86
Lemna lavado	4578,38	1573,29	65,64	34,36
Lemna PH	4187,59	1448,78	65,40	34,60

Fonte o autor.

5.5.Características dos inóculos: pH inicial; Sólidos Totais (ST); Voláteis (SV) e fixos (SF)

O inóculo metanogênico de cor preta apresentou grânulos de microrganismos foram coletados de um reator de tratamento de resíduos de um abatedouro de aves, apresentou pH inicial de aproximadamente 7,07. O inóculo acidogênico possui cor branca com pH inicial levemente ácido, em torno de 6,2.

Os sólidos totais, sólidos voláteis e sólidos fixos do inóculo metanogênico foram respectivamente 7,4 g/L (ST), seguido de 6,16 g/L (SV) e 1,23 g/L (SF). Os sólidos

totais, sólidos voláteis e sólidos fixos do inóculo acidogênico foram respectivamente 5,6 g/L (ST), seguido de 5,06 g/L (SV) e 0,53 g/L (SF).

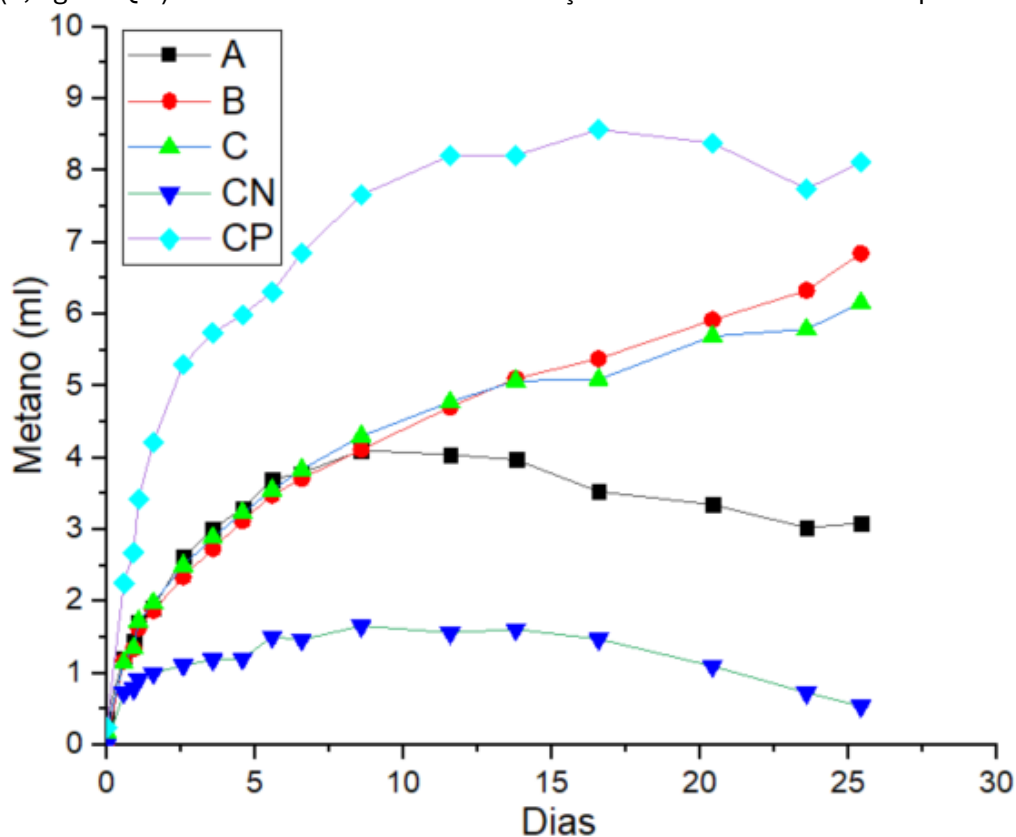
5.6. Produção do biogás - perfil de atividade

5.6.1. Metano

Uma característica desta biomassa para a produção de biogás é a presença de amido que representa de 7% da biomassa (Kaur *et al.* 2019), que com o auxílio do tratamento hidrotérmico (15 min a 121°) pode ter sido utilizado como fonte de carbono pelos inóculos durante a produção dos gases. Isso foi observado principalmente na análise do metano com um período de amostragem de 610h (FIGURA 15). O maior volume produzido de 6,85 ml foi observado na concentração intermediária de 2,6g/L de DQO (reatores B) (em 610 horas a produção começou a estabilizar), em seguida o reator com maior concentração de matéria orgânica 5,2g/L de DQO (reatores C) produziu 6,4 ml (em 300h apresentou perfil de estabilidade de produção) e a menor produção de 5,8 ml foi observada na menor concentração com 1,3g/L de DQO(reatores A) (em 278h já apresentou perfil de estabilidade na produção de metano).

No controle negativo já era esperado obter o menor tempo de produção e menor rendimento, onde já nas primeiras 62h apresentou o perfil de estabilização no volume produzido, seu pico de produção ficou em torno de 1,66 ml em cerca de 206h. No controle positivo em 300h de experimento, sua curva de produção começou a apresentar o perfil de estabilização, com pico de produção de 9ml a partir das 400h.

Figura 15. Perfil temporal da produção acumulada de metano. Produção de metano(ml) referente ao período de aproximadamente 25 dias. Controle positivo (CP) composto por sacarose (71,4 mg), controle negativo (CN) composto somente do inóculo metanogênico, amostra A referente a concentração de 1,3 g/L DQO, amostra B (2,6 g/L DQO) e amostra de C (5,2 g/L DQO). Todas as diferentes concentrações foram realizadas em triplicata.



Fonte: o autor.

