

ESTELA GATO FERREIRA

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS VIA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA A
PARTIR DO RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DO LÚPULO E DEJETO DE
BOVINOS**

**Botucatu
2024**

ESTELA GATO FERREIRA

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS VIA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA A PARTIR
DO RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DO LÚPULO E DEJETO DE BOVINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção de título de
Mestre em Engenharia Agrícola.

Orientadora: Sarita Cândida Rabelo

Coorientadora: Valeria Cristina Rodrigues
Sarnighausen

Botucatu

2024

F383p

Ferreira, Estela Gato

Produção de biogás via integração lavoura-pecuária a partir do resíduo lignocelulósico do lúpulo e de dejetos de bovinos / Estela Gato Ferreira. -- Botucatu, 2024

167 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu

Orientadora: Sarita Cândida Rabelo

Coorientadora: Valeria Cristina Rodrigues Sarnighausen

1. Biometano. 2. Manejo de resíduos. 3. Caule de lúpulo. 4. Pré-tratamento. 5. Bioenergia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS VIA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA A PARTIR DO
RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE LÚPULO E DEJETO DE BOVINOS**

AUTORA: ESTELA GATO FERREIRA

ORIENTADORA: SARITA CÂNDIDA RABELO

COORIENTADORA: VALERIA CRISTINA RODRIGUES SARNIGHAUSEN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Engenharia
Agrícola, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SARITA CÂNDIDA RABELO (Participação Presencial)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrômicas - Campus de Botucatu

Prof.ª Dr.ª BRUNA SOARES FERNANDES (Participação Virtual)
Biosystems Engineering / University of Manitoba

Prof. Dr. SERGIO AUGUSTO RODRIGUES (Participação Presencial)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrômicas - Unesp

Botucatu, 18 de janeiro de 2024.

Dedico esta dissertação à minha mãe e irmãos,

Renata, Henrique e Igor

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sarita, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de comprometimento e dedicação.

À Profa. Dra. Valeria pela contribuição e ensinamentos no decorrer das atividades.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus queridos pais, avós, tios e padrinhos pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao meu irmão Henrique, que me incentivou desde o começo, e pelo apoio, amor e compreensão durante este período.

À Nathalia Lara, minha companhia preferida desde a graduação até os dias de hoje, que me apoiou em todas as fases e obstáculos, com muito amor e paciência, fundamental para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

À minha querida amiga Nathalia Lossolli pelo apoio e incentivo durante a pós-graduação, sempre presente, atenciosa, amorosa e paciente, que tornou os dias difíceis mais leves.

Às minhas queridas amigas e colegas da área de pesquisa, Ingrid Lorena e Nathalia Barbosa, pelo incentivo e ajuda na minha trajetória pessoal e acadêmica, me acolhendo sempre com muita paciência e carinho, vibrando pelo meu sucesso e felicidade.

À Michelle, pela ajuda e atenção na realização de diversas atividades e etapas pertinentes a esta pesquisa.

Aos meus colegas da área de pesquisa do Laboratório de Bioenergia e Produtos Renováveis (LBPR), Guilherme, Karine e Luiz, sempre atenciosos e prestativos.

À minha amiga e colega da área de pesquisa, Lara Resende, pelo incentivo, ajuda e parceria durante algumas fases de desenvolvimento deste trabalho, assim como em momentos de descontração. Sempre prestativa, paciente e carinhosa.

Ao técnico de laboratório, Marcelo, pela paciência e ajuda, desde o meu primeiro dia de atividade em laboratório. Sempre prestativo e proativo, e me proporcionou risadas em meio a rotina maçante.

RESUMO

A bioenergia, especialmente o biogás, vem despertando grande interesse mundial devido à crescente demanda energética e viabilidade técnico-econômica. Neste mercado, os dejetos bovinos, muitas vezes mal gerenciados e poluentes, são uma fonte de energia significativa, com volume expressivo de matéria-prima. Além disso, devido à expansão do cultivo de lúpulo (*Humulus lupulus L.*) no Brasil, os resíduos gerados em sua poda também podem ser utilizados na digestão anaeróbica (DA), sendo uma alternativa de manejo e aproveitamento. Sendo assim, a junção destes resíduos pode promover uma integração da cadeia lavoura-pecuária, proporcionando um manejo adequado através da geração de bioenergia e biofertilizante. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial metanogênico do resíduo da cultura do lúpulo em processos de mono e co-digestão (co-DA) com dejetos de bovinos. A biomassa lignocelulósica foi pré-tratada hidrotermicamente em três condições, 175, 190 e 205°C por 10 min, visando avaliar como a severidade do processo influencia na biodegradabilidade do material. Os ensaios de DA foram avaliados empregando a biomassa in-natura, pré-tratada integralmente (lama) e utilizando apenas a fração líquida (hidrolisado hemicelulósico, HH), em processos de mono e co-DA. Ao final do processo, o digestato de cada ensaio foi avaliado quimicamente e biologicamente a fim de mensurar as modificações na microbiota e seu potencial de aplicabilidade. Os resultados indicaram que a condição mais severa de pré-tratamento (205°C, 10 min) proporcionou a maior produção acumulada de biometano em processos de mono e co-DA, empregando tanto o HH quanto a lama de pré-tratamento. Nesta condição, considerando o processo de mono-DA, a lama e o HH proporcionaram uma produção de biometano 84,78 e 57,27% maior, respectivamente, quando comparado à biomassa in-natura. Já para o processo de co-DA, a mistura da lama com o dejetos promoveu um aumento da produção de biometano de 220,66% quando comparado a mistura da biomassa in-natura com o dejetos. Quanto a mistura de HH e dejetos, houve um aumento de 167,45% na produção de biometano em relação à mistura da biomassa in-natura e dejetos, demonstrando, em ambos os casos, a importância da etapa de pré-tratamento da biomassa. As análises do digestato indicaram seu potencial como biofertilizante, demonstrando a presença de nutrientes essenciais disponíveis para a nutrição de plantas. A microbiota detectada nos digestatos apresentou grupos de bactérias e arqueas essencialmente relevantes para as

diferentes etapas do processo de DA, indicando bom desempenho do sistema e a falta de patógenos ao final do processo.

Palavras chave: bioenergia; manejo de resíduos; caule de lúpulo; pré-tratamento; biometano.

ABSTRACT

Bioenergy, especially biogas, has been attracting great interest worldwide due to growing energy demand and technical-economic viability. In this market, cattle waste, often poorly managed and polluting, is a significant source of energy, with a significant volume of raw material. Furthermore, due to the expansion of hop cultivation (*Humulus lupulus* L.) in Brazil, the residues generated from its pruning can also be used in anaerobic digestion (AD), providing an alternative for management and use. Therefore, combining these residues can promote integration of the crop-livestock chain, providing adequate management through the generation of bioenergy and biofertilizers. Therefore, this work aimed to evaluate the methanogenic potential of hop crop residue in mono- and co-digestion (co-DA) processes with cattle waste. The lignocellulosic biomass was pre-treated hydrothermally under three conditions, 175, 190, and 205°C for 10 min, aiming to evaluate how the severity of the process influences the biodegradability of the material. The AD assays were evaluated using raw biomass, pretreated (slurry), and using only the liquid fraction (hemicellulosic hydrolyzate, HH), in mono and co-AD processes. At the end of the process, of each assay was chemically and biologically evaluated to measure the changes in the microbiota and their potential applicability. The results indicated that the most severe pretreatment condition (205°C, 10 min) provided a greater accumulated production of biomethane in mono- and co-AD processes, employing both HH and slurry. In this condition, considering the mono-AD process, the slurry and HH provided 84.78 and 57.27% higher biomethane production, respectively, when compared to raw biomass. As for the co-AD process, mixing slurry with manure promoted an increase in biomethane production of 220.66% compared to mixing raw biomass with manure. As for the mixture of HH and manure, there was a 167.45% increase in biomethane production concerning the mixture of raw biomass and manure, demonstrating, in both cases, the importance of the pretreatment step. Analyzes of the digestate indicated its potential as a biofertilizer, demonstrating the presence of essential nutrients available for plant nutrition. The microbiota detected in the digestates presented groups of bacteria and archaea essentially relevant to the different stages of the AD process, indicating the good performance of the system and the lack of pathogens at the end of the process.

Keywords: bioenergy; waste management; hop stem; pretreatment; biomethane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma das atividades executadas no projeto	25
Figura 2 - Matriz elétrica brasileira e média mundial	26
Figura 3 - Etapas básicas e grupos microbianos envolvidos no processo de digestão anaeróbica.....	32
Figura 4 - Porcentagem de produção de biogás (barra laranja escura) e do número de plantas em operação no país (barra laranja clara), considerando cada um dos setores produtivos.	36
Figura 5 - Número de plantas e volume de produção de biogás nos Estados	37
Figura 6 - Desenho esquemático da planta de lúpulo	40
Figura 7 - Sistema radicular da planta do lúpulo	41
Figura 8 - Parte aérea da planta do lúpulo	42
Figura 9 - Inflorescência (cones) da planta feminina.....	43
Figura 10 - Emissões de metano pelo setor agropecuário	51
Figura 11 - Processo de separação manual dos caules (a) e a biomassa limpa, preparada e moída (b), para uso nos ensaios.....	59
Figura 12 - Dejetos in-natura homogeneizados	61
Figura 13 - Biodigestor Canadense da Fazenda Campestre (a) e coleta do inóculo (b)	62
Figura 14 - Sistema de pré-tratamento. Banho de aquecimento de fluido térmico (a) e um exemplo do reator empregado nos ensaios (b)	63
Figura 15 - Sistema de determinação do volume de biogás (a) e biorreator (b)	75
Figura 16 - Bandas de DNA obtidas em géis de agarose.....	84
Figura 17 - Preparação da biblioteca através do Index disponibilizados pela Illumina	86
Figura 18 - Biomassa pré-tratada na condição 190°C, 10 min: lama obtida após o pré-tratamento (a), e hidrolisado hemicelulósico (HH) (b), e celulignina (c) após a etapa de separação sólido/líquido	88
Figura 19 - As reações de hidrólise da celulose e hemiceluloses levando à formação de furfural, HMF, ácido levulínico e fórmico, além da humina	93
Figura 20 - Produção de metano obtida na DA dos HHs.....	107
Figura 21 - Produção de metano obtida na DA das lamas	108
Figura 22 - Produção de metano na co-DA dos substratos HH e dejetos	112

Figura 23 - Produção metano obtida na co-DA das lamas e dejetos	114
Figura 24 - Produção de metano nos processos de mono e co-DA da biomassa in-natura e dejetos	114
Figura 25 - Redução de SVT e avaliação do pH ao final do processo	119
Figura 26 - Resultado da Classificação por nível taxonômico	126
Figura 27 - Classificação geral dos resultados de filos de bactérias	127
Figura 28 - Abundância de reads (%) em nível de gênero de bactérias e arqueas nos ensaios de mono e co-DA.....	132
Figura 29 - Abundância de reads (%) em nível de gênero da microbiota do dejetos bovino e inóculo.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e tipo de biomassas.....	28
Tabela 2 - Biomassas e seus produtos/subprodutos empregadas no mercado brasileiro de energia elétrica	29
Tabela 3 - DA de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas hidrotermicamente	48
Tabela 4 - Co-DA de diferentes biomassas lignocelulósicas e dejetos bovinos.....	55
Tabela 5 - Materiais obtidos após os ensaios de pré-tratamento hidrotérmico.....	64
Tabela 6 - Ensaio de potencial bioquímico de metano (PBM)	74
Tabela 7 - Condições de termociclagem	84
Tabela 8 - Classificação das peneiras e distribuição granulométrica	87
Tabela 9 - Fator de severidade (Log R0), severidade combinado (Log R'0) e pH das biomassas pré-tratadas	88
Tabela 10 - Composição físico-química da biomassa in-natura e das celuligninas obtidas após a etapa de pré-tratamento para determinação da porcentagem de solubilização dos macrocomponentes	91
Tabela 11 - Composição química do HH em cada condição de pré-tratamento	92
Tabela 12 - Comparação entre a solubilização de hemiceluloses e produção de xilooligossarídeos em condições similares de pré-tratamento	94
Tabela 13 - Análise de série de sólidos e pH dos substratos e inóculo utilizados nos ensaios de DA.....	96
Tabela 14 - Composição elementar (%), nitrogênio orgânico, sólidos totais e DQO dos substratos provenientes da biomassa lignocelulósica e dejetos bovinos	98
Tabela 15 - Comparação da composição elementar de diferentes biomassas lignocelulósicas in-natura, comumente utilizadas em processos de DA para produção de biometano e hidrogênio, e dejetos bovinos	99
Tabela 16 - Concentrações de micro e macronutrientes encontrados nos substratos e inóculo utilizados na DA e co-DA	101
Tabela 17 - Concentrações dos açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos no início do processo	104
Tabela 18 - Concentrações dos AGVs no início do processo	105
Tabela 19 - Concentrações dos macrocomponentes da biomassa nos reatores	106

Tabela 20 - Valores de PBMT, PBM, digestibilidade e parâmetros cinéticos da DA	110
Tabela 21 - Valores de PBM e parâmetros cinéticos das co-Da	116
Tabela 22 - Análise de série de sólidos do digestato dos ensaios de DA e co-Da ...	118
Tabela 23 - Composição química dos digestatos obtidos nos processos de DA e co- DA.....	121
Tabela 24 - Concentrações de AGVs no digestato	122
Tabela 25 - Concentração de nutrientes presentes no digestato proveniente dos processos de DA e co-DA.....	124
Tabela 26 - Principais grupos de arqueas metanogênicas encontradas nos efluentes	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
co-DA	Co-digestão Anaeróbia
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DA	Digestão Anaeróbia
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ENEL	Entidade Nacional de Eletricidade
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FS	Fator de Severidade
FSC	Fator de Severidade Combinado
GEE	Gases de Efeito Estufa
Gt	Gigatonelada
GW	Gigawatts
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILP	Integração Lavoura Pecuária
ILPF	Integração Lavoura Pecuária Floresta
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
LUPAM	Grupo de pesquisa: Lúpulo, Aplicações e Manejo
MDL	Mecanismos de Desenvolvimento Limpo
MO	Matéria Orgânica
pH	Potencial Hidrogeniônico
PT	Pré-tratamento

SFT	Sólidos Fixos Totais
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
SVT	Sólidos Voláteis Totais
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica
CG	Cromatografia Gasosa
Kw	Quilowatt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	BIOENERGIA NO BRASIL	26
2.2	PRODUÇÃO DE BIOGÁS	30
2.3	CENÁRIO DO BIOGÁS NO BRASIL.....	34
2.4	POTENCIAL DAS BIOMASSAS DE SEGUNDA GERAÇÃO E DEJETOS NA DA	38
2.4.1	A CULTURA DO LÚPULO E SEUS RESÍDUOS	38
2.4.1.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAULE DE LÚPULO E PROCESSOS DE FRACIONAMENTO PARA MELHORARIA DA DA.....	45
2.5	PRODUÇÃO DE DEJETOS E POTENCIAL NA DA.....	50
2.6	CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS E DEJETOS BOVINOS	53
2.7	SUBPRODUTO DA DA: DIGESTATO	57
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1	MATERIAIS.....	59
3.1.1	COLHEITA E PREPARAÇÃO DOS RESÍDUOS DE PODA DE LÚPULO..	59
3.1.2	ANÁLISE DE GRANULOMETRIA DO CAULE DE LÚPULO MOÍDO	60
3.1.3	OBTENÇÃO E PREPARO DO DEJETO.....	60
3.1.4	OBTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO	61
3.2	PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO CAULE DE LÚPULO	62
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SUBSTRATOS E INÓCULO.....	64
3.3.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CAULE DE LÚPULO IN-NATURA, DA FRAÇÃO SÓLIDA E DA LAMA	65
3.3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.	65
3.3.3	ANÁLISE DA SÉRIE DE SÓLIDOS	67
3.3.4	DETERMINAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO TEÓRICO (PBMT) DOS HH	68
3.3.5	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO TEÓRICO (PBMT) DAS FRAÇÕES SÓLIDAS	71
3.3.6	ANÁLISE DE MACRO E MICRONUTRIENTES DOS SUBSTRATOS E INÓCULO	72
3.4	BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	73
3.4.1	MONITORAMENTO DO PROCESSO DE DA	75
3.4.2	CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE PROCESSO.....	76
3.4.3	MODELAGEM CINÉTICA DA DA.....	78
3.5	ANÁLISES DOS DIGESTATOS	80
3.5.1	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)	80
3.5.2	ANÁLISE DA SÉRIE DE SÓLIDOS	81
3.5.3	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO).....	81
3.5.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	81
3.5.5	ANÁLISE DE MICRO E MACRONUTRIENTES	82
3.5.6	ANÁLISE DE METAGENÔMICA	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
4.1	PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO CAULE DO LÚPULO.....	87

4.2	COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS E INÓCULOS PARA OS ENSAIOS DE DA E CO-DA	95
4.2.1	ANÁLISE DA SÉRIE DE SÓLIDOS E PH	95
4.2.2	ANÁLISE DE DQO E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR	97
4.2.3	ANÁLISE DE MACRO E MICRONUTRIENTES DOS SUBSTRATOS E INÓCULO.....	99
4.3	AVALIAÇÃO DA DIGESTÃO (DA) E CO-DIGESTÃO (CO-DA) ANAERÓBICA.....	103
4.3.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA INICIAL DOS REATORES.....	103
4.3.2	POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO EM DA	106
4.3.3	POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO EM CO-DA.....	112
4.4	ANÁLISES DO DIGESTATO	117
4.4.1	ANÁLISE DE SÉRIE DE SÓLIDOS E AVALIAÇÃO DO PH FINAL.....	117
4.4.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	120
4.4.3	ANÁLISE DE MICRO E MACRONUTRIENTES.....	123
4.5	ANÁLISE DE METAGÊNOMICA.....	126
5	CONCLUSÃO.....	135
	REFERÊNCIAS	139
	APÊNDICE A – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	159
	APÊNDICE B – MASSA DE ENTRADA DE CADA FRAÇÃO 2:1 SVT (SUBSTRATO:INÓCULO)	167

1 INTRODUÇÃO

A energia cumpre um papel indispensável na economia de um país, fornecendo suporte para diversos setores e serviços de suma importância. Em escala global, os combustíveis fósseis predominam na oferta de energias primárias mas, em muitos países, a energia renovável já representa uma parcela relevante deste setor (Nogueira; Capaz; Lora, 2021). Segundos dados do relatório da Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2023), em 2022, a participação das energias renováveis na matriz energética mundial representava apenas 14%, enquanto para o Brasil tal energia já corresponde à 47,4%, valor este representativo e muito associado ao uso das bioenergias.

A bioenergia é uma forma de energia renovável produzida a partir de uma biomassa, que pode ser de origem vegetal e animal. Tal energia pode ser utilizada para gerar calor, eletricidade ou mesmo combustível para motores de combustão em geral. Este tipo de energia renovável e de baixo carbono, promove o sequestro do gás carbônico atmosférico, além de oferecer inúmeros benefícios ambientais e socioeconômicos, apoiado nas metas globais de mudança climática dentro da Agenda 2023 da ONU (IPEA, 2018; Röder; Welfle, 2019).

No Brasil, a bioenergia é fortemente representada pelo uso da cana-de-açúcar, que equivale à 15,4% da matriz energética renovável do país. Além disso, o carvão e a lenha vegetal (9,0%), e a lixívia (7,0%) - subproduto do setor de celulose -, são outras fontes relevantes de bioenergia para o país (EPE, 2023). Visando aumentar e melhorar ainda mais este índice de renovabilidade da matriz energética brasileira, muitos estudos vêm sendo realizados visando explorar novas biomassas e desenvolver tecnologias de segunda geração (2G) para produção de bioenergia (Chandel *et al.*, 2021; Dias *et al.*, 2011; Lorenzi; Andrade, 2019).

As bioenergias 2G são produzidas a partir de culturas não alimentares, produzidas diretamente para este fim, ou a partir de resíduos agrícolas de culturas alimentares ou de resíduos do setor florestal. Uma das principais vantagens em utilizar subprodutos do setor agroindustrial na produção de bioenergia 2G é que não há consumo de fertilizante adicional, água ou terra para cultivar tal matéria-prima, melhorando ainda mais a pegada de carbono destes processos (Dahman *et al.*, 2019).

Muitos setores agroindustriais utilizam parte destas biomassas lignocelulósicas, como palhas, bagaços, cascas, para produzir bioenergia a partir da sua queima direta em caldeiras, no processo chamado de cogeração. Entretanto, ainda há uma quantidade substancial de biomassa que pode ser usada para a produção de novos biocombustíveis (Menandro *et al.*, 2017).

Além das biomassas lignocelulósicas, as biomassas residuais de origem animal também podem promover a geração de bioenergia, com destaque para dejetos de animais, que apresentam um grande caráter poluidor, necessitando de tratamento para um manejo adequado (Abbas *et al.*, 2023).

O agronegócio brasileiro se intensifica a cada ano e ganha destaque no mercado mundial, sendo importante fonte de criação de riqueza para a economia do país. No Brasil, a bovinocultura apresenta o segundo maior rebanho do mundo, e ganha destaque como o maior exportador de carne bovina (Galvão, 2017). Sendo assim, a ampliação e intensificação das atividades pecuárias resultam em novas exigências para o descarte seguro de grandes quantidades de dejetos que são gerados na produção desse setor (Capitani; Farina, 2022)

Diante desse cenário de demanda energética, uso da terra e mudanças climáticas, surgem diversas alternativas tecnológicas para o tratamento destes resíduos do setor agroindustrial e agropecuário para geração de energia. Dentre essas alternativas, a que desperta grande interesse devido sua facilidade de implementação e viabilidade técnico-econômica é a digestão anaeróbica (DA) (Vu *et al.*, 2020).

O processo de DA, também chamado de biodigestão, é um tratamento biológico que permite a decomposição e estabilização de diversos resíduos, como os lignocelulósicos e dejetos de animais, enquanto produz simultaneamente bioenergia (biogás), nutrientes que podem ser utilizados para correções de solo (biofertilizante), além de compensar a emissão de gases de efeito estufa (Wagner *et al.*, 2018).

Em 2022, o biogás representou apenas 2,1% da matriz energética brasileira (EPE, 2023). Entretanto, muitos dos entraves políticos referentes à produção e a distribuição desse biocombustível vêm se modificando ao longo dos últimos anos, mediante uma estratégia federal de incentivo ao uso sustentável de biogás e

biometano. O objetivo destas estratégias é fomentar programas e ações para reduzir as emissões de metano e incentivar o uso de biogás e biometano como fontes renováveis de energia e combustível (BRASIL, 2022).

Neste mercado, a cadeia produtiva lavoura-pecuária pode contribuir para a produção desta bioenergia, favorecendo uma destinação correta e segura destes resíduos, minimizando as emissões de gases de efeito estufa (Capitani; Farina, 2022). Sendo assim, a geração de biogás a partir de dejetos e resíduos agroindustriais pode ser aderida a um plano de desenvolvimento sustentável do agronegócio, proporcionando soluções sistêmicas que contemplem energia, alimento e meio ambiente (Galvão, 2017).

Dentre as biomassas lignocelulósicas de baixo uso podemos destacar o resíduo de poda da cultura do lúpulo (*Humulus Lupulus L.*), composto por caules e folhas, que representa aproximadamente 75% da biomassa produzida no cultivo. Este resíduo é normalmente queimado ou utilizados em compostagem após a colheita dos cones, visto que não apresenta valor comercial e possui baixa efetividade de recobrimento de solo, trazendo problemas ambientais devido à baixa biodegradabilidade (Kanai *et al.*, 2021). Sendo assim, além do seu uso na produção de mudas, por meio de estacas herbáceas (pedaços do caule), o resíduo pode ser destinado no processo de DA, trazendo benefícios a cadeia mediante a produção de bioenergia, já que a cultura exige alta taxa de incidência de luz, natural e artificial (Agehara, 2020).

Atualmente o Brasil possui 50 cultivares no Registro Nacional de Cultivares, sendo que todas livres de patentes (RNC, 2023). Apesar das dificuldades naturais de um novo cultivo se estabelecendo, em 2018 foi fundada a Associação Brasileira dos Produtores de Lúpulo (APROLÚPULO), que conta atualmente com mais de 170 associados, presentes em quatorze Estados e o Distrito Federal. Segundo dados da Aprodúpulo (APROLÚPULO, 2022), o Brasil atualmente possui cerca de 50 hectares de lúpulo, com produção estimada em 20 toneladas. Já os dejetos bovinos representam uma expressiva biomassa no país, tornando cada dia mais preocupante o manejo deste resíduo. O Brasil produziu em 2021 mais de 224,6 milhões de cabeças de gado, reportando sucessivos crescimentos ao longo dos anos (IBGE, 2021a).

Sendo assim, a junção dos resíduos da cultura do lúpulo com os dejetos bovinos pode promover uma integração da cadeia lavoura-pecuária, proporcionando um manejo adequado dos resíduos na geração de bioenergia e biofertilizantes, por meio dos processos de co-digestão anaeróbica (co-DA). A cultura do lúpulo está em expansão no país e vale destacar que os resíduos lignocelulósicos gerados ainda não foram explorados em estudos científicos. Além disso, regiões onde cultivares de lúpulo vêm ganhando destaque, como Santa Catarina e Minas Gerais, os plantios estão localizados próximos à produção animal, como suinocultura e bovinocultura, respectivamente, sendo muitas vezes lotados em uma mesma propriedade. Assim, o manejo integrado pode favorecer a sustentabilidade no setor.

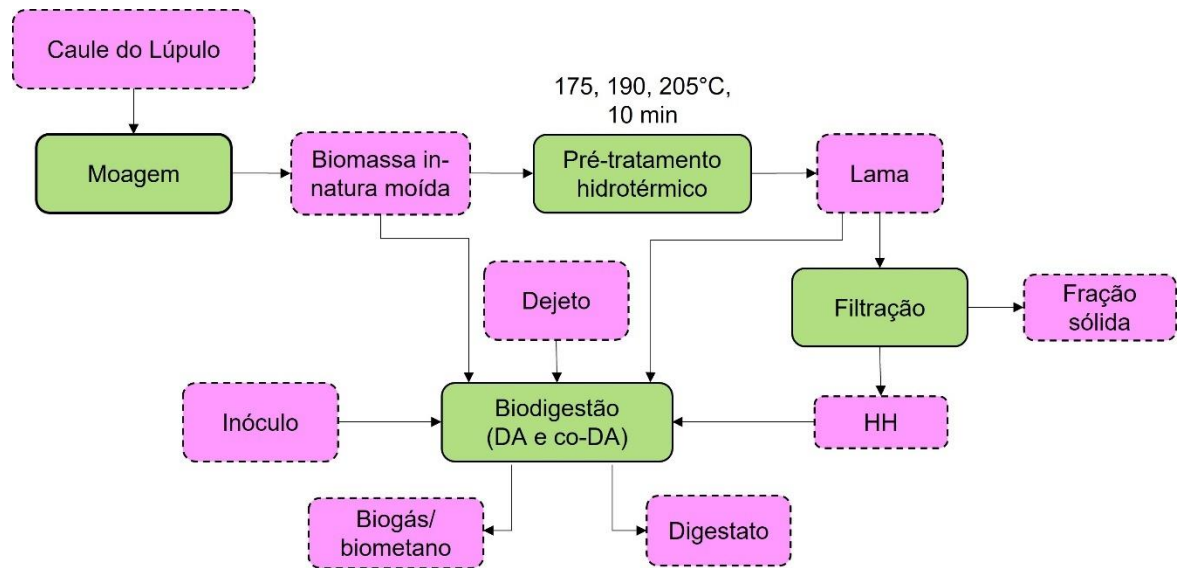
Neste sentido, visando contribuir com estudos no âmbito de manejo de resíduos e produção de energia renovável, este projeto tem por objetivo avaliar o potencial metanogênico, em estudos de mono e co-digestão, utilizando dejetos bovinos e caule de lúpulo pré-tratados em meios aquosos. Foi avaliado como o caule de lúpulo pré-tratado pode contribuir com o processo de DA dos dejetos bovinos, utilizando tanto a fração líquida do pré-tratamento quanto a lama (mistura da fração sólida + líquida). Foi avaliado também como a etapa de pré-tratamento e as condições operacionais deste processo influenciam na produção do biogás e biometano, entre os processos de DA e co-DA. Para isso, alguns objetivos específicos foram delineados:

- Avaliar o efeito das condições operacionais do pré-tratamento hidrotérmico do caule de lúpulo em relação ao fracionamento da biomassa;
- Avaliar o potencial bioquímico de metano (PBM) da biomassa in-natura, das frações obtidas nos ensaios de pré-tratamento (lama e hidrolisado hemicelulósico), e do dejetos bovino, assim como a co-DA entre os substratos pré-tratados e o dejetos;
- Realizar um ajuste de modelo cinético e obter parâmetros cinéticos;
- Caracterizar quimicamente e biologicamente os digestatos obtidos a fim de verificar as mudanças biológicas no sistema e composição do mesmo para potencial aplicação em fertirrigação.

A Figura 1 ilustra o fluxograma de atividades conduzido ao longo da pesquisa, representando os substratos e delineando suas frações após passarem pelo pré-

tratamento hidrotérmico. Além disso, demonstra a utilização desses substratos nos processos de DA e co-DA, assim como seus produtos finais, biogás/biometano e digestato.

Figura 1 - Fluxograma das atividades executadas no projeto



Fonte: Elaborada pelo autor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

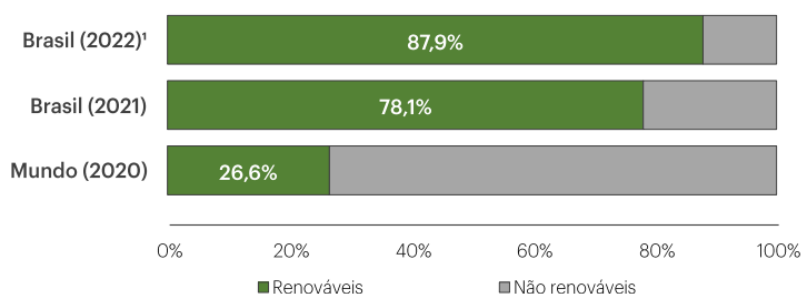
2.1 Bioenergia no Brasil

A bioenergia, energia proveniente da biomassa, produzida a partir de uma matéria orgânica de origem vegetal e/ou animal, pode ser disponibilizada em rotas para produção de biocombustíveis líquidos, sólidos ou gasosos (Monroy; Acitores; Cifuentes, 2018), sendo considerada uma excelente alternativa às fontes de energia de origem fóssil, dominantes na matriz energética mundial (Khan *et al.*, 2022).

No caso do Brasil, as bioenergias vêm sendo fortemente produzidas e utilizadas, com destaque em 2022, para produtos energéticos provenientes da biomassa da cana, da lenha e do carvão vegetal, além de lixívia – resíduo da produção de celulose. Dentro dos setores econômicos, as bioenergias representam 42,7% de toda a energia consumida no setor industrial, 21,5% no setor de transportes, e 25,9% no setor residencial (EPE, 2023).

Em relação a matriz elétrica brasileira, em 2022, 87,9% da produção interna foi proveniente de fontes renováveis (Figura 2), com destaque para a energia hidráulica (63,1%), seguida de eólica (12,1%) e biomassa (7,7%), representada por lenha, bagaço de cana, biodiesel e lixívia (EPE, 2023). Apesar do número ser muito superior à média mundial (26,6%, em 2020), a energia elétrica dominante no país ainda é a hidráulica, que vem sofrendo quedas de produção, ano após ano, devido as mudanças climáticas.

Figura 2 - Matriz elétrica brasileira e média mundial



¹A renovabilidade é calculada com base na oferta interna de energia elétrica, ou seja, toda a geração nacional mais a importação líquida, o que inclui a parcela importada de Itaipu.

Fonte: Adaptada de EPE, (2023).

Apesar da bioenergia ainda representar uma baixa parcela na matriz elétrica brasileira, o país tem grande potencial na produção, visto que a quantidade de biomassa produzida é bastante expressiva, podendo alcançar 1 Gt em 2030 (Moraes *et al.*, 2017). Entretanto, os resíduos/subprodutos gerados após colheita e beneficiamento da maioria das biomassas agroindustriais e florestais ainda são muito subutilizados no país, comumente deixados para decomposição natural - mesmo que em excedente para manter a preservação e qualidade do solo -, não proporcionando o aproveitamento do mesmo. Existem diversos tipos de fontes de biomassa que podem ser empregadas na geração de energia. A Tabela 1 apresenta detalhes e classificação das mesmas.

Em relação ao mercado de energia elétrica, o Brasil possui hoje 633 empreendimentos em operação com foco na bioenergia, gerando 17 GW de potência outorgada. Essa bioenergia direcionada à energia elétrica representa 8,55% da potência total produzida no país, que correspondem 190 GW (ANEEL, 2023). A Tabela 2 apresenta os tipos de biomassas empregadas nesta geração de bioenergia, além da quantidade de empreendimentos vinculados ao setor, além da potência outorgada.

De acordo com os dados da Tabela 2, o setor agroindustrial apresenta a maior produção de energia elétrica do mercado de bioenergia, que abrange as culturas agroenergéticas, resíduos, sedimentos e subprodutos das atividades agrícolas. Além das principais culturas produzidas no Brasil, como soja, milho, cana-de-açúcar, o país possui outras oportunidades que proporcionam potencial de crescimento. Essas possibilidades surgem de outras diversas biomassas não tradicionais e seus resíduos, mesmo que produzidas em menor quantidade e de menor valorização no mercado, ainda representam fontes de potencial energético, auxiliando no contexto de uma matriz energética mais segura, e diminuição de impactos socioeconômicos e ambientais (Lopes; Martins; Miranda, 2019).

Tabela 1 - Classificação e tipo de biomassas

Classe	Tipo	Biomassa	Referências
Vegetais não lenhosos	Sacarídeos	Cana-de-açúcar, beterraba sacarina, sorgo sacarino	Cortez; Lora; Gómez, 2008; Goldemberg, 2009
	Celulósico	Algodão, biomassas energéticas	
	Amiláceos	Milho, mandioca, batata	
	Aquáticos	Algas e microalgas	
	Oleaginosas	Milho, girassol, soja, mamona	
Vegetais lenhosos	Madeiras	Eucalipto, pinus,	Cortez; Lora; Gómez, 2008; Santos; Nascimento; Alves, 2017
	Resíduos florestais	Galhos, resíduos de podas, cavacos refugados do setor industrial	
Resíduos orgânicos	Urbanos	Lixo domiciliar, comercial, esgoto e efluente doméstico	Goldemberg, 2009; Júnior <i>et al.</i> , 2009; Santos; Nascimento; Alves, 2017
	Agroindustriais e agropecuária	Esterco e excrementos, casca, bagaço, palha, pó de serra, licor negro, gorduras de beneficiamento animal	

Tabela 2 - Biomassas e seus produtos/subprodutos empregadas no mercado brasileiro de energia elétrica

Fonte	Combustível	Quantidade de Empreendimentos	Potência outorgada (kW)
Agroindustriais	Bagaço de cana-de-açúcar	423	12.431.209,20
	Biogás	5	32.615,80
	Capim elefante	3	49.636,00
	Casca de arroz	14	56.833,00
Biocombustíveis	Etanol	1	320,00
líquidos	Óleos vegetais	5	17.180,40
Floresta	Biogás	1	5.000,00
	Carvão vegetal	6	30.197,00
	Gás de alto forno - biomassa	12	124.265,05
	Lenha	13	237.202,80
	Licor negro	21	3.299.414,00
	Resíduos florestais	74	749.250,00
Resíduos	Biogás	18	6.493,20
Animais			
Resíduos	Biogás	26	201.887,60
Sólidos Urbanos	Carvão	3	8.250,00
(RSU)	Resíduos Sólidos Urbanos	8	24.413,00
Total		633	17.274.617,05

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados da ANEEL, (2023).

As previsões socioeconômicas, em nível mundial, indicam um aumento no uso das terras agrícolas para produção de alimentos, rações e bioenergia (Popp *et al.*, 2017). Diante do crescimento populacional, o aumento de área cultivada é cada vez mais explorado devido à alta demanda por alimento e energia. Entretanto, é necessário estratégias de manejo para melhorias no uso da terra, recuperação de pastagens degradadas e intensificação da pecuária, como, por exemplo, aumentar as taxas de lotação do gado, são medidas propostas com frequência para liberar área adicional para o cultivo de produção de bioenergia, sem comprometer a produção de alimentos (Frank *et al.*, 2017; Pereira; De Castro, 2022).

Este cenário produtivo, mesmo que promissor, permite abordar problemas e desafios da bioenergia no Brasil e em outros países, como promover a oferta sustentável de biomassa, com alta produtividade, além da adoção de processos eficientes para sua conversão em formas finais e úteis de energia. O Brasil, seguindo esse conceito, tem investido cada dia mais no desenvolvimento de biocombustíveis a partir de fontes secundárias de biomassas, ou biomassas de segunda geração (2G), que são residuais e de baixo valor mercadológico (Nogueira; Capaz; Lora, 2021).

Muitas vezes, o excesso destas biomassas provoca danos ambientais ligados à disposição inadequada destes resíduos orgânicos in-natura ou não tratados no solo, que incluem a contaminação do solo por dejetos e resíduos com altos teores de produtos químicos de lixiviação de nutrientes; eutrofização de rios e lagos; e emissão de GEEs produzidos durante a decomposição da biomassa (Frigo *et al.*, 2015). Nesse cenário, a produção de biogás pode contribuir para atingir o aumento da bioenergia no país e tratamentos de resíduos (Cruz *et al.*, 2021). Portanto, as biomassas residuais, especialmente biomassas 2G e de baixa utilização mercadológica, como é o caso de dejetos de animais, seriam matérias-primas valiosas para o desenvolvimento de bioenergia limpa e renovável para regiões agroindustriais e, simultaneamente, uma ferramenta para mitigar os efeitos ambientais da produção pecuária.

2.2 Produção de Biogás

A produção de biogás ocorre através do processo de digestão anaeróbica (DA), que pode ser definida como a conversão de matéria orgânica, de origem vegetal ou animal, em dióxido de carbono, metano, além de outros gases presentes em menores proporções. Esse processo ocorre em sucessivas etapas biológicas, sendo dependente das diversas interações entre microrganismos, em um ambiente com a ausência de oxigênio (Meegoda *et al.*, 2018). Ao final do processo, além do biogás é obtido um lodo, chamado de digestato, muito empregado para adubação devido a sua composição mineral proveniente das biomassas empregadas no processo (Franco; Bezerra, 2018).

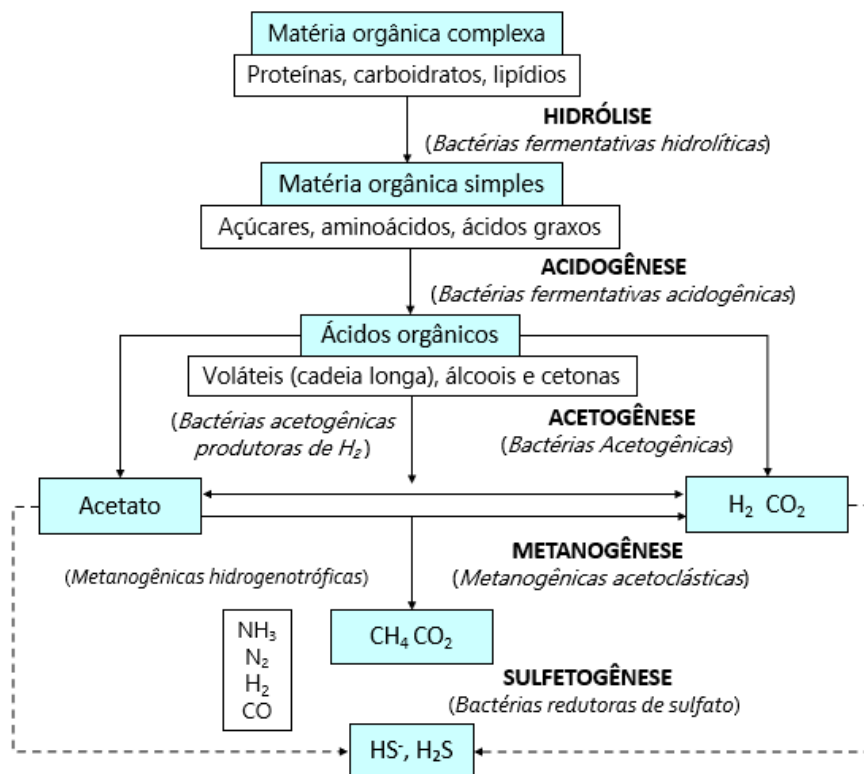
A flexibilidade de uso do biogás, cuja característica física é semelhante ao gás natural, propicia com que ele possa ser utilizado em um sistema de geração distribuída (GD), ou seja, geração de energia elétrica que ocorre na própria unidade de consumo (UC) ou próximas a elas, ou por meio de uma geração centralizada (GC), que se caracteriza principalmente por grandes centrais de geração de energia elétrica conectadas ao Sistema Interligado Nacional (SIN). Além disso, o biogás pode ser purificado para a obtenção do biometano, que pode ser utilizado em substituição do diesel de origem fóssil e do gás natural, reduzindo as emissões de CO₂ em até 95% quando comparado aos combustíveis fósseis (Gomes *et al.*, 2016).

Na DA, uma série de processos bioquímicos são realizados por um grupo de microrganismos anaeróbios, que atuam coletivamente para transformar a massa orgânica em biogás e em um material digerido, rico em nutrientes. Cada grupo microbiano tem características únicas, como taxa de crescimento, diversidade e densidade no sistema, trazendo respostas diversas dependendo das condições operacionais (Tyagi *et al.*, 2021).

O processo de DA é normalmente descrito em cinco fases, conforme apresentado na Figura 3, a saber: hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese, além da sulfetogênese (Kothari *et al.*, 2014).

Durante a hidrólise, as enzimas hidrolíticas, excretadas pelas bactérias, hidrolisam os polímeros insolúveis, carboidratos, lipídios e proteínas em oligômeros e monômeros, fazendo com que fiquem disponíveis para os microrganismos. Nesta etapa, os compostos orgânicos complexos, como os presentes em materiais lignocelulósicos, por exemplo, apresenta uma hidrólise muito lenta, o que pode se tornar uma etapa limitante durante o processo DA (Zhou *et al.*, 2018). Portanto, nestes casos, há necessidade de técnicas para diminuir a recalcitrância da biomassa e, assim, aumentar a disponibilidade destes materiais para a decomposição microbiana anaeróbica (Olatunji; Ahmed; Ogunkunle, 2021).

Figura 3 - Etapas básicas e grupos microbianos envolvidos no processo de digestão anaeróbica



Fonte: Adaptado de (Atelge *et al.*, 2020; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

Na segunda etapa, a acidogênese, um grande grupo de bactérias anaeróbicas facultativas e obrigatórias convertem os produtos da hidrólise -açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos-, em ácidos orgânicos ou ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia curta, álcoois, e alguns compostos inorgânicos como dióxido de carbono, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio e amônia (Zhou *et al.*, 2018). Alguns dos principais ácidos liberados nesse estágio são ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico e valérico (Rajendran *et al.*, 2013, 2020).

Na acetogênese, terceiro estágio do metabolismo anaeróbico, os ácidos graxos voláteis e álcoois são convertidos em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (Mir; Hussain; Verma, 2016).

Já a metanogênese marca o estágio final da digestão anaeróbica, onde intermediários acessíveis são consumidos por microrganismos metanogênicos para produzir metano (Ferry, 2010b).

O metano é produzido pelas arqueas, por duas vias metabólicas principais: arqueas hidrogenotróficas, que utilizam o hidrogênio como doador de elétrons e o dióxido de carbono como aceptor de elétrons para a produção de metano; e as arqueas acetoclásticas, que transformam o acetato em metano e em dióxido de carbono. Em digestores anaeróbios, cerca de 70% do metano produzido é advindo da degradação do acetato durante o metabolismo das metanogênicas acetoclásticas e menos de 30% é produzido por metanogênicas hidrogenotróficas (Mir; Hussain; Verma, 2016).

Na presença de sulfato, sulfeto e outros compostos sulfurados, as bactérias redutoras de sulfato (ou bactérias sulforedutoras) são capazes de utilizar o hidrogênio para formação de sulfeto, que pode se dissolver no meio (HS^- , S^{2-} , $\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}$) ou constituir o biogás ($\text{H}_2\text{S}_{\text{gás}}$) (Chen *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2018; Nuvolari, 2011; O'flaherty; Collins; Mahony, 2006).

Estes compostos podem causar alterações nas rotas metabólicas no processo de DA, nas fases de acetogênese e metanogênese, conforme Figura 3. Isso se dá devido as bactérias redutoras de sulfato competirem com os outros microrganismos do meio, como as bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas, pelos mesmos substratos, como o hidrogênio e o acetato, resultando na formação de metano, por meio da metanogênese, e sulfeto, através da redução de sulfeto (Callado; Damianovic; Foresti, 2016).

Além disso, tais compostos podem reduzir a produção do biogás devido à competição entre as bactérias redutoras de sulfato e as metanogênicas (Chernicharo, 2016). Essa competição está relacionada a uma série de fatores, em particular ao pH e à relação entre Demanda Química de Oxigênio (DQO) e o sulfato.

Como as fases de degradação são todas intimamente ligadas umas às outras, mesmo que os microrganismos sejam funcionalmente distintos, um desequilíbrio entre a comunidade bacteriana e arqueas pode causar uma deterioração em desempenho do reator e, portanto, mudanças na quantidade de metano produzido (Franke-Whittle *et al.*, 2014a).

A identificação, análise e monitoramento da comunidade microbiana de bactérias e arqueas é essencial para conhecer e até mesmo prever processos de

estabilidade, instabilidade e explicar o desempenho do sistema. O desequilíbrio de um nível trófico pode afetar toda a comunidade microbiana, resultando em desequilíbrios ou falhas no processo. Portanto, a caracterização da composição e estrutura da comunidade microbiana é indispensável para analisar e melhorar a eficiência da digestão anaeróbia (Luo; Wang; Angelidaki, 2013; Wang *et al.*, 2012b).

A maior parte dos microrganismos não podem ser estudados através de métodos de cultivo e há limitações de conhecimento das pesquisas realizadas sobre diversidade microbiana através de métodos independentes, como a análise de genes específicos. Essas técnicas foram significativamente favorecidas com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de DNA, as quais possibilitaram o estudo em larga escala da microbiota em um determinado ambiente (Shokralla *et al.*, 2012). Entretanto, ferramentas de biologia molecular têm sido utilizadas com base nas variações e análise da sequência de nucleotídeos presentes no gene RNAr 16S, por conter regiões conservadas e variadas (exclusivas de uma única espécie, por exemplo), e contribuir para a caracterização da diversidade microbiana (Madigan *et al.*, 2016).

A análise metagenômica torna possível o estudo aprofundado da diversidade e abundância da comunidade microbiana, uma vez que podem ser geradas milhares de sequências a partir de uma única amostra, sendo possível detectar aqueles microrganismos que estão em baixa quantidade ou que sejam raros na amostra. Portanto, podem fornecer informações detalhadas e significativas da composição e estrutura da comunidade em reatores anaeróbios (Cho *et al.*, 2013).

2.3 Cenário do Biogás no Brasil

No Brasil, o incentivo à geração de biogás e biometano é relativamente recente, com o surgimento em 2002 pelo Programa Federal de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia (Proinfa), cuja finalidade era diversificar a matriz energética nacional e reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE). Embora o biogás já fosse avaliado como fonte de energia no país há muitos anos, este foi o primeiro estudo que regionalmente mapeou a capacidade real de geração de biogás e biometano a partir

do uso de biomassas, considerando os 26 estados brasileiros (Guerino Filho *et al.*, 2019).

Hoje, com a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), que visa expandir cada dia mais a produção de biocombustíveis no país, além do novo mercado do gás, que busca a formação de um mercado aberto, dinâmico e competitivo, e com toda a evolução do ambiente regulatório referente ao seu uso, a produção e aplicação dos biocombustíveis está em plena expansão. Tal efeito é averiguado na implementação de novas biorrefinarias que visam a obtenção de diversas bioenergias (MME, 2020).

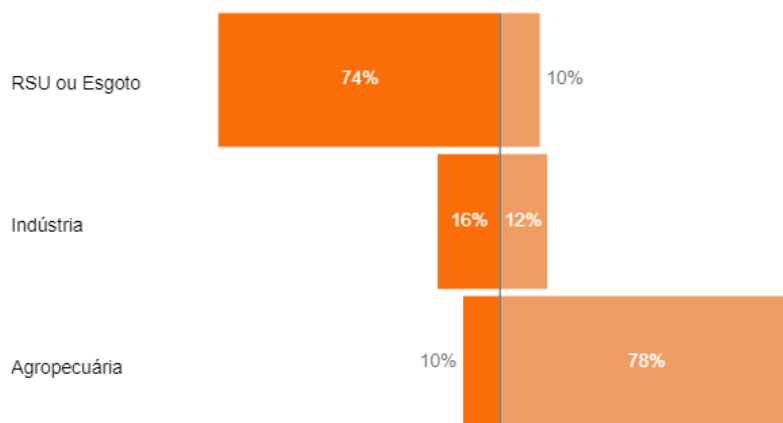
Nesta expansão, o setor do agronegócio apresenta grandes vantagens já que há várias possibilidades de integração com suas cadeias produtivas, além da grande geração de biomassas residuais, que hoje intensificam problemas ambientais relacionados à disposição de resíduos orgânicos. Neste cenário, o uso desses resíduos para geração de biogás constitui uma alternativa que contribui para a redução de impactos ambientais e para a oferta de energia renovável, agregando valor aos resíduos orgânicos gerados pelo setor produtivo e de transformação (Ferreira *et al.*, 2018; Singh; Kalamdhad, 2022).

Conforme disponibilizado no Sistema de Informações de Geração da ANEEL (SIGA), o Brasil possui 50 empreendimentos em operação com geração elétrica a partir do biogás tendo como origem a biomassa, totalizando aproximadamente 246 MW de potência outorgada. Desses, mais da metade, 26 empreendimentos, geram biogás a partir de biomassas e a maioria está localizada no Estado de São Paulo (ANEEL, 2023). A Associação Brasileira do Biogás estimou que o Brasil deixa de aproveitar, por ano, aproximadamente 44,1 bilhões m³ de biogás, considerando a geração de resíduos da agroindústria, pecuária e saneamento, que poderiam fornecer 19 GW de capacidade instalada para a produção de energia elétrica ou 120 milhões de m³/dia de biometano (ou gás natural renovável). Se traduzidos em equivalência energética, esse montante de biogás poderia suprir 34,5% da demanda por energia elétrica ou substituir 70% do consumo de diesel do país (ABIOGÁS, 2021).

Em 2022 o país apresentava 885 plantas de biogás em operação. As quantidades das fontes de substratos utilizadas na produção de biogás no Brasil estão representadas na Figura 4. Observa-se que, um grande número de plantas em

operação utiliza os resíduos do setor agropecuário, entretanto, sua participação na produção de biogás é a menos representativa com apenas 10% da produção nacional.

Figura 4 - Porcentagem de produção de biogás (barra laranja escura) e do número de plantas em operação no país (barra laranja clara), considerando cada um dos setores produtivos.



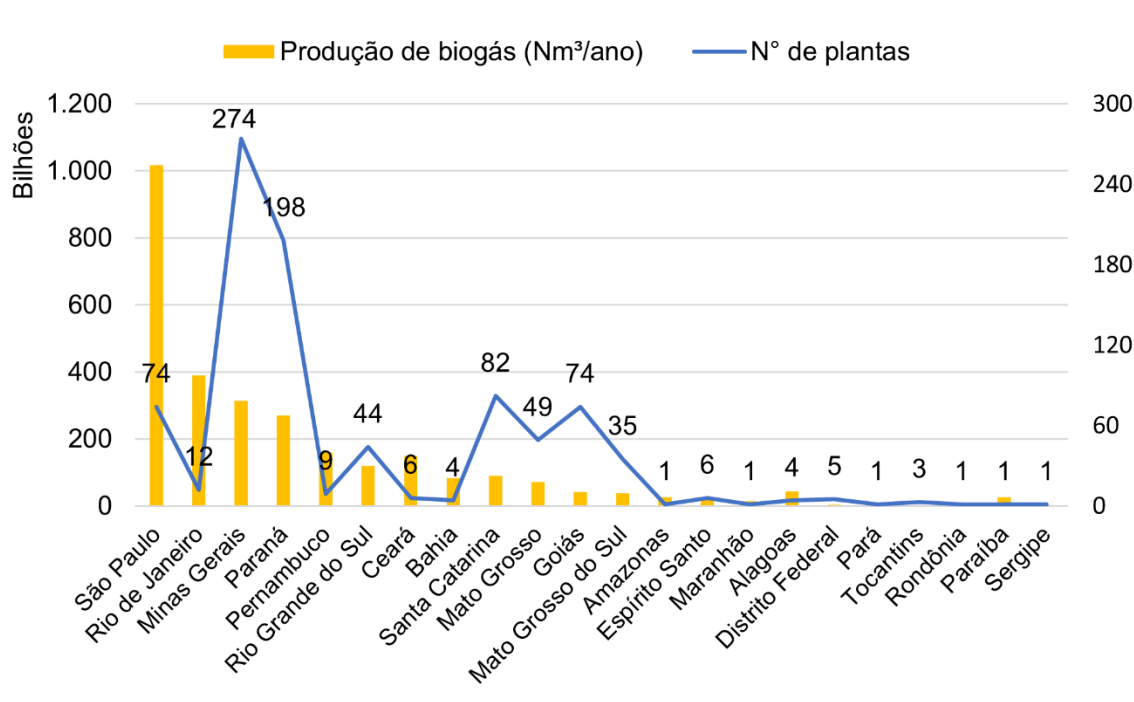
RSU: Resíduos Sólidos Urbanos

Fonte: Biogasmap, (2022).

Embora o maior número de plantas hoje do Brasil esteja vinculado ao setor agropecuário (78%), ele é responsável por apenas 10% do volume total de biogás produzido no país, cerca de 0,29 bilhões de Nm³/ano. A maior parte de biogás produzido no país, aproximadamente 74% do volume total (2,46 bilhões de Nm³/ano), é gerado nas plantas que processam resíduos sólidos urbanos (RSU) ou efluentes das estações de tratamento de esgoto, representando apenas 10% das plantas em operação no país (Biogasmap, 2022).

A Figura 5 reporta a produção de biogás no território nacional, assim como a distribuição destas plantas. Os dados reportados foram baseados em dados públicos das agências reguladoras dos setores de energia elétrica (ANEEL).

Figura 5 - Número de plantas e volume de produção de biogás nos Estados



Fonte: Biogasmap, (2022).

É possível observar que o estado de São Paulo é o maior produtor de biogás do país, com uma produção de aproximadamente 1,05 bilhões de Nm³/ano, distribuído em 74 plantas em operação. Grande parte desta produção do estado está vinculada ao setor sucroenergético. O estado do Rio de Janeiro aparece como o segundo maior produtor, com uma geração de quase 0,389 bilhões de Nm³/ano de biogás, com 12 plantas em operação. Neste caso, grande parte da produção vem de tratamento de RSU e esgoto.

Por ser um estado que dispõe de um moderno sistema agroindustrial, sendo o maior do Brasil e um dos mais expressivos do mundo, São Paulo já apresenta grandes empreendimentos no setor de biogás voltando ao setor agroindustrial, com destaque para empresas do setor sucroenergético, como Raízen, São Martinho, Cocal, dentre outras (Martinez *et al.*, 2023).

Neste contexto em que a biomassa representa uma fonte renovável e abundante de energia e tem potencial para se tornar uma fonte global de recursos, a reutilização desses resíduos é uma grande oportunidade para gerar energia na forma de biogás, pois representa uma troca de fonte de substrato atraente em termos de

redução do impacto no desenvolvimento e uso de energia renovável (Bühning; Silveira, 2018).

2.4 Potencial das Biomassas de Segunda Geração e Dejetos na DA

Atualmente diversos produtos vêm sendo desenvolvidos a partir de resíduos da agropecuária como biocombustíveis, biomateriais, produtos químicos, farmacêuticos, cosméticos e produtos de higiene. Além disso, é possível obter agroquímicos como biofertilizantes e biopesticidas, enfatizando a bioeconomia, gerando inúmeros benefícios socioeconômicos e ambientais à nossa sociedade (Vaz Junior, 2020).

É de suma importância avaliar a classificação e composição das biomassas, uma vez que biomassas de diferentes origens e regiões são utilizadas e convertidas em formas úteis de energia ou outros materiais, por diversos processos. A junção da avaliação com o processo de aproveitamento das biomassas pode servir de base para sua eficiência e rendimento para o produto desejado. Dentre as biomassas, podemos destacar os resíduos de poda da cultura do lúpulo, já que sua produção no país vem crescendo muito ao longo dos últimos anos e ainda não há aplicação efetiva dos resíduos desta cultura (Kanai *et al.*, 2021), além dos dejetos de bovinocultura, devido a larga produção de animais no país (Silva, 2018).

2.4.1 A Cultura do Lúpulo e Seus Resíduos

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta herbácea, perene e trepadeira que pertence à ordem Rosales e à família Cannabaceae, considerada de antiga domesticação e uso, encontrada na natureza em quase todas as regiões de clima temperado do Hemisfério Norte (Jastrombek *et al.*, 2022). Esta planta tem como característica ser constituída por sistema radicular profundo, dioicas, anemófilas e dextrogiras (Aquino *et al.*, 2022).

As grandes regiões produtoras de lúpulo no mundo encontram-se no Hemisfério Norte, na faixa entre as latitudes 30° e 55°, que compreende as áreas frias

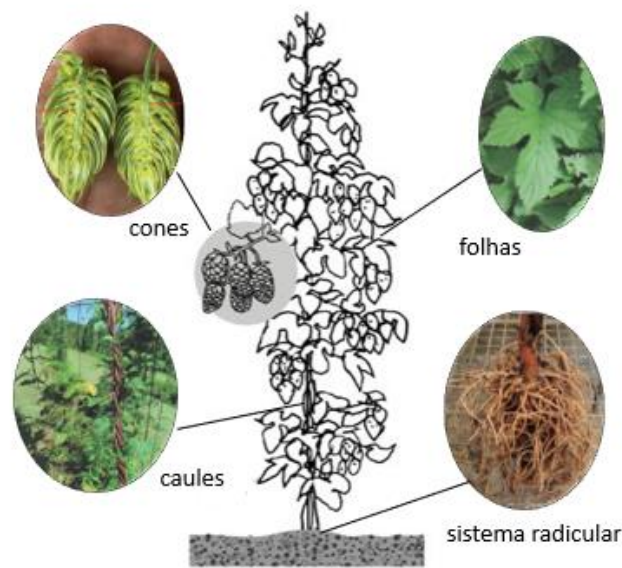
da América do Norte, Europa e Ásia (Aquino *et al.*, 2022). A vida útil do lúpulo pode alcançar até 50 anos, entretanto, a renovação das plantas é realizada de 10 a 20 anos conforme as tendências do mercado por novas variedades (Fagherazzi *et al.*, 2017).

No Brasil, acreditava-se que as condições climáticas não seriam favoráveis para o seu cultivo, um dos motivos pela qual a grande maioria do lúpulo é importado (Mongelli *et al.*, 2016), vindo da Alemanha e dos EUA. Porém, com o passar dos anos, a cultura vem se estabelecendo mostrando grande capacidade de adaptação (Fagherazzi *et al.*, 2017), o que torna sua expansão um atrativo para produtores de todo o país.

Contudo, a produção de lúpulo no país ainda enfrenta alguns obstáculos, tal como a falta de tecnologias em maquinários que são utilizados em diversas etapas, além de que a planta tem demanda específica principalmente ao fator fotoperíodo (incidência de luz solar na planta ao longo dos dias). Entretanto, certas cultivares têm se adaptado ao clima do Brasil e conseguiu-se produção e qualidade de lúpulo significativa. Portanto, a expansão do cultivo do lúpulo no Brasil é uma necessidade mercadológica que possivelmente proporcionará diversas vantagens, principalmente, a priori, à indústria cervejeira (MAPA, 2022).

A parte aérea da planta de lúpulo é anual e sua parte abaixo do solo é perene, assim, a rebrota ocorre a cada estação. A coroa, que é a base da planta que senesceu ou foi podada continua bem desenvolvida e viável para ser refeita na primavera (Doods, 2017). A Figura 6 mostra as partes da planta do lúpulo.

Figura 6 - Desenho esquemático da planta de lúpulo



Fonte: Adaptado de DOODS (2017).

O lúpulo produz inflorescências anualmente, chamadas de cones, ao longo de um período de aproximadamente quatro meses. A temperatura e o fotoperíodo são as principais restrições de produção da planta, e como a produtividade e a oferta global de lúpulo são influenciadas por esses fatores climáticos, algumas tecnologias e manejos de ambiente controlado podem ser adotadas como alternativa (Bauerle, 2019).

A parte subterrânea da planta é composta por um sistema radicular permanente, composto por raízes verdadeiras e rizomas, enquanto sua parte aérea se renova a cada ano. As raízes podem se desenvolver até 4,0 m de profundidade e até 5,0 m lateralmente (Figura 7) (Fagherazzi *et al.*, 2017), mas concentram-se na faixa de 20 a 30 cm. Os rizomas tendem a crescer apenas perto da superfície e têm brotos que dão origem a novas raízes e brotos (Spósito *et al.*, 2019).

Figura 7 - Sistema radicular da planta do lúpulo

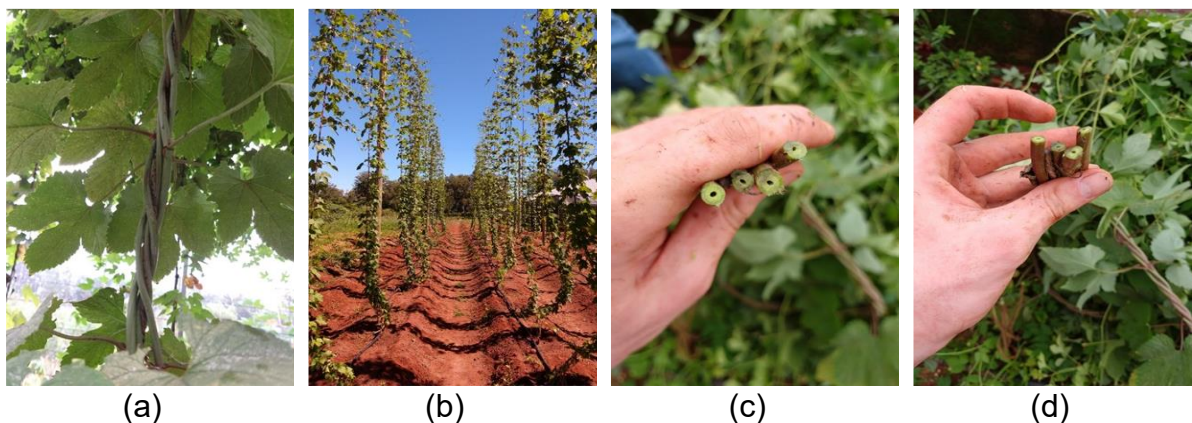


Fonte: Fotos do grupo de pesquisa.

A parte aérea da planta do lúpulo é formada por ramos, folhas e cones. Para que ocorra a formação de frutos, por ser uma planta dioica, o pomar precisa de plantas femininas e masculinas, para que ocorra a polinização cruzada. Ao contrário de outras plantas trepadeiras que possuem gavinhas para a fixação dos galhos, no lúpulo, os galhos possuem pelos aderentes que se prendem as estruturas à medida que se envolvem em uma estrutura. Os ramos do lúpulo apresentam crescimento indefinido, chegando a um comprimento de 8 a 9 m. Estes, vão se tornando mais grossos e lignificados a medida do seu crescimento (Spósito *et al.*, 2019).

Já os ramos, também chamados de caules, podendo crescer até seu comprimento máximo em três meses. Os ramos primários crescem verticalmente em torno da estrutura de sustentação, no sentido horário. Na fase inicial são de consistência herbácea, de forma tendencialmente hexagonal e movimento de enrolamento dextrogiro (Rodrigues; Moraes; Castro, 2015). O caule é piloso, oco, de coloração verde ou roxa, com formato hexagonal (Portugal, 2021).

A Figura 8 apresenta os ramos primários enrolados ao redor da estrutura de sustentação (a) e a planta em desenvolvimento no sistema de condução vertical (b). Nota-se ainda, na Figura 8 (c e d), o aspecto interno do caule e sua coloração.

Figura 8 - Parte aérea da planta do lúpulo

Fonte: Fotos do grupo de pesquisa.

Os ramos primários, bem desenvolvidos e lignificados, com a estrutura da planta já estabelecida, são chamados de caule. Nos ramos primários, que é segmentado por nós e entrenós, forma-se em cada nó um par de folhas e, nas axilas de cada folha há uma gema que dá origem a um ramo lateral, conhecido como ramo secundário, com somente folhas, ou, com folhas e inflorescências (ramo secundário misto). O lado superior da folha possui coloração verde escuro, diferente da face inferior (Spósito *et al.*, 2019). As folhas se apresentam em pares, de maneira opostas umas a outra nos nós, e podem conter de 3 até 7 lóbulos (Rodrigues; Morais; Castro, 2015).

As flores femininas desenvolvem-se em cones, responsáveis por conferir amargor, aroma e estabilidade microbiológica à cerveja (Korpelainen; Pietiläinen, 2021). Na Figura 9 encontram-se os cones, principal parte do lúpulo e de grande importância comercial.

Sendo assim, o interesse comercial nas plantas de lúpulo está relacionado predominantemente às inflorescências das plantas femininas, pois os cones formados possuem grande quantidade de glândulas de lupulina, ricas em resinas e óleos essenciais. São nessas glândulas que estão presentes os componentes mais relevantes para a indústria cervejeira, os quais são sintetizados e armazenados. Entre os compostos presentes nas resinas estão o α - e β -ácidos, responsáveis pelo

amargor da cerveja, e os óleos essenciais, responsáveis pelo aroma da cerveja (Aquino *et al.*, 2022; Fagherazzi *et al.*, 2017).

Figura 9 - Inflorescência (cones) da planta feminina



Fonte: SPÓSITO *et al.*, (2019).

O α -ácido, representando de 3 a 17% na composição da resina, é expelido pelas glândulas de lupulinas, e seu aspecto é um pó de cor amarelada, sendo extraído como um pó hidrofóbico. Para ser solubilizado em água, o ácido precisa ser isomerizado através de calor em solução (100 - 130°C), resultando em iso- α -ácido. Já o β -ácido, que representa de 3 a 7% de composição da resina, não sofrendo isomerização, e, assim, é insolúvel em água, tendo uma alta atividade antimicrobiana e como agente antioxidante (Spósito *et al.*, 2019).

Embora o lúpulo seja majoritariamente empregado no setor cervejeiro, os óleos e resinas apresentam propriedades sedativas, além de apresentarem efeitos antibacterianos e antifúngicos. Sendo assim, os cones também vêm sendo avaliados na produção de repelentes (Bedini *et al.*, 2015), como agente antioxidante (Alonso-Esteban *et al.*, 2019), antimicrobiano (Bocquet *et al.*, 2019), e no setor farmacêutico, apresentando excelentes atividades anti-inflamatória (Bartmanska *et al.*, 2013; Van Cleemput *et al.*, 2009) e no tratamento do câncer (Mouratidis *et al.*, 2013; Roehrer *et al.*, 2019).

Os caules e as folhas representam aproximadamente 75% da biomassa produzida no cultivo do lúpulo, sendo, estes, normalmente queimados ou aterrados após a colheita dos cones, já que estudos recentes comprovam que esse material não apresenta boa performance como recobrimento direto no solo, diferentemente das palhadas de outras culturas. Recentemente a utilização de resíduos agroindustriais

provenientes de plantas chamam a atenção por se tratar de resíduos de grande valor para reutilização. Esse valor agregado reduz a quantidade de descarte incorreto e desenvolve uma nova oportunidade de negócio, podendo construir um sistema de reciclagem circular regional (Kanai *et al.*, 2021).

Devido aos diversos usos dos cones, a cultura do lúpulo no Brasil está em crescente expansão, sendo necessário que haja aplicações para as outras partes da planta, como os resíduos da poda, compostos majoritariamente por caules primários, secundários e folhas. Alguns estudos da literatura apontam que, mesmo em menor quantidade, outras partes da planta, como caule e folhas, também apresentam concentrações de lupulina, e podem ser efetivos na ação bacteriostáticas, principalmente contra bactérias Gram-positivas (Abram *et al.*, 2015; Sugiyama; Oda; Kurosaki, 2006). Assim, percebe-se que o lúpulo pode ser utilizado em diversas outras aplicações além de seu uso no mercado cervejeiro, entre elas, aplicações voltadas ao uso medicinal, antioxidante e bactericida (Abram *et al.*, 2015; Buçu; Rodino; Buçu, 2016).

A produção de lúpulo no Brasil enfrenta alguns obstáculos, como uma cadeia produtiva não estabelecida, poucas tecnologias em maquinários que são utilizados em diversas etapas, além da demanda específica que planta possui, principalmente ao fotoperíodo (incidência de luz solar na planta ao longo dos dias). Entretanto, certas cultivares têm se adaptado ao clima do Brasil e conseguiu-se produção e qualidade de lúpulo significativa (MAPA, 2022).

Mesmo que o cultivo no país ainda esteja sendo consolidado e recente, um número considerável de produtores brasileiros está cultivando o lúpulo, sendo assim, é importante e promissor incentivar estudos e investimentos relacionados a cultura (MAPA, 2022). Estratégias para gerir e valorizar os resíduos gerados na produção de lúpulo devem também ser considerado. Após a colheita, muitas folhas e caules permanecem como resíduos orgânicos sem aproveitamento específico (Afonso *et al.*, 2021). Entretanto, para emprego deste tipo de biomassa é necessário realizar uma etapa de pré-tratamento anteriormente, visando abertura da sua estrutura macromolecular, o que irá favorecer os processos de biodegradação (Kasinath *et al.*, 2021).

2.4.1.1 Composição Química do Caule de Lúpulo e Processos de Fracionamento para Melhoraria da DA

O caule de lúpulo, assim como as demais biomassas lignocelulósicas são constituídas por celulose (35–50%), hemiceluloses (20–35%) e lignina (10–25%), bem como pequenas quantidades de extrativos e cinzas (Akhiar, 2016; Ponnusamy *et al.*, 2019).

A celulose é um polímero linear de glicose, formado por ligações do tipo β -O-4. Trata-se de uma molécula bastante estável e insolúvel na grande maioria dos solventes (Jong, 2014; Nagarajan *et al.*, 2017).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos amorfos, ramificado, composto por unidades de hexoses (glicose, manose e galactose), pentoses (xilose e arabinose), ácidos urônicos, desoxihexoses (ramnose e fucose) e grupos acetilas, com um comprimento de cadeia mais curto em comparação com a celulose. Devido à estrutura e natureza das hemiceluloses, a interação com a celulose ocorre facilmente, proporcionando flexibilidade e estabilidade à matriz lignocelulósica (Sjostrom, 2013).

Por fim, a lignina é o terceiro principal constituinte da planta, sendo uma macromolécula fenilpropanóides que confere resistência mecânica à sua estrutura. A biossíntese de lignina contribui extensivamente para o crescimento da planta, desenvolvimento de tecidos/órgãos, resistência e respostas a uma variedade de estresses bióticos e abióticos (Liu; Luo; Zheng, 2018). Nos processos de conversão das biomassas lignocelulósicas em bioenergia e em produtos de maior valor agregado, a lignina é componente limitante do processo, que dificulta especialmente as reações biológicas empregando microrganismos ou enzimas (Zoghلامي; Paës, 2019).

Os extrativos consistem em gorduras, lipídios, resinas, esteroides, taninos, terpenos, terpenoides, compostos fenólicos e flavonoides (Okolie *et al.*, 2019). São componentes não estruturais da planta, solúveis em água ou solventes orgânicos, como etanol e hexano.