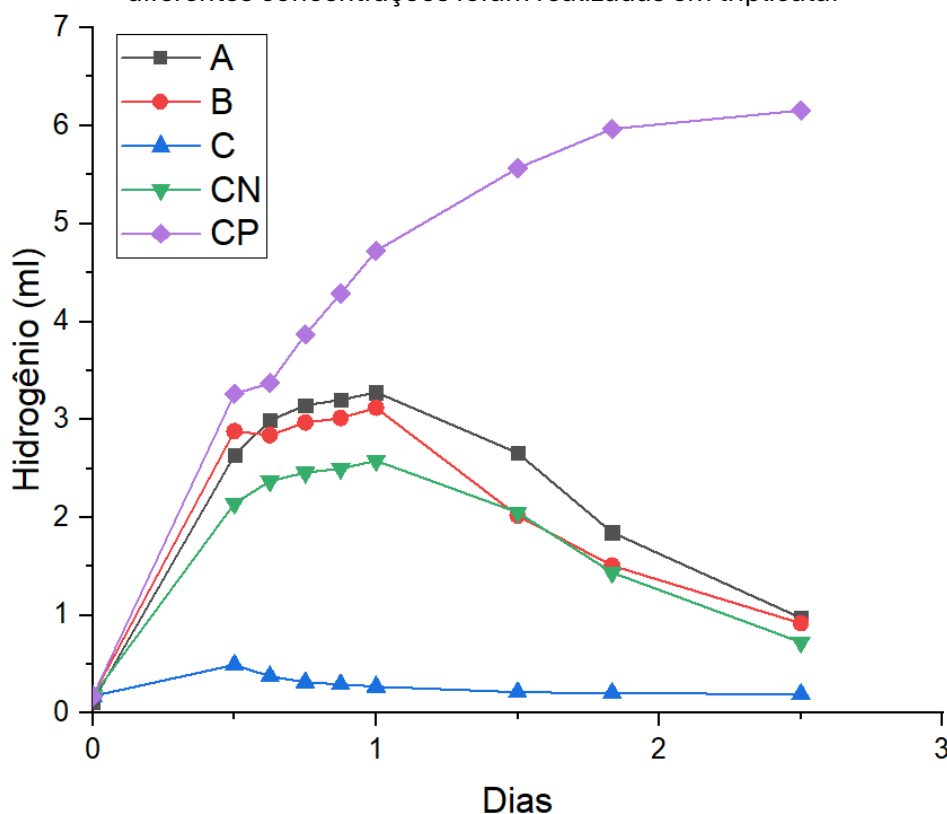
5.6.2. Hidrogênio

A produção de hidrogênio apresentou um perfil de geração mais rápido se comparado ao experimento do metano (FIGURA 16). O período de amostragem durou 60h e foi observado que a produção já apresentava estabilização em cerca de 24h, a produção máxima de hidrogênio foi de 3,34 ml na concentração de 1,3g/L (A), com 15h de tempo de estabilização de produção, seguido de 3,14ml produzidos na concentração de 2,6g/L (B), com 15h de tempo de estabilização de produção. Já na concentração de 5,2g/L de DQO(C), a maior concentração de extrato de *Lemna m.* se demonstrou inibir a atividade do inóculo de hidrogênio do começo ao fim do experimento, pois a produção máxima foi de 0,52ml nas primeiras 12h e posteriormente o volume acumulado do metano em cada reator decaiu ao longo das

60h para cerca de 0,2ml de hidrogênio, estes valores se mostraram menores que o próprio controle negativo (inóculo + água) durante o período de amostragem.

Durante a amostragem do controle negativo, foi observado um perfil de estabilização semelhante aos reatores com concentração de 1,3g/L e 2,6g/L de *Lemna m.*, com tempo de estabilização em torno de 15h, mas com uma produção máxima de hidrogênio em cerca de 2,58ml. No controle positivo a estabilidade foi observada em cerca de 40h e com produção máxima de 6,16 ml de gás hidrogênio.

Figura 16. Perfil temporal da produção acumulada de hidrogênio. Produção de hidrogênio (ml) referente ao período de 2,5 dias. Controle positivo (CP) composto por sacarose (71,4 mg), controle negativo (CN) composto somente do inóculo acidogênico, amostra A referente a concentração de 1,3 g/L DQO, amostra B (2,6 g/L DQO) e amostra de C (5,2 g/L DQO). Todas as diferentes concentrações foram realizadas em triplicata.



Fonte: o autor.

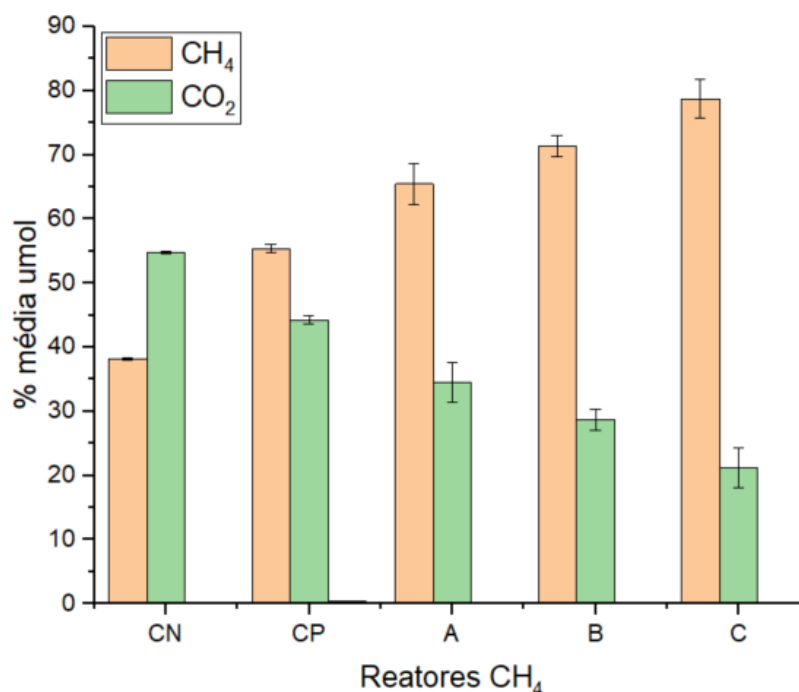
5.7. Composição do biogás

5.7.1. Metano

Yadav *et al.* 2016, obteve um rendimento de metano compondo o gás, de 63,5% na razão: 75:25 (lentilhas d'água/ esterco de gado) e 36,5% de CO₂ (compondo o biogás) obtido na mesma proporção, que ocorreu no vigésimo oitavo dia de amostragem.