As cinzas são resíduos sólidos inorgânicos e não combustível, proveniente da queima completa da biomassa, que inclui elementos e minerais como silicatos, carbonatos, fosfatos, cálcio, magnésio, sódio, potássio, entre outros (Nanda *et al.*,

2013; Vassilev *et al.*, 2012). As quantidades de materiais inorgânicos na composição da biomassa podem variar, se apresentarem em maior quantidade, ou estarem presentes na forma de contaminantes (Nakashima *et al.*, 2017).

A caracterização da biomassa fornece informações importantes para escolha de processos de pré-tratamento e assim melhorar a digestibilidade da biomassa. O objetivo de um pré-tratamento é desestruturar a biomassa lignocelulósica, tornando-o mais acessível para o ataque do microrganismo, o que auxilia no aumento do rendimento do biogás (Ponnusamy *et al.*, 2019).

Em relação aos resíduos da cultura de lúpulo, ainda há poucos trabalhos na literatura reportando a composição química do resíduo da cultura de lúpulo (Lukešová *et al.*, 2019; Reddy; Yang, 2015), e eventuais aplicações destes resíduos, com trabalhos recentes na área de compostagem (Luskar *et al.*, 2022), produção de papel (Haunreiter; Dichiara; Gustafson, 2021), biocompósitos (Harder *et al.*, 2023) e de nanofibrilas de celulose (Kanai *et al.*, 2021). Entretanto, ainda não há relatos de uso deste material nos processos de DA.

Existe uma gama de pré-tratamentos que podem ser aplicados ao processo para facilitar a desestruturação da biomassa, e sua escolha depende de vários fatores como características dos substratos, custo do processo, produto final de interesse, dentre outros (Rabelo; Pradella; Ienczak, 2019). Muitos processos de pré-tratamento têm sido avaliados visando aumentar a digestibilidade da biomassa em processos de digestão anaeróbica (DA), como o pré-tratamento mecânico (Apul; Sanin, 2010), hidrotérmico (Wang *et al.*, 2018a), ozonólise (Goel; Tokutomi; Yasui, 2003), dentre outros.

Segundo Hashemi *et al.*, (2021), para que o pré-tratamento seja eficaz na DA ele precisa promover o aumento da área superficial da biomassa, para facilitar o processo de hidrólise, diminuir a recalcitrância da mesma e da cristalinidade da celulose, além de promover uma menor formação de inibidores.

A primeira etapa da DA, a hidrólise, é considerada muitas vezes uma etapa limitante, pois a matéria orgânica complexa, como as frações macromoleculares, precisa ser solubilizada e hidrolisada em componentes mais simples. Neste sentido, a etapa de pré-tratamento é crucial, e pode levar a um fracionamento prévio da

biomassa e, assim, diminuir drasticamente o tempo da etapa de hidrólise no processo da DA, tanto para mono quanto para co-digestão (Kasinath *et al.*, 2021).

Dentre os processos de pré-tratamento, o hidrotérmico apresenta inúmeras vantagens, pois utiliza apenas água a altas pressões e temperaturas como catalisador químico, o que minimiza os custos operacionais. Além disso, apresenta eficácia na abertura da estrutura macromolecular da biomassa, levando a uma remoção parcial das hemiceluloses, aumento da acessibilidade à celulose, com mínima formação de produtos inibitórios fermentativos (Santucci *et al.*, 2015).

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura que empregaram o pré-tratamento hidrotérmico em biomassas lignocelulósicas para produção de biogás no sistema de mono-digestão.

Alguns trabalhos compararam o efeito das condições operacionais do pré-tratamento hidrotérmico na DA comparado a biomassa biodigerida sem pré-tratamento. Luo *et al.*, (2019) avaliaram o desempenho do pré-tratamento hidrotérmico da palha de arroz empregando diferentes condições operacionais. Os autores demonstraram que o aumento da temperatura de pré-tratamento promove uma mudança na estrutura química da celulose e favorece a solubilização das hemiceluloses. O pré-tratamento à 100°C e 150 min levou a um melhor desempenho na DA, com produção de metano de 127,6 NmL/g ST, pouco mais de 22% superior que a produção observada na biomassa sem pré-tratamento.

Tabela 3 - DA de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas hidrotermicamente

Biomassa	Condições Operacionais	Inóculo	DA	Produção máxima (NmL CH ₄ /g SV)	Referências
Microalgas	130°C, 15 min	Reator DA de tratamento de esgoto	Inóculo:substrato, 0,5:1 SV, 35°C	170	Passos; Ferrer, 2015
Palha de arroz	180°C, 15 min, 10% (m/m)	Reator DA	35 g ST/L, 35°C, 50 dias	175	Wang <i>et al.</i> , 2018a
Resíduos da colheita de girassol	180°C, 30 min	Reator DA de tratamento de esgoto	0,5 g SV/L, 35°C, 150 rpm	289,47	Lee e Young Park, 2020
Palha de cártamo	180°C, 60 min, 8,3% (m/m)	Reator de DA mesófilo de estação municipal de tratamento de esgoto	Inóculo:substrato, 2:1 SV	406,9 (fração líquida)	Hashemi; Karimi; Mirmohamadsadeghi, 2019
	120°C, 60 min, 8,3% (m/m)			191,4 (fração sólida)	
Capim Napier	175°C, 15 min, 9% (m/m)	Lodo ativado residual de DA	Inóculo:substrato, 2:1 SV	248,2 ± 5,5	Phuttaro <i>et al.</i> , 2019

Segundo Bařar; Eskicioglu; Perendeci, (2022), o pré-tratamento hidrotérmico foi benéfico para produção de metano utilizando biochar e cinzas de madeira no processo de DA. O pré-tratamento   200 C a 0 min (há uma rampa de aquecimento do reator, não apresentada no trabalho) promoveu uma produção acumulada de metano de 256,9 NmL/g SV, correspondendo a um aumento de aproximadamente de 32% em relação a biomassa não pré-tratada. Em condições mais severas de pré-tratamento, superiores   220 C e 20 min, foi observado uma alta degradação de a  uc res, causando uma forte inibição na produção do metano.

A eficácia do pré-tratamento pode depender de vários fatores, como temperatura, tempo de residência, pressão, características físico-químicas da biomassa, concentração de sólidos, entre outros (Yousefifar *et al.*, 2017).

Um dos importantes fatores determinados nos processos de pré-tratamentos   altas pressões e temperaturas é o fator de severidade. O aumento da severidade do pré-tratamento favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses e provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses (Hendriks; Zeeman, 2009). A Equação 1 descreve o fator de severidade do processo (Overend *et al.*, 1997).

$$\log (R_0) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{T - T_{ref}}{14.75} \right) \right] \quad (1)$$

Onde:

Log (R0): fator de severidade

t: tempo de residência, em min.

T: temperatura de pré-tratamento, em  C.

T_{ref} :temperatura de referência, 100 C.

O valor 14,75 é uma constante arbitrária ω baseada na energia de ativação, quando se assume uma cinética de pseudo primeira ordem.

O fator de severidade combinado é calculado com base no fator de severidade ($\log R'_0$) (Equação 2), considerando o valor do pH determinado após a etapa de pré-tratamento (Chum; Johnson; Black, 1990).

$$\log R'_0 = \log R_0 - pH \quad (2)$$

Onde:

Log (R'_0): fator de severidade combinado

Log (R_0): fator de severidade

pH: potencial hidrogeniônico da lama pré-tratada

A severidade das condições de pré-tratamento pode influenciar e até definir os parâmetros operacionais do digestor alimentado com a biomassa pré-tratada.

Phuttaro *et al.*, (2019) constataram que a biomassa pré-tratada a 200°C resultou na produção de altas concentrações de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, o que inibiu significativamente a fase metanogênica da DA. Em ensaios semi-contínuos, o digestor alimentado com a biomassa pré-tratada a 200°C, como uma carga orgânica volumétrica de 4 g SV/L.dia, resultou em falha total do processo de DA. Apesar dos estudos empregando diversas biomassas, é importante reportar que não há trabalhos na literatura empregando as biomassas de resíduo de lúpulo para tal avaliação, o que demonstra os desafios deste estudo.

2.5 Produção de Dejetos e Potencial na DA

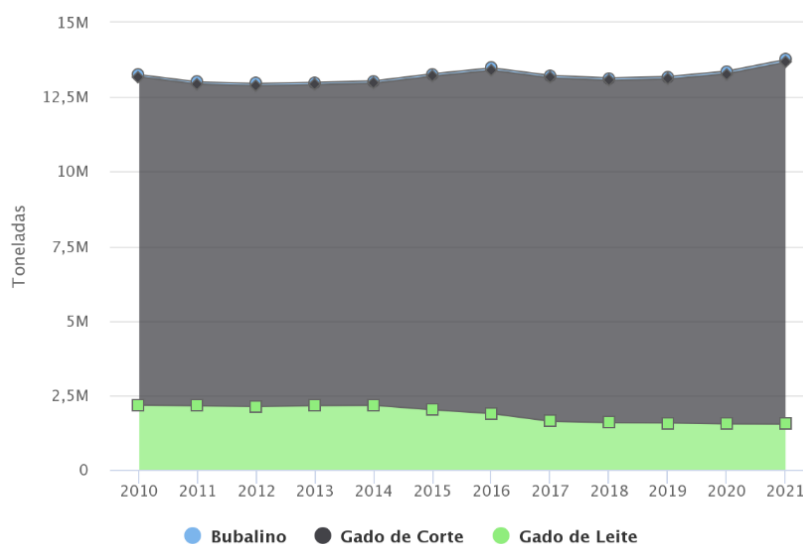
No Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas constam informações sobre o aumento do aquecimento global que será ainda mais evidente neste século danificando, especialmente, os sistemas de produção agropecuária em virtude da dependência climática variável dos mesmos (IPCC, 2021).

De acordo com Dortzback *et al.*, (2021), a pecuária é considerada uma atividade de grande impacto ambiental, devido as emissões de gases poluentes e aos grandes volumes de resíduos gerados. Sua importância econômica a torna uma das principais atividades emissoras de GEE no país e no mundo, especialmente pelos extensos rebanhos bovinos.

Durante a Conferência das Nações Unidas sobre as mudanças Climáticas (COP26), em 2021, o Brasil se comprometeu, junto à 100 outros países, a reduzir as emissões de metano em 30% até 2030, usando de base o ano de 2020. As nações terão que tornar a pecuária mais limpa, obrigatoriamente, para cumprir o tratado (Zaparolli; Vasconcelos, 2022).

A Figura 10 apresenta os dados sobre emissões de metano provenientes do setor agropecuário, onde é possível observar uma emissão de mais de 13 milhões de toneladas ao longo dos últimos anos, sendo esta emissão dada majoritariamente pela fermentação entérica e pelo manejo de dejetos animais.

Figura 10 - Emissões de metano pelo setor agropecuário



Fonte: SEEG, (2022).

Resultado da fermentação entérica, o metano é gerado no rúmen, um dos compartimentos do estômago dos bovinos, liberado majoritariamente por meio da eructação (arroto) e, em menor escala, por flatulência. Seu potencial para aumentar a

temperatura global, em um curto período de tempo (20 anos), é 80 vezes maior que o do CO₂ (Zaparolli; Vasconcelos, 2022).

Dos produtos restantes provenientes da pecuária, 35% são resíduos não comestíveis (resíduos de ração, pelos, resíduos e partes de animais após o abatedouros, entre outros) e 50% correspondem à água residual referente à produção (efluentes), totalizando um valor de 4 milhões de toneladas que podem ser utilizadas para outras aplicações industriais, como a geração de energia (Rodas; Botton; Furtado, 2020).

Diante de problemas relacionados às atividades agropecuárias, a área rural enfrenta problemas com a gestão de resíduos advindos da mesma. Além da emissão de GEE, que contribuem de forma negativa para o aquecimento global, os dejetos de animais podem ser responsáveis também pela contaminação do solo e águas subterrâneas, em razão da grande quantidade de nitrato (Resende, 2017). Em contrapartida, esses resíduos apresentam potencial energético e são fonte de matéria orgânica para a produção de biogás.

Sendo assim, a DA é uma solução possível para esse problema, pois pode produzir biogás e biofertilizantes, que têm benefícios econômicos. A reintrodução do biofertilizante na lavoura é uma questão relevante, especialmente em relação aos níveis seguros de coliformes termotolerantes, que estão associados à contaminação fecal e que representam riscos para a saúde humana e animal (Manzoli *et al.*, 2022).

De acordo com o Observatório da Pecuária Brasileira, o efetivo dos rebanhos bovinos no país chegou a 224 milhões de cabeças em 2021. Deste, mais de 22.856 milhões provem do Estado de Minas Gerais, ocupando o terceiro lugar no ranking nacional. Rio Grande do Sul e São Paulo também se destacam do ranking do país, ocupando os 7º e 8º lugares, respectivamente (IBGE, 2021b). Os três estados além de serem grandes produtores pecuários, também imperam como os principais Estados no cultivo do lúpulo (Kretzer; Creuz, 2022; Spósito *et al.*, 2019). Sendo assim, a integração destas cadeias pode ser atrativa para ambos os setores econômicos.

A DA é uma prática adequada para rentabilizar os resíduos, mas é limitante pela inibição de amônia quando ocorre a fermentação de dejetos bovinos em monodigestão (Shah *et al.*, 2015). A co-DA de dejetos com outros resíduos orgânicos podem

efetivamente regular o suprimento de nutrientes, melhorar a capacidade de tamponamento e, eventualmente, aumentar a produção de metano (Wang *et al.*, 2018b). Portanto, a junção de dejetos com os resíduos lignocelulósicos do lúpulo serão avaliados quanto ao potencial de melhorias no processo de DA.

2.6 Co-digestão Anaeróbia de Biomassas Lignocelulósicas e Dejetos Bovinos

A DA pode ocorrer na presença de um ou mais substratos, sendo conhecida como co-digestão anaeróbia (co-DA). Um dos principais objetivos da co-DA é minimizar os efeitos dos compostos inibidores no processo anaeróbico, trazendo um equilíbrio de nutrientes ao processo, e melhorando o efeito sinérgico entre os microrganismos, contribuindo, assim, para melhorar a estabilidade e o desempenho da DA de resíduos de difícil degradação (Buendía *et al.*, 2009).

Alguns autores relatam que as biomassas vegetais podem ser utilizadas em processos de co-DA juntamente com dejetos de animais, promovendo benefícios ao processo de digestão em termos de rendimento, produtividade, e vantagens econômicas e ambientais, uma vez que ocorre destinação e tratamento de diferentes resíduos transformando-os em fonte de energia (Aboudi; Álvarez-Gallego; Romero-García, 2016; Avaci *et al.*, 2013; Bah *et al.*, 2014).

Dentre as biomassas vegetais, as lignocelulósicas se destacam pela dificuldade na DA, devido a sua estrutura complexa e recalcitrante. Além disso, a alta relação C/N destas biomassas pode limitar o crescimento microbiano e, assim, o carbono não será totalmente degradado ou mesmo demandará de longos tempos para degradação da matéria orgânica total. Nestes casos, a co-DA destas biomassas com substratos de maior teor de nitrogênio, como é o caso dos dejetos de animais, pode trazer benefícios ao processo, melhorando a produção do metano (Abouelenien *et al.*, 2014; Rajlakshmi *et al.*, 2023).

Estudos realizados por Zhao *et al.*, (2018) demonstraram um rendimento específico de metano superior na co-DA empregando uma proporção de 2:1 (substrato:dejeito) de palha de aveia e dejetos bovinos com 841,77 mL/g SV, uma produção cumulativa 26,64% maior do que a produção empregando apenas a

biomassa vegetal digerida sozinha em comparação com uma produção empregando apenas a biomassa vegetal (155 ± 26 NmL/g SV).

Diversos trabalhos avaliaram o processo de co-DA de biomassas lignocelulósicas com dejetos bovinos, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Mendieta *et al.*, (2020) descreveram que processos DA empregando biomassas lignocelulósicas muito dificilmente atingem uma viabilidade técnico-econômica atrativa, seja pelo potencial metanogênico reduzido da biomassa ou pela cinética da reação excessivamente lenta, devido às características recalcitrantes da mesma. Neste sentido, estratégias de pré-tratamento podem ser realizadas visando diminuir tal recalcitrância e favorecendo, assim, o processo (Elalami *et al.*, 2020; Volpi *et al.*, 2022).

A co-DA a partir de substratos lignocelulósicos e dejetos animais oferece uma rota promissora para a produção eficiente de biogás (Neshat *et al.*, 2017; Ulukardesler, 2023). Um requisito importante para a comercialização da tecnologia de co-DA é localizar propriedades de produção animal e agrícola próximas umas às outras, para que grande quantidade de resíduos lignocelulósicos e dejetos estejam disponíveis em abundância e próximo ao local de consumo.

Tabela 4 - Co-DA de diferentes biomassas lignocelulósicas e dejetos bovinos

Biomassa	Pré-tratamento	Dejeto	Inóculo	Condições operacionais	Produção máxima de metano (NmL/g SV)	Referências
Azevém perene	Silagem por 100 dias, à 15°C	Bovino	Reator industrial de co-DA de dejeto bovino e silagem de capim	35°C, razão azevém:dejeto 0,6:0,4 (SV), 35 dias	285,7	Himanshu <i>et al.</i> , 2018
Resíduos de colheita de milho	Hidrotérmico à 175°C e 30 min	Bovino	Próprio dejeto	55°C, 26 dias	306,96	Kovačić <i>et al.</i> , 2018
Palha de soja	Hidrotérmico à 121°C e 90 min				261,44	
Resíduos de colheita de girassol	Hidrotérmico à 121°C e 90 min				245,02	
Palha de arroz	Moagem à 40 mesh	Bovino	Reator de DA para tratamento de esgoto de cervejaria	35°C; 140 dias 35°C; 140 dias, 1% de limonita	460,2 ± 30,0 601,0 ± 28,0	Xu <i>et al.</i> , 2019
Resíduos da cultura do milho	-	Bovino	Reator de DA de dejetos bovinos	55°C; 21 dias	357,41	Joseph <i>et al.</i> , (2019)
	Pré digestão com o inóculo à 55°C por 3 dias				446,84	
	Pré digestão com o inóculo à 55°C por 7 dias				518,58	

Tabela 4 - Co-DA de diferentes biomassas lignocelulósicas e dejetos bovinos (Continuação)

Biomassa	Pré-tratamento	Dejeto	Inóculo	Condições operacionais	Produção máxima de metano (NmL/g SV)	Referências
Casca de nozes	-	Bovino	Reator de DA mesófilo de estação de tratamento de águas residuais industriais	37°C; 30 dias; 200 rpm, razão casca:dejeto 3:1 (SV)	173,2 ± 8,7	Şenol, 2020
	Solução de hidróxido de sódio à 4% (m/m), 10% sólidos (m/m), 24 h				342,5 ± 9,6	
	Solução de hidróxido de potássio à 4% (m/m), 10% sólidos (m/m), 24 h				289,2 ± 7,7	
	Solução de hidróxido de cálcio à 3% (m/m), 10% sólidos (m/m), 24 h				289,2 ± 7,7	
Palha de colza	Explosão de vapor à 180°C e 5 min, seguido de moagem superfina	Bovino	Reator de DA de dejetos bovinos	37°C; 40 dias, razão dejeto:biomassa 60:40	535,4 ± 6,8	Gaballah <i>et al.</i> , 2020
Palha de trigo	Físico, por moagem obtendo partículas de 1mm, seguido de químico com 1 mol/L de bicarbonato de sódio à temperatura ambiente	Bovino	Próprio dejeto	35°C; 125 dias, 3% sólidos totais e 1:1 biomassa:dejeto	307,0	Mosadegh Ranjbar; Karrabi; Shahnava, 2022

2.7 Subproduto da DA: Digestato

Como uma biotecnologia bem estabelecida, a DA pode não apenas produzir energia renovável na forma de biogás por meio da decomposição de vários resíduos orgânicos (Yin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018), mas também oferecer uma alternativa à estabilização de resíduos, reduzindo o volume e recuperando os nutrientes por meio da aplicação do lodo digerido (Capson-Tojo *et al.*, 2018). A fração líquida digerida é um subproduto do sistema de DA e contém quantidades abundantes de microrganismos não patógenos e substâncias inorgânicas (Akhlar, 2016; Hagos *et al.*, 2017).

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento da indústria de aproveitamento energético dos resíduos agroindustriais é a necessidade da destinação correta do efluente dos biodigestores, também conhecido como digestato. Por um lado, existem tecnologias para o tratamento do digestato, que visa a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo), possibilitando o reuso do efluente ou o seu lançamento em corpos hídricos receptores. Porém, o emprego destas tecnologias agrega custos que impactam na viabilidade econômica destes empreendimentos (Miele *et al.*, 2015).

Em alguns casos, o lodo residual necessita de uma espécie de beneficiamento final para estabilizar a porção restante de matéria orgânica para aumentar a qualidade do fertilizante e aplicabilidade como condicionador de solo (Bustamante *et al.*, 2013). Algumas características indesejáveis do digerido, como odor, viscosidade, alta quantidade de água e ácidos graxos voláteis residuais podem restringir a sua aplicação direta em solos agrícolas sem qualquer tratamento (Abdullahi *et al.*, 2008). Além disso, esse efluente pode conter patógenos como bactérias, parasitas, vírus e fungos, o que normalmente acontece quando os processos de DA ocorrem abaixo de condições termofílicas (Walker; Charles; Cord-Ruwisch, 2009).

Uma opção é separar digestato em uma fração líquida e uma sólida, onde a fração sólida pode ser compostada para obter produtos finais valiosos e prontos para uso na agricultura (Holm-Nielsen; Al Seadi; Oleskowicz-Popiel, 2009). Por apresentar um baixo teor de sólidos, o processo de compostagem costuma ser diferente (Franke-Whittle *et al.*, 2014a). Já a fração líquida tem sido utilizada como agente de pré-

tratamento biológico para diferentes tipos de biomassa lignocelulósica em pesquisas laboratoriais, apresentando vantagens na biodegradação e na produção de biometano (Tambone *et al.*, 2017).

A maior parte do digestato apresenta um caráter alcalino, possui alto teor de umidade e baixa relação C:N, assim como baixa biodegradabilidade (Zeng; De Guardia; Dabert, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Colheita e Preparação dos Resíduos de Poda de Lúpulo

A biomassa lignocelulósica utilizada nos ensaios foi obtida após a colheita dos cones, da variedade Americana *Cascade*, cujo transplântio ocorreu em setembro de 2021 e a colheita em janeiro de 2022, obtendo assim um ciclo de cultivo de 156 dias. O material foi fornecido pelo grupo de pesquisa “Lúpulo, Aplicações e Manejo”, LUPAM, da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Unesp, Campus de Botucatu, sendo a variedade um cruzamento entre as variedades *Fuggle* e *Serebrianka*, mais resistente as principais doenças fúngicas da planta, como o oídio, o míldio e a murcha do *Verticillium* (Fagherazzi *et al.*, 2017).

A biomassa residual foi seca ao ar livre, em ambiente protegido de luminosidade, tendo o caule separado manualmente para aproveitamento e utilização apenas desta fração (ramos primários e secundários). As folhas e os rizomas foram descartados. Em seguida, os caules foram quebrados manualmente, em pedaços menores, e posteriormente moídos em um moinho de facas tipo Willey utilizando na saída uma peneira de 10 mesh, sendo, assim, coletadas as partículas com granulometria inferior a 1,70 mm. A Figura 11 demonstra o material utilizado neste trabalho.

Figura 11 - Processo de separação manual dos caules (a) e a biomassa limpa, preparada e moída (b), para uso nos ensaios



(a)



(b)

3.1.2 Análise de Granulometria do Caule de Lúpulo Moído

Para determinar a granulometria dos resíduos de poda de lúpulo (caules) após o processo de moagem, foi empregado o método de peneiramento, amplamente utilizado na classificação granulométrica de partículas sólidas granulares, incluindo a classificação de biomassas de origem vegetal.

A análise foi conduzida em um agitador de peneiras eletromagnético (MBL, modelo AGMAGB) utilizando peneiras da série Tyler. O tempo de peneiramento foi de 10 min, e a frequência de vibração correspondia à posição oito do potenciômetro do agitador. Um conjunto de 7 peneiras (Malha: 3/8, 40, 45, 50, 60, 80, 100), além da base inferior sem perfuração, foi utilizado no procedimento. Após cada ciclo de peneiramento, o material retido em cada peneira teve sua massa determinada e os valores registrados.

3.1.3 Obtenção e Preparo do Dejeto

O dejeto utilizado nos estudos de DA e co-DA foi obtido junto a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Unesp, Campus de Botucatu. O material foi gerado por bovinos de corte em confinamento, oriundo de uma raça de melhoramento genético, que se alimenta de uma dieta especial, auxiliando no seu desenvolvimento precoce quando associado ao cruzamento.

O dejeto foi coletado em seis diferentes pontos distribuídos nas baias, sendo considerando uma única coleta. Na sequência, o material foi homogeneizado manualmente em laboratório, com o auxílio de uma pá e, em seguida, foram retiradas amostras de 1,0 g para a determinação de umidade em uma balança de infravermelho (IV 2500, Gehaka). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após análise, o material foi armazenado em um saco plástico bem vedado, permanecendo sob refrigeração à 5°C, até ser empregado nos ensaios de DA e co-DA.

Nos ensaios onde o dejeto foi empregado, o mesmo foi utilizado como substrato, na sua forma in-natura. O material apresenta alto teor de fibras e matéria orgânica, em virtude da alimentação bovina, visível a olho nu, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Dejetos in-natura homogeneizados



Foto: Estela Gato Ferreira- 2022

3.1.4 Obtenção e Preparo do Inóculo

O inóculo foi coletado em um biodigestor modelo Canadense, construído em lona de PVC, e alimentado por dejetos de bovinos confinados de produção leiteira, pertencentes a Fazenda Campestre, localizada no município de São Pedro – SP. O material foi armazenado em galões de 5 L, à temperatura ambiente, e mantidos semiabertos, afim de não ocorrer vazamentos ou inchamento do recipiente, devido a eventual produção de metano.

A Figura 13 apresenta o biodigestor da Fazenda Campestre, onde o inóculo foi coletado.

Destaca-se que para esse projeto foi escolhido tal inóculo devido às chances de aceleração no processo de biodegradação, garantindo que o inóculo em sua concentração e estabilidade ideal, desempenhe o aumento da produção de metano.

Figura 13 - Biodigestor Canadense da Fazenda Campestre (a) e coleta do inóculo (b)



(a)



(b)

3.2 Pré-tratamento Hidrotérmico do Caule de Lúpulo

As reações de pré-tratamento foram realizadas em reatores de aço inox 316L, com capacidade de 500 mL (Projeto próprio, Conexões Gerais). Cada reator foi alimentado com aproximadamente 30 g de caule de lúpulo (base seca) e 270 mL de água destilada, mantendo a concentração de sólidos de 10% (m/m). A determinação da umidade da biomassa foi realizada em uma balança de infravermelho (IV 2500, Gehaka).

Os reatores foram fechados e imersos em um banho de aquecimento de fluido térmico (MA 159/BB, Marconi) considerando três diferentes temperaturas de pré-tratamento (175, 190 e 205°C) em 10 min de reação. Estas condições foram realizadas visando encontrar fator de severidade (LogR0) e fator de severidade combinado (Log

R'0) distintos para cada uma das condições, a fim de avaliar como estas variações interferem na solubilização da biomassa e nos processos de DA e co-DA. Os fatores LogR0 e Log R'0 foram determinados de acordo com a Equação 1 e 2, descritas na revisão de literatura.

Ao final de cada tempo estabelecido, os reatores foram submetidos a uma etapa de resfriamento em banho de gelo fundente até atingir a temperatura ambiente.

A Figura 14 apresenta um dos reatores empregados no processo, assim como o sistema de aquecimento por fluido térmico.

Figura 14 - Sistema de pré-tratamento. Banho de aquecimento de fluido térmico (a) e um exemplo do reator empregado nos ensaios (b)



(a)



(b)

No total, foram realizados 18 ensaios de pré-tratamento hidrotérmico, sendo seis para cada condição operacional estabelecida no estudo, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Materiais obtidos após os ensaios de pré-tratamento hidrotérmico

Condição operacional (°C, min)	Número de ensaios	Separação sólido/líquido?	Material obtido para estudos de DA e co-DA
175, 10	3	Não	Lama
	3	Sim	HH
190, 10	3	Não	Lama
	3	Sim	HH
205, 10	3	Não	Lama
	3	Sim	HH

Conforme mencionado na Tabela 5, o material que não passou por uma etapa de separação sólido/líquido foi nomeado de lama, sendo utilizado nos estudos de DA e co-DA da forma integral após a etapa de pré-tratamento. Já o material que passou por uma etapa de separação sólido/líquido, apenas a fração líquida foi direcionada para os ensaios de DA e co-DA, sendo nomeada como hidrolisado hemicelulósico (HH). Na etapa de separação sólido/líquido foi utilizado uma peneira de 65 mesh, e a fração sólida retida, nomeada como celulignina, foi posteriormente lavada com água corrente e seca, para determinação do rendimento do pré-tratamento. O rendimento do pré-tratamento foi expresso pela média e desvio padrão ($\pm$) dos três ensaios, em cada uma das condições. Além disso, uma análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias (Teste de Tukey) foram realizados para avaliar as diferenças estatísticas do processo ($p\text{-value} < 0,05$), pelo Excel.

As amostras lama, HH e celulignina foram caracterizadas quanto a sua composição química, conforme será descrito nos itens 4.6.1 (lama e celulignina) e 4.6.2 (HH), e armazenadas em geladeira para posterior utilização nos ensaios.

3.3 Análises Físico-Químicas dos Substratos e Inóculo

As análises físico-químicas foram realizadas para caracterização do inóculo e dos substratos, além do acompanhamento e monitoramento dos ensaios realizados.

3.3.1 Caracterização Química do Caule de Lúpulo In-Natura, da Fração Sólida e da Lama

A fração sólida recuperada no processo de separação sólido/líquido, celulignina, e a lama de cada ensaio de pré-tratamento foram caracterizadas segundo a metodologia descrita por Sluiter *et al.*, (2016). O procedimento experimental e as equações são apresentadas no APÊNDICE A.

3.3.2 Caracterização Química do Hidrolisado Hemicelulósico

O HH foi caracterizado quanto aos teores de açúcares monoméricos e oligoméricos, além dos produtos de degradação, segundo a metodologia descrita por Nakasu *et al.*, (2016).

Para determinação dos açúcares oligoméricos, 5,0 mL dos HH obtidos após as etapas de pré-tratamento foram submetidos a uma etapa de hidrólise ácida empregando uma solução de ácido sulfúrico 72% (m/m), afim de hidrolisar os oligossacarídeos presentes no meio. O volume de ácido necessário para hidrólise dos açúcares foi determinado de acordo com o pH do meio, visando atingir uma concentração de ácido no meio de 4% (m/m). Para todos os ensaios foi necessário adicionar 0,174 mL da solução de ácido sulfúrico 72% (m/m) para atingir tal concentração.

Os tubos foram levados para hidrólise em autoclave, à 121°C, por 1 h. Ao final, o material foi filtrado e a fração líquida analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação dos açúcares monoméricos e produtos de degradação formados. Além disso, o do HH bruto (sem hidrólise) também foi analisado por HPLC para quantificação dos açúcares presentes no meio antes do processo hidrolítico. Todas as amostras foram filtradas em uma membrana de celulose 0,22 µm e transferidas para os vials.

As análises cromatográficas foram realizadas por meio de um HPLC Agilent Technologies (1260 Infinity) empregando os detectores de índice de refração (IR), para quantificação da glicose, celobiose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido levulínico e ácido fórmico, e detector de ultravioleta de arranjo de diodos (UV-DAD), para quantificação do furfural e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF).

Para quantificação dos açúcares e ácidos orgânicos foi utilizado as condições:

- Coluna: Bio-Rad Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm);
- Volume de injeção: 10 µL;
- Fase móvel: solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L degaseificada;
- Vazão: 0,5 mL/min;
- Tempo de corrida: 25 min;
- Temperatura dos detectores e do forno da coluna: 43°C.

Para a determinação de aldeídos furânicos (furfural e HMF), as condições de análise foram:

- Coluna: Nova-Pak C18, 4 µm (Waters);
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fase móvel: acetonitrila:água, 1:8, com 1% (v/v) de ácido acético, degaseificada;
- Vazão: 0,8 mL/min;
- Tempo de corrida: 5 min;
- Temperatura do detector DAD e do forno da coluna: temperatura ambiente e 30°C, respectivamente.
- Comprimento de onda: 274 nm.

3.3.3 Análise da Série de Sólidos

Os substratos utilizados nos ensaios de PBM foram caracterizados quanto aos sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT) e sólidos fixos totais (SFT) segundo a metodologia APHA (2005).

Inicialmente os cadinhos de porcelana passaram pela calcinação em uma mufla (2000 F/DI, Lucadema) durante 1 h, a 550°C, a fim de remover resíduos orgânicos, e posteriormente foram ambientados no dessecador. Ao final, a massa de cada cadinho foi determinada em balança analítica (ATX 224, Shimadzu).

Em seguida, realizou-se a amostragem do inóculo e dos substratos (biomassa in-natura, lama, HH, dejetos e celulose microcristalina), utilizando, aproximadamente, 20,0 mL para os líquidos, cuja massa foi quantificada, e 5,0 g para os sólidos. As amostras foram pesadas nos cadinhos e então levadas para secagem em uma estufa de circulação de ar (MA 035/3, Marconi) à 105°C por 24 h.

Após a secagem, os cadinhos foram transferidos para um dessecador, resfriados, tendo a massa novamente determinada em balança analítica (ATX 224, Shimadzu). A partir dos valores de massa obtidos, calculou-se os sólidos totais presentes nas amostras, conforme descrito na Equação 1.

$$ST = \frac{M_2 - M_1}{\text{Massa da amostra de entrada}} \quad (1)$$

Onde:

ST: sólidos totais (g/g);

M₁: massa do cadinho vazio (g);

M₂: massa do cadinho + resíduo seco (g).

Após determinação dos ST, os cadinhos foram levados para calcinação em mufla (2000 F/DI, Lucadema), à 550°C por 2 h. Ao final deste processo, o material foi mantido na mufla até temperatura ambiente e posteriormente transferido para uma

estufa, para garantir a massa seca da amostra. Após secagem por 24 h em estufa à 105°C, os cadinhos foram transferidos para um dessecador para posterior determinação de massa em balança analítica (ATX 224, Shimadzu). A quantificação dos SVT e SFT foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente.

$$SVT = \frac{M_2 - M_3}{\text{Massa da amostra de entrada}} \quad (2)$$

Onde:

SVT: sólidos voláteis totais (g/g);

M₂: massa do cadinho + resíduo seco (g);

M₃: massa do cadinho + resíduo calcinado (g).

$$SFT = \frac{M_3 - M_1}{\text{Massa da amostra de entrada}} \quad (3)$$

Onde:

SFT: sólidos fixos totais (g/g);

M₁: massa do cadinho vazio (g);

M₃: massa do cadinho + resíduo calcinado (g).

3.3.4 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Potencial Bioquímico de Metano Teórico (PBMT) dos HH

A análise de demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada para as amostras líquidas na entrada, HH, de acordo com o método 5220D descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Para a análise de DQO, as amostras de HH foram diluídas 100 vezes. Alíquotas das amostras diluídas foram transferidas para tubos de DQO padrão HACH, sendo submetidas a reação química pela adição da solução de dicromato de potássio e

solução de sulfato de prata com ácido sulfúrico concentrado. Após a adição das soluções, os tubos foram levados ao digestor de DQO DRB 200 (HACH), por 120 min, à 150°C. Após o resfriamento dos tubos em um local escuro, a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro DR 6000 (HACH), com comprimento de onda fixado em 600 nm.

Para determinar o Potencial Bioquímico de Metano Teórico (PBMT) do HH empregados na produção de biogás foi realizada a quantificação da composição elementar dos materiais. Sendo assim, a composição elementar dos substratos líquidos foi estimada a partir dos dados de análise de DQO, do nitrogênio orgânico (N_{org}) e do teor de sólidos totais (ST).

As análises de N_{org} das frações líquidas foram realizadas como prestação de serviço, empregando o método Kjeldahl, que determina as formas orgânica e inorgânica do nitrogênio. Já o teor de ST foi determinado conforme descrito no item 4.3.3.

As Equações 4, 5 e 6 descrevem a porcentagem mássica dos elementos hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N), respectivamente, presentes no material orgânico, conforme descrito por Kleerebezem, (2014). A quantificação do carbono (C) foi determinada por diferença.

$$H = \frac{308 \text{ DQO} + 704 N_{org}}{49 \text{ DQO} - 64 N_{org} + 112 \text{ ST}} \quad (4)$$

$$O = \frac{224 \text{ ST} + 56 \text{ DQO} - 304 N_{org}}{49 \text{ DQO} - 64 N_{org} + 112 \text{ ST}} \quad (5)$$

$$N = \frac{352 N_{org}}{49 \text{ DQO} - 64 N_{org} + 112 \text{ ST}} \quad (6)$$

Onde:

DQO: demanda química de oxigênio que corresponde a quantidade equivalente de oxigênio necessário para oxidar todo o carbono orgânico em dióxido de carbono (CO₂);

ST: conteúdo de matéria orgânica seca;

N_{org}: nitrogênio orgânico normalmente estimado a partir da concentração total de compostos de nitrogênio reduzido.

Com os dados elementares determinados foi possível calcular o PBMT através da equação de Buswell (Raposo *et al.*, 2011; Siegert; Banks, 2005), conforme apresentado na Equação 7. Neste caso, assume-se a conversão estequiométrica total da matéria em metano e dióxido de carbono.

$$PBM_{TThAtC} = \frac{\left[\left(\frac{C}{2}\right) + \left(\frac{H}{8}\right) - \left(\frac{O}{4}\right)\right] \times 22.400}{(12C + H + 16O)} \quad (7)$$

Onde:

PBM_{TThAtC}: potencial bioquímico de metano teórico (NmLCH₄/g SVT);

22.400: é o volume molar do gás, em mL/mol, nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP, 273 K e 1 bar);

C, H, O: são a fração molar do substrato em carbono, hidrogênio, oxigênio, respectivamente.

No entanto, quando proteínas estão presentes nas amostras, amônia e sulfeto de hidrogênio são liberados e devem ser levados em consideração pela equação de Boyle, como mostra a Equação 8.

$$PBM_{To-ThAtC} = \frac{\left[\left(\frac{C}{2}\right) + \left(\frac{H}{8}\right) - \left(\frac{O}{4}\right) - \left(\frac{3N}{8}\right) - \left(\frac{S}{4}\right)\right] \times 22.400}{(12C + H + 16O + 14N + 32S)} \quad (8)$$

Onde:

PBM_{To-ThAtC}: potencial bioquímico de metano teórico (NmLCH₄/g SVT);

22.400: volume molar do gás, em mL/mol, nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP, 273 K e 1 bar),

C, H, O, N, S: são a fração molar do substrato em carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, respectivamente.

Além do cálculo do PBMT_L, os dados de DQO do digestato foram utilizados para avaliar o potencial de uso do efluente em fertirrigação.

3.3.5 Determinação da Composição Elementar e Potencial Bioquímico de Metano Teórico (PBMT) das Frações Sólidas

A análise elementar foi realizada nas frações sólidas (lama, biomassa in-natura e dejetos) em parceria com o Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (CAQI-IQSC-USP). Para isso, foi utilizado o analisador elementar (FlashSmart, ThermoScientific) para quantificação do carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre, onde o oxigênio foi determinado por diferença de massa. Para a quantificação dos elementos, foi utilizado método da calibração externo tendo como padrões a metionina, o triófenol (BBOT), a sulfanilamida e a cistina.

Uma massa conhecida da amostra foi acondicionada em um porta amostra de estanho e este sistema inserido em um tubo de reação, que foi aquecido à 950°C. O interior do tubo foi preenchido com reagentes que criaram uma zona de oxidação (CuO) e outra de redução (Cu eletrolítico). A alta temperatura promoveu a oxidação (combustão) do estanho do porta amostra, que, por sua vez, promoveu uma reação altamente exotérmica, gerando um aumento substancial da temperatura do sistema (cerca de 1.700°C), promovendo a total degradação da amostra.

Neste processo, todo o C presente na amostra foi transformado em CO₂; todo o H em H₂O; todo o N em N₂; e todo o S em SO₂. Estes gases gerados no processo de combustão foram direcionados para uma coluna de cromatografia gasosa para quantificação dos mesmos por meio de um detector de condutividade térmica (TCD)

utilizando as curvas de calibração para determinação das porcentagens de CHNS e O por diferença.

Os dados obtidos foram utilizados para calcular o Potencial Bioquímico de Metano Teórico (PBMT) das frações sólidas, empregando, para isso, as Equações 7 e 8, conforme descrito no item 4.3.4.

3.3.6 Análise de Macro e Micronutrientes dos Substratos e Inóculo

As análises de macro e micronutrientes foram realizadas para todos os substratos e inóculo no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), localizado na Faculdade de Engenharia Química, da UNICAMP, como prestação de serviço. As análises foram realizadas empregando a técnica de fluorescência de Raios X (XRF) (Axios, Panalytical).

Antes das análises, as amostras foram queimadas segundo a metodologia descrita no APÊNDICE A, para obtenção das cinzas e assim melhorar a acurácia dos dados analíticos.

As amostras foram pesadas em uma balança analítica (Gehaka) e pastilhadas com o reagente aglomerante em uma prensa hidráulica (AMEF).

Em vidro de relógio pesou-se aproximadamente 0,2 g das amostras previamente maceradas e aproximadamente 3,5 g de aglomerante MAXXIWAX 1000 (MaxxiFlux). Os materiais foram levados para uma prensa hidráulica (AMEF) e compactados manualmente em uma pastilha de aproximadamente 20 mm. Sobre a amostra, foi utilizado um filme Mylar (Densidade de 1,38 g/cm³; diâmetro de 6,35 cm e espessura de 6,0 µm) para evitar que um possível desprendimento de partículas e contaminação da câmara de análise do equipamento.

A pastilha de amostra foi colocada no porta amostras específico e levada ao equipamento para análise. Os elementos químicos de número atômico 1-7 não são detectados nesta análise e os resultados de saída foram reportados na forma de óxidos, em porcentagem mássica e não normalizados a 100%.

Os resultados obtidos foram tratados e expressos como concentração dos elementos químico quantificado, levando em consideração no cálculo a correção de massa molar, a massa de cinzas obtidas em cada material analisado, e transpondo os valores para a biomassa na sua composição original, da forma empregada no processo de DA e co-Da.

3.4 Biodigestão Anaeróbia

Os ensaios de DA e co-DA foram realizados visando a determinação do Potencial Bioquímico de Metano (PBM) empregando as biomassas lignocelulósicas pré-tratadas e o dejetos bovino (co-DA) como substratos, segundo a metodologia alemã (VDI 4630, 2016).

Os ensaios foram realizados em frascos de soro de 100 mL, com um headspace de 40%, em temperatura mesofílica (35°C) e pH 7. Quando necessário, o pH foi ajustado na fase inicial com uma solução de ácido clorídrico 1 mol/L ou hidróxido de sódio 50% (m/v). Os ensaios foram realizados em quintuplicata, totalizando 85 frascos, utilizando a celulose microcristalina como controle positivo e o inóculo como controle negativo, conforme planejamento apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM)

	Condição de pré-tratamento (°C, min)	DA	Co-DA
Controle negativo		Inóculo	-
Controle positivo		Celulose microcristalina + inóculo	-
Dejeto bovino		Dejeto + inóculo	-
Biomassa de lúpulo sem pré-tratar (BSP)		BSP + inóculo	Dejeto + BSP + inóculo
	170, 10	Lama + inóculo	Dejeto + lama + inóculo
Biomassa pré-tratada	190, 10	Lama + inóculo	Dejeto + lama + inóculo
	205, 10	Lama+ inóculo	Dejeto + lama + inóculo
	170, 10	HH + inóculo	Dejeto + HH + inóculo
Hidrolisado hemicelulósico (HH)	190, 10	HH + inóculo	Dejeto + HH + inóculo
	205, 10	HH + inóculo	Dejeto + HH + inóculo

A caracterização gravimétrica do inóculo, dejeto, lama e HH foi realizada previamente a fim de garantir a proporção de 2:1 entre os sólidos voláteis totais (SVT) do inóculo e do substrato, conforme definido pela metodologia (VDI 4630, 2016). Para os ensaios de co-DA, a proporção dos substratos foi mantida fixa em 1:1, assim, 2:0,5:0,5 de inóculo:biomassa pré-tratada:dejeto.

Para garantir a atmosfera anaeróbia no interior dos frascos, o gás nitrogênio foi fluxionado durante 3 min no headspace com o frasco vedado, sob pressão de 5 kgf/cm². Os frascos foram então armazenados em incubadoras do tipo shaker (MA 159, Marconi), e as pressões foram aferidas diariamente ou quando necessário, para o cálculo do volume de biogás produzido e quantificação do biometano e demais gases formados. As amostras foram coletadas até que a variação da produção acumulada de CH₄ permanecesse inferior a 1%.

3.4.1 Monitoramento do Processo de DA

Para a determinação do volume de biogás e quantificação do biometano foi empregada a metodologia descrita por Aquino *et al.*, (2007), com as devidas adaptações necessárias.

O volume de biogás produzido em cada frasco foi esgotado com o auxílio de uma seringa de vidro graduada com a inserção da agulha na borracha de vedação do sistema. Após esgotamento e determinação do volume, a agulha da seringa contendo o biogás foi inserida em um frasco lacrado contendo uma solução de hidróxido de sódio 15% (m/v). A Figura 15 apresenta os componentes utilizados para quantificação do volume de biogás e biometano.

Figura 15 - Sistema de determinação do volume de biogás (a) e biorreator (b)



(a)



(b)

A composição de biogás produzido também foi analisada por cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo 2030), utilizando a coluna Hayesep D, e o detector de filamento de tungstênio, tendo como princípio de funcionamento a condutividade térmica TCD. O nitrogênio e o hélio foram usados como gás de arraste a uma pressão de 180,0 kPa e 310,0 kPa, respectivamente. As colunas cromatográficas foram mantidas a 60°C e os detectores 1 (medidor de CH₄, H₂S e CO₂) e 2 (medidor de H₂) à 150°C.

3.4.2 Cálculo dos Parâmetros de Processo

A eficiência de remoção dos SVT do processo foi determinada pela Equação 9.

$$Ef(\%SVT_{rem}) = \frac{SVT_{inicial} - SVT_{final}}{Massa\ de\ amostra} * 100 \quad (9)$$

Onde:

$Ef(\%SVT_{rem})$: eficiência de remoção de sólidos voláteis totais;

$SVT_{inicial}$: sólidos voláteis totais iniciais;

SVT_{final} : sólidos voláteis totais final.

O potencial bioquímico de metano (PBM) foi determinado através da Equação 10.

$$PBM = P\ secas_N * \%CH_4 \quad (10)$$

Onde:

PBM: potencial bioquímico de metano (NmL /g SVT);

$\%CH_4$: teor de metano no biogás;

$P\ secas_N$: produção acumulada de biogás por SVT (NmL/g SVT).

A digestibilidade do processo foi determinada através da Equação 11, utilizando a metodologia descrita por Buffiere *et al.*, (2006) com as devidas modificações, a qual o metano produzido foi expresso pela quantidade de SVT, e não em DQO.

$$DG = \frac{PBM}{PBMT} \quad (11)$$

Onde:

DG: digestibilidade;

PBM: potencial bioquímico de metano (NmL/g SVT);

PBMT: potencial bioquímico de metano total (NmL/g SVT).

Para a determinação do PBM (Equação 10) foi descontado a produção de biogás do inóculo contido em cada ensaio da produção de biogás pelo consumo do substrato (Equação 12). Em seguida foi feita a conversão para as Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP) (Equação 13), após isso, foi descontado o vapor de água do volume produzido (Equação 14) e a produção de biogás foi transformada em PBM considerando o teor médio de metano.

$$P_s = \frac{(PAB_s - \frac{PAB_1}{V_{1,1}} V_{1,s})}{SVT_s * V_{s,s}} \quad (12)$$

Onde:

P_s : produção acumulada de biogás do substrato por SVT (mL/g);

PAB_1 : produção acumulada de biogás referente ao ensaio com inóculo (mL);

PAB_s : produção acumulada de biogás referente ao ensaio com substrato e inóculo (mL);

SVT_s : SVT do substrato (g/mL);

$V_{1,1}$: volume de inóculo no ensaio com inóculo (mL);

$V_{1,s}$: volume de inóculo no ensaio com substrato e inóculo (mL);

$V_{s,s}$: volume de substrato no ensaio (mL).

$$P_s N = P_s * \frac{T_0}{(273 + T)} \quad (13)$$

Onde:

P_{sN} : produção acumulada de biogás do substrato normal por SVT (NmL/g SVT);

T : temperatura de medição ($T = 295,15$ K);

T_0 : temperatura normal ($T_0 = 273,15$ K).

$$P_{seca_{sN}} = \frac{P_{sN} * (P - P_W) * T_0}{P_0 * (273 + T)} \quad (14)$$

Onde:

$P_{seca_{sN}}$: produção acumulada de biogás do substrato por SVT (NmL/g SVT);

P : pressão do gás referente a temperatura de medição ($P = 1013$ hPa);

P_0 : pressão normal ($P_0 = 1013$ hPa);

P_W : pressão do vapor de água referente a temperatura de medição ($P = 23$ hPa).

3.4.3 Modelagem Cinética da DA

A seleção de um modelo cinético e parâmetros deve considerar o desempenho na modelagem de uma condição experimental, bem como a robustez do modelo explicando as variações experimentais como um todo (Tyagi *et al.*, 2018). Sendo assim, dois modelos cinéticos foram utilizados como ferramentas para integração e interpretação dos dados experimentais obtidos na produção volumétrica de metano, em mono e co-Da, ao longo do tempo.

Ao final, foram selecionados dois modelos que apresentaram um bom ajuste dos dados.

Um dos modelos avaliados foi o de sigmoide de Boltzmann em um estágio (Mockaitis *et al.*, 2020), conforme apresentado na Equação 15.

$$V_{CH_4}^{STP}(t) = AI + \frac{(AS - AI)x^2}{1 + e^{\left(\frac{PI - x}{Inc}\right)}} + \varepsilon_i \quad (15)$$

Onde:

$V_{CH_4}^{STP}$: produção específica de metano no dia (NmL CH₄/g SVT);

A_l : assíntota inferior, que indica o volume de metano no momento da instalação;

A_s : assíntota superior, refere-se ao volume máximo de metano acumulado pelo sistema;

PI : ponto de inflexão, momento no qual ocorre a máxima liberação do metano;

Inc : inclinação da curva no PI, indicando a máxima liberação de metano;

t : tempo (dia);

$\mathcal{E}_i$: erro experimental do modelo no dia.

Já o segundo modelo cinético utilizado para a interpretação foi a função sigmoideal subsequente, baseada na sigmoide dupla de Boltzman (Mockaitis *et al.*, 2020; Volpi *et al.*, 2022), representada pela Equação 16. A co-DA geralmente apresenta um arranjo múltiplo e sucessivo de produção de CH₄ devido à diferença entre a biodegradabilidade de cada substrato. Sendo assim, esse modelo representou melhor os dados deste processo.

$$V_{CH_4}^{STP}(t) = V_{CH_4}^{max} \cdot \left[\frac{p}{1 + e^{\left(\frac{4r_1 \cdot (t_1 - t)}{V_{CH_4}^{max} \cdot p}\right)}} + \frac{1 - p}{1 + e^{\left(\frac{4r_2 \cdot (t_2 - t)}{V_{CH_4}^{max} \cdot 1 - p}\right)}} \right] \mathcal{E}_i \quad (16)$$

Onde:

$V_{CH_4}^{STP}$: produção específica de metano no dia (NmL CH₄/g SVT);

$V_{CH_4}^{max}$: volume máximo específico de metano acumulado no experimento (NmL CH₄ /g SVT);

p : proporção entre os valores ordenados do primeiro e segundo sigmóide empilhado;

PI : ponto de inflexão, momento no qual ocorre a máxima liberação do metano;

t_1 e t_2 : tempo (dia) em que a produção do primeiro e segundo padrão sigmoidal, respectivamente, atinge a taxa máxima (d);

r_1 e r_2 : taxa máxima de produção de metano para o primeiro e segundo padrão sigmoidal, respectivamente (NmL CH₄ /g SVT/d);

ε_i : erro experimental do modelo no dia.

As regressões foram realizadas por meio do método dos mínimos quadrados (Gradiente reduzido generalizado) para modelos não lineares, o qual foi implementado no Solver do Excel.

O parâmetro $V_{\max}\text{CH}_4$ pode ser considerado como um Potencial Bioquímico de Metano (PBM) do ensaio, pois representa a produção máxima assintótica de CH₄. A principal vantagem de adotar esse parâmetro como PBM é que ele leva em consideração a tendência de todos os dados experimentais, principalmente aqueles da etapa formada na fase final de cada experimento. Assim, existe uma precisão maior para calcular o PBM do que utilizar a média dos últimos valores de produção específica acumulada de CH₄.

3.5 Análises dos Digestatos

Ao final dos ensaios de PBM, os frascos foram abertos em uma câmara de fluxo laminar e as amostras de uma mesma condição operacional foram unificadas para serem analisadas como amostra única. Parte do material foi transferido para eppendorfs e armazenado em um freezer -80°C, para realização das análises de metagenômica. O restante do material foi armazenado em um freezer -12°C para análise do pH, composição química e macro e micronutrientes.

3.5.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH da mistura final foi determinado utilizando o pHmetro de bancada (PH913, Metrohm) previamente calibrado.

3.5.2 Análise da Série de Sólidos

Os efluentes obtidos foram caracterizados quanto aos sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT) e sólidos fixos totais (SFT) segundo a metodologia APHA (2005), conforme descrito no item 4.3.3.

3.5.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO dos efluentes obtidos foram realizadas de acordo com o método 5220D descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), conforme descrito no item 4.3.4. Para estes materiais, a diluição analítica foi de 500 vezes.

3.5.4 Composição Química

Para determinação da composição química do efluente, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga de bancada (NT 820, Nova Técnica) e o sobrenadante armazenado sob refrigeração à 5°C. Na preparação das amostras para análise em HPLC, o líquido teve o pH ajustado com uma solução de ácido sulfúrico 2 mol/L. Para cada 1,0 mL de amostra foram adicionados 40 µL da solução ácida, conforme metodologia descrita por Mockaitis *et al.*, (2020). Ao final, as amostras foram filtradas em filtros de 0,22 µm, de membrana de celulose, em vials, para análise da composição.

As análises cromatográficas foram realizadas por meio de um HPLC Agilent Technologies (1260 Infinity) empregando os detectores de índice de refração (IR), para quantificação da glicose, celobiose, xilose, arabinose e ácidos acético, levulínico, fórmico, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e hexanóico (capróico). Já o detector de ultravioleta de arranjo de diodos (UV-DAD) foi empregado para a quantificação do furfural e HMF.

Para quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos e ácidos graxos voláteis (AGVs) foi empregado as condições:

- Coluna: Bio-Rad Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm);
- Volume de injeção: 100 µL;
- Fase móvel: solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L degaseificada;
- Vazão: 0,8 mL/min;
- Tempo de corrida: 70 min;
- Temperatura dos detectores e do forno da coluna: 45°C.

Para a determinação de aldeídos furânicos (furfural e HMF), as condições de análise foram:

- Coluna: Nova-Pak C18, 4 µm (Waters);
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fase móvel: acetonitrila:água, 1:8, com 1% (v/v) de ácido acético, degaseificada;
- Vazão: 0,8 mL/min;
- Tempo de corrida: 5 min;
- Temperatura do detector DAD e do forno da coluna: temperatura ambiente e 30°C, respectivamente;
- Comprimento de onda: 274 nm.

3.5.5 Análise de Micro e Macronutrientes

As análises de micro e macronutrientes do digestato foram realizadas no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e Metais Pesados, do Departamento de Solos e Recursos Ambientais da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Unesp, Campus de Botucatu, como prestação de serviços.

As leituras foram realizadas diretamente nas amostras encaminhadas, sem qualquer processo de diluição ou etapa de filtração. Foram determinadas as concentrações nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), na forma mineral.

A quantificação do N foi realizada por titulação com uma solução de ácido sulfúrico. A análise de P total foi realizada através da colorimetria do metavanadato. Já os elementos S e B foram quantificados por técnicas espectrofotométricas. Os demais elementos químicos, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, foram quantificados por fotometria de absorção atômica.

3.5.6 Análise de Metagenômica

A análise metagenômica foi realizada para o inóculo e o dejetos utilizados nos ensaios, assim como os digestatos obtidos após os ensaios de DA e co-DA. A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, do Laboratório de Biotecnologia Aplicada, localizado na Faculdade de Medicina (FMB) da Unesp, Campus de Botucatu, conforme descrito por Manzoli *et al.*, (2022).

As análises foram realizadas pelo sequenciamento em larga escala da região genômica V3-V4 do 16S ribossomal utilizando o sequenciador MiSeq (Illumina, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

O DNA genômico foi extraído utilizando DNeasy PowerSoil Kit (100) – QIAGEN seguindo o protocolo estabelecido disponível comercialmente pela própria empresa. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para serem utilizadas nas etapas seguintes.

Após a extração de DNA, as amostras foram encaminhadas para a quantificação e constatação da pureza utilizando espectrofotômetro tipo NanoDrop One (Thermo Scientific), a 260 e 280 nm. As amostras foram analisadas em duplicata. Para a quantificação foi utilizado 2,0 µL de cada amostra e o equipamento foi calibrado utilizando água.

Após as etapas de extração e quantificação, o gene ribossomal 16S foi amplificado pela utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O gene 16S do DNA extraído foi amplificado com os conjuntos de primer amplamente conservados visando às regiões V3-V4. Esta etapa usou beads magnéticas AMPure XP para purificar o amplicon desejado, seguindo o protocolo PCR Clean-up do guia de preparação da biblioteca de sequenciamento metagenômico 16S.

Para preparação do mix foram utilizadas as seguintes sequências de oligonucleotídeos dos primers: F CCTACGGGNGGCWGCAG e R GACTACHVGGGTATCTAATCC, a fim de preparação as diluições e concentrações ideais da biblioteca, conforme o Protocolo NEBNext Library Quant Kit Quick (E7630) (New England Biolabs, 2015).

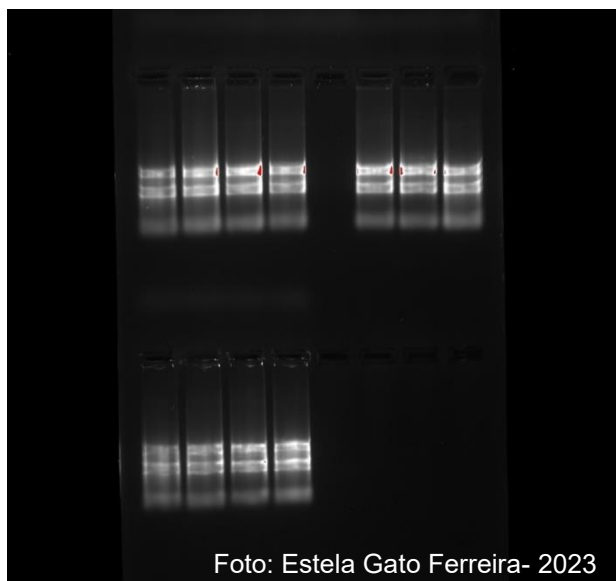
O PCR foi realizado em um termociclador (SimpliAmp) seguindo as orientações para termociclagem descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições de termociclagem

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	1	98	30
		98	10
2	30	55	30
		72	30
3	1	72	5
4	1	4	Infinito

Ao final foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,0%, contendo 3,0 µL de brometo de etídeo, corridos em PBS 1x por 30 min em 90 V, para confirmação da qualidade do DNA. Ao término da corrida da eletroforese, o gel foi fotodocumentado sob luz ultravioleta, conforme apresentado na Figura 16.

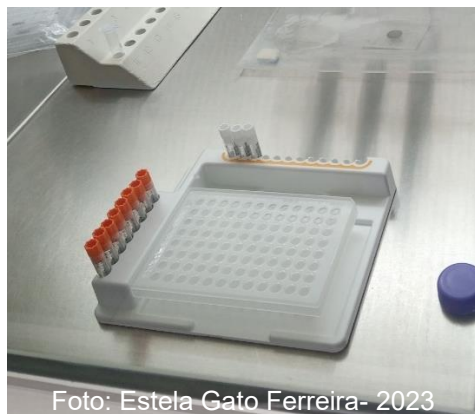
Figura 16 - Bandas de DNA obtidas em géis de agarose



Após o término da PCR, os produtos (amplicons) foram conferidos para certificar que todas as amostras foram amplificadas corretamente por meio de uma eletroforese em gel de agarose 0,8% com 5,0 μ L de amplicons. Em seguida, para a confirmação da qualidade dos amplicons, 22,0 μ L foram purificados seguindo as orientações descritas no kit comercial QIAquick® PCR Purification Kit. Ao final, o material foi avaliado novamente quanto a qualidade e integridade do produto em eletroforese utilizando um volume de 2,0 μ L do amplicon purificado.

No preparo da biblioteca foi realizada a indexação seguindo as instruções do protocolo. Foi utilizado uma placa da empresa Illumina realizando combinações dos index para cada amostra ter uma combinação característica e única. A Figura 17 apresenta a preparação da biblioteca.

Figura 17 - Preparação da biblioteca através do Index disponibilizados pela Illumina



Posteriormente foi realizada a purificação da biblioteca utilizando beads AMPure antes da etapa de quantificação, seguida de uma segunda etapa de PCR de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (PCR Clean-up 2). As condições de termociclagem para essa etapa foram as mesmas apresentadas na Tabela 7. A preparação e diluição dos primers contidos no kit, assim como as amostras, seguiram a metodologia descrita pelo fabricante (Illumina, 2013).

Após a indexação e purificação das amostras foi feita uma eletroforese com gel de agarose a 2,0% e tampão tris/borato/EDTA (TBE) para certificar que as amostras foram todas amplificadas corretamente, cujo tamanho esperado do amplicon foi de aproximadamente 630 pb. Para ser possível sequenciar as amostras foi necessário deixar todas em uma mesma concentração ($4,0 \pm 0,2$ nM) para estarem igualmente representadas, concentrando ou diluindo as amostras. Sendo assim, as amostras foram quantificadas no Qubit (NanoDrop) obtendo para adequação da concentração. Ao final, foi preparado um pull com 5 μ L de cada amostra e inserido no cartucho para sequenciamento.

Após extração de DNA, quantificação, purificação e amplificação, o sequenciamento foi iniciado utilizado no sequenciador Genome Analyser (Illumina).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Pré-tratamento Hidrotérmico do Caule do Lúpulo

A distribuição granulométrica da biomassa moída é apresentada na Tabela 8.

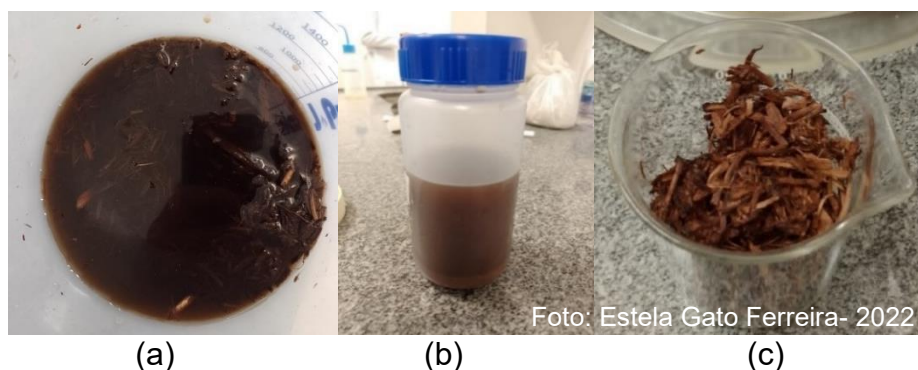
Tabela 8 - Classificação das peneiras e distribuição granulométrica

Peneira		Biomassa retida	Fração retida
Malha	Abertura (mm)	(g)	(%)
3/8	9,52	103,59	77,13
40	0,42	21,41	15,94
45	0,35	3,21	2,39
50	0,297	1,02	0,76
60	0,250	0,81	0,60
80	0,177	1,74	1,29
100	0,148	0,57	0,42
Base	-	1,93	1,43
Total		134,29	100

A Figura 18 demonstra a biomassa obtida após a etapa de pré-tratamento e as frações recuperadas após a etapa de separação sólido/líquido utilizando, como exemplo, a condição à 190°C, 10 min. As demais condições de pré-tratamento apresentaram um material com aspecto e coloração muito similar à da imagem.

Um dos fatores importantes deste processo é a severidade, que desempenha um papel relevante na produção de biometano (Hashemi; Karimi; Mirmohamadsadeghi, 2019), pois interfere diretamente na digestibilidade do material e está intrinsicamente ligado as condições operacionais.

Figura 18 - Biomassa pré-tratada na condição 190°C, 10 min: lama obtida após o pré-tratamento (a), e hidrolisado hemicelulósico (HH) (b), e celulignina (c) após a etapa de separação sólido/líquido



A Tabela 9 apresenta os fatores de severidade e severidade combinado de cada condição de pré-tratamento avaliado, além do pH ao final do processo.

Tabela 9 - Fator de severidade (Log R0), severidade combinado (Log R'0) e pH das biomassas pré-tratadas

Condições operacionais (°C, min)	Log R0	Ph	Log R'0
175, 10	3,21	5,2	- 1,96
190, 10	3,65	4,8	- 1,15
205, 10	4,09	4,6	- 0,52

Analisando a Tabela 9 é possível observar que o pH diminui à medida que o fator de severidade aumenta, devido ao aumento da temperatura do processo. Isso pode ser explicado devido à parte da fração hemicelulósica solubilizada ter sido degradada e levando à formação de ácidos fracos, promovendo a redução do pH do meio. Além disso, quanto mais severo é o processo de pré-tratamento, mais ácido acético das cadeias hemicelulósicas podem ser solubilizadas, promovendo também essa alteração do pH do meio.

Um estudo realizado por Thompson *et al.*, (2020), demonstrou a importância da severidade do pré-tratamento nos processos de DA. Os autores realizaram o pré-tratamento hidrotérmico de algas invasoras (*Sargãos pelágicos*) e observaram que o

aumento da severidade do pré-tratamento promoveu uma maior hidrólise das frações da biomassa, como carboidratos, proteínas e a conversão de polissacarídeos à monômeros orgânicos. Entretanto, os autores também observaram uma redução significativa na produção de metano quando o fator de severidade é aumentado, saindo de uma produção de $103,90 \pm 1,48$ NmL/g SV para $62,37 \pm 2,16$ NmL/g SV quando o fator foi alterado de 2,77 para 3,83. Isso se deve ao fato da formação de compostos inibitórios que muito provavelmente prejudicaram o processo fermentativo.

Song *et al.*, (2019) investigaram o efeito do fator da severidade do pré-tratamento hidrotérmico no desempenho na DA dos resíduos da cultura do milho. O pré-tratamento da biomassa foi realizada com e sem a presença de amônia, nas temperaturas de 100, 150 e 200°C, em tempos de 5 à 30 min. Os resultados mostraram que os pré-tratamentos favoreceram a formação de ácidos graxos voláteis (AGVs), onde na condição mais severa (200°C, 10 min; Log R0 7,27) foi observado um aumento na produção de AGVs de 3,35 vezes quando comparado a condição de menor severidade (100°C, 5 min, LogR0 1,09). Nas condições mais severas, foram observadas alta solubilização de hemiceluloses, entretanto, para a DA, as condições mais brandas de processo favoreceram a produção de metano, com incremento de 16,26% e 22,74% para a biomassa pré-tratada à 100°C, 30 min, com e sem a presença de amônia, respectivamente.

O mesmo efeito de formação de inibidores nas condições mais severas de processo foram observados por Batista *et al.*, (2019). Os autores avaliaram diferentes fatores de severidade no pré-tratamento hidrotérmico da palha da cana-de-açúcar e demonstraram que baixos fatores de severidade ($< 3,39$) não promoveram alteração expressivas na estrutura da biomassa, enquanto valores mais elevados ($> 4,70$) resultaram em perda de açúcares hidrolisados, levando a formação de inibidores como furfural e formação de estruturas de pseudo-lignina. A melhor condição de pré-tratamento foi obtida à 195°C e 10 min, promovendo uma baixa solubilização de celulose (9,80%) e alta solubilização de hemiceluloses (85,45%). Valores próximos de solubilização de celulose (9,4%) foram observados no estudo presente, empregando a condição menos severa de pré-tratamento (175°C, 10 min) como mostra a Tabela 10.

A Tabela 10 apresenta a composição química da biomassa in-natura e das frações sólidas lavadas (celuligninas) obtidas após as etapas de separação sólido/líquido. Além disso, é apresentado o balanço de solubilização de cada um dos componentes macromoleculares após a etapa de pré-tratamento.

É possível observar que não houve diferença estatística nos valores percentuais de celulose entre as biomassas pré-tratadas. Quanto à lignina composicional, foi observada uma diferença na composição considerando a condição mais severa de pré-tratamento (205°C, 10 min).

Já no caso das hemiceluloses, todos as condições operacionais avaliadas demonstraram uma diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, o que era esperado já que o pré-tratamento hidrotérmico favorece a solubilização desta fração da biomassa, com o aumento da severidade do processo, como também foi observado por Rahmani *et al.*, (2023).

Os dados expostos na Tabela 10 evidenciam um aumento progressivo na solubilização das hemiceluloses conforme a severidade aumenta. A utilização do fator de severidade em processos hidrotérmicos tem se difundido para a compreensão das interações entre temperatura e tempo de reação e seus efeitos nas alterações estruturais da biomassa. O principal impacto do pré-tratamento hidrotérmico em biomassas lignocelulósicas reside na solubilização da fração hemicelulósica, gerando intermediários a um custo operacional reduzido (Ruiz; Thomsen; Trajano, 2017).

Devido a presença dos grupos acetilas nas cadeias das hemiceluloses, há um favorecimento da acidificação do meio e consequentemente a hidrólise das hemiceluloses. Além disso, a presença do ácido acético se torna um componente importante para o processo de DA, por se tratar de um AGVs. Tal efeito da presença do ácido acético na solubilização das hemiceluloses pode ser observado na composição química da fração líquida obtida após cada ensaio de pré-tratamento (HH), conforme apresentado na Tabela 11. A Tabela 11 apresenta a composição química dos açúcares monoméricos e oligoméricos obtidos após a etapa de pré-tratamento, em cada uma das condições operacionais, além da concentração dos ácidos orgânicos e produtos de degradação.

Tabela 10 - Composição físico-química da biomassa in-natura e das celuligninas obtidas após a etapa de pré-tratamento para determinação da porcentagem de solubilização dos macrocomponentes

Biomassa	Rendimento (%)	Composição da celulignina (%)					Solubilização (%)		
		Celulose	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Extrativos	Celulose	Hemiceluloses	Lignina
In-natura	-	34,2 ± 0,1 ^a	8,3 ± 0,9 ^a	29,9 ± 0,7 ^a	5,3 ± 0,2 ^a	27,4 ± 0,9	-	-	-
175°C	62,7 ± 0,7 ^a	49,8 ± 0,5 ^b	11,0 ± 0,1 ^b	34,5 ± 0,3 ^b	5,4 ± 0,4 ^a	-	9,4 ± 1,1 ^a	13,0 ± 2,7 ^a	27,1 ± 0,1 ^a
190°C	59,7 ± 0,4 ^{ab}	50,5 ± 0,2 ^b	9,9 ± 0,2 ^c	34,9 ± 0,5 ^b	5,6 ± 0,2 ^a	-	12,5 ± 0,2 ^b	24,6 ± 1,8 ^b	29,9 ± 1,4 ^a
205°C	58,9 ± 0,7 ^b	50,5 ± 0,2 ^b	5,7 ± 0,1 ^d	38,5 ± 0,0 ^c	5,3 ± 0,9 ^a	-	14,5 ± 0,5 ^b	57,1 ± 2,7 ^c	25,7 ± 2,1 ^a

Letras iguais em cada coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, pelo teste de Tukey.