Analisando a porcentagem média de metano referente a composição do gás de cada ponto (FIGURA 17 e TABELA 5), cerca de 41,13% de metano foi aferido compondo o biogás no controle negativo durante o período de amostragem. No controle positivo a média em umol% de CH₄ compondo o gás foi de 55,36% do biogás. Nas amostras A, B e C, foram observados 65,47%, 71,36% e 78,72% (%umol) respectivamente, de porcentagem média de metano presente no biogás. A maior porcentagem de CH₄ compondo o biogás foi observada nos reatores C, com 78,72% de CH₄ e 21,2% de CO₂ compondo o biogás, em um período de amostragem de aproximadamente 25 dias (610 horas).

Figura 17. Composição do gás durante o experimento do metano.



Fonte: o autor.

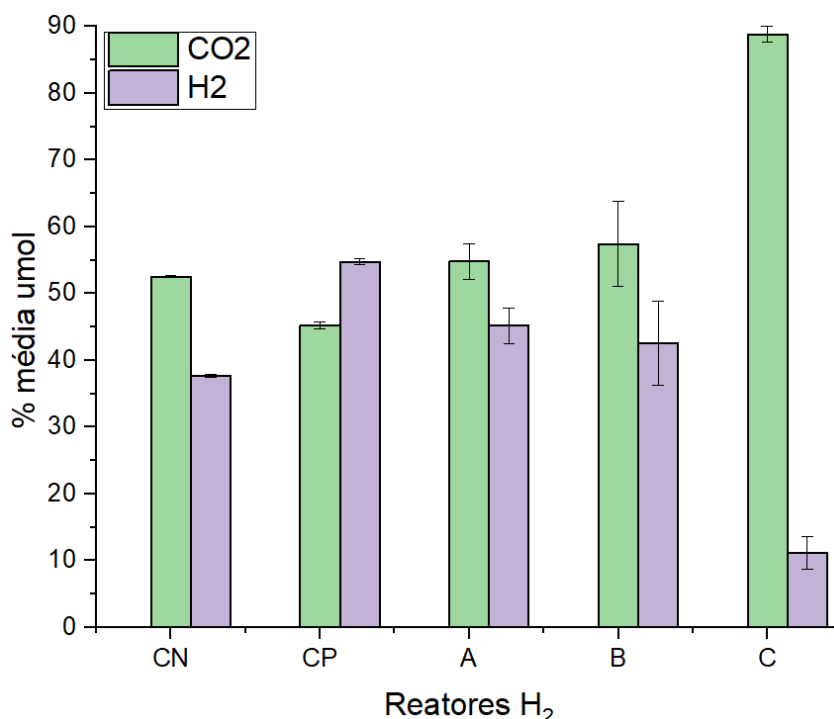
Tabela 5. Composição do biogás durante o experimento com CH₄. O gráfico está representando a porcentagem média de cada tipo de gás presente no biogás em umol.

MÉDIA DE CH ₄ , CO ₂ e H ₂ NO BIOGÁS (%)						Desvio padrão			
	CN	CP	A	B	C	CP	A	B	C
CH ₄	41,13	55,36	65,46	71,36	78,72	0,69	3,17	1,63	2,97
CO ₂	58,87	44,25	34,53	28,63	21,20	0,69	3,17	1,63	3,05
H ₂	0	0,37	0	0	0	0,09	0	0	0

Fonte: o autor.

5.7.2. Hidrogênio

A análise da porcentagem média do gás de cada ponto (contido na seringa, demonstrado na FIGURA 18 e TABELA 6), resultou em cerca de 37,65% de hidrogênio no biogás foi observado no controle negativo, podendo demonstrar que o inóculo possivelmente fez reservas de sacarose em suas células (sacarose advinda da própria produção do inóculo) o que contribuiu para ele produzir hidrogênio mesmo sem adição de substrato. No controle positivo a média em umol% de hidrogênio detectado foi de 54,78% do biogás. Nas amostras A, B e C, foram observados 45,19%, 42,57% e 11,16% (%umol) respectivamente, de H₂ médio presente no biogás. Vale ressaltar que a última porcentagem referente a maior concentração de extrato de *Lemna minor* (5,2g/L DQO) acabou demonstrando comportamento inibitório durante a produção do gás hidrogênio.

Figura 18. Composição do gás durante o experimento do Hidrogênio.

Fonte: o autor.

Tabela 6. Composição do biogás durante o experimento com H₂. O gráfico está representando a porcentagem média de cada tipo de gás presente na composição do biogás em umol.

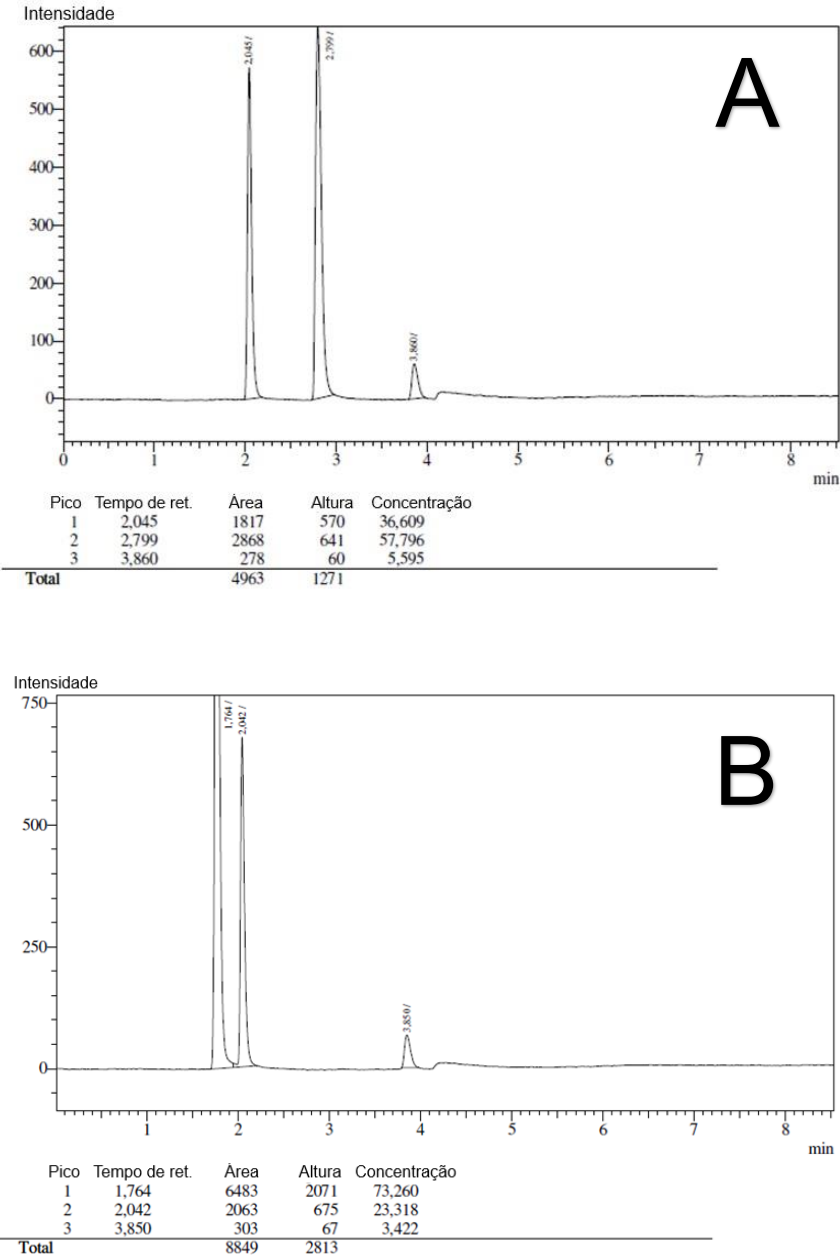
MÉDIA DE CH ₄ , CO ₂ e H ₂ NO BIOGÁS (%)						Desvio padrão			
	CN	CP	A	B	C	CP	A	B	C
CH ₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CO ₂	52,55	45,22	54,81	57,43	88,84	0,50	2,63	6,35	2,51
H ₂	37,65	54,78	45,19	42,57	11,16	0,50	2,63	6,35	2,51