Tabela 11 - Composição química do HH em cada condição de pré-tratamento

Concentração (g/L)	Hidrolisado hemicelulósico		
	175°C, 10 min	190°C, 10 min	205°C, 10 min
Xilose	3,09 ± 0,03 ^a	3,25 ± 0,05 ^a	6,63 ± 0,20 ^b
Xilana	0,00	0,00	0,00
Glicose	1,90 ± 0,06 ^a	1,05 ± 0,03 ^b	1,60 ± 0,03 ^c
Glucana	0,31 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,00 ^c
Arabinose	0,57 ± 0,04 ^a	0,56 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,02 ^b
Ácido fórmico	0,79 ± 0,09 ^a	1,87 ± 0,34 ^b	8,59 ± 0,91 ^c
Ácido acético	2,42 ± 0,45 ^a	4,79 ± 0,23 ^b	10,63 ± 0,66 ^c
Ácido levulínico	0,24 ± 0,0 ^a	0,28 ± 0,07 ^a	0,00 ^b
Furfural	0,00	0,00	0,61 ± 0,02 ^a
5-Hidroxiacetilfurfural (HMF)	0,61 ± 0,07 ^a	1,11 ± 0,06 ^b	2,56 ± 0,04 ^c

Letras iguais em cada linha indicam que não houve diferença estatisticamente à 95% de confiança, pelo teste de Tukey.

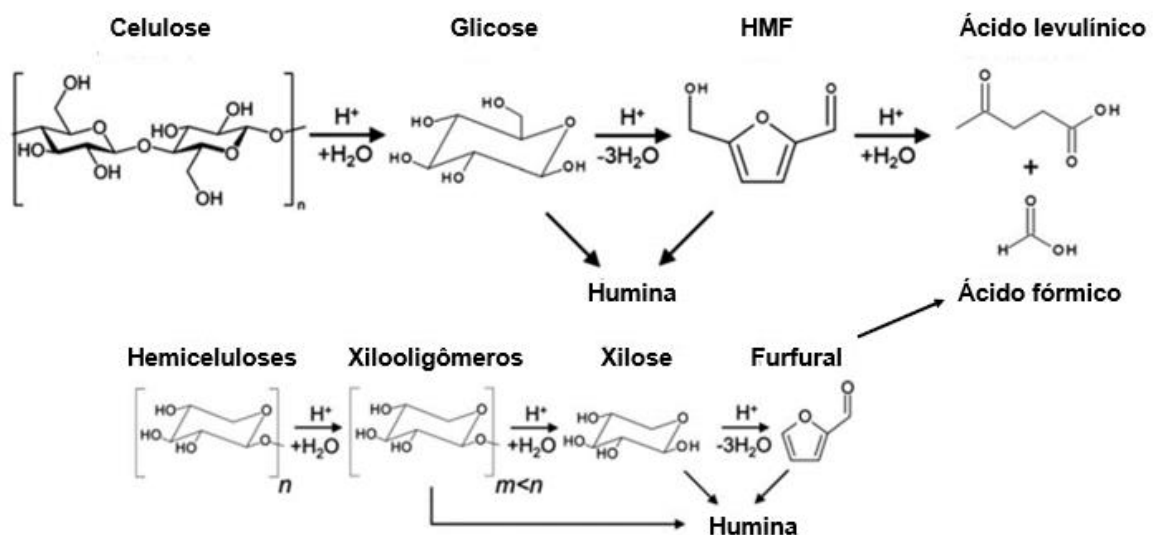
Analisando os dados da Tabela 11, é possível observar que o aumento da temperatura de pré-tratamento promove um aumento da concentração de xilose monomérica no meio, sendo observado uma diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança na condição mais severa do processo. Além disso, há um aumento na liberação do ácido acético presente nas cadeias hemicelulósicas da biomassa, com o aumento da severidade do processo.

Outro fator interessante é que não foi observado a presença de xilana em nenhuma condição de pré-tratamento avaliada, sendo este xilooligossacarídeos (XOS) comumente observado em processos hidrotérmicos empregando outras biomassas lignocelulósicas em condições operacionais similares, como bagaço de cana-de-açúcar (Santucci *et al.*, 2015), palha de cana-de-açúcar (Brenelli *et al.*, 2020a), casca de avelã (Surek; Buyukkileci, 2017), e capim elefante (Toscan *et al.*, 2019). Ao mesmo tempo, condições similares de pré-tratamento levam a uma solubilização de hemiceluloses muito mais expressiva destas biomassas, demonstrando características estruturais distintas do caule de lúpulo. Além disso, é

comum visualizar a presença de oligossacarídeos no meio, como pode ser visto na Tabela 12, o que não acontece em nosso processo.

Ainda considerando a Tabela 11, é possível observar um aumento considerável da concentração de HMF e ácido fórmico com o aumento da severidade do pré-tratamento, sendo estes produzidos mediante a degradação da celulose, conforme pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 - As reações de hidrólise da celulose e hemiceluloses levando à formação de furfural, HMF, ácido levulínico e fórmico, além da humina



Fonte: Adaptado de Yu *et al.*, (2020).

Tabela 12 - Comparação entre a solubilização de hemiceluloses e produção de xilooligossacarídeos em condições similares de pré-tratamento

Biomassa	Processo	Condição de pré-tratamento (°C, min, % sólidos)	Solubilização de hemiceluloses (%)	Xilooligossacarídeos (XOS, %)	Referência
Caule de lúpulo	Hidrotérmico	175, 10, 10	13,0	0	Nosso trabalho
		190, 10, 10	24,6	0	
		205, 10, 10	57,1	0	
Palha de cana-de-açúcar	Desacetilação	170, 10, 10	16,0	4,4	Brenelli <i>et al.</i> , 2020
	(60°C, 30 min 0,8% NaOH m/m) seguido de hidrotérmico	190, 10, 10	64,4	8,8	
		200, 10, 10	82,7	8,5	
		210, 10, 10	91,8	0	
Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrotérmico	170, 10, 10	42,2	30,0	Santucci <i>et al.</i> , 2015
		190, 10, 10	63,0	45,0	
Casca de avelã	Hidrotérmico	190, 15, 10	77,8	50,2	Surek; Buyukkileci, 2017
Capim elefante	Hidrotérmico	180, 60, 10	88,7	10,2	Toscan <i>et al.</i> , 2019

Em estudos realizados por (Lee; Young Park, 2020), o pré-tratamento hidrotérmico de resíduos de girassol à 200°C, 30 min e 0,1% (m/v) sólidos, promoveu um aumento significativo da produção de HMF (0,4032 g/L) quando comparado à condições mais brandas de pré-tratamento avaliadas, o que impactou negativamente na produção de biometano. A condição à 200°C promoveu uma produção de 236,95 NmL CH₄/g SV, redução de 18% quando comparado a DA empregando a biomassa pré-tratada à 180°C, 30 min e 0,1% (m/v) sólidos, melhor condições no processo de DA. Isso se deve ao fato dos aldeídos furânicos, como HMF e furfural, inibirem o metabolismo dos microrganismos e reduzir o rendimento do processo de DA (Balasundaram *et al.*, 2022).

De forma geral, nos estudos relacionados ao pré-tratamento hidrotérmico de biomassas lignocelulósicas, a concentração de furfural gerada durante o processo costuma ser relatada de maneira superior a de HMF, e sua formação ocorre em temperaturas acima de 150°C (Rahmani *et al.*, 2023). Conforme observado na Tabela 10, a concentração de HMF foi bem superior à de furfural, o que pode ser explicado devido a produção de ácido fórmico a partir da quebra do furfural, gerando um aumento expressivo deste ácido com o aumento da severidade do pré-tratamento. Como o ácido fórmico também pode ser obtido a partir da quebra do furfural (Figura 19), o aumento da sua concentração do meio pode ser justificado mediante esse processo.

4.2 Composição dos Substratos e Inóculos para os Ensaios de DA e co-DA

4.2.1 Análise da Série de Sólidos e pH

A determinação do teor de sólidos tem como objetivo quantificar a matéria biodegradável disponível nos substratos visando um melhor desempenho do processo de DA. A Tabela 13 apresenta os dados de sólidos totais (ST), voláteis totais (SVT) e fixos totais (SFT) obtidos em cada uma das amostras empregadas nos ensaios, bem como os valores iniciais de pH dos substratos.

Tabela 13 - Análise de série de sólidos e pH dos substratos e inóculo utilizados nos ensaios de DA

Substratos	Condições de pré-tratamento (°C, min)	pH	Sólidos Totais (ST) (g/g)	Sólidos Voláteis Totais (SVT) (g/g)	Sólidos Fixos Totais (SFT) (g/g)
In-natura	-	-	$0,880 \pm 0,009^e$	$0,788 \pm 0,012^f$	$0,092 \pm 0,011^c$
Lama	175, 10	$5,7 \pm 0,01^a$	$0,108 \pm 0,003^a$	$0,103 \pm 0,003_b$	$0,005 \pm 0,000^a$
Lama	190, 10	$5,6 \pm 0,01^a$	$0,097 \pm 0,002^{ab}$	$0,091 \pm 0,002_c$	$0,006 \pm 0,000^a$
Lama	205, 10	$5,4 \pm 0,02^a$	$0,083 \pm 0,005^b$	$0,077 \pm 0,005^d$	$0,006 \pm 0,000^a$
Licor	175, 10	$5,2 \pm 0,31^b$	$0,024 \pm 0,000^c$	$0,020 \pm 0,000^a$	$0,004 \pm 0,000^a$
Licor	190, 10	$4,8 \pm 0,02^c$	$0,027 \pm 0,000^c$	$0,023 \pm 0,000^a$	$0,004 \pm 0,000^a$
Licor	205,10	$4,6 \pm 0,02^c$	$0,028 \pm 0,000^c$	$0,023 \pm 0,000^a$	$0,004 \pm 0,000^a$
Dejeto	-	-	$0,197 \pm 0,002^d$	$0,160 \pm 0,005^e$	$0,037 \pm 0,004^b$
Inóculo	-	$7,4 \pm 0,02^d$	$0,008 \pm 0,000^f$	$0,004 \pm 0,000^g$	$0,004 \pm 0,000^a$

Letras iguais em cada coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, pelo teste de Tukey.

Analisando a Tabela 13 é possível observar que o lodo utilizado como inóculo nos ensaios apresentou pH inicial de 7,4, o que demonstra que o mesmo estava neutralizado e estabilizado no processo de coleta. Valores similares de pH foram observados na literatura de lodos proveniente de biodigestão de dejetos bovinos (Sicchieri *et al.*, 2022) e de DA com 20% de águas residuais municipais e 80% de dejetos animal (Dawana Keche *et al.*, 2022). Para os substratos obtidos após a etapa de pré-tratamento (HH e lama), a faixa de pH variou de 4,6 à 5,7.

Analisando a concentração de SVT, é possível observar que apesar das diferentes composições químicas entre os HH (Tabela 13), não é observado uma diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança na concentração de SVT.

Já para a lama, a concentração de SVT diminuiu com o aumento da severidade do pré-tratamento. A biomassa in-natura apresentou o maior valor de SVT, $0,788 \pm 0,012$ g SVT/g substrato.

4.2.2 Análise de DQO e Composição Elementar

A composição elementar permite uma estimativa rápida do PBMT para cada substrato (Oliva *et al.*, 2021). A caracterização por meio da composição elementar também é empregada para projetar uma conversão de biomassa e melhorar a eficiência geral de produção de biogás (Das *et al.*, 2023).

A Tabela 14 apresenta os valores de carbono (C), nitrogênio (N), hidrogênio (H), oxigênio (O) e enxofre (S) da biomassa in-natura, do dejetos, das lamas, e dos HH. Os dados de análise elementar das amostras de HH foram determinadas a partir dos dados de nitrogênio total (NT), sólidos totais (ST) e DQO, conforme descrito pelas Equações 4, 5 e 6.

Analisando a

Tabela **14** é possível observar que a porcentagem de carbono aumenta à medida que as condições de pré-tratamento ficam mais severas, sendo este efeito observado tanto para a lama quanto para o hidrolisado obtido.

Tabela 14 - Composição elementar (%), nitrogênio orgânico, sólidos totais e DQO dos substratos provenientes da biomassa lignocelulósica e dejetos bovinos

Substrato	Composição elementar (%)					NT (g/L)	ST (g/kg)	DQO (g/L)
	C	N	H	S	O			
In natura	41,12	1,45	5,18	-	52,25			
Dejeto	37,66	1,57	4,70	0,27	55,80			
Lama 175°C	44,92	3,69	4,24	-	47,15			
Lama 190°C	45,62	4,66	4,15	-	45,57			
Lama 205°C	46,52	1,28	5,40	0,14	46,66			
HH 175°C	39,07	3,81	7,25	-	49,87	0,94	24,5	26,3
HH 190°C	40,23	3,82	7,84		48,11	1,04	27,0	31,5
HH 205°C	41,91	3,53	8,67		45,88	0,98	27,6	36,1

Diversos trabalhos encontrados na literatura analisam a composição elementar de substratos lignocelulósicos e de dejetos de animais a fim auxiliar na determinação do potencial de produção de biogás e biometano (Sahoo; Kumar; Mohanty, 2022), e na produção de hidrogênio (Sridevi *et al.*, 2023). Os dados de composição elementar de diferentes tipos de biomassas lignocelulósicas e de dejetos bovinos são apresentados na Tabela 15.

É possível observar que os valores dos componentes elementares variam bastante entre as biomassas e os dejetos bovinos.

Observando a Tabela 15 é possível notar que o percentual de enxofre (S) presente em dejetos de bovinos é maior que as biomassas lignocelulósicas in-natura.

Tabela 15 - Comparação da composição elementar de diferentes biomassas lignocelulósicas in-natura, comumente utilizadas em processos de DA para produção de biometano e hidrogênio, e dejetos bovinos

Substratos	Composição elementar (%)					Referências
	C	N	H	S	O	
Caule de lúpulo	41,12	1,45	5,18	-	52,25	Este trabalho
Resíduos de capim de área não cultivada	47,1	2,8	5,8	0,09	44,2	Bedoić <i>et al.</i> , 2019
Caníço	46,87	0,55	6,14	0,08	46,87	Lizasoain <i>et al.</i> , 2016
<i>Echinochloa stagnina</i>	44,98	1,85	5,66	-	47,49	Singh; Mahanta; Bora, 2017
Palha de arroz	38,65	0,2	5,58	-	43,05	Lin <i>et al.</i> , 2014
Palha de milho	43,5	1,5	6,2	0,2	43,9	Zhao <i>et al.</i> , 2011
Bambu	49,9	6,0	6,5	0,6	37,0	Shi <i>et al.</i> , 2017
Caule de milho	48,3	0,9	5,5	0,1	45,1	Parvez <i>et al.</i> , 2020
Dejeto bovino	37,66	1,57	4,70	0,27	55,80	Este estudo
Dejeto bovino	43,38	5,02	6,35	0,83	31,72	Abid <i>et al.</i> , 2021
Dejeto de bovinocultura leiteira	34,42	1,92	4,91	0,65	30,44	Shen <i>et al.</i> , 2015
Dejeto de bovinocultura de corte	37,64	2,16	5,26	0,59	31,90	Shen <i>et al.</i> , 2015
Dejeto bovino	38,8	2,2	4,7	0,7	26,5	Kim; Lee; Young Kim, 2023

4.2.3 Análise de Macro e Micronutrientes dos Substratos e Inóculo

Os oligoelementos são essenciais para o crescimento celular dos microrganismos, sendo sua deficiência muitas vezes ignorada devido à diversidade destas fontes presentes no substrato. Os sistemas de DA funcionam de forma eficiente quando são suplementados com micro e macronutrientes (Agrawal; Chaudhari; Ghosh, 2023; Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2019), sendo a falta destes prejudicial a produção de biometano (Agrawal; Chaudhari; Ghosh, 2023).

Nos processos anaeróbicos, os metais podem atuar como micronutrientes essenciais para diversas reações enzimáticas; além de inibidores de toxicidade por

sulfeto. Atuam também como agentes ligantes de nutrientes, estimulantes de biomassa, ou promotores de agregação celular (Oleszkiewicz; Sharma, 1990).

Ressalta-se que os valores de micro e macronutrientes podem variar de acordo com a biomassa vegetal, em virtude da cultura, solo, clima, manejo, fertilizantes, dentre outros (Isikgor; Becer, 2015).

A Tabela 16 apresenta as concentrações de micro e macronutrientes detectadas nos substratos utilizados nos ensaios de DA e co-DA.

Analizando a Tabela 16 é possível observar que o dejetto apresenta uma concentração mais elevada de ferro quando comparado aos demais substratos. Tal elemento é fundamental para manter o funcionamento estável da DA, devido às suas propriedades condutoras (Kato; Hashimoto; Watanabe, 2012), sua capacidade de diminuir o potencial oxidativo-redutor e, portanto, fornece um ambiente mais favorável para a DA (Liu *et al.*, 2011). Além disso, desempenha um papel como cofator de várias atividades enzimáticas importantes, como a piruvato-ferrodoxina oxidoreductase, que contém aglomerados de Fe-S e desempenha um papel fundamental na DA (Liu *et al.*, 2012).

Wu *et al.*, (2016) determinaram os efeitos de diferentes concentrações de metais na suplementação de DA de óleos residuais de caixas de gorduras. Foram avaliadas diferentes concentrações de potássio (K), magnésio (Mg), zinco (Zn) e manganês (Mn), empregando um lodo de DA em condições mesofílica. A concentração de Fe do inóculo foi de 68,06 mg/g ST, significativamente maior que o valor detectado no inóculo utilizado neste estudo (3,22 mg/g ST).

Dentre os macroelementos de grande importância na DA estão o N, P, K, S, Ca, Mg e Na. Esses componentes são essenciais para o crescimento microbiano durante o processo de DA (Vintiloiu *et al.*, 2012).

Tabela 16 - Concentrações de micro e macronutrientes encontrados nos substratos e inóculo utilizados na DA e co-DA

Nutrientes (mg/g ST)	Inóculo	Dejeto	In-natura	Lama			HH		
				175°C	190°C	205°C	175°C	190°C	205°C
Sódio (Na)	30,49	14,68	0,38	1,03	0,67	1,17	2,27	2,01	2,43
Magnésio (Mg)	30,42	8,67	3,49	2,86	3,20	3,71	9,80	8,99	9,22
Alumínio (Al)	3,83	12,15	0,07	0,09	0,11	0,15	0,08	0,17	0,18
Silício (Si)	16,45	30,43	0,46	0,68	0,77	0,82	2,29	2,14	2,53
Fósforo (P)	21,99	11,61	5,36	5,53	5,41	6,00	16,91	13,20	13,83
Enxofre (S)	6,16	3,56	0,43	0,62	0,71	0,81	1,49	1,21	1,16
Cloro (Cl)	17,54	4,91	1,97	2,76	3,29	4,41	18,35	14,88	12,00
Potássio (K)	42,79	13,22	15,25	13,55	15,89	18,72	58,25	52,27	49,30
Cálcio (Ca)	53,02	14,34	7,70	9,62	9,89	10,00	6,09	6,81	8,48
Titânio (Ti)	0,36	3,09	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,03
Cromo (Cr)	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Manganês (Mn)	0,46	0,35	0,02	0,02	0,03	0,03	0,06	0,04	0,06
Ferro (Fe)	3,22	15,29	0,16	0,18	0,21	0,22	0,16	0,21	0,31
Cobre (Cu)	0,79	0,22	0,12	0,02	0,02	0,02	0,03	0,00	0,01
Zinco (Zn)	0,45	0,28	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03
Boro (Br)	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,08	0,07	0,07
Rubídio (Rb)	0,06	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,07	0,08	0,08
Estrôncio (Sr)	0,20	0,04	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,09
Zircônio (Zr)	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Bário (Ba)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00

O K desempenha uma importante função fisiológica nos microrganismos metanogênicos (Scherer; Lippert; Wolff, 1983) e de modo geral, todos os substratos apresentaram valores significativos de K, cujas maiores concentrações foram observadas para os HH. Há também, concentrações significativamente maiores de fósforo (P) no HH quando comparados às frações de lama, nas mesmas condições, como mostra a Tabela 15.

O Na pode causar efeito inibitório na metanização de AGVs, principalmente o ácido propiônico, em concentrações entre 3 a 16 g/L. No entanto, para substratos ricos em glicose, esta concentração não afeta significativamente a fase de metanogênica. As arqueas metanogênicas são capazes de se adaptar a altas concentrações de Na, levando a altas conversões de CH₄ (Feijoo *et al.*, 1995). Analisando a Tabela 15 é possível observar que os substratos lignocelulósicos, oriundos do pré-tratamento do caule de lúpulo, não apresentaram concentrações de sódio que pudessem interferir negativamente no processo de DA. Entretanto, a concentração de Na detectada no dejetto bovino deste estudo é bastante superior quando comparada a estudos presentes na literatura, que demonstram valores variando de 2,01 mg/g ST (Li *et al.*, 2016) a 7,37 mg/g ST de Na (Tsapekos *et al.*, 2021) no dejetto.

Quantidades consideráveis de S podem diminuir a produção de CH₄ a partir do acetato devido à atividade da bactéria redutora de sulfato. Essas bactérias competem utilizando o acetato para produção de sulfeto e podem até inibir a atividade metanogênica, levando a uma redução do processo produtivo (Koster *et al.*, 1986).

Analisando a Tabela 16, a biomassa de lúpulo in-natura, assim como as lamas obtidas nas três condições de pré-tratamento hidrotérmico apresentam valores de S bem menores se comparado ao dejetto bovino e ao próprio inóculo.

O uso de aditivos inorgânicos e biológicos em sistemas de DA tornou-se um tópico importante devido à sua capacidade de aumentar o desempenho dos reatores em termos de estabilidade do processo, produção de biogás e capacidade de tratamento. Entretanto, experiências de pesquisa também mostraram que os aditivos podem levar a fenômenos inibitórios, principalmente como resultado da alta concentração de cátions no meio digestor. Suplementos de macro e micronutrientes têm sido usados para superar a instabilidade do processo através da melhoria da

capacidade tampão do sistema e atividade anaeróbica de biomassas (Romero-Güiza *et al.*, 2016).

4.3 Avaliação da Digestão (DA) e Co-Digestão (Co-DA) Anaeróbica

4.3.1 Composição Química Inicial dos reatores

As Tabelas 17, 18 e 19 apresentam a concentração inicial dos analitos solúveis presentes em cada uma das reações de DA e co-DA, e da composição do sólido presente no material. A Tabela I, presente no APÊNDICE B, descreve a massa de cada fração utilizada na entrada dos reatores.

Analisando a Tabela 17 é possível observar uma baixa concentração de compostos inibitórios ao processo fermentativo, como o furfural e HMF. O pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica é por vezes acompanhado da formação destes compostos, que atuam como recalcitrantes levando à inibição do processo biológico (Ahmed *et al.*, 2019). No entanto, as bactérias metanogênicas são capazes adaptar-se a tais compostos em um determinado período de tempo, até uma certa concentração (Monlau *et al.*, 2013).

Dentre os AGVs, é observado uma concentração mais expressiva do ácido acético, devido a sua presença nas cadeias de hemiceluloses sendo liberados durante a etapa de pré-tratamento. Quanto mais severa a condição do pré-tratamento, maior a concentração de ácido acético no início da fermentação.

Não houve presença de isobutírico em nenhuma das amostras analisadas na entrada (Tabela 18).

Em relação à composição sólida de alguns reatores (Tabela 19), é possível observar que quanto maior a severidade do pré-tratamento, maior é a massa inicial de celulose no reator. Em contrapartida, a massa de lignina presente no sistema também aumenta, o que pode impactar negativamente o processo.

Tabela 17 - Concentrações dos açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos no início do processo

	Reator	Concentração (g/L)						
		Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Furfural	HMF	Ácido levulínico
Controle	Inóculo	0,021	0,015	0,078	0,005	0,000	0,009	0,115
	Celulose	0,030	0,015	0,078	0,005	0,000	0,010	0,013
DA	In-natura	0,029	0,081	0,000	0,006	0,000	0,011	0,132
	Dejeto	0,016	0,015	0,078	0,008	0,000	0,010	0,128
	HH 175°C	0,086	0,229	0,093	0,012	0,000	0,027	0,023
	HH 190°C	0,029	0,124	0,091	0,010	0,001	0,033	0,310
	HH 205°C	0,061	0,104	0,088	0,014	0,003	0,022	0,036
	Lama 175°C	0,023	0,047	0,080	0,005	0,000	0,012	0,018
	Lama 190°C	0,024	0,045	0,081	0,006	0,000	0,014	0,014
	Lama 205°C	0,024	0,036	0,080	0,007	0,000	0,018	0,232
Co-DA	In-natura + dejeto	0,024	0,048	0,078	0,005	0,000	0,011	0,191
	HH 175°C + dejeto	0,032	0,205	0,091	0,011	0,000	0,025	0,269
	HH 190°C + dejeto	0,036	0,054	0,083	0,007	0,001	0,013	0,250
	HH 205°C + dejeto	0,024	0,058	0,083	0,009	0,000	0,012	0,260
	Lama 175°C + dejeto	0,025	0,031	0,078	0,004	0,000	0,011	0,157
	Lama 190°C + dejeto	0,025	0,030	0,079	0,005	0,000	0,012	0,146
	Lama 205°C + dejeto	0,010	0,023	0,079	0,005	0,000	0,013	0,026

Tabela 18 - Concentrações dos AGVs no início do processo

	Reator	Concentração de AGVs (g/L)					
		Acético	Butírico	Isobutírico	Isovalérico	Capróico	Propiônico
Controle	Inóculo	0,021	0,000	0,000	0,070	0,050	0,000
	Celulose	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
DA	In-natura	0,146	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
	Dejeto	0,028	0,310	0,000	0,000	0,000	0,000
	HH 175°C	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,060
	HH 190°C	1,701	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	HH 205°C	2,587	0,000	0,000	0,070	0,000	0,080
	Lama 175°C	0,108	0,000	0,000	0,150	0,050	0,000
	Lama 190°C	0,253	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
	Lama 205°C	0,560	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
Co-DA	In-natura + dejeto	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	HH 175°C + dejeto	1,046	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000
	HH 190°C + dejeto	1,010	0,000	0,000	0,060	0,060	0,000
	HH 205°C + dejeto	1,044	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
	Lama 175°C + dejeto	0,047	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	Lama 190°C + dejeto	0,100	0,280	0,000	0,060	0,050	0,000
	Lama 205°C + dejeto	0,137	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000

Tabela 19 - Concentrações dos macrocomponentes da biomassa nos reatores

	Reator	Celulose (g)	Hemiceluloses (g)	Lignina (g)
Controle	Inóculo	-	-	-
	Celulose	0,1417	-	-
DA	In-natura	0,0576	0,0140	0,0503
	Dejeto	-	-	-
	HH 175°C	-	-	-
	HH 190°C	-	-	-
	HH 205°C	-	-	-
	Lama 175°C	0,6332	0,1399	0,4387
	Lama 190°C	0,7222	0,1416	0,4991
	Lama 205°C	0,8470	0,0956	0,6457
	In-natura + dejeto	-	-	-
	HH 175°C + dejeto	-	-	-
Co-DA	HH 190°C + dejeto	-	-	-
	HH 205°C + dejeto	-	-	-
	Lama 175°C + dejeto	0,3422	0,0756	0,2371
	Lama 190°C + dejeto	0,3892	0,0763	0,2690
	Lama 205°C + dejeto	0,4546	0,0513	0,3465

A maior concentração de ácido acético foi detectada na amostra de entrada contendo HH 205°C (2,587 g/L). O ácido butírico foi detectado em apenas três ensaios no início do processo, in-natura, dejeto e lama 190°C + dejeto, com 0,020, 0,310 e 0,280 g/L, respectivamente (Tabela 18).

4.3.2 Potencial Bioquímico de Metano em DA

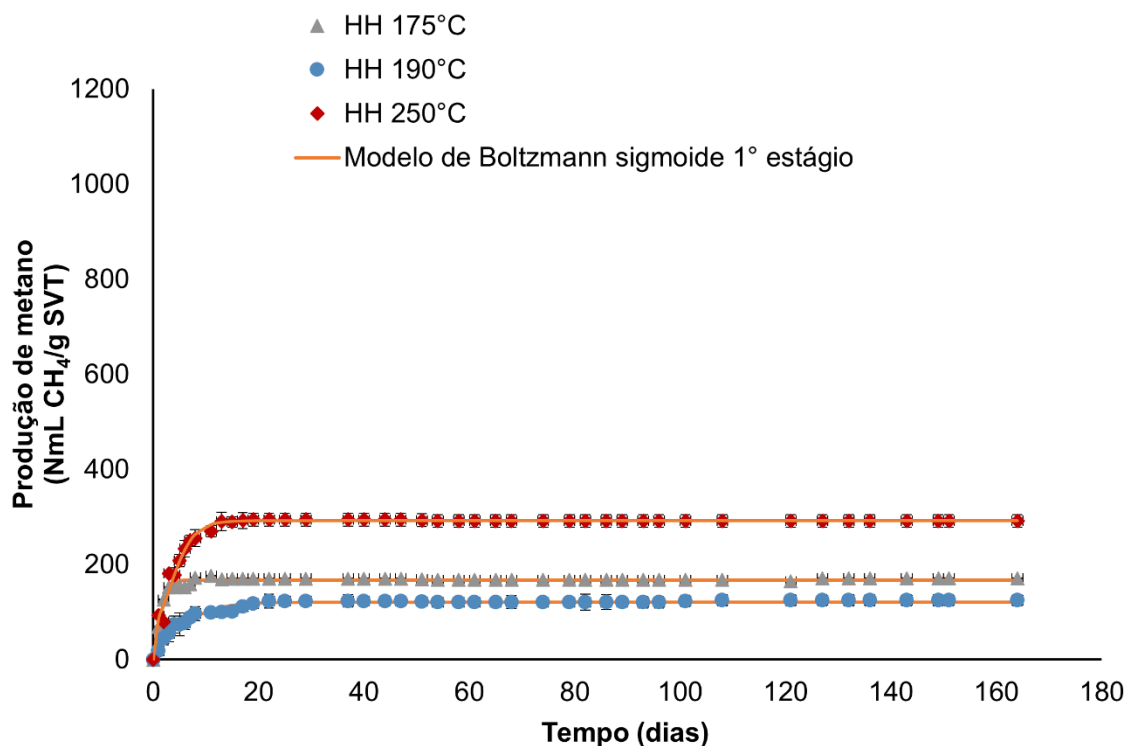
O PBM do processo de DA dos ensaios empregando apenas o HH, nas três condições de pré-tratamento hidrotérmico, estão reportados na Figura 20.

O melhor resultado de PBM empregando o HH foi observado na condição mais severa do pré-tratamento (205°C, 10 min), com uma produção média de 291,50 ±

13,50 NmL CH₄/g SVT. Observa-se que a produção de metano se manteve estável a partir do vigésimo dia, cujo incremento na produção ao longo dos demais dias foi inferior a 1%. Os HH obtidos à 175 e 190°C apresentaram uma produção de metano relativamente inferiores, com resultados de $172,82 \pm 16,06$ e $267,03 \pm 11$ NmL CH₄/g SVT, respectivamente.

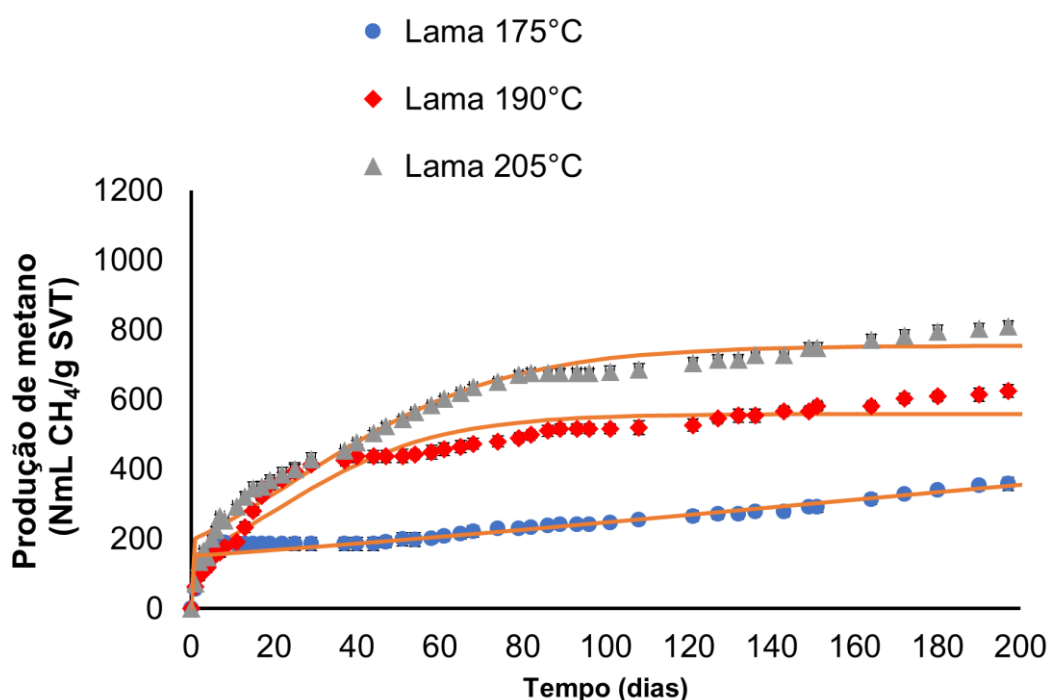
Estudos realizados por Buitrón *et al.*, (2019) empregaram HH obtidos após o pré-tratamento por explosão a vapor (150°C, 3 bar, 40 min) de diferentes biomassas lignocelulósicas: palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de agave, visando avaliar o PBM. Para os ensaios, foi utilizado como inóculo o lodo obtido de uma estação de águas residuais da cervejaria, na proporção de 2:1 SV de inóculo:substrato. O maior valor de PBM foi obtido do bagaço de cana-de-açúcar, com 358 ± 19 mL CH₄/g SV, e a menor produção foi observada para a palha de trigo com 212 ± 2 mL CH₄/g SV, ambos em aproximadamente 13 dias. É possível observar que valores similares foram obtidos empregando o HH de resíduos da cultura do lúpulo.

Figura 20 - Produção de metano obtida na DA dos HHs



A lama também obteve um PBM superior considerando a condição mais severa do pré-tratamento, com uma produção média de $818,05 \pm 16,25$ NmL CH₄/g SVT, como mostra a Figura 21. É possível observar que, após 100 dias do início do processo, os reatores de ensaios ainda estavam produzindo CH₄ de forma considerável. Os resultados indicam que a lama demonstrou um potencial de produção significativamente maior que o HH, considerando todas as condições de pré-tratamento.

Figura 21 - Produção de metano obtida na DA das lamas



Curiosamente, Wang *et al.*, (2018a) observaram um fenômeno contrário, indicando inibições na produção de biogás ao empregar o pré-tratamento hidrotérmico na biomassa de palha de arroz em condições mais severas. As condições de pré-tratamento empregadas foram (90, 150, 180 e 210°C, 15 min). As condições mais severas indicaram que as frações solúveis controlaram o desempenho da DA, e que houve uma relação negativa entre o rendimento de metano e as frações solúveis, incluindo carboidratos solúveis, ácido fórmico e furfural. O maior rendimento de metano foi de 175,7 mL/g ST (180°C, 15), 9,5% significativamente maior do que a biomassa não tratada (160,4 mL/g ST). O pré-tratamento hidrotérmico, especialmente

à temperaturas mais elevadas, não potencializou o processo de DA, porém, temperatura mais baixas foram potencialmente consideradas.

Durante o processo de mono-digestão, foi observado nas DA da lama um comportamento diauxico na produção de metano, conforme ilustrado na Figura 21. Esse padrão é comumente observado em diversos substratos, como aqueles ricos em gordura ou lignocelulose (Kim; Kim, 2017).

Alguns modelos, previamente tratados para representação e ajuste cinético de produção diauxica, foram identificados em estudos (Bohutskyi *et al.*, 2019; Howell; Bennett; Materić, 2019; Nguyen *et al.*, 2019). Entretanto, a adaptação de modelos multicinéticos para soluções numéricas pode se tornar mais complexa, uma vez que o mesmo conceito básico pode ser reexpresso de maneira diferente com base em suposições sobre reações em duas etapas, crescimento diauxico ou co-metabolização. Neste caso, a cinética de produção de metano do tipo diauxica ainda assim obteve melhor ajuste no modelo de um estágio.

A cinética de produção com comportamento diauxico também pode indicar algum grau de inibição nas etapas bioquímicas do processo de produção de metano (Kim; Kim, 2017). A velocidade de degradação dos principais compostos da biomassa (carboidratos, proteínas e lipídios) variou conforme as condições de temperatura aplicadas no pré-tratamento.

O padrão diauxico descrito por Aromolaran *et al.*, (2023) pode ser associado aos ajustes metabólicos durante a biodegradação dos diversos componentes da mistura na co-DA. Neste estudo, a lama consiste na combinação da fração sólida e líquida, o que pode ter resultado no consumo sequencial das diferentes frações e compostos ao longo do tempo.

A Tabela 20 apresenta o PBM e PBMT de cada um dos ensaios de mono-DA, além dos dados do modelo matemático empregado em cada estudo. Ao observar os dados de PBM, é possível notar que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os ensaios.

Tabela 20 - Valores de PBMT, PBM, digestibilidade e parâmetros cinéticos da DA

Substratos	In-natura	Dejeto	HH 175°C	HH 190°C	HH 205°C	Lama 175°C	Lama 190°C	Lama 205°C
PBMT_{ThAtC} (NmLCH₄/gSVT)	601,53	474,95	407,23	442,0297	489,08	724,73	768,73	809,74
PBMT_{o-ThAtC} (NmLCH₄/gSVT)	336,50	277,30	368,82	402,24	450,58	350,14	354,03	413,27
Digestibilidade	0,21	1,67	0,42	0,60	0,60	0,55	0,83	1,01
PBM (NmL CH₄/g SVT)	124,55 ± 0,01 ^h	793,29 ± 6,38 ^b	170,82 ± 16,06 ^g	267,03 ± 11,95 ^f	291,50 ± 13,50 ^e	400,40 ± 18,15 ^d	638,82 ± 18,11 ^c	818,05 ± 16,25 ^a
Modelo	120,50	505,60	167,64	259,67	291,91	393,16	513,15	764,64
R²	0,96	0,92	0,97	0,98	0,98	0,93	0,93	0,98
AI	0	0		0		0		
AS	121,86	668,84		259,67		887,86		
Inc	4,59	38,32		4,11		145,46		
PI	4,21	37,50		1,65		237,42		
P			0,44		0,63		0,3167	0,2460
V^{max}_{CH4}			377,16		455,93		513,17	766,17
t1(dia)			1,22		2,94		14,04	6,45
t2 (dia)			418,35		436,76		14,89	42,64
r1			50,23		29,67		1648,79	17,58
r2			0,79		0,84		4,38	5,30

Letras iguais em linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, pelo teste de Tukey. Modelo Boltzmann sigmoide 1° estágio: (AI) Assíntona Inferior, (AS) Assíntona Superior, (PI) Ponto de Inflexão, (Inc) Inclinação da curva no PI. Modelo Boltzmann sigmoidal empilhada: (p) Proporção, (VmaxCH4) produção específica de CH₄ (NmL CH₄/g SVT), t1e t2 tempo em que a produção do primeiro e segundo padrão sigmoidal atinge a taxa máxima, r1e r2 taxa máxima de produção de CH₄ para o primeiro e segundo padrão sigmoidal, respectivamente.

Analisando os dados da Tabela 20 é possível identificar que o maior valor de potencial foi encontrado para a lama na condição mais severa (205°C, 10 min), seguido do dejetos bovino, com $818,05 \pm 16,25$ e $793,29 \pm 6,38$ NmL CH₄/g SVT, respectivamente.

Adghim *et al.*, (2020) avaliaram o PBM de dejetos de fazendas leiteiras empregando dejetos de vacas em lactação, vacas secas e vacas jovens, de idade entre 6 e 16 anos. A maior produção de metano foi alcançada empregando os dejetos de vaca em lactação, com uma produção média 412 mL CH₄/g SVT, seguido pela DA empregando o dejetos de vaca jovem e seca, com 332 e 273 mL CH₄/g SVT, respectivamente. Os resultados de PBM a partir do dejetos bovino empregado em nosso estudo foi significativamente maior, como já demonstrado.

O menor valor de PBM foi obtido na biomassa in-natura de lúpulo com $124,55 \pm 0,01$ NmL CH₄/g SVT, muito provavelmente devido a sua estrutura recalcitrante e de difícil degradação.

Buitrón *et al.*, (2019) investigaram PBM a partir da fração sólida da palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de agave pré-tratados por explosão a vapor (150°C, 3 bar, 40 min). Para os ensaios, foi utilizado como inóculo o lodo obtido de uma estação de águas residuais da cervejaria, na proporção de 2:1 SV de inóculo:substrato. Os autores observaram que a fração sólida obtida após pré-tratamento produziu um PBM inferior ao HH, efeito contrário ao observado neste estudo, onde a mistura de sólido/líquido (lama) elevou o PBM.

É possível observar também que o maior PBMT foi determinado para a lama na condição mais severa, desconsiderando a presença de nitrogênio (N) e enxofre (S) (PBMT_{ThAtC}), com 809,74 NmL CH₄/g SVT, sendo o menor valor para o HH na condição menos severa, 407,23 NmL CH₄/g SVT.

Em relação aos modelos matemáticos, foram observados bons ajustes, onde os valores de R² variaram de 0,92 a 0,98, considerando os dois modelos cinéticos utilizados.

Analisando a Tabela 20, é possível observar que os substratos com maior digestibilidade foi o dejetos, seguido da lama na condição mais severa, com 1,67 e

1,01, respectivamente. Já os substratos de menor digestibilidade foram a biomassa de lúpulo in-natura e o HH na condição mais branda (175°C, 10 min) com 0,21 e 0,42, respectivamente.

Os resultados mostram um PMB aumentando conforme a severidade de pré-tratamento para ambos os materiais. Portanto, o pré-tratamento hidrotérmico empregado neste estudo proporcionou um efeito positivo na DA da biomassa lignocelulósica quando comparado ao material in-natura.

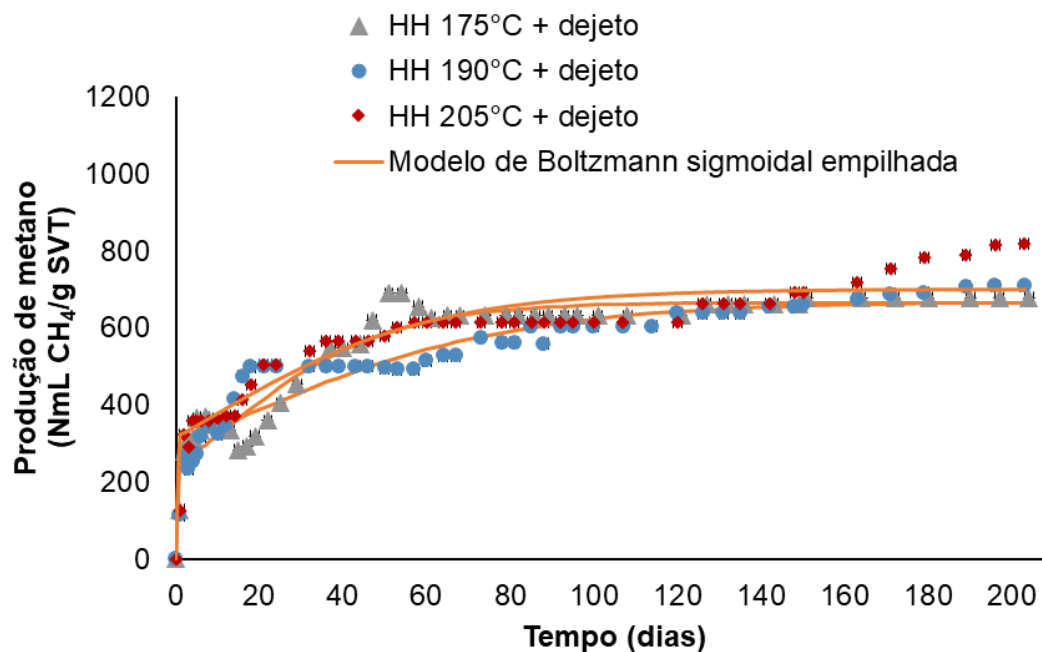
Outros trabalhos presentes na literatura apontam resultados efetivos ao utilizar o pré-tratamento hidrotérmico, como Zerback *et al.*, (2022), que avaliaram o efeito do pré-tratamento hidrotérmico na digestibilidade da palha de trigo sob diferentes temperaturas (160 - 180°C) e tempos de retenção (15 - 45 min). Os resultados mostraram que a solubilização da matéria orgânica foi consequência de parâmetros de pré-tratamento (temperatura e tempo), onde o efeito foi influenciado principalmente pela temperatura. Esse efeito é passível de comparação assim como nos ensaios de DA, onde a temperatura de pré-tratamento deteve a principal influência, levando em consideração que não houve variação de tempo de banho de aquecimento de fluido térmico da biomassa nos reatores.

4.3.3 Potencial Bioquímico de Metano em co-DA

A Figura 22 apresenta o PBM a partir da co-DA do HH com dejetos. Nota-se que os ensaios de HH + dejetos nas três condições de pré-tratamento (175, 190 e 205°C, 10 min), apresentaram rendimento de $678,03 \pm 24,47$, $709,07 \pm 19,83$ e $818,25 \pm 23,83$ NmL CH₄/g SVT, respectivamente, onde, mais uma vez, a condição mais severa de processo levou a maior produção de metano.

Se compararmos os resultados obtidos da DA (Figura 20) e co-DA (Figura 22) empregando o HH, é possível observar um incremento considerável na produção de metano nos processos de co-DA, onde a maior produção de metano na co-DA ($818,25 \pm 23,83$ NmL CH₄/g SVT) levou a uma produção similar ao do dejetos em processo de mono-DA ($793,29 \pm 6,38$ NmL CH₄/g SVT).

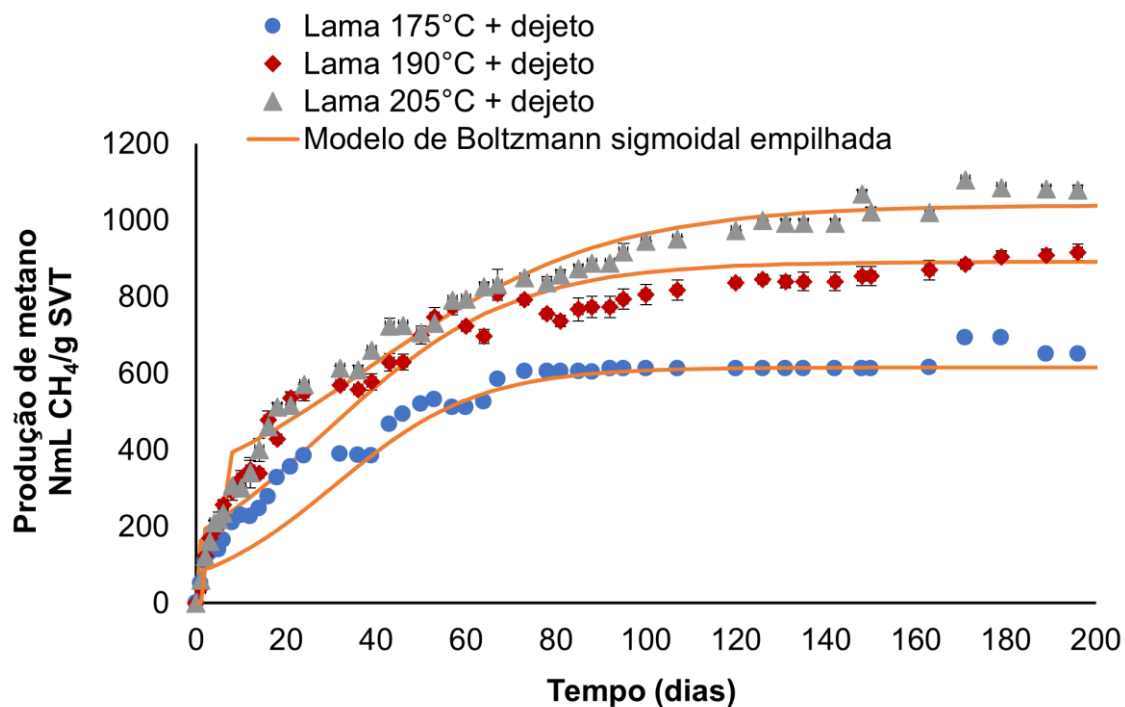
Figura 22 - Produção de metano na co-DA dos substratos HH e dejetos



A Figura 23 apresenta os dados de PBM a partir da co-DA das lamas com dejetos.

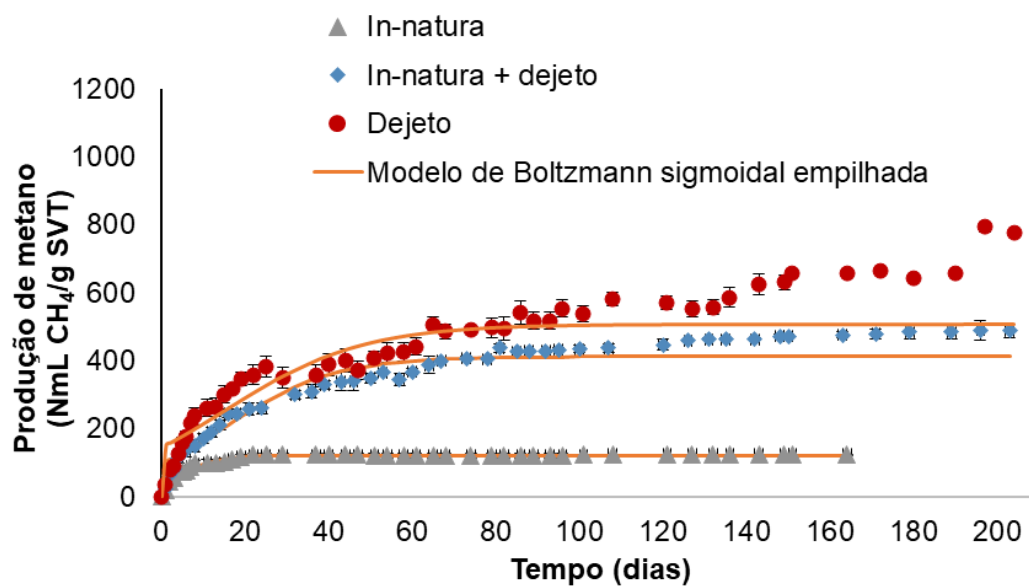
Analisando a Figura 23 é possível observar o mesmo fenômeno já mencionado anteriormente, que a condição mais severa de pré-tratamento proporcionou uma maior produção de metano, $1078,22 \pm 13,20$ NmL CH₄/g SVT. A lama pré-tratada a 175°C, 10 min, obteve rendimento de $650,79 \pm 0,00$ NmL CH₄/g SVT, enquanto a pré-tratada na condição de 190°C, 10 min, $916,25 \pm 19,66$ NmL CH₄/g SVT. É possível notar que os dois ensaios nas maiores temperaturas proporcionaram PBM superior ao dejetos, conforme apontado na Tabela 19.

Figura 23 - Produção metano obtida na co-DA das lamas e dejetos



A Figura 24 apresenta o PBM da biomassa in-natura, em mono e co-DA com o dejetos bovino, assim como os dados de DA do dejetos.

Figura 24 - Produção de metano nos processos de mono e co-DA da biomassa in-natura e dejetos



A complexidade estrutural das biomassas lignocelulósicas são um desafio para processos fermentativos devido a recalcitrância da mesma o que impacta negativamente nos processos de DA (Sawatdeenarunat *et al.*, 2016). Para a biomassa in-natura foi observado uma produção de metano de $124,55 \pm 0,01$ NmL CH₄/g SVT no processo de mono-DA. Nos ensaios de co-DA, a produção acumulada foi de $488,63 \pm 20,08$ NmL CH₄/g SVT, conforme apresentado na Figura 24. Ao analisar a produção do dejetado isolado, $793,27 \pm 6,38$ NmL CH₄/g SVT foi produzido, o que demonstra que sem a etapa de pré-tratamento, a presença da mesma no meio reduz a produção de metano.

Métodos de pré-tratamento são empregados para modificar as estruturas da biomassa lignocelulósica, a fim de disponibilizar a matéria orgânica para conversão em bioenergia (Rajendran *et al.*, 2018), rompendo e despolimerizando a parede celular e evitando maior cristalinidade da celulose (Karimi; Taherzadeh, 2016). Muitos trabalhos apontam que o pré-tratamento hidrotérmico é um método eficaz para aumentar a produção de metano, com um consumo de energia relativamente baixo e sendo uma tecnologia positiva para o meio ambiente (Gong *et al.*, 2019).

A Tabela 21 reporta os valores PBM dos ensaios de co-DA, bem como os parâmetros matemáticos obtidos a partir do modelo cinético utilizado.

Analizando os dados da Tabela 21 é possível observar que o processo de co-DA favoreceu a produção de metano, em todas as condições avaliadas, quando comparado ao processo de mono-Da (Tabela 20). Os valores das médias de produção de biometano obtidos do processo de co-DA apresentam diferença estatisticamente significativa entre todos os ensaios.

O PBM foi aumentado em 3,97 vezes empregando o HH na condição menos severa com dejetado. Para a co-DA da lama, a condição menos severa teve um aumento de produção de 1,63 vezes quando comparado ao processo em mono-DA.

Tabela 21 - Valores de PBM e parâmetros cinéticos das co-Da

	In-natura + dejeto	HH 175°C + dejeto	HH 190°C + dejeto	HH 205°C + dejeto	Lama 175°C + dejeto	Lama 190°C + dejeto	Lama 205°C + dejeto
PBM (NmL CH ₄ /g SVT)	488,63 ± 20,08 ^g	678,03 ± 24,47 ^e	709,07 ± 19,83 ^d	818,25 ± 23,83 ^c	650,79 ± 24,89 ^f	916,25 ± 19,66 ^b	1078,22 ± 13,20 ^a
Modelo (NmL CH ₄ /g SVT)	476,63	638,93	578,36	715,63	615,22	891,38	1038,14
R²	0,99	0,98	0,94	0,92	0,96	0,95	0,98
V^{max}_{CH₄}	477,21	638,93	505,86	717,50	615,24	891,58	1038,14
P	0,45	0,51	0,49	0,25	0	0	0,18
t1	8,12	1,21	1,02	1,90	1,26	1,40	6,09
t2	50,31	37,32	11,84	23,44	30,81	28,55	38,50
r1	12,06	168,83	818,09	586,40	491,89	498,38	631,63
r2	2,61	17,40	21,31	4,17	9,64	10,72	8,07

Letras iguais em linha indicam que não houve diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, pelo teste de Tukey. Modelo Boltzmann sigmoidal empilhada: (p) Proporção, (VmaxCH₄) produção específica de CH₄ (NmL CH₄/g SVT), t1e t2 tempo em que a produção do primeiro e segundo padrão sigmoidal atinge a taxa máxima, t1e t2 taxa máxima de produção de CH₄ para o primeiro e segundo padrão sigmoidal, respectivamente.

Quanto aos valores de R^2 , variaram de 0,92 a 0,99 no modelo cinético utilizado para modelagem da produção de metano dos ensaios de co-DA, indicando um ajuste cinético eficiente.

Algumas pesquisas avaliaram o processo de co-DA de biomssas lignocelulósicas como dejetos animais (Mostafa Imeni *et al.*, 2019; Neshat *et al.*, 2017) e demonstraram a eficiência desta co-DA no incremento da produção de metano. Um exemplo é o estudo realizado por (Awais *et al.*, 2016), que avaliaram a produção de metano empregando palha de trigo, capim braquiária e dejetos bovinos em um processo de co-DA. Os resultados mostraram que a utilização de 50% de palha de trigo e misturas de capim e dejetos nas proporções de 25:75, 50:50 e 75:25 proporcionaram uma produção de metano de 20 a 24% superior ao processo empregando apenas a palha, levando a taxas de produção de metano de 27, 23 e 22 NmLCH₄/g SVT.d, respectivamente.

4.4 Análises do Digestato

4.4.1 Análise de Série de Sólidos e Avaliação do pH Final

A Tabela 22 apresenta os dados da análise de série de sólidos do digestato. Ressalta-se que, a proporção 2:1 (inóculo:substrato) foi empregada com o ajuste de massa baseando-se nos teores de SVT de cada substrato (Tabela 13), a fim de promover possibilidades iguais de biodegradação e conversão de matéria orgânica, para todos os substratos, e ao final do processo analisou-se os teores de sólidos da mistura dos substratos após a DA e co-DA.

Analisando a Tabela 22, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os digestatos do processo de DA empregando a lama, nas três condições de pré-tratamento nos dados de ST, SVT e SFT. Os digestatos a partir da biomassa in-natura, HH 175°C com dejetos e HH 190°C com dejetos não apresentam diferença estatisticamente significativa entre eles, nos valores de ST obtidos ao final do processo. Assim como os digestatos de HH 190°C com dejetos e HH 175°C, ambos com $0,009 \pm 0,001$ g/L.

Tabela 22 - Análise de série de sólidos do digestato dos ensaios de DA e co-Da

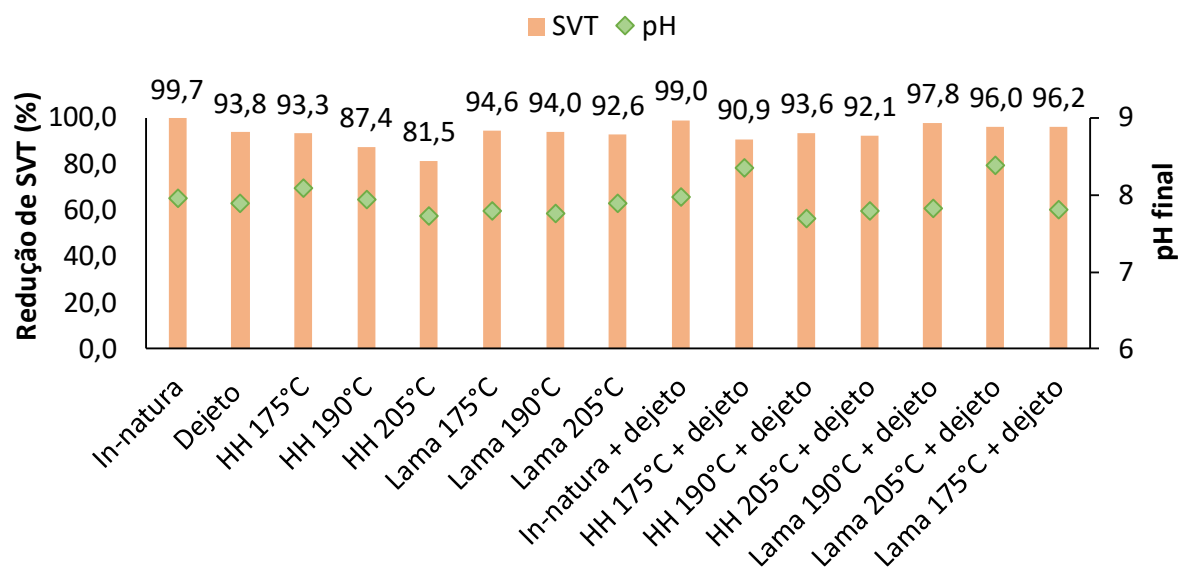
	Digestato	Sólidos Totais (ST) (g/g)	Sólidos Voláteis Totais (SVT) (g/g)	Sólidos Fixos Totais (SFT) (g/g)
DA	In-natura	0,011 ± 0,001 ^a	0,006 ± 0,001 ^d	0,005 ± 0,000 ^{ade}
	Dejeto	0,042 ± 0,000 ^d	0,030 ± 0,000 ^g	0,011 ± 0,000 ^f
	HH 175°C	0,009 ± 0,000 ^e	0,004 ± 0,000 ^h	0,004 ± 0,000 ^a
	HH 190°C	0,015 ± 0,000 ^f	0,008 ± 0,000 ⁱ	0,006 ± 0,000 ^b
	HH 205°C	0,024 ± 0,000 ^g	0,017 ± 0,000 ^j	0,007 ± 0,000 ^c
	Lama 175°C	0,024 ± 0,000 ^h	0,016 ± 0,000 ^f	0,007 ± 0,000 ^c
	Lama 190°C	0,023 ± 0,000 ^h	0,016 ± 0,000 ^f	0,007 ± 0,000 ^c
	Lama 205°C	0,024 ± 0,000 ^h	0,017 ± 0,000 ^f	0,007 ± 0,000 ^c
Co- DA	In-natura + dejeto	0,014 ± 0,000 ^b	0,008 ± 0,000 ^e	0,005 ± 0,000 ^d
	HH 175°C + dejeto	0,010 ± 0,001 ^a	0,005 ± 0,001 ^d	0,004 ± 0,000 ^e
	HH 190°C + dejeto	0,009 ± 0,001 ^{ae}	0,007 ± 0,000 ^{acde}	0,001 ± 0,000 ^f
	HH 205°C + dejeto	0,013 ± 0,000 ^{ab}	0,009 ± 0,000 ^{be}	0,003 ± 0,000 ^g
	Lama 175°C + dejeto	0,014 ± 0,001 ^{bc}	0,008 ± 0,000 ^{abe}	0,005 ± 0,000 ^d
	Lama 190°C + dejeto	0,020 ± 0,000 ^c	0,013 ± 0,000 ^k	0,007 ± 0,000 ^h
	Lama 205°C + dejeto	0,017 ± 0,000 ⁱ	0,011 ± 0,001 ^l	0,006 ± 0,000 ^d

Letras iguais em cada coluna indicam que não houve diferença estatisticamente significativa à 95% de confiança, pelo teste de Tukey

Na co-DA, os digestatos de lama 175°C com dejeto e lama 205°C com dejeto não obtiveram diferença significativa à 95% de confiança pelo teste de Tukey, nos dados de SFT ao final do processo. Já os digestatos nas três condições de pré-tratamento de lama com dejeto apresentou diferença estatisticamente significativa entre eles, nos valores de SVT.

A redução de SVT foi determinada a partir da relação entre os valores de entrada e saída da reação. Os dados são apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Redução de SVT e avaliação do pH ao final do processo



Analisando a Figura 25 é possível observar uma redução considerável dos SVT presentes no meio. De modo geral, quanto mais severo o processo de pré-tratamento, menor foi a redução dos SVTs do sistema. A menor redução foi observada empregando a DA do HH na condição mais severa de pré-tratamento, 205°C e 10 min, com uma redução de 81,5%.

Dawana Keche *et al.*, (2022) avaliaram a produção de metano a partir do aguapé (*Eichhornia crassipes*) utilizando como inóculo lodo de uma planta de biogás de águas residuárias municipais (20%) e dejeto animal (80%). Os autores também observaram altas remoções de SVTs ao final do processo, com valores próximos a 96,1%. Em nosso estudo, a maior remoção de SVT (99,7%) foi obtida no ensaio empregando a biomassa in-natura, onde altas taxas de remoção indicam estabilidade no sistema.

O pH desempenha um papel fundamental para indicar a estabilidade do processo, sendo o pH ideal entre 4 e 8 para a fase de hidrólise e 6,5 a 7,5 para comunidades metanogênicas (Muratçobanoğlu *et al.*, 2020). Já Ward *et al.*, (2008) afirmam que as etapas de hidrólise e acidogênese geralmente necessitam de pH 5,5 e 6,5 para um bom desenvolvimento do processo. Autores como Mirmohamadsadeghi *et al.*, (2019), Cárdenas-Cleves *et al.*, (2016) e Yang *et al.*, (2015) afirmam que a faixa

de pH operacional ideal para o processo DA está entre 6,0 e 8,0. As arqueas metanogênicas são muito mais sensíveis à variação do pH que outros organismos na comunidade bacteriana (BAJPAI, 2017).

De modo geral, os digestatos apresentam valores finais de pH variando de 7,7 a 8,4.

4.4.2 Composição Química

A Tabela 23 apresenta a concentração de açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos nos digestatos provenientes dos processos de DA e co-DA. Os dados indicam que não há presença significativa açúcares e produtos de degradação ao final do processo, sendo a maior concentração observada ao final do processo a do ácido levulínico, os digestatos dos ensaios com lama à 190°C e HH 190°C com dejetos, ambas com concentração de 0,21 g/L. Se compararmos com os dados de composição inicial (Tabela 16), é possível observar uma redução da concentração deste analito de 32 e 16%, respectivamente, o que demonstra um baixo consumo desse analito nos processos de DA.

A Tabela 24 mostra a composição dos AGVs ao final do processo. Os AGVs são produtos intermediários na DA, decorrentes das etapas de acidogênese e acetogênese, quando os materiais orgânicos são degradados (Lim *et al.*, 2006). Durante a hidrólise, polímeros orgânicos complexos são quebrados e reduzidos em monômeros orgânicos mais simples por enzimas excretadas por microrganismos hidrolíticos. Então, acidógenos fermentam esses monômeros principalmente em AGVs, como ácidos acético, propiônico e butírico (Lukitawesa *et al.*, 2020). Entre os diversos AGVs produzidos durante a DA, há diferentes efeitos cooperativos sob as bactérias e arqueas (Franke-Whittle *et al.*, 2014b).

Tabela 23 - Composição química dos digestatos obtidos nos processos de DA e co-DA

	Reator	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido levulínico (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)
DA	In-natura	0,07	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
	Dejeto	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	HH 175	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	HH 190	0,00	0,01	0,01	0,00	0,04	0,00	0,01
	HH 205	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
	Lama 175	0,00	0,01	0,01	0,00	0,10	0,00	0,01
	Lama 190	0,08	0,02	0,02	0,01	0,21	0,00	0,01
	Lama 205	0,00	0,01	0,01	0,00	0,10	0,00	0,01
Co-DA	In-natura + dejeto	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	HH 175 + dejeto	0,07	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
	HH 190 + dejeto	0,07	0,01	0,01	0,00	0,21	0,00	0,01
	HH 205 + dejeto	0,00	0,01	0,01	0,00	0,11	0,00	0,00
	Lama 175 + dejeto	0,07	0,01	0,00	0,00	0,10	0,00	0,01
	Lama 190 + dejeto	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
	Lama 205 + dejeto	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01

Tabela 24 - Concentrações de AGVs no digestato

	Reator	Ácido acético (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Ácido isobutírico (g/L)	Ácido isovalérico (g/L)	Ácido capróico (g/L)	Ácido propiónico (g/L)
Controle	Inóculo	0,240	0,026	0,000	0,105	0,059	0,000
	Celulose	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
DA	In-natura	0,240	0,020	0,000	0,000	0,000	0,020
	Dejeto	0,070	0,030	0,000	0,100	0,000	0,000
	HH 175°C	0,000	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
	HH 190°C	0,040	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	HH 205°C	0,020	0,010	0,000	0,100	0,000	0,000
	Lama 175°C	0,050	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	Lama 190°C	0,015	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
	Lama 205°C	0,090	0,000	0,000	0,090	0,000	0,000
Co-DA	In-natura + dejeto	0,120	0,030	0,000	0,100	0,000	0,000
	HH 175°C + dejeto	0,000	0,190	0,000	0,060	0,000	0,000
	HH 190°C + dejeto	0,010	0,070	0,000	0,000	0,060	0,010
	HH 205°C + dejeto	0,050	0,030	0,000	0,120	0,000	0,000
	Lama 175°C + dejeto	0,020	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	Lama 190°C + dejeto	0,010	0,000	0,000	0,060	0,050	0,000
	Lama 205°C + dejeto	0,070	0,000	0,000	0,110	0,000	0,000

Com base na Tabela 24, observa-se que as baixas concentrações de AGVs indicam um bom desempenho do sistema, uma vez que na metanogênese, parte dos AGVs gerados serão consumidos para produção de biogás (Toerien; Hattingh, 1969).

A maior concentração de AGVs residual foi de ácido acético, observada no ensaio empregando apenas a biomassa in-natura (0,24 g/L).

Não houve a presença de ácido isobutírico em nenhuma das amostras. Para os demais AGVs, foram detectadas concentrações mínimas na maior parte das amostras de digestatos analisadas. Concentrações de ácido isovalérico foram detectadas entre 0,06 e 0,12 g/L. O AGV detectado em maior concentração foi o ácido butírico com 0,19 g/L no digestato proveniente do HH 175°C com dejetos.

Efeitos inibitórios causados pelos AGVs podem ocorrer causando falhas no sistema e consequentemente baixa produção de metano. Al-sulaimi *et al.*, (2022) apresentaram concentração máxima de AGVs como ácido isovalérico (0,19 g/L) ácido propiônico (0,17 g/L), ácido capróico (0,14 g/L) e ácido isobutírico (0,10 g/L). Com exceção do ácido acético, nenhum dos outros ácidos foi convertido em CH₄ pelos microrganismos metagônicos. A causa da não conversão foi a complexidade das estruturas moleculares dos outros AGVs, por apresentarem cadeias mais longas e ramificadas. Em contrapartida, a literatura reporta que o aumento da produção de AGVs resulta no aumento da atividade microbiana e do crescimento eficiente das bactérias produtoras de ácido (Wijekoon; Visvanathan; Abeynaysaka, 2011).

4.4.3 Análise de Micro e Macronutrientes

A análise de micro e macronutrientes no digestato é relevante visando a produção de fertilizantes orgânicos, fertilizantes orgânicos-minerais ou condicionadores de solo (Czekala, 2021; Czekala *et al.*, 2022).

A Tabela 25 apresenta a composição destes nutrientes no digestato para fins de fertirrigação.

Tabela 25 - Concentração de nutrientes presentes no digestato proveniente dos processos de DA e co-DA

	Concentração (mg/L)	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn
DA	In-natura	794,07	51,97	988,4	86,85	193,4	90,08	403,54	1,67	0,37	0	0,19	0,19
	Dejeto	986,34	115,11	1055	40,1	167,1	145,65	423,62	2,12	0,27	1,35	0,09	0,36
	HH 175°C	805,16	123,51	1003,4	29,91	164,57	175,85	378,69	3,63	1,24	1,24	0,27	0,53
	HH 190°C	798,93	103,62	913,78	36,45	169,77	150,69	367,37	2,95	0,78	1,07	0,21	0,36
	HH 205°C	338,23	220,48	1092	31,41	228,07	181,8	401,05	3,32	0,77	1,06	0,29	0,39
	Lama 175°C	919,38	122,6	941,9	31,9	148,23	150,1	403,4	2,32	0,38	1,78	0,09	0,28
	Lama 190°C	1105,3	173,7	1011,8	39,28	176,43	226,01	417,18	3,87	0,58	2,63	0,1	0,39
	Lama 205°C	1041,2	125,45	983,66	32,81	162,54	170,59	394,08	3,05	0,31	2,45	0,08	0,31
Co-DA	In-natura + dejeto	894,54	88,75	910,16	35,85	163,29	126,9	406,09	1,93	0,28	1,56	0,07	0,28
	HH 175°C + dejeto	976,68	121,97	918,35	38,31	168,12	163,68	344,24	1,82	0,91	1,26	0,23	0,57
	HH 190°C + dejeto	2876,3	173,91	899,55	139,93	222,11	288,05	444,22	0	1,67	2,22	0,56	0,56
	HH 205°C + dejeto	1069,9	213,22	717,52	43,09	191,05	225,55	337,53	2,93	0,85	3,18	0	0,42
	Lama 175°C + dejeto	1744,1	188,37	944,55	67,73	251,43	178,38	412,25	8,15	0,68	0,68	0,23	0,68
	Lama 190°C + dejeto	911,03	98,98	929,1	34,85	182,93	137,83	394,06	2,39	0,58	2,46	0,14	0,29
	Lama 205°C + dejeto	1533,3	96,73	931,88	41,95	183,78	191,43	400,97	2,87	1,11	3,34	0,19	0,74

Macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) são exigidos pelas plantas em maiores quantidades, enquanto os micronutrientes (ferro, cobre, manganês, zinco, boro, molibdênio e cloro) são necessários em quantidades relativamente menores (Slepetiene *et al.*, 2020).