Fonte: o autor.

O primeiro cromatograma (FIGURA 19 A) é um exemplo que demonstra os picos durante a análise de produção de CH₄ e no segundo cromatograma (FIGURA 19 B) representa um exemplo dos picos que apareceram durante a análise de produção de H₂. O tempo de retenção do hidrogênio foi detectado em 1,8 minutos, seguido do nitrogênio em 2,06 minutos, o metano em 2,8 minutos e o dióxido de carbono em 3,9 minutos. Durante as análises o tempo de retenção do nitrogênio injetado no reator somado a medição com o manômetro, serviram de controle para averiguar se os reatores estavam com vazamentos no septo.

Neste método cromatográfico o N₂ não foi incluído no balanço do biogás total produzido, pois este gás foi utilizado para criar o ambiente anaeróbio dos reatores. Na FIGURA 19 (A), temos o exemplo de cromatograma onde podemos observar o pico no ponto 2,045 (minutos) que se refere ao N₂ injetado no reator, em seguida o ponto 2,8(minutos) referentes ao pico de CH₄ e por último o ponto 3,8 (minutos) referente ao CO₂. O pico de detecção do H₂ aparece entre 1,76 e 1,8 minutos (B).

Figura 19. Exemplo do cromatograma do GC-TCD para análise de gases, utilizando a metodologia descrita por Adorno; Tomita (2014).



Fonte: Adaptado do software Lab solutions da marca Shimadzu.

5.7.3. Remoção de DQO

Peixoto *et al.* 2012, obteve a porcentagem de remoção de DQO de 50,7% em reatores fixos de 2L com 1 L de volume útil. Kaur *et al.* 2019, obteve resultados de produção de metano especificamente com a espécie *Lemna minor* e utilizou a razão %TOCr (total organic carbon removal) para a análise de metano, com eficácia de remoção entre 48,2-54,6%. Seu experimento foi realizado com frascos de 125ml, com 100ml de volume de trabalho, com inóculo contendo 1,8g SV (sólidos voláteis) em 15 dias de experimento.

As condições da incubadora shaker foram utilizadas como base para este trabalho, sendo a agitação em 120 rpm e temperatura de 37°. Seu melhor rendimento de metano (32,9 – 52,5 m³/tonelada) foi encontrado no cenário em que ela utiliza o pré-tratamento hidrotérmico que gera menos inibidores do que o pré-tratamento químico.

No atual trabalho, que também envolveu a espécie *Lemna minor*, foi obtido uma porcentagem de DQO removida nos reatores de metano (TABELA 7), com valores de 69,02%, 90,85% e 93,49%, respectivamente para as concentrações A (1,3g/L DQO), B (2,6g/L DQO) e C (5,2g/L DQO). Supõe-se que este valor de alta remoção da matéria orgânica deve-se ao longo tempo de amostragem (cerca de 610h de duração), baixo volume utilizado por reator (20ml de volume útil, com 18ml de headspace) e alta porcentagem de metano produzido.

Em relação aos reatores de hidrogênio, a porcentagem de DQOr (DQO removida) foi de 21,8%, 58,17% e 74,52%, das respectivas amostras A (1,3g/L DQO), B (2,6g/L DQO) e C (5,2g/L DQO), os valores de DQOr indicam que a matéria orgânica foi removida ao longo do aumento de concentração, mas a matéria orgânica foi utilizada na produção de CO₂ e não de H₂, como foi visto na FIGURA 18. Portanto, pode ter ocorrido a inibição do processo acidogênico por inibidores da digestão anaeróbia, mas com os dados da DQO removida, também pode se supor que a matéria orgânica foi utilizada por outros tipos de microrganismos, não somente os acidogênicos para a produção de outros gases, neste caso, o dióxido de carbono.

Tabela 7. DQO removida e eficiência de cada concentração de DQO por reator. Nesta tabela a %DQO removida representa a porcentagem média de matéria orgânica removida após a produção de biogás. É demonstrado também quantos ml/g são produzidos pelo uso das concentrações A, B e C.

	DQO removida (%)			Volume produzido por g de DQO (ml)		
	A	B	C	A	B	C
Concentração	(1,3g/L)	(2,6g/L)	(5,2g/L)	(1,3g/L)	(2,6g/L)	(5,2g/L)
CH ₄	69,02	90,85	93,49	3,85	2,63	1,23
H ₂	21,80	58,17	74,51	2,57	1,21	0,10

Fonte: o autor.

5.7.4. Inibidores da produção de biogás

Compostos fenólicos, ácidos graxos e nitrogênio amoniacal, são alguns dos principais fatores de inibição da produção de biogás citados na literatura.