As maiores concentrações de nutrientes foram para o NPK, nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, e para o Na. A maior concentração de N foi observada no digestato de HH 190°C com dejetos, de P no HH 205°C com dejetos. Já o potássio (K), a maior concentração disponibilizada foi observada no dejetos biodigerido.

Quanto aos nutrientes Mn e S, ambos foram detectados em maior concentração no digestato a partir do HH 190°C com dejetos, com 0,56 e 288,05 g/L, respectivamente.

Em especial, resíduos lignocelulósicos utilizados em processos de DA possuem grande potencial na produção de digestatos que podem ser aplicados como biofertilizantes (Aduba *et al.*, 2023; Manyi-Loh; Lues, 2023). Essas culturas lignocelulósicas são materiais de estrutura complexa, e são resistentes à biodegradação (Zhong *et al.*, 2011), e seu digestato contém matéria orgânica semidegradada que possui nutrientes residuais úteis como condicionadores de solo (Lansing *et al.*, 2010; Zacharof *et al.*, 2015).

O digestato tem potencial para ser utilizado como fertilizante orgânico semelhante ao fertilizante químico ou dejetos de animal, pois esses recursos têm características semelhantes às matérias-primas. A maior diferença é que o digestato contém um maior teor de $\text{NH}_4\text{-NH}^+$ e permite uma maior eficiência de absorção de N do que os demais fertilizantes (Möller; Müller, 2012).

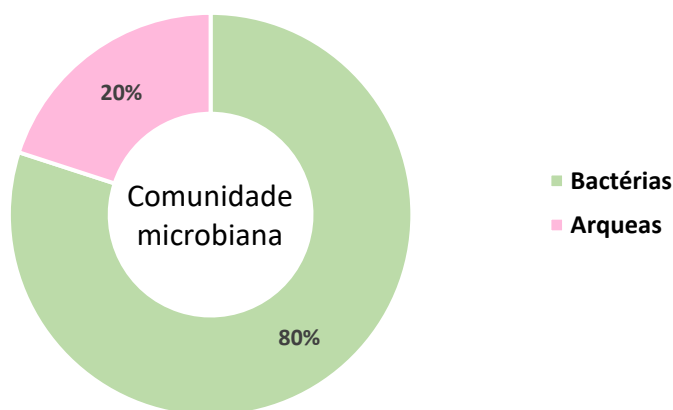
A maior concentração de sódio (Na) foi detectada no digestato a partir do dejetos bovino com 423,62 mg/L. O magnésio (Mg) obteve a maior concentração (222,11 mg/L) na amostra do digestato de HH 205°C. As concentrações de Fe variaram de 0,00 a 3,34 mg/L. Já as concentrações de cálcio (Ca) variaram de 29,91 a 139,93 mg/L.

4.5 Análise de Metagenômica

O sequenciamento de todas as bibliotecas das amostras dos digestatos resultou em média 4.592 leituras brutas (reads), sendo aproximadamente 2.485 reads classificadas após a filtragem de qualidade. O número de reads em OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) foi de 1.984. A função da OTU foi agrupar sequências próximas, como uma estratégia de análise para minimizar variações incorretas durante a etapa de amplificação no PCR, levando à detecção de organismos semelhantes.

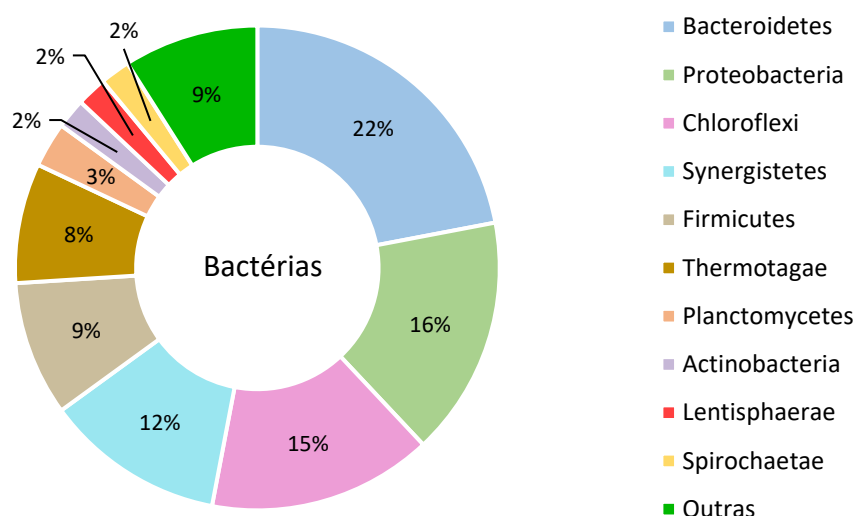
Em relação aos resultados de classificação por nível taxonômico, a Figura 26 mostra que bactérias dominam com 80%, englobando todas as sequências e ensaios dos reatores de biogás ao final do processo, enquanto 20% das sequências foram classificadas como arqueas.

Figura 26 - Resultado da Classificação por nível taxonômico



Os filos predominantes foram Bacteroidetes com 22%, Proteobacteria com 16%, Chloroflexi com 15% e Synergistetes com 12% ao nível bacteriano como mostra a Figura 27.

Figura 27 - Classificação geral dos resultados de filotaxia de bactérias



Em um estudo avaliando a evolução da comunidade microbiana (Hu; Wang; Chi, 2020) em sistema de DA mesofílica de resíduos de alimentos, com alto teor de sódio, foi utilizado a caracterização por sequenciamento de alto rendimento baseado no gene 16S rRNA. Os resultados revelaram que os filotaxia predominantes foram Bacteroidetes, Firmicutes, Thermotogae, Chloroflexi, Proteobacteria e Synergistetes. O aumento dos gêneros funcionais Kosmotoga, Levilinea e Longilinea durante o processo promoveu potencialmente a biodegradação de orgânicos. Quanto à comunidade de arqueas, os metanogênicos Mixotróficos de Methanosarcina foram quase substituídos pelos metanogênicos hidrogenotróficos, Methanobacterium e metanocorpusculo.

Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Chloroflexi predominaram nas DA com base em uma meta-análise baseada em sequência observada nos sistemas de DA (Nelson; Morrison; Yu, 2011). Caracterização metatranscriptômica em metano a produção de celulose demonstrou que Thermotogales, Clostridiales e Bacteroidetes estão envolvidos na degradação da celulose (Xia *et al.*, 2014).

Campanaro *et al.*, (2016) descobriram que os filotaxia Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes foram predominantes na degradação de polissacarídeos de cadeia

longa, sendo a alta biodegradabilidade de resíduos lignocelulósicos relacionados à abundância de Bacteroidetes no meio (Qiao *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2012).

Pasalari *et al.*, (2021) apontam que, a dominância de Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Thermotogae e Chloroflexi foi relatada independentemente das variações nas condições de temperatura e fases do processo. O filo Firmicutes consiste em numerosas bactérias que secretam enzimas líticas para degradam matéria orgânica, essas bactérias podem sobreviver em condições ambientais extremas devido à formação de esporos.

Já os filos Bacteroidetes e Chloroflexi desempenham um papel importante na manutenção da saúde do solo. A população de Chloroflexi pode converter biofertilizantes e/ou nitrogênio orgânico em nitrogênio mineral auxiliando na nutrição de plantas. Bacteroidetes secretam várias enzimas ativas em carboidratos para degradar matéria orgânica complexa, em especial glucanos, polissacarídeos estruturais, no solo (Sun *et al.*, 2020).

Kurade *et al.*, (2019) observaram que mais de 95% das bactérias eram representadas por Chloroflexi, Bacteroidetes e Firmicutes e 90% do total de arqueas eram representadas por Methanosarcina após os ensaios de co-DA de resíduos de óleos, gorduras e graxas.

O filo Actinobacteria é constituído por diversas espécies capazes de fermentar carboidratos e proteínas, e de degradar biomassas lignocelulósicas através da secreção de hidrolítica extracelular (Rajagopal; Kannan, 2017). A actinobacteria representa 2% na classificação dos resultados de filos presentes na microbiota dos digestatos desta pesquisa.

Assim como na apresentado na Figura 27, um dos filos presente em menor quantidade em processos de DA foi Spirochaetes, conhecido por sua morfologia helicoidal enrolada e crescimento quimioheterotrófico, relatado na oxidação da glicose (Lee *et al.*, 2015). A oxidação sintrófica do acetato de espiroquetas com metanógenos hidrogenotróficos também foi relatada (Lee *et al.*, 2013).

Na Tabela 26 são apresentados os principais grupos de arqueas, pertencentes ao filo Euryarchaeota e Thaumarchaeota. Os metanogênicos pertencentes ao filo Euryarchaeota, foram representados pelas ordens Methanosarcinales,

Methanomicrobiales, Methanobacteriales e Halobacteriales. Quanto ao filo Thaumarchaeota foram identificados pela ordem Thermoplasmatales.

Tabela 26 - Principais grupos de arqueas metanogênicas encontradas nos efluentes

Ordem	Família	Gênero
Methanosarcinales	Methanosaetaceae	Methanosaeta
	Methanosarcinaceae	Methanosarcina
Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	Methanospirillum
	Methanomicrobiaceae	Methanoculleus
		Methanogenium
	Methanocorpusculaceae	Methanocorpusculum
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter Methanobacterium
Halobacteriales	Miscellaneous euryarchaeota	
Thermoplasmatales	Methanomassiliicoccaceae	Methanomassiliicoccus

A ordem dos Methanosarcinales é dividida em duas famílias, Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae. Todos os membros da família Methanosarcinaceae são capazes de crescer com compostos contendo grupos metil. A família Methanosaetaceae está representada por apenas um gênero, Methanosaeta, e todas as células produzem metano dividindo o acetato. Sendo assim, entre os metanógenos, os gêneros Methanosarcina e Methanosaeta são bem conhecidos por utilizar acetato para a fase de metanogênese.

Methanoseta é especializada na produção de metano por clivagem de acetato, enquanto Methanosarcina é relativamente generalista, cujas características metabólicas são diversas e incluem caminhos acetoclásticos e hidrogenotróficos (Li *et al.*, 2013; LIU; Whitman, 2008).

Para o processo metanogênico, cerca de 20 gêneros estão envolvidos, incluindo *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanoculleus*, *Methanosaeta*, entre outros (Cheng *et al.*, 2018; Garcia; Patel; Ollivier, 2000). Os principais metanogênicos apresentam taxa de crescimento ótima em temperaturas mesofílicas (30 – 40°C), com exceção de *Methanohalobium* e *Methanosarcina*, que têm crescimento ideal em condições termofílicas (50–55°C) (Gerardi, 2003).

Methanobacterium, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanolinea* são os principais metanogênicos hidrogenotróficos na DA, que usam principalmente gás carbônico junto com hidrogênio ou formiato para gerar metano (Gerardi, 2003; Lin *et al.*, 2018). Em estudos realizados por Ma, Chen e Ndegwa, (2021), não foi observado uma correlações significativas entre o rendimento de metano e estas bactérias metanogênicas.

Methanothermobacter são capazes de usar hidrogênio, gás carbônico ou formiato para produzir metano. Já a *Methanomassiliicoccus* só produz metano a partir de hidrogênio e metanol (Dridi *et al.*, 2012) e *Methanospirillum* consome principalmente hidrogênio e formiato para produção de metano (Hedderich; Whitman, 2006). Estes resultados exemplificam que, embora estes metanogênicos com menor potencial de geração de metano não pareça significativo, entretanto, eles desempenham papéis e funções de apoio fundamentais que mantêm a estabilidade nos processos de DA (Ma; Chen; Ndegwa, 2021).

A metanogênese é um processo de múltiplas etapas que envolve diferentes grupos de microrganismos como hidrolíticos, fermentativos, acetogênicos e sobretudo microrganismos metanogênicos (Getabalew; Alemneh; Bzuneh, 2020). Biologicamente, a produção de metano é limitada à alguns membros de arqueas sob condições anaeróbicas (Whitman; Bowen; Boone, 2006). A metanogênese é a principal fonte de metano biogênico e pode seguir três variantes metabólicas: (i) a via hidrogenotrófica baseada em CO₂ e H₂; (ii) a rota acetoclástica; e (iii) aqueles à base de compostos metílicos (metilotróficos) (Costa; Leigh, 2014; Whitman; Bowen; Boone, 2006; Zhu *et al.*, 2020).

O metano biogênico (CH₄) é produzido por arqueas metanogênicas, usando três substratos principais: acetato, gás carbônico e substâncias contendo um grupo

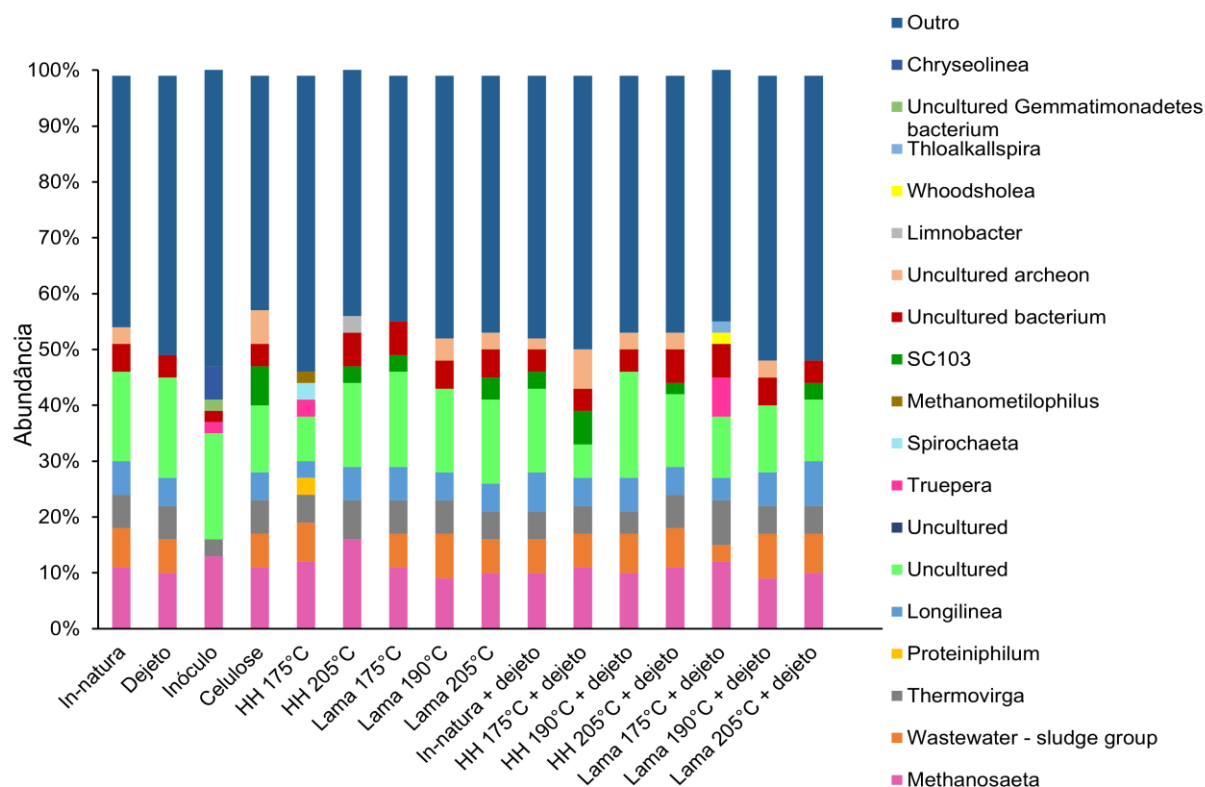
metil. Entre todas as arqueas metanogênicas, apenas a ordem Methanosarcinales inclui membros capazes de metabolizar todos os três substratos (Liu; Whitman, 2008).

A metanogênese hidrogenotrófica, a redução de gás carbônico com hidrogênio para metano pode ser realizada por quase todos os metanogênicos e, entre eles, podem ser distinguidos metanogênicos e microrganismos redutores de gás carbônico capazes de usar uma ampla gama de substratos. Eles diferem em algumas das enzimas envolvidas e o modelo de conservação de energia (Ferry, 2011). Organismos considerados incapazes de realizar a metanogênese hidrogenotrófica são encontrados apenas dentro dos Methanosarcinales. Foi demonstrado que o metanogênico mesófilo *Methanosarcina acetivorans* é incapaz de usar gás carbônico para metanogênese (Liu; Whitman, 2008).

A metanogênese acetoclástica é exclusivamente realizada pelos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, ambos membros dos Methanosarcinales, que diferem em sua especificidade do substrato e sua afinidade com o acetato (Ferry, 2010a; Liu; Whitman, 2008). A metanogênese metilotrófica pode ser dependente de hidrogênio ou independente de hidrogênio e é limitado a Methanosarcinales, Methanomassiliicoccales e uma espécie de Methanobacteriales (Dridi *et al.*, 2012; Liu; Whitman, 2008).

Na Figura 28 é possível visualizar a distribuição dos gêneros metanogênicos (arqueas) e das bactérias ao final do processo.

Figura 28 - Abundância de reads (%) em nível de gênero de bactérias e arqueas nos ensaios de mono e co-DA



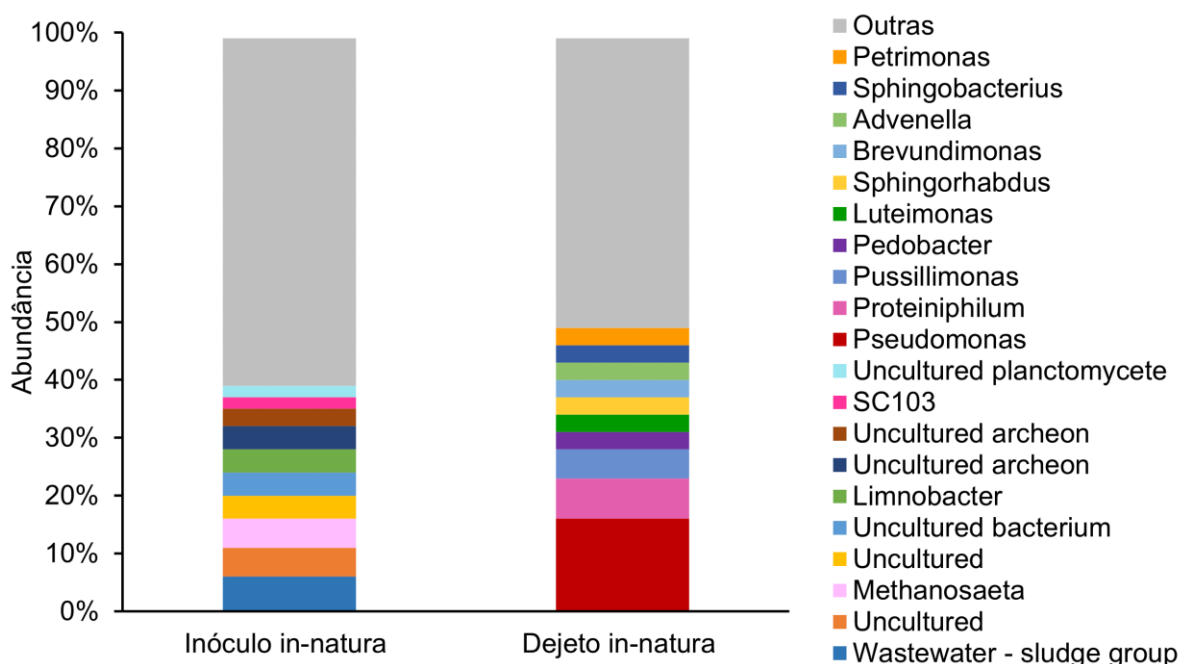
A categoria “outro” significa a soma de todas as classificações com abundância inferior a 2,5%.

Analisando os digestato é possível observar que apenas o efluente proveniente do inóculo digerido não apresentou o grupo de águas residuárias (wastewater – sludge group). Além disso, apenas nos ensaios utilizando a lama na condição mais branda de pré-tratamento (175°C, 10 min) e no inóculo foram observados a presença do gênero *Truepera*.

Espécies de *Limnobacter* (1,2%) pertencentes ao filo *Proteobacteria* foram descritas como bactérias aeróbicas oxidantes de enxofre (Wang *et al.*, 2012a). Este gênero foi encontrado na microbiota das amostras avaliadas.

A Figura 29 apresenta as principais bactérias encontradas na comunidade microbiana do substrato de dejeito bovino e do inóculo in-natura, utilizados nos ensaios de DA.

Figura 29 - Abundância de reads (%) em nível de gênero da microbiota do dejetos bovino e inóculo



É possível observar que os gêneros *Luteimonas* e *Pseudomonas* foram detectados apenas no substrato dejetos utilizado para os ensaios de sistemas de co-DA. O gênero predominante no dejetos in natura foi a gammaproteobactéria *Pseudomonas*. *Luteimonas* é uma Gammaproteobactéria capaz de degradar polissacarídeos complexos, como a quitina e substratos celulósicos, o que favorece seu crescimento (Remmas *et al.*, 2023).

Proteiniphilum são bactérias produtoras de ácido que produzem principalmente ácido acético e ácido propiônico, mas também produzem NH_3 via degradação de proteínas (Ziganshin *et al.*, 2013). A presença de *Proteiniphilum* foi detectada no substrato de dejetos bovino in-natura.

Iwasaki *et al.*, (2019) reforçam que a DA elimina muitos tipos de microorganismos nos dejetos bovinos e investigaram alterações quantitativas de espécies de *Pseudomonas* durante sistemas de DA mesófilas e termofílicas com foco em *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, que são conhecidas como patógeno e rizobactéria, promotora do crescimento de plantas, respectivamente. Os resultados sugerem que o digerido tem benefícios como a ausência de riscos

patogênicos pelas espécies de *Pseudomonas* e espera-se um efeito promotor do crescimento das plantas facilitado pelas *Pseudomonas* fluorescentes.

Analisando a Figura 28, é possível observar que o digestato do reator de ensaio com dejetos não detectou a presença de *Pseudomonas* ou microrganismos de potencial patogenicidade, assim como as amostras dos demais efluentes de mono e co-DA. Isso indica que provavelmente foram eliminadas ao longo do processo, visto que o gênero *Pseudomonas* foi detectada apenas no dejetos bovino in-natura.

A avaliação da microbiota e funcionalidade do digestato proveniente dos processos de mono e co-DA proporciona melhor entendimento da dinâmica desses processos. Através de tecnologias moleculares é possível obter informações sobre a composição da comunidade microbiana nas diferentes etapas de DA. A análise metagenômica do digestato indicou que parâmetros operacionais, incluindo temperatura, métodos de pré-tratamento, concentração de amônio, oligoelementos, taxa de carga orgânica e composição do substrato têm efeitos significativos sobre bactérias fermentativas e metanógenos na digestão anaeróbica. Além disso, tanto as bactérias acetolásticas quanto as hidrogenotróficas estão envolvidas na biometaminação em diferentes abundâncias relativas, dependendo da condição operacional de pré-tratamento.

5 CONCLUSÃO

A caracterização do caule de lúpulo, incluindo as frações obtidas após o pré-tratamento, revelou-se fundamental para a compreensão do desempenho do pré-tratamento hidrotérmico e sua influência na modificação da estrutura da biomassa lignocelulósica. Ao explorar as propriedades do caule de lúpulo, foi possível identificar como o pré-tratamento hidrotérmico afetou os componentes da biomassa, evidenciando mudanças, especialmente a baixa liberação de hemiceluloses. Essas alterações estruturais têm implicações significativas nos processos subsequentes de conversão da biomassa em produtos de interesse, como o biocombustível em questão.

Adicionalmente, a análise detalhada da caracterização do caule de lúpulo possibilitou estabelecer correlações entre a composição do material e seu desempenho durante o pré-tratamento. Esse entendimento é fundamental para aprimorar as condições de processamento, com o intuito de maximizar a eficácia na obtenção de produtos derivados dessa biomassa, e também para explorar possibilidades adicionais de utilização, manejo e aproveitamento dos resíduos de poda para os produtores dessa cultura.

A eficiência do pré-tratamento na DA foi demonstrada frente ao uso da biomassa in-natura, além do efeito positivo da co-DA na produção de biometano. No caso da fração líquida (HH), nos processos de mono-DA, a condição de pré-tratamento a 175°C apresentou resultados menos significativos quando comparado à biomassa in-natura, com um aumento de produção de 27,05%. Por outro lado, os HH obtidos à 190 e 205°C demonstraram uma produção acumulada de biometano 53,36 e 57,27% superior, respectivamente, a da biomassa in-natura. Já a lama pré-tratada, em processo de mono-DA, demonstrou uma produção superior de biometano quando comparada a biomassa in-natura e ao HH, nas mesmas condições operacionais. A lama, na condição mais severa de pré-tratamento (175°C, 10 min), obteve produção de biometano 293,53% maior do que a biomassa in-natura.

O processo co-DA se demonstrou eficaz, observando que, ao empregar a biomassa in-natura com os dejetos bovinos, obteve-se uma produção acumulada de $488,63 \pm 20,08$ NmL CH₄/g SVT, representando um aumento de 392,32% em relação à produção obtida na mono-DA do substrato in-natura. No entanto, ao comparar esse

resultado com a mono-DA dos dejetos bovinos, que registrou uma produção de $793,27 \pm 13,68$ NmL CH₄/g SVT, foi observado que o processo com dejetos proporcionou um acréscimo de 61,59% no biometano produzido. Já na co-DA utilizando a lama na condição mais severa de processo (205°C), foi observado uma produção de $1078,22 \pm 13,20$ NmL CH₄/g SVT, promovendo um aumento de 73,57% na produção de biometano em comparação com a mono-DA do dejetos bovino e um aumento de 75,87% em relação à mono-DA da lama.

Assim, a combinação entre o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa de lúpulo e o dejetos bovino, por meio do processo de co-DA, demonstrou ser uma abordagem promissora para aumentar a produção de metano. Essa observação destaca a importância de comparar a produção de biometano entre os sistemas de DA e co-DA, considerando as diferentes temperaturas de pré-tratamento, o que pode ser significativo ao implementar a co-DA e o pré-tratamento hidrotérmico em um contexto real no setor agropecuário.

A caracterização e composição do digestato evidenciou seu potencial como biofertilizante, apresentando nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas e propriedades benéficas para a saúde do solo, em especial concentrações significativas de NPK, corroborando com a sustentabilidade na gestão de resíduos agrícolas e pecuários e maior valor agregado.

A análise metagenômica no estudo permitiu uma compreensão mais aprofundada da microbiota presente no efluente. A comunidade microbiana incluindo arqueas e demais bactérias variou conforme foram expostas às diferentes condições de pré-tratamento, entretanto, foi observada a presença de microrganismos e bactérias essenciais para o desenvolvimento das diferentes etapas dos processos anaeróbios.

Assim, a valorização do resíduo lignocelulósico do caule de lúpulo destaca-se como uma alternativa promissora, contribuindo para a busca contínua por soluções inovadoras e sustentáveis no campo da gestão de resíduos e na produção de energia renovável. Além disso, a utilização do dejetos bovino na DA proporciona uma destinação eficiente desta biomassa de alto potencial poluidor e pouco explorada.

A pesquisa proporcionou uma contribuição significativa para o avanço do conhecimento na área de produção de biogás utilizando resíduos da cultura do lúpulo,

explorando a integração da cadeia lavoura-pecuária através de estudos de DA e co-DA de resíduos da cultura de lúpulo com dejetos bovinos. Destaca-se a significativa contribuição para o campo de DA, ao explorar a efetividade do resíduo lignocelulósico proveniente do caule de lúpulo. A ausência de estudos prévios sobre o uso do caule de lúpulo em processos de DA realça a singularidade e a relevância desta pesquisa, ampliando o entendimento sobre a diversidade de substratos para DA, e oferece uma perspectiva promissora para a valorização de resíduos lignocelulósicos até então pouco explorados.

A constatação do efeito positivo do pré-tratamento hidrotérmico na biodegradabilidade do caule de lúpulo não apenas amplia o escopo de aplicação desse material, mas também sinaliza caminhos para a otimização de processos de DA, tornando-os mais eficientes e sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Y. et al. Co-digestion of cow manure and food waste for biogas enhancement and nutrients revival in bio-circular economy. **Chemosphere**, v. 311, p. 137018, 1 jan. 2023.
- ABDULLAHI, Y. A. et al. Investigating the effects of anaerobic and aerobic post-treatment on quality and stability of organic fraction of municipal solid waste as soil amendment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8631–8636, 1 dez. 2008.
- ABID, M. et al. Novel insights of impacts of solid content on high solid anaerobic digestion of cow manure: Kinetics and microbial community dynamics . **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125205, 1 ago. 2021.
- ABOUDI, K.; ÁLVAREZ-GALLEGO, C. J.; ROMERO-GARCÍA, L. I. Evaluation of methane generation and process stability from anaerobic co-digestion of sugar beet by-product and cow manure. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 566–572, 1 maio 2016.
- ABRAM, ONIKA et al. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones - ScienceDirect. fev. 2015.
- ADGHIM, M. et al. Assessment of the biochemical methane potential of mono- and co-digested dairy farm wastes. **Waste Management & Research**, v. 38, n. 1, p. 88–99, 1 jan. 2020.
- ADUBA, C. C. et al. Integrated Valorization of Cassava Wastes for Production of Bioelectricity, Biogas and Biofertilizer. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 12, p. 4003–4019, 1 dez. 2023.
- AGEHARA, S. Using Supplemental Lighting to Control Flowering of Hops in Florida. IFAS Extension HS1365. v. 2, 2020.
- AGRAWAL, A.; CHAUDHARI, P. K.; GHOSH, P. Anaerobic digestion of fruit and vegetable waste: a critical review of associated challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 24987–25012, 1 fev. 2023.
- AHMED, B. et al. Improvement of Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass by Hydrothermal Pretreatment. **Applied Sciences**, v. 9, n. 18, p. 3853, 13 set. 2019.
- AKHIAR, D. PERANCANGAN APLIKASI SUPPLY CHAIN MANAGEMENT PADA DISTRIBUSI AYAM POTONG PT. NUJ / MTS DENGAN MENGGUNAKAN METODE DISTRIBUTOR REQUIRMENT PLANNING (DRP). **Jurnal Sains dan Teknologi: Jurnal Keilmuan dan Aplikasi Teknologi Industri**, v. 16, n. 2, p. 118–132, 15 dez. 2016.
- ALONSO-ESTEBAN, J. I. et al. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 154–159, 1 ago. 2019.

- AL-SULAIMI, I. N. et al. Effect of Volatile Fatty Acids Accumulation on Biogas Production by Sludge-Feeding Thermophilic Anaerobic Digester and Predicting Process Parameters. **Fermentation**, v. 8, n. 4, p. 184, abr. 2022.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, D.C.APHA-AWWA-WEF, , 2005a.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l.] American Public Health Association, 2005b.
- APROLÚPULO. **Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo - Estatísticas**. Disponível em: <<https://aprolupulo.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 6 mar. 2023.
- APUL, O. G.; SANIN, F. D. Ultrasonic pretreatment and subsequent anaerobic digestion under different operational conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8984–8992, 1 dez. 2010.
- AQUINO, A. M. DE et al. **Produção de lúpulo na Região Serrana Fluminense: manual de boas práticas**. [s.l.] Nova Friburgo: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo - ACIANF, 2022., 2022.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- AROMOLARAN, A.; SARTAJ, M.; ALQARALLEH, R. M. Z. Biogas production from sewage scum through anaerobic co-digestion: the effect of organic fraction of municipal solid waste and landfill leachate blend addition. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 17, p. 16049–16065, 1 nov. 2023.
- ATELGE, M. R. et al. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 2020.
- AVACI, A. B. et al. Avaliação econômico-financeira da microgeração de energia elétrica proveniente de biogás da suinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 456–462, abr. 2013.
- AWAIS, M. et al. Methane Production and Kinetic Modeling for Co-digestion of Manure with Lignocellulosic Residues. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 12, p. 10516–10523, 15 dez. 2016.
- BAH, H. et al. Evaluation of batch anaerobic co-digestion of palm pressed fiber and cattle manure under mesophilic conditions. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 1984–1991, 1 nov. 2014.
- BALASUNDARAM, G. et al. Recalcitrant compounds formation, their toxicity, and mitigation: Key issues in biomass pretreatment and anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 291, p. 132930, 1 mar. 2022.
- BARTMANSKA, A. et al. Biotransformations of prenylated hop flavonoids for drug discovery and production. **Current drug metabolism**, v. 14, n. 10, p. 1083–1097, 24 dez. 2013.

BATISTA, G. et al. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 321–327, 1 mar. 2019.

BAUERLE, W. L. Disentangling photoperiod from hop vernalization and dormancy for global production and speed breeding. **Scientific Reports**, p. 16003, 5 nov. 2019.

BEDINI, S. et al. Not just for beer: Evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 3, p. 583–592, 20 set. 2015.

BEDOÍĆ, R. et al. Green biomass to biogas – A study on anaerobic digestion of residue grass. **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 700–709, 10 mar. 2019.

BIOGASMAP. **CI Biogas Energias Renováveis**. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiODc2NTlhOGItOTc2Ny00ZDc1LWI5MTMtYjYwZTRIYjFiOWQ3liwidCI6ImMzOTg3Zml3LTQ5ODMtNDA2Ny1iMTQ2LTc3MGU5MWE4NGViNSJ9&pageName=ReportSection6ed365e9760a3c113b0d>>. Acesso em: 21 dez. 2022.

BOCQUET, L. et al. Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1024, 14 mar. 2019.

BOHUTSKYI, P. et al. Co-digestion of Wastewater-Grown Filamentous Algae With Sewage Sludge Improves Biomethane Production and Energy Balance Compared to Thermal, Chemical, or Thermochemical Pretreatments. **Frontiers in Energy Research**, v. 7, 2019.

BRENELLI, L. B. et al. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: From lab to pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 313, n. March, p. 123637, 2020a.

BRENELLI, L. B. et al. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: From lab to pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 313, n. 123637, 1 out. 2020b.

BUENDÍA, I. M. et al. Feasibility of anaerobic co-digestion as a treatment option of meat industry wastes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1903–1909, 1 mar. 2009.

BUFFIERE, P. et al. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. **Water Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 233–241, 1 abr. 2006.

BÜHRING, G. M. B.; SILVEIRA, V. S. P. Biogas originated from residual biomass in ecosystem services. **SciELO - Brasil**, p. 13, 2018.

BITRÓN, G. et al. Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111555, 1 nov. 2019.

BUSTAMANTE, M. A. et al. Recycling of anaerobic digestates by composting: effect of the bulking agent used. **Journal of Cleaner Production**, Cleaner Production: initiatives and challenges for a sustainable world. v. 47, p. 61–69, 1 maio 2013.

BUȚU, A.; RODINO, S.; BUȚU, M. THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HUMULUS LUPULUS L. DEPENDING ON STORAGE CONDITIONS. v. 62, 2016.

CAMPANARO, S. et al. Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 26, 2 fev. 2016.

CAPITANI, D. H. D.; FARINA, J. V. Viabilidade energética e econômica da produção de biogás a partir de dejetos bovinos em um sistema de integração lavoura-pecuária | REUNIR Revista de Administração Contabilidade e Sustentabilidade. 21 out. 2022.

CAPSON-TOJO, G. et al. Addition of granular activated carbon and trace elements to favor volatile fatty acid consumption during anaerobic digestion of food waste. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 157–168, 1 jul. 2018.

CÁRDENAS-CLEVES, L. M. et al. Perspectives of Biochemical Methane Potential - BMP test for control the anaerobic digestion process of wastes. **Revista ION**, v. 29, n. 1, p. 95–108, jun. 2016.