De acordo com o estudo de Escher (1996), compostos fenólicos têm a capacidade de inibir o gradiente eletroquímico de prótons nas membranas celulares, resultando em redução no transporte de elétrons e na produção de energia. Segundo estudos de O'Connor (1989); Wang (1989); Sierra-Alvarez (1991) e Olguin-Lora (2003); é gerada uma toxicidade que é associada ao tamanho molecular, substituição no anel aromático e apolaridade da molécula. Além disso, tais compostos fenólicos podem afetar a cadeia trófica entre microrganismos, impactando a produção de ácidos graxos, hidrogênio e consequentemente o metano, segundo Wang (1989) e Fedorak (1984). Em um estudo conduzido por Gülçin *et al.* (2010), foram identificados 22 µg/mg e 16,7 µg/mg de compostos fenólicos totais no extrato aquoso e extrato etanólico, respectivamente, na espécie *Lemna minor*. Trabalhos como o de Gülçin, (2010); Duangjarus, 2022; Sil, 2023 e Dogan, S. Y. (2024); relatam ações biológicas desta espécie, como sua atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

Outro fator inibitório pode ocorrer durante a acetogênese, os ácidos graxos de cadeia longa sofrem oxidação, resultando na formação de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Posteriormente, o acetato, hidrogênio e dióxido de carbono são convertidos em metano e dióxido de carbono, por metanogênicos acetotróficos e hidrogenotróficos (Zinder, 1984). Alternativamente, o acetato pode ser

oxidado a dióxido de carbono e hidrogênio por meio da oxidação sintrófica do acetato, acoplada à metanogênese hidrogenotrófica (Zinder, 1984; Schnürer *et al.*, 1999). Estas etapas de degradação podem ocorrer de maneira sincronizada, e a diminuição da atividade de um ou vários grupos microbianos pode afetar severamente a eficiência e até levar à falha do processo de formação de gases durante a digestão anaeróbia.

Trabalhos indicaram que biomassas ricas em proteínas possuem alto potencial de produção comercial de biogás (Nordell *et al.*, 2013). Mas infelizmente, em altas concentrações, a inibição pode ocorrer devido à instabilidade do processo devido à liberação de nitrogênio amoniacal (Chen *et al.*, 2008; Yenigün & Demirel, 2013), que causa a inibição do processo de degradação microbiana. A amônia é liberada durante a acidogênese, a partir da degradação de aminoácidos, e em concentrações elevadas, ela é tóxica para consórcios microbianos, especialmente os produtores de metano (Chen *et al.*, 2008).

5.8. Perfil inicial para produção bioetanol

O teor de lignina (17,6%) se encontra alto se comparado aos outros encontrados na literatura (3,5% - 7,72%). O valor de celulose (18,5%) analisado foi inferior se comparado aos trabalhos anteriormente citados (23,5—35%), isso é um indicativo que esta biomassa apresentou características menos favoráveis para uma futura fermentação alcoólica, mas um fator que pode aumentar seu potencial energético é o uso de enzimas para a hidrólise da celulose e do amido encontrado em lentilhas d'água.

A biomassa com pré-tratamento hidrotérmico não apresentou formação de inibidores, mesmo sendo submetida a uma temperatura de 121°C, a concentração de furfural detectada ficou entre 0,005 e 0,015 g/L, já a concentração de hidroximetilfurfural (HMF) ficou entre 0,008 e 0,005 g/L, valores estes que são irrelevantes para serem consideradas inibitórias, sendo furfural >1g/L e HMF >1g/L as concentrações de inibição. (Taherzadeh 2011; Kaur *et al.* 2019).

Por possuírem a capacidade de absorver nutrientes e remover poluentes, *Lemna m.* é citada em pesquisa envolvendo fitorremediação de águas residuais (Heitzman *et al.*, 2024). Alguns fatores podem influenciar a composição final de lentilhas d'água, dentre eles podemos citar a intensidade de luz durante a fase de

reprodução e dependendo do período do ciclo de vida, as lentilhas apresentam maior ou menor quantidade de amido (Pagliuso, 2018). Essas características e o local onde ela se desenvolve pode influenciar na quantidade de componentes lignocelulósicos, o que se espera destas biomassas é alto teor de celulose e baixa recalcitrância (baixo teor de lignina).

Kaur *et al.* (2019), relata a maior produção de glicose em torno de 36,5-44,2g e o maior rendimento de etanol em torno de 0,167-0,231 g/g, com o mesmo tratamento hidrotérmico utilizado.

5.9. Análise inicial do potencial econômico do Biogás

Lemna minor apresentou um volume de CH₄ interessante nos reatores B e C, 6,85 ml e 6,4 ml, respectivamente. Onde cerca de 78,72% (reatores C) da composição do biogás foi identificada como CH₄ nos cromatogramas. Por conta destes resultados, há a possibilidade de usar *Lemna minor* como biomassa para produção de biogás, a biomassa possui alta taxa de reprodução, podendo ser adquirida em grande quantidade e servir como fonte de alimentação de biorreatores.

O custo de instalação de um biodigestor pode variar dependendo de vários fatores, incluindo o tamanho do projeto e as especificidades de sua instalação. No entanto, um estudo realizado por Calza *et al.* (2015), no município de Cascavel – PR, Brasil, avaliou os custos envolvidos na construção de modelos de biodigestores (indiano, chinês e canadense). O biodigestor modelo canadense apresentou o melhor custo-benefício de construção e de implantação, variando de R\$ 2.104,00 a R\$ 7.266,0012. Para a utilização em biorreatores, outros inóculos (mais acessíveis) podem ser utilizados, assim como, fezes de suínos, caprinos e bovinos.

5.9.1. Cálculo de produção do metano

Para o cálculo de volume de metano diário e mensalmente produzido, a seguinte equação foi utilizada:

$$\text{Vol. (CH}_4\text{)} = ((\text{CM}_0 \cdot \text{Q}) \cdot \text{Kr}) \cdot \text{Y (CH}_4\text{)} \text{ (Equação 15)}$$

Sendo:

CM₀- concentração de matéria orgânica inicial (g/L)

Q- Vazão de *Lemna minor* produzida (g/dia)

Kr- constante de remoção DQOr (%)

Y(CH₄) (teórico)- volume de metano produzido por g de DQOr (L)

Com uma produção teórica de 100kg de *Lemna minor* por dia, concentração teórica de 0,35 L/g DQOr (L/g) máxima do metano (Angelidaki, 2004), somadas aos dados do experimento, Kr=0,9 (% de eficiência de matéria orgânica removida do reator de concentração 2,6 g/L DQO) e CM₀=22 g/L (concentração de DQO inicial de *Lemna m.*), o volume teórico de CH₄ produzido seria igual a 693 m³/dia e cerca de 20.790 m³/mês.

5.9.2. Rendimento energético

Para o cálculo energético foi utilizado a equação 16. Utilizando os dados de produção de CH₄ diária, a eficiência de 30% de que um gerador somado a um motor consegue aproveitar com a queima do metano e o rendimento do metano em torno de 9,97 KWh/m³, foi obtido o rendimento teórico de 2.072,76 KWh/dia e 62.182,9 KWh/mês. Considerando o valor de KWh entre R\$ 0,60 e R\$1,00, os produtores de lemna advinda da piscicultura, poderiam ter uma economia de energia aproximada entre R\$ 37.309 e R\$ 62.182 por mês (com o rendimento teórico de 100kg de biomassa de *Lemna minor* diário).

$$\text{KWh/dia} = V(\text{CH}_4) \cdot n \cdot \text{Re}(\text{CH}_4) \text{ (Equação 16)}$$

Sendo:

V(CH₄) -Volume de metano produzido por dia (m³/dia).

n- A eficiência de energia de um gerador + motor (%).

Re (CH₄) - Rendimento energético do metano (KWh).

6. CONCLUSÕES

Para a produção de etanol efetiva com esta biomassa de *Lemna minor*, estudos deverão ser conduzidos para realizar uma hidrólise enzimática e aumentar o aproveitamento do amido e da celulose presente na fermentação, com o uso de amilases e celulases o potencial energético da biomassa pode aumentar. No presente trabalho o valor de lignina total (somados a lignina solúvel e insolúvel em ácido) foi de 17,6%, mais recalcitrante que o valor encontrado na literatura (4,1%). O valor de celulose (18,5%) analisado também foi inferior se comparado aos trabalhos anteriormente citados (23,5-35%).

Durante a produção de hidrogênio os resultados demonstraram que o próprio inóculo já produziu um volume considerável de H₂. A menor concentração do extrato de *Lemna m.* (encontrada no reator A, 1,3g/L DQO) produziu o melhor resultado com um aumento do volume produzido de 12,34% em relação ao controle negativo. Em relação a porcentagem média (% umol) de hidrogênio no perfil das amostras A(1,3g/L), B (2,6 g/L) e C (5,2 g/L), foram observados 45,19%, 42,57% e 11,16% de H₂ compondo o biogás, demonstrando que o aumento das concentrações do extrato, pode ter ocasionado uma inibição de produção do hidrogênio, ou o consórcio microbiano pode ter utilizado outra rota metabólica que ao invés de produzir H₂ acabou gerando CO₂.

As prováveis causas da inibição, podem estar relacionadas aos subcomponentes presente na biomassa como compostos fenólicos, ácidos graxos e proteínas, que em quantidades excessivas ou insuficientes, podem acarretar o desequilíbrio da rota metabólica dos microrganismos acidogênicos.

Os resultados da produção de metano foram promissores, pois em um período de 25 dias, as concentrações dos reatores B e C de *Lemna* (2,6g/L DQO e 5,2 g/L DQO) apresentaram os melhores resultados em volume produzido, 6,4ml e 6,85ml respectivamente, produziu em média 71,36% (nos reatores B) e 78,72% (nos reatores C) de metano presente na composição do gás, cerca de 28,63% e 21,2% de CO₂ (respectivos aos reatores B e C) e apresentou eficácia de 90,85% e 93,49% de remoção da matéria orgânica (DQOr respectivos aos reatores B e C). Obteve uma maior porcentagem de metano produzido, em menor tempo de análise, com menor produção de CO₂ e com maior eficiência de remoção da matéria orgânica dos reatores, se comparado aos trabalhos relacionados a *Lemna minor*.

REFERÊNCIAS

ADORNO, M.; TOMITA, I. Desenvolvimento e validação de método para determinação de nitrogênio, hidrogênio, metano e gás carbônico por CG/DCT. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), **37a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Natal, 26 mai. 2014.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 3, n. 2, p. 117–129, jan. 2004. DOI: 10.1007/s11157-004-2502-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-004-2502-3>. Acesso em: 27 set. 2024. Acesso em: 2 dez. 2022.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th Edition, American Public Health Association, Washington DC. 2001.

APPENROTH, K.J. *et al.* Accumulation of starch in duckweeds (Lemnaceae), potential energy plants. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 27, p. 2621–2633, nov. 2021. DOI: doi.org/10.1007/s12298-021-01100-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34924714/>. Acesso em: 18 nov 2022.

ARGUN, H., KARGI F., KAPDAN, I. K., OZTEKIN, R. 2008. Hydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1813-1819, abr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.038>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319908001365>. Acesso em: 02 jul. 2024.

CALZA, L.F. *et al.* Avaliação dos custos de implantação de biodigestores e da energia produzida pelo biogás. **Engenharia agrícola**, v. 35, n. 6, p. 990–997, nov. - dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v35n6p990-997/2015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eagri/a/ngnkXvLLKcpYg4RM4nBZcRR/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 20 jul. 2023.

CHEN, G. *et al.* A review on bioenergy production from duckweed, **Biomass and Bioenergy**, Volume 161, n. 106468, jun. 2022. DOI: doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106468. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953422001295>. Acesso em: 07 jul. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044–4064, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852407001563>. Acesso em: 23 jul 2023

COONEY, M.; MAYNARD, N.; CANIZZARO, C.; BENEMANN, J. Two phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2641 – 2651, out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.054>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852406005190>. Acesso em: 03 jul. 2024.

DEMANN J. *et al.* Nutritional Value of Duckweed as Protein Feed for Broiler Chickens-Digestibility of Crude Protein, Amino Acids and Phosphorus. **Animals (Basel)**, v.13, p. 130, dez. 2022. DOI: 10.3390/ani13010130. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/1/130>. Acesso em: 23 jul 2023.

DOGAN, S. Y. Antimicrobial Properties of Lyophilized *Lemna minor* L. Extract Obtained by Microwave Extraction. **International Journal of Science, Engineering and Management**, v.11, p. 37-40, mai. 2024. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/381926157_Antimicrobial_Properties_of_Lyophilized_Lemna_minor_L_Extract_Obtained_by_Microwave_Extraction. Acesso em: 18 ago. 2024.

DUANGJARUS, N. *et al.* Antimicrobial and Functional Properties of Duckweed (*Wolffia globosa*) Protein and Peptide Extracts Prepared by Ultrasound-Assisted Extraction. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2348, ago. 2022. DOI: 10.3390/foods11152348. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35954113/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

ESCHER, B. I. *et al.* Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. **Environmental Science & Technology**, v. 30(12), p.3071–3079, set. 1996. DOI: doi.org/10.1021/es960153f. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es960153f>. Acesso em: 8 jun. 2023.

FAIZAL, A. *et al.* Production of bioethanol from four species of duckweeds (*Landoltia punctata*, *Lemna aequinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza*, and *Wolffia arrhiza*) through optimization of saccharification process and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, p. 294–301, jan. 2021. Doi:10.1016/j.sjbs.2020.10.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20304848>. Acesso em: 20 nov. 2022.

FEDORAK, P. M.; Hruđey, S. E. The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. **Water Research**, v.18, p.361–367, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90113-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90113-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0043135484901131>. Acesso em: 18 mai. 2023.

FERNANDES, B.S., PEIXOTO, G., ALBRECHT, F.R., SAAVEDRA, N.K.D.A., ZAIAT M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p.143-148, jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.esd.2010.03.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0973082610000165>. Acesso em: 20 jul. 2024.

GALVANI, F.; Gaertner, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E), v.63, p. 9, 2006.

GÜLÇİN, I. *et al.* Antioxidant, Antibacterial and Anticandidal Activities of Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). **Turkish Journal of Biology**, v.

34, p. 175-188, mai. 2010. DOI:10.3906/biy-0806-7. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285036697_Antioxidant_antibacterial_and_anticandidal_activities_of_an_aquatic_plant_Duckweed_Lemna_minor_L_Lemnaceae. Acesso em: 20 jul. 2023.

HEITZMAN, B. S. *et al.* Duckweed application in nature-based system for water phytoremediation and high-value coproducts at family agrisystem from a circular economy perspective. **Science of The Total Environment**, v. 919, n. 170714, abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170714>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969724008532>. Acesso em: 15 jun. 2024.

KAUR, M. *et al.* An integrated approach for efficient conversion of *Lemna minor* to biogas. **Energy Conversion and Management**. Haryana, v.180, p. 25-35. jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.10.106>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196890418312354>. Acesso em: 22 novembro. 2022

KAUR, M. *et al.* A sustainable biorefinery approach for efficient conversion of aquatic weeds into bioethanol and biomethane. **Energy Conversion and Management**, Haryana, v. 187, p. 133–147, mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.03.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196890419302857>. Acesso em: 20 jul. 2023.

KEANOI N.; HUSSARO K.; TEEKASAP S. The effect of natural water with cow dung and agricultural waste ratio on biogas production from anaerobic co-digestion. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 9, n. 6, p. 529–536, jan. 2013. DOI:10.3844/ajessp.2013.529.536. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/286316421_The_effect_of_natural_water_with_cow_dung_and_agricultural_waste_ratio_on_biogas_production_from_an_aerobic_co-digestion. Acesso em: 27 jul. 2023.

KHAN, N. D. *et al.* Role of Biofuels in Energy Transition, Green Economy and Carbon Neutrality. **Sustainability**, *Pekan*, v. 13, n. 22, p. 12374–12374, 9 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/su132212374>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/22/12374>. Acesso em: 3 ago. 2024.

KRZESŁOWSKA, M. *et al.* Pectinous cell wall thickenings formation – A common defense strategy of plants to cope with Pb. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 354–361, jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.019>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107260/>. Acesso em: 9 ago. 2024.

LANDOLT, E; KANDELER, R. **Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)**. Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, Zurich, v. 4, p. 638, dez.1987.

LAY, J. J.; LEE, Y. J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v. 33, p. 2579-2586, ago. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00483-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00483-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135498004837>. Acesso em: 27 jul. 2023.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Plants of the World Online**. *Lemna minor* L., 2017. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:526194-1>. Acesso em: 22 fev. 2023.

LENG, R. *et al.* Duckweed-a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. **Agricultural and Food Sciences** v.7, p.36. 1995.

LES, D.H. *et al.* Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. **Systematic Botany**. v. 27, p. 221– 240. Jan. 2002. DOI:10.1043/0363-6445-27.2.221. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237476771_Phylogeny_and_Systematics_of_Lemnaceae_the_Duckweed_Family. Acesso em: 22 fev. 2023.

LEVIN, D. B. *et al.* Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173–185, fev. 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319903000946>. Acesso em: 28 jul. 2023.

LI, C.I.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Crit Rev Env Sci Technol**, v.37, p.1-39, jan. 2007. DOI:10.1080/10643380600729071. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/233953557_Fermentative_Hydrogen_Production_From_Wastewater_and_Solid_Wastes_by_Mixed_Cultures. Acesso em: 28 jul. 2023.

LIN, C. Y.; LAY, C. H. Effect of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, Taichung, v. 29, p. 275– 281, mar. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.07.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319903002222>. Acesso em: 28 jul. 2023

LIU Y. *et al.* The influence of different plant hormones on biomass and starch accumulation of duckweed: a renewable feedstock for bioethanol production. **Renew Energy**, Chengdu, v. 138, p. 659–665, ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.128>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960148119301375>. Acesso em: 28 jul. 2023.

LOGAN, B.; OH, S.E.; KIM, I.; VAN GINKEL, S.W. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p.2530-2535, abr. 2002. DOI: 10.1021/es015783i. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12075817/>. Acesso em: 30 jul. 2023

MALAVOLTA, E. e VITTI, Godofredo César e OLIVEIRA, Sebastião Alberto de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS. Acesso em: 29 out. 2024. 1997.

MAYO S.J. *et al.* **Recent progress in the phylogenetic and Classification of Araceae**. In: Wilkin P & Mayo SJ (eds.) Early events in monocot evolution. Cambridge University Press, Cambridge. p. 118-164, mai. 2013.

DOI:10.1017/CBO9781139002950.010. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/271868393_Recent_progress_in_phylogenetics_and_classification_of_Araceae. Acesso em: 27 jul. 2023.

MEEGODA, J. *et al.* A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, p. 2224–2224, out. 2018. DOI: 10.3390/ijerph15102224. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6210450/>. Acesso em: 8 ago. 2024.

NOAA Global **Monitoring Laboratory**. US, 2023. Disponível em:
<https://gml.noaa.gov/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

NORDELL, E. *et al.* Ammonia inhibition in mesophilic anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v.48, p. 901, mai. - jun. 2013. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511313001657>. Acesso em: 9 jul. 2024.

O'CONNOR, O. A.; Young, L. Y. Toxicity and anaerobic biodegradability of substituted phenols under methanogenic conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, p.853, out.1989. DOI:
<https://doi.org/10.1002/etc.5620081003>. Disponível em:
<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620081003>. Acesso em: 11 jul. 2024.

OLGUIN-LORA, P. *et al.* Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. **Environmental Technology**, Cárdenas v. 24, p. 999, ago. 2003. DOI: 10.1080/09593330309385638. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14509391/>. Acesso em: 8 jul. 2024.

PAGLIUSO, D. **Padrões de alocação de carbono estrutural e não estrutural em cinco espécies de lentilhas d'água (Lemnaceae)**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia, São Paulo, 2018. DOI:
[doi.org/10.11606/D.87.2019.tde-10042019-101022](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-10042019-101022). Disponível em:
<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-10042019-101022/pt-br.php>. Acesso em: 18 abr. 2024.

PEIXOTO, G. *et al.* Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, São Carlos, v. 36, p.8953, jul. 2011. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.014>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319911011682>. Acesso em: 8 ago. 2024.

PEIXOTO, G.; LUIS, J.; AUGUSTO, J.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 168, n. 3, p. 651–671, jul. 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9807-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-012-9807-4>. Acesso em: 8 ago. 2024.

PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas**

residuárias industriais. 2011. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, nov. 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-18102012-164602/>. Acesso em: 18 abr. 2024.

ROJAS, M. D. P. **Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, mai. 2010. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.18.2010.tde-11052010-173601>. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-11052010-173601/es.php>. Acesso em: jan. 2024.

SCHNÜRER, A. *et al.* Clostridium ultunense sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Uppsala. v. 49, p. 991, out. 1999. DOI: 10.1099/00207713-46-4-1145. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8863449/>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SEMBADA A. A.; FAIZAL, A. Effect of polyculture cultivation system and addition of abscisic acid (ABA) on enhancement of starch and protein content from duckweeds. **AIP conference proceedings**, Bandung, v. 2120, n. 030026, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5115630>. Disponível em: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2120/1/030026/1024602/Effect-of-polyculture-cultivation-system-and>. Acesso em: 9 ago. 2024.

SIERRA-ALVAREZ, R.; Lettinga, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 544, jan.1991.

SIL, S. K. *et al.* Anatomical Features and Antimicrobial Activity of Duckweed. **Bangladesh Journal of Botany**, Bangladesh, v. 52, p.105, abr. 2023. DOI: 10.3329/bjb.v52i1.65241. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/369779118_Anatomical_Features_and_Antimicrobial_Activity_of_Duckweed. Acesso em: 03 jul. 2024.

SILVA, J.S. HIRASAWA, M.B. VARESCHE, E. FORESTI, M. ZAIAT. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea, **Anaerobe**, São Carlos, v.12, p. 93, abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.12.003>. Acesso em: 01 jul. 2024.

SUN, Y. *et al.* Structural changes in Bamboo cellulose in formic acid. **BioResources**, Guangzhou, v. 3(2), p. 297, out. 2008. DOI: 10.15376/biores.3.2.297-315. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26507967_Structural_changes_in_Bamboo_cellulose_in_formic_acid. Acesso em: 03 jul. 2024.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Chapter 12 - Fermentation Inhibitors in Ethanol Processes and Different Strategies to Reduce Their Effects, **Biofuels**, Sweden, p. 287, jul. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00012-7>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123850997000127>. Acesso em: 9 ago. 2024.

TERINTE N. *et al.* Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques, **Lenzinger Berichte**, v. 89, p. 118, jan. 2011. Acesso em: 02 jul. 2024.

VAN GINKEL, S. W.; OH, S. E.; LOGAN, B. E. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. **International Journal of Hydrogen Energy**, Pennsylvania, v. 30, p. 1535, dez. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.017>. Acesso em: 02 jul. 2024.

WANG, W. *et al.* DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biol**, Pennsylvania, v.10, p. 1, set. 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-205. Acesso em: 02 jul. 2024.

WANG, Y. T. *et al.* The effect of concentration of phenols on their batch methanogenesis. **Biotechnology and Bioengineering**, Lexington, v. 33, p.1353, jul.1989. DOI: 10.1002/bit.260331020. Acesso em: 02 jul. 2024.

YADAV, L. *et al.* An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.119, p. 253, abr. 2017. DOI:10.1016/j.ibiod.2016.09.007. Acesso em: 02 jul. 2024

YANG, G.-L. Duckweed Is a Promising Feedstock of Biofuels: Advantages and Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15231, dec, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232315231>. Acesso em: 02 jul. 2024

YENIGÜN, O.; Demirel, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v.48, p. 901, mai./jun. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511313001657> Acesso em: 01 ago. 2024.

ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 441, mar. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.05.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319905001850> Acesso em: 29 jul. 2024.

ZHAO, X. *et al.* Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). **Carbohydrate Polymers**, Colney, v. 111, p. 410, out. 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.079. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25037369/>. Acesso em: 01 ago. 2024.

ZULIANI, L. *et al.* Biorefinery Gets Hot: Thermophilic Enzymes and Microorganisms for Second-Generation Bioethanol Production. **Processes**, Verona, v. 9, n. 1583, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9091583>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/9/1583>. Acesso em: 29 jul. 2024.