CHEN, J. L. et al. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523–1534, 2014.

CHENG, D. L. et al. Problematic effects of antibiotics on anaerobic treatment of swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 642–653, 1 set. 2018.

CHO, S.-K. et al. Dry anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and methanogenic community analysis. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 210–217, 1 mar. 2013.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K. Organosolv pretreatment for enzymic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 2, p. 156–162, fev. 1990.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. (EDS.). **Biomassa para energia**. Campinas: Unicamp, 2008.

COSTA, K. C.; LEIGH, J. A. Metabolic versatility in methanogens. **Current Opinion in Biotechnology**, Cell and Pathway Engineering. v. 29, p. 70–75, 1 out. 2014.

CRUZ, I. A. et al. Valorization of cassava residues for biogas production in Brazil based on the circular economy: An updated and comprehensive review. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 4, p. 100196, 1 out. 2021.

CZEKAŁA, W. Solid Fraction of Digestate from Biogas Plant as a Material for Pellets Production. **Energies**, v. 14, n. 16, p. 5034, jan. 2021.

CZEKAŁA, W. et al. Biogas Plant Operation: Digestate as the Valuable Product. **Energies**, v. 15, n. 21, p. 8275, jan. 2022.

DAS, N. et al. A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 2, p. 1503–1527, 1 jan. 2023.

DAWANA KECHE, D. et al. Anaerobic digestion of urea pretreated water hyacinth removed from Lake Abaya; bio-methane potential, system stability, and substance conversion. **RSC Advances**, v. 12, n. 14, p. 8548–8558, 2022.

DRIDI, B. et al. Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt_8, p. 1902–1907, 2012.

ELALAMI, D. et al. Mild microwaves, ultrasonic and alkaline pretreatments for improving methane production: Impact on biochemical and structural properties of olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122591, 1 mar. 2020.

EPE. Relatório Síntese 2022 - Ano Base 2021. 2022.

FAGHERAZZI, M. M. et al. A cultura do lúpulo: botânica e variedades. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 1, n. 1, 2017.

FEIJOO, G. et al. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 2, p. 180–188, 1 fev. 1995.

FERREIRA, L. R. A. et al. Review of the energy potential of the residual biomass for the distributed generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 440–455, out. 2018.

FERRY, J. G. How to Make a Living by Exhaling Methane. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 453–473, 2010a.

FERRY, J. G. The chemical biology of methanogenesis. **Planetary and Space Science**, v. 58, n. 14, p. 1775–1783, 1 dez. 2010b.

FERRY, J. G. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, Energy biotechnology – Environmental biotechnology. v. 22, n. 3, p. 351–357, 1 jun. 2011.

FRANCO, W. M.; BEZERRA, M. F. C. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. dez. 2018.

FRANKE-WHITTLE, I. H. et al. Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. **Waste Management**, v. 34, n. 3, p. 632–641, 1 mar. 2014a.

FRANKE-WHITTLE, I. H. et al. Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2080–2089, 1 nov. 2014b.

FRIGO, E. P. et al. BIOMASSA RESIDUAL RURAL PROVENIENTE DE DIFERENTES ATIVIDADES AGROPECUÁRIAS BRASILEIRAS. v. 30, p. 7, 2015.

GABALLAH, E. S. et al. Enhancement of biogas production from rape straw using different co-pretreatment techniques and anaerobic co-digestion with cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123311, 1 ago. 2020.

GALVÃO, R. R. DE A. **Boletim de conjuntura do setor energético**. [s.l.] FGV ENERGIA, mar. 2017. Disponível em: <https://fgvenergia.fgv.br/sites/fgvenergia.fgv.br/files/boletim_conjuntura-marco-2017_v3_rev1_0.pdf>.

GARCIA, J.-L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v. 6, n. 4, p. 205–226, 1 ago. 2000.

GERARDI, M. H. **The Microbiology of Anaerobic Digesters**. first ed. ed. Linden, Pennsylvania: John Wiley & Sons, 2003.

GETABALEW, M.; ALEMNEH, T.; BZUNEH, E. Review on Methanogenesis and its Role. v. 6, p. 7, 2020.

GOEL, R.; TOKUTOMI, T.; YASUI, H. Anaerobic digestion of excess activated sludge with ozone pretreatment. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 207–214, 1 jun. 2003.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, p. 582–587, 2009.

GONG, L. et al. Impact of hydrothermal pre-treatment on the anaerobic digestion of different solid–liquid ratio sludges and kinetic analysis. **RSC Advances**, v. 9, n. 33, p. 19104–19113, 14 jun. 2019.

GUERINO FILHO, M. et al. Biomass availability assessment for biogas or methane production in Rio Grande do Sul, Brazil | SpringerLink. p. 1353–1366, jun. 2019.

HAGOS, K. et al. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1485–1496, 1 set. 2017.

HASHEMI, B. et al. Yield improvements in anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks - ScienceDirect. v. 288, mar. 2021.

HASHEMI, S. S.; KARIMI, K.; MIRMOHAMADSADEGHI, S. Hydrothermal pretreatment of safflower straw to enhance biogas production. **Energy**, v. 172, p. 545–554, 1 abr. 2019.

HEDDERICH, R.; WHITMAN, W. B. Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. Em: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry**. New York, NY: Springer, 2006. p. 1050–1079.

HIMANSHU, H. et al. Synergies from co-digesting grass or clover silages with cattle slurry in in vitro batch anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 127, p. 474–480, 1 nov. 2018.

HOLM-NIELSEN, J. B.; AL SEADI, T.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. **Bioresource Technology**, OECD Workshop: Livestock Waste Treatment Systems of the Future: A Challenge to Environmental Quality, Food Safety, and Sustainability. v. 100, n. 22, p. 5478–5484, 1 nov. 2009.

HOWELL, G.; BENNETT, C.; MATERIĆ, D. A comparison of methods for early prediction of anaerobic biogas potential on biologically treated municipal solid waste. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 887–894, 15 fev. 2019.

HU, Y.; WANG, F.; CHI, Y. The Evolution of Microbial Community during Acclimation for High Sodium Food Waste Anaerobic digestion. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 11, p. 6057–6063, 1 nov. 2020.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. [s.l.] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021a. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>>. Acesso em: 12 jan. 2023.

IBGE. **Produção Agropecuária em Minas Gerais**. Estatístico e Informativo. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mg>>. Acesso em: 10 jul. 2023b.

ILLUMINA. **16S metagenomic sequencing library preparation: preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system**. San Diego, CA - EUA: Illumina Technical Document, 2013. Disponível em: <https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2023.

IPEA. **Agenda 2030| ODS - Metas Nacionais dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. [s.l.] Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8855/1/Agenda_2030_ods_metas_na_c_dos_obj_de_desenv_susten_propos_de_adequa.pdf>.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 16 jun. 2015.

IWASAKI, M. et al. Quantity changes in *Pseudomonas* species in dairy manure during anaerobic digestion at mesophilic and thermophilic temperatures. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 21, n. 3, p. 423–432, 1 maio 2019.

JASTROMBEK, J. M. et al. Hop: An Emerging Crop in Subtropical Areas in Brazil. **Horticulturae** 2022, Vol. 8, Page 393, v. 8, n. 5, p. 393, 30 abr. 2022.

JIMÉNEZ, J. et al. Microbial community dynamics reflect reactor stability during the anaerobic digestion of a very high strength and sulfate-rich vinasse. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 975–984, 2018.

JOSEPH, G. et al. Two-stage thermophilic anaerobic co-digestion of corn stover and cattle manure to enhance biomethane production. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 54, n. 5, p. 452–460, 16 abr. 2019.

KANAI, N. et al. Upcycling of Waste Hop Stems into Cellulose Nanofibers: Isolation and Structural Characterization. **ACS Agricultural Science & Technology**, p. acsagscitech.1c00041, 11 jun. 2021a.

KANAI, N. et al. Upcycling of Waste Hop Stems into Cellulose Nanofibers: Isolation and Structural Characterization. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 1, n. 4, p. 347–354, 16 ago. 2021b.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 348–356, 1 mar. 2016.

KASINATH, A. et al. Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111509, 1 out. 2021.

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

KHAN, S. et al. Challenges and perspectives on innovative technologies for biofuel production and sustainable environmental management. **Fuel**, v. 325, p. 124845, 1 out. 2022.

KIM, M. J.; KIM, S. H. Minimization of diauxic growth lag-phase for high-efficiency biogas production. **Journal of Environmental Management**, v. 187, p. 456–463, 1 fev. 2017.

KIM, S.; LEE, C.; YOUNG KIM, J. Effects of alkaline thermal hydrolysis on the formation of refractory compounds and energy balance of anaerobic digestion of cattle manure. **Applied Energy**, v. 342, p. 121097, 15 jul. 2023.

KLEEREBEZEM, R. Biochemical Conversion. Em: **Biomass as a Sustainable Energy Source for the Future**. Department of Biotechnology, Environmental Biotechnology Group, Faculty of Applied Sciences, Delft University of Technology, Delft, the Netherlands: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 441–468.

KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential. **Economic Botany**, v. 75, n. 3, p. 302–322, 1 dez. 2021.

KOSTER, I. W. et al. Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. **Water Research**, v. 20, n. 12, p. 1561–1567, 1 dez. 1986.

KOTHARI, R. et al. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 174–195, 1 nov. 2014.

KOVAČIĆ, Đ. et al. xu. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 471–483, 1 fev. 2018.

KURADE, M. B. et al. Acetoclastic methanogenesis led by Methanosarcina in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 351–359, 1 jan. 2019.

LANSING, S. et al. Wastewater transformations and fertilizer value when co-digesting differing ratios of swine manure and used cooking grease in low-cost digesters. **Biomass and Bioenergy**, Current and Potential Capabilities of Wood Production Systems in the Southeastern U.S. v. 34, n. 12, p. 1711–1720, 1 dez. 2010.

LEE, J.; PARK, K. Y. Impact of hydrothermal pretreatment on anaerobic digestion efficiency for lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperature on the formation of biomass-degrading byproducts. **Chemosphere**, v. 256, p. 127116, 1 out. 2020.

LEE, J.; YOUNG PARK, K. Impact of hydrothermal pretreatment on anaerobic digestion efficiency for lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperature on the formation of biomass-degrading byproducts. **Chemosphere**, v. 256, p. 127116, 1 out. 2020.

LEE, S.-H. et al. Distribution and abundance of Spirochaetes in full-scale anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop. v. 145, p. 25–32, 1 out. 2013.

LEE, S.-H. et al. Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 543–549, 1 ago. 2015.

LI, A. et al. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 3, 15 jan. 2013.

LI, H. et al. Mass balances and distributions of C, N, and P in the anaerobic digestion of different substrates and relationships between products and substrates. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 329–336, 1 mar. 2016.

LIM, S. J. et al. Nitrate removal in a packed bed reactor using volatile fatty acids from anaerobic acidogenesis of food wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 538–543, 1 dez. 2006.

LIN, R. et al. Improved efficiency of anaerobic digestion through direct interspecies electron transfer at mesophilic and thermophilic temperature ranges. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 681–691, 15 out. 2018.

LIN, Y.-C. et al. Production of hydrogen from rice straw using microwave-induced pyrolysis. **Fuel**, v. 119, p. 21–26, 1 mar. 2014.

LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, 1 fev. 2018.

LIU, Y. et al. Applying an electric field in a built-in zero valent iron – Anaerobic reactor for enhancement of sludge granulation. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1258–1266, 1 jan. 2011.

LIU, Y. et al. Optimization of anaerobic acidogenesis by adding Fe₀ powder to enhance anaerobic wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 192, p. 179–185, 1 jun. 2012.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171–189, 2008.

LIZASOAIN, J. et al. Biogas production from reed biomass: Effect of pretreatment using different steam explosion conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 95, p. 84–91, 1 dez. 2016.

LOPES, K.; MARTINS, E. M.; MIRANDA, R. L. A potencialidade energética da biomassa no Brasil. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, v. 5, n. 1, p. 94, 29 maio 2019.

LUKITAWESA, NULL et al. Factors influencing volatile fatty acids production from food wastes via anaerobic digestion. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 39–52, 1 jan. 2020.

LUO, G.; WANG, W.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic Digestion for Simultaneous Sewage Sludge Treatment and CO₂ Biomethanation: Process Performance and Microbial Ecology. **Environmental Science & Technology**, p. 130904143045005, 4 set. 2013.

MA, G.; CHEN, Y.; NDEGWA, P. Association between methane yield and microbiota abundance in the anaerobic digestion process: A meta-regression. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, p. 110212, 1 jan. 2021.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock - 14ª Edição**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

MANYI-LOH, C. E.; LUES, R. Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass: Substrate Characteristics (Challenge) and Innovation. **Fermentation**, v. 9, n. 8, p. 755, ago. 2023.

MANZOLI, J. M. et al. POTENCIAL DE REDUÇÃO DE MICRORGANISMOS TERMOTOLERANTES DE EFLUENTES DA PECUÁRIA BOVINA LEITEIRA POR MEIO DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA COM E SEM INOCULAÇÃO. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica**, p. 1409–1420, 6 dez. 2022.

MAPA. **Lúpulo no Brasil: Perspectivas e Realidade**. 1. ed. Brasil: Eduardo Martins Soares, 2022.

MARKOU, G. et al. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 2, p. 419–426, 1 fev. 2022.

MARTINEZ, L. F. et al. Geo Biogas & Tech: leading sustainable energy transition in Brazil through biogas business. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 26, n. 2, p. 341–354, 11 abr. 2023.

MEEGODA, J. N. 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, out. 2018.

MENDIETA, O. et al. Synergistic effect of sugarcane scum as an accelerant co-substrate on anaerobic co-digestion with agricultural crop residues from non-centrifugal cane sugar agribusiness sector. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122957, 1 maio 2020.

MIELE, M. et al. Tratamento dos efluentes de usinas de biogás. **Revista de Política Agrícola**, v. 24, n. 1, p. 31–46, 20 maio 2015.

MIR, M. A.; HUSSAIN, A.; VERMA, C. Design considerations and operational performance of anaerobic digester: A review. **Cogent Engineering**, v. 3, n. 1, p. 1181696, 31 dez. 2016.

MIRMOHAMADSADEGHI, S. et al. Biogas production from food wastes: A review on recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100202, 1 set. 2019.

MME. **RenovaBio - Ministério de Minas e Energia**. Disponível em: <<https://antigo.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-biocombustiveis/acoes-e-programas/programas/renovabio>>. Acesso em: 29 nov. 2023.

MOCKAITIS, G. et al. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 1 jan. 2020.

MÖLLER, K.; MÜLLER, T. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 3, p. 242–257, 2012.

MONGELLI, A. et al. Are *Humulus lupulus* L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A phytochemical approach. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 693–700, 1 maio 2016.

MONLAU, F. et al. **Do by-products of thermochemical treatment of lignocellulosic materials inhibit anaerobic mixed cultures? Overview of recent findings**. . Em: 13. WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION: RECOVERING (BIO) RESOURCES FOR THE WORLD. AD13. Juan M. Lema, Fernando Fdez-Polanco, Marta Carballa, Jorge Rodriguez, Sonia Suarez 2013, 25 jun. 2013. Disponível em: <<https://hal.inrae.fr/hal-02750144>>. Acesso em: 21 fev. 2024

MONROY, C. R.; ACITORES, G. M.; CIFUENTES, G. N. **Electricity generation in Chile using non-conventional renewable energy sources – A focus on biomass**

- **ScienceDirect**. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117312054?casa_token=yu49kDUO3ZYAAAAA:zKmR39EOFqRyqQGJ9FeLBc99KjSdmQduTMEEzFT1y8GmOx9IPeaYDcxqgsNfSiZiYXSgXZphOg>. Acesso em: 13 dez. 2022.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

MORAES, S. L. DE et al. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **REVISTA IPT TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**, v. 1, n. 4, 2017.

MOSADEGH RANJBAR, F.; KARRABI, M.; SHAHNAVAZ, B. Bioconversion of wheat straw to energy via anaerobic co-digestion with cattle manure in batch-mode bioreactors (Experimental investigation and kinetic modeling). **Fuel**, v. 320, p. 123946, 15 jul. 2022.

MOSTAFA IMENI, S. et al. Techno-economic assessment of anaerobic co-digestion of livestock manure and cheese whey (Cow, Goat & Sheep) at small to medium dairy farms. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121872, 1 nov. 2019.

MOURATIDIS, P. X. E. et al. An investigation into the anticancer effects and mechanism of action of hop β -acid lupulone and its natural and synthetic derivatives in prostate cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 7, p. 1086–1092, 2013.

MURATÇOBANOĞLU, H. et al. Simultaneous synergistic effects of graphite addition and co-digestion of food waste and cow manure: Biogas production and microbial community. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123365, 1 ago. 2020.

NAKASHIMA, G. T. et al. Lignocellulosic Materials: Characterization and Production of Briquettes. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 150–162, 2017.

NAKASU, P. Y. S. et al. Acid post-hydrolysis of xylooligosaccharides from hydrothermal pretreatment for pentose ethanol production. **Fuel**, v. 185, p. 73–84, 2016.

NANDA, S. et al. Characterization of North American Lignocellulosic Biomass and Biochars in Terms of their Candidacy for Alternate Renewable Fuels. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 663–677, 1 jun. 2013.

NELSON, M. C.; MORRISON, M.; YU, Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3730–3739, 1 fev. 2011.

NESHAT, S. A. et al. Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 308–322, 1 nov. 2017.

NEW ENGLAND BIOLABS. **NEBNext Library Quant Kit Quick Protocol (E7630)**. , 2015. Disponível em: <<https://www.neb.com/en/protocols/2015/05/14/nebnext-library-quant-kit-quick-protocol-e7630>>. Acesso em: 22 nov. 2023

NGUYEN, D. D. et al. Thermophilic anaerobic digestion of model organic wastes: Evaluation of biomethane production and multiple kinetic models analysis. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 269–276, 1 maio 2019.

NOGUEIRA, L. A. H.; CAPAZ, R. S.; LORA, E. S. Bioenergia no Brasil: onde estamos e quais nossos horizontes. **Revista Brasileira de Energia**, v. 27, n. 3, 17 ago. 2021.

NUVOLARI, A. **Esgoto Sanitário: Coleta, Transporte, Tratamento e Reúso Agrícola**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

O'FLAHERTY, V.; COLLINS, G.; MAHONY, T. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 39–55, 2006.

OKOLIE, J. A. et al. Supercritical water gasification of biomass: a state-of-the-art review of process parameters, reaction mechanisms and catalysis. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 3, n. 3, p. 578–598, 27 fev. 2019.

OLATUNJI, K. O.; AHMED, N. A.; OGUNKUNLE, O. Optimization of biogas yield from lignocellulosic materials with different pretreatment methods: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 159, 19 jul. 2021.

OLESZKIEWICZ, J. A.; SHARMA, V. K. Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals—A review. **Biological Wastes**, v. 31, n. 1, p. 45–67, 1 jan. 1990.

OLIVA, A. et al. Effect of methanol-organosolv pretreatment on anaerobic digestion of lignocellulosic materials. **Renewable Energy**, v. 169, p. 1000–1012, 1 maio 2021.

OVEREND, R. P. et al. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 523–536, jan. 1997.

PARVEZ, A. M. et al. Microwave-assisted biomass pyrolysis polygeneration process using a scaled-up reactor: Product characterization, thermodynamic assessment and bio-hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 139, p. 105651, 1 ago. 2020.

PASALARI, H. et al. Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: A systematic review. **Chemosphere**, v. 270, p. 128618, 1 maio 2021.

PASSOS, F.; FERRER, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. **Water Research**, v. 68, p. 364–373, 1 jan. 2015.

PHUTTARO, C. et al. Anaerobic digestion of hydrothermally-pretreated lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperatures, inhibitors and soluble organics on methane yield. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 128–138, 1 jul. 2019.

PONNUSAMY, V. K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462–472, 1 jan. 2019.

POPP, A. et al. Land-use futures in the shared socio-economic pathways. **Global Environmental Change**, v. 42, p. 331–345, 1 jan. 2017.

PORTUGAL, L. **Análise de preservação de água no solo na cultura irrigada de lúpulo com o uso de cobertura morta**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (Unesp), 28 jan. 2021.

QIAO, J.-T. et al. Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 512–518, 1 set. 2013.

RABELO, S. C.; PRADELLA, J. G. DA C.; IENCZAK, J. L. **Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**. [s.l.] Editora Blucher, 2019. v. 3

RAHMANI, A. M. et al. Hydrothermal and thermal-alkali pretreatments of wheat straw: Co-digestion, substrate solubilization, biogas yield and kinetic study. **Environmental Research**, v. 216, p. 114436, 1 jan. 2023.

RAJAGOPAL, G.; KANNAN, S. Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 30–36, 1 mar. 2017.

RAJENDRAN, K. et al. Experimental and economical evaluation of a novel biogas digester. **Energy Conversion and Management**, v. 74, p. 183–191, 1 out. 2013.

RAJENDRAN, K. et al. Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 471–483, 1 jun. 2018.

RAJENDRAN, K. et al. Advancing anaerobic digestion through two-stage processes: Current developments and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, p. 109746, 1 maio 2020.

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

RASHAMA, C.; IJOMA, G. N.; MATAMBO, T. S. Elucidating Biodegradation Kinetics and Biomethane Potential Trends in Substrates Containing High Levels of Phytochemicals: The Case of Avocado Oil Processing By-products. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 4, p. 2071–2081, 1 abr. 2022.

REMMAS, N. et al. A Critical Review on the Microbial Ecology of Landfill Leachate Treatment Systems. **Sustainability**, v. 15, n. 2, p. 949, jan. 2023.

RNC. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Informativo. Disponível em:

<https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 6 mar. 2023.

ROCHA, G. J. DE M. et al. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. **Proceedings**, 1997.

RODAS, D. P. V.; BOTTON, J. P.; FURTADO, A. C. **Fundamentos de Biodigestão Anaeróbia. Conceitos e Processos**. [s.l.] Brazil Publishing, 2020.

RÖDER, M.; WELFLE, A. Bioenergy. Em: **Managing Global Warming**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 379–398.

RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. O lúpulo: da cultura ao extrato. Técnica cultural tradicional. **Livro de atas das Jornadas do Lúpulo e da Cerveja: novas oportunidades de negócio**, p. 1–10, 2015.

ROEHRER, S. et al. Analyzing bioactive effects of the minor hop compound xanthohumol C on human breast cancer cells using quantitative proteomics. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2019.

ROMERO-GÜIZA, M. S. et al. The role of additives on anaerobic digestion: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 1486–1499, 1 maio 2016.

RUIZ, H. A.; THOMSEN, M. H.; TRAJANO, H. L. **Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass**. [s.l.] Springer, 2017.

SAHOO, A.; KUMAR, S.; MOHANTY, K. A comprehensive characterization of non-edible lignocellulosic biomass to elucidate their biofuel production potential. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 11, p. 5087–5103, 1 nov. 2022.

SANTOS, G. H. F.; NASCIMENTO, R. S.; ALVES, G. M. BIOMASSA COMO ENERGIA RENOVÁVEL NO BRASIL. v. 29, 2017.

SANTUCCI, B. et al. Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 2015a.

SANTUCCI, B. S. et al. Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **BioEnergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 1 dez. 2015b.

SAWATDEENARUNAT, C. et al. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**, Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy. v. 215, p. 304–313, 1 set. 2016.

SCHERER, P.; LIPPERT, H.; WOLFF, G. Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria determined by inductively coupled plasma emission spectrometry. **Biological Trace Element Research**, v. 5, n. 3, p. 149–163, 1 jun. 1983.

SEEG. **Emissões por setor**. Informativo. Disponível em: <<http://seeg.eco.br/>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ŞENOL, H. Enhancement in methane yield from anaerobic co-digestion of walnut shells and cattle manure. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 39, n. 6, nov. 2020.

SHAH, F. A. et al. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 627–642, 1 fev. 2015.

SHEN, X. et al. Compositional characteristics and energy potential of Chinese animal manure by type and as a whole. **Applied Energy**, v. 160, p. 108–119, 15 dez. 2015.

SHI, K. et al. Microwave-assisted pyrolysis of bamboo coupled with reforming by activated carbon for the production of hydrogen-rich syngas. **Energy Procedia**, Proceedings of the 9th International Conference on Applied Energy. v. 142, p. 1640–1646, 1 dez. 2017.

SHOKRALLA, S. et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1794–1805, 2012.

SICCHIERI, I. M. et al. Selection, composition, and validation of standard inoculum for anaerobic digestion assays. **Biomass and Bioenergy**, v. 164, p. 106558, 1 set. 2022.

SIEGERT, I.; BANKS, C. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3412–3418, 1 nov. 2005.

SINGH, P.; KALAMDHAD, A. S. Assessment of agricultural residue-based electricity production from biogas in India: Resource-environment-economic analysis. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 54, p. 102843, 1 dez. 2022.

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P.; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 103, p. 490–500, 1 abr. 2017.

SLEPETIENE, A. et al. The potential of digestate as a biofertilizer in eroded soils of Lithuania. **Waste Management**, v. 102, p. 441–451, 1 fev. 2020.

SLUITER, J. B. et al. Evaluation of Brazilian sugarcane bagasse characterization: An interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 579–585, 2016.

SONG, X. et al. Effect of hydrothermal pretreatment severity on the pretreatment characteristics and anaerobic digestion performance of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121646, 1 out. 2019.

SPÓSITO, M. B. et al. **A cultura do lúpulo**Série Produtor Rural. [s.l.: s.n.].

SPÓSITO, M. B. et al. **A Cultura do Lúpulo**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca: Eliana Maria Garcia, 2019b.

SRIDEVI, V. et al. Challenges and opportunities in the production of sustainable hydrogen from lignocellulosic biomass using microwave-assisted pyrolysis: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 1 jul. 2023.

SUGIYAMA, R.; ODA, H.; KUROSAKI, F. Two distinct phases of glandular trichome development in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 493–496, 2006.

SUN, B. et al. Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 148, p. 107911, 1 set. 2020.

SUREK, E.; BUYUKKILECI, A. O. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 565–571, 15 out. 2017.

TAMBONE, F. et al. Solid and liquid fractionation of digestate: Mass balance, chemical characterization, and agronomic and environmental value. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1251–1256, 1 nov. 2017.

THOMPSON, T. M.; YOUNG, B. R.; BAROUTIAN, S. Efficiency of hydrothermal pretreatment on the anaerobic digestion of pelagic *Sargassum* for biogas and fertiliser recovery. **Fuel**, v. 279, p. 118527, 1 nov. 2020.

TOERIEN, D. F.; HATTINGH, W. H. J. Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion. **Water Research**, v. 3, n. 6, p. 385–416, 1 jun. 1969.

TOSCAN, A. et al. New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization. **Bioresource Technology**, v. 285, p. 121346, 1 ago. 2019.

TSAPEKOS, P. et al. Anaerobic co-digestion of macroalgal biomass with cattle manure under high salinity conditions. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105406, 1 ago. 2021.

TYAGI, V. K. et al. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 93, p. 380–399, 1 out. 2018.

TYAGI, V. K. et al. Microbial community dynamics in anaerobic digesters treating organic fraction of municipal solid waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101303, 1 fev. 2021.

ULUKARDESLER, A. H. Anaerobic co-digestion of grass and cow manure: kinetic and GHG calculations. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6320, 18 abr. 2023.

VAN CLEEMPUT, M. et al. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. **Journal of natural products**, v. 72, n. 6, p. 1220–1230, 26 jun. 2009.

VASSILEV, S. V. et al. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. **Fuel**, v. 94, p. 1–33, 1 abr. 2012.

VDI 4630. **Fermentation of organic materials - Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests**. [s.l.: s.n.].

VINTILOIU, A. et al. Mineral substances and macronutrients in the anaerobic conversion of biomass: An impact evaluation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 3, p. 287–294, 2012.

VOLPI, M. PAULA. C. et al. Use of Lignocellulosic Residue from Second-Generation Ethanol Production to Enhance Methane Production Through Co-digestion. **BioEnergy Research**, v. 15, n. 1, p. 602–616, 1 mar. 2022.

WAGNER, A. O. et al. Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production. **Energies**, v. 11, n. 7, p. 1797, jul. 2018.

WALKER, L.; CHARLES, W.; CORD-RUWISCH, R. Comparison of static, in-vessel composting of MSW with thermophilic anaerobic digestion and combinations of the two processes. **Bioresource Technology**, Selected papers from the International Conference on Technologies and Strategic Management of Sustainable Biosystems. v. 100, n. 16, p. 3799–3807, 1 ago. 2009.

WANG, D. et al. Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomass? **Bioresource Technology**, v. 249, p. 117–124, 1 fev. 2018a.

WANG, H. et al. Effects of disinfectant and biofilm on the corrosion of cast iron pipes in a reclaimed water distribution system. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1070–1078, 15 mar. 2012a.

WANG, X. et al. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7042–7047, out. 2012b.

WANG, X. et al. Study on improving anaerobic co-digestion of cow manure and corn straw by fruit and vegetable waste: Methane production and microbial community in CSTR process. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 290–297, 1 fev. 2018b.

WARD, A. J. et al. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7928–7940, 1 nov. 2008.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria. Em: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes**. New York, NY: Springer, 2006. p. 165–207.

WIJEKOON, K. C.; VISVANATHAN, C.; ABEYNAYAKA, A. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, Special Issue on Challenges in Environmental Science and Engineering, CESE-2010: Technological Advances in Waste Treatment for a Sustainable Future. v. 102, n. 9, p. 5353–5360, 1 maio 2011.

WU, L.-J. et al. Effects of Potassium, Magnesium, Zinc, and Manganese Addition on the Anaerobic Digestion of De-oiled Grease Trap Waste. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 7, p. 2417–2427, 1 jul. 2016.

XIA, Y. et al. Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6708, 21 out. 2014.

XU, L. et al. Performance and microbial community analysis of dry anaerobic co-digestion of rice straw and cow manure with added limonite. **Biomass and Bioenergy**, v. 126, p. 41–46, 1 jul. 2019.

YAN, L. et al. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 49–54, 1 maio 2012.

YANG, L. et al. Enhancing biogas generation performance from food wastes by high-solids thermophilic anaerobic digestion: Effect of pH adjustment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 153–159, 1 nov. 2015.

YIN, Q. et al. Clarifying electron transfer and metagenomic analysis of microbial community in the methane production process with the addition of ferroferric oxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 333, p. 216–225, 1 fev. 2018.

YOUSEFIFAR, A. et al. Fundamental mechanisms and reactions in non-catalytic subcritical hydrothermal processes: A review. **Water Research**, v. 123, p. 607–622, 15 out. 2017.

ZACHAROF, M.-P. et al. Valorization of spent anaerobic digester effluents through production of platform chemicals using *Clostridium butyricum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 294–303, 1 out. 2015.

ZAPAROLLI, D.; VASCONSELOS, Y. Menos metano no pasto: soluções tecnológicas podem ajudar a pecuária a reduzir as emissões de gases de efeito estufa. **Pesquisa Fapesp**, n. 314, p. 29–37, 2022.

ZENG, Y.; DE GUARDIA, A.; DABERT, P. Improving composting as a post-treatment of anaerobic digestate. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 293–303, 1 fev. 2016.

ZERBACK, T. et al. Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw—Evaluating the Effect of Substrate Disintegration on the Digestibility in Anaerobic Digestion. **Processes**, v. 10, n. 6, p. 1048, jun. 2022.

ZHANG, J. et al. Recent achievements in enhancing anaerobic digestion with carbon- based functional materials. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 555–567, 1 out. 2018.

ZHAO, X. et al. Microwave pyrolysis of straw bale and energy balance analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 92, n. 1, p. 43–49, 1 set. 2011.

ZHAO, Y. et al. Co-digestion of oat straw and cow manure during anaerobic digestion: Stimulative and inhibitory effects on fermentation. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 143–152, 1 dez. 2018.

ZHONG, W. et al. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11177–11182, 1 dez. 2011.

ZHOU, M. et al. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, Bioconversion of Food Wastes. v. 248, p. 68–78, 1 jan. 2018.

ZHU, X. et al. Metabolic dependencies govern microbial syntrophies during methanogenesis in an anaerobic digestion ecosystem. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 22, 15 fev. 2020.

ZIGANSHIN, A. M. et al. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5161–5174, 1 jun. 2013.

ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 874, 18 dez. 2019.

APÊNDICE A – Procedimento experimental para caracterização química

i. Determinação do Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado utilizando uma balança de infravermelho. A biomassa foi homogeneizada e em seguida amostras de aproximadamente 1,0 g foram analisadas, em triplicata. O valor da umidade final foi considerado a média dos teores de umidade.

ii. Determinação do Teor de Cinzas Totais

Os cadinhos de porcelana foram calcinados em estufa a 105°C por 24 h, e, em seguida, foram transferidos e mantidos no dessecador até atingir temperatura ambiente, tendo a massa determinada em uma balança analítica (M_C). Para cada ensaio foi adicionado aproximadamente 2,0 g de amostra, em base seca, e a massa foi registrada (M_{Cbs}).

As amostras foram calcinadas na mufla, com as tampas dos cadinhos semi abertas. O aquecimento foi feito de maneira gradual seguindo uma rampa de temperatura: após a mufla atingir 105°C, foi cronometrado 12 min; em seguida a 205°C por 30 min; quando a temperatura alcançou 575°C, foram cronometrados 180 min. Após esse tempo, a mufla foi desligada, afim de atingir 105°C.

Os cadinhos contendo as amostras foram retirados da mufla e transferidos para um dessecador para esfriar até a temperatura ambiente. Em seguida, foi registrada a massa do cadinho com as cinzas (M_{Cc}) afim de determinar a cinzas (%) como mostra a Equação 1.

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \left(\frac{M_{Cc} - M_C}{M_{Cbs} - M_C} \right) \quad (1)$$

Onde:

M_C : Massa do cadinho de porcelana (g)

M_{Cbs} : Massa do cadinho de porcelana + amostra inicial (base seca) (g)

M_{Cc} : Massa do cadinho de porcelana + cinzas totais (g)

iii. Determinação do Teor de Extrativos

A quantificação dos extrativos foi feita apenas para a biomassa in-natura. O processo foi realizado antes de hidrólise com ácido sulfúrico para evitar que componentes presentes nos extrativos interfiram nas análises subsequentes. Foram pesados 3,0 g de biomassa in-natura (M_{BS}) e adicionados em cartuchos de papel filtro qualitativo (14 cm x 10 cm). Em seguida, os cartuchos foram colocados em um extrator do tipo Soxhlet, sem exceder a altura do sifão do extrator, e acoplado a balões de vidro de fundo redondo, apoiado em uma placa de aquecimento, no qual foram adicionados 200 mL da solução de ciclohexano e etanol (proporção de 1:1) e pérolas de vidro dentro do balão. A placa de aquecimento foi ajustada para que ocorra de 4 a 5 ciclos por hora no sifão. Após 72 h, a solução do balão foi substituída por água destilada (200 mL) e a extração foi mantida por mais 72 h, após o primeiro ciclo de extração.

Após a extração total, o material foi retirado do saquinho de papel de filtro e filtrado em um funil de Blucher com papel filtro, utilizando a menor quantidade de água necessária para a transferência da biomassa para o funil. Em seguida, a amostra foi colocada na estufa a 105°C até massa constante (M_{BE}). Por fim, foi feita a quantificação dos extrativos (Equação 4).

$$Extrativos (\%) = \left(\frac{M_{BS} - M_{BE}}{M_{BS}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

M_{BS} : Massa e biomassa seca e moída (g);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (base seca).

iv. Determinação do Teor de Lignina, Celulose e Hemiceluloses

Para a quantificação da celulose, hemiceluloses e lignina total foi realizada a hidrólise ácida dos resíduos do caule do lúpulo in-natura e pré-tratados, em todas as condições. A lama foi seca em uma capela, a temperatura ambiente. O material livre de extrativos, o resíduo sólido lavado e a lama foram moídos a uma granulometria de 0,08 mm. Os cadinhos de fundo poroso foram deixados na estufa à 105°C, por 24 h, e em seguida transferidos e mantidos no dessecador até atingirem a temperatura ambiente, e pesados (M_C).

Foram pesados aproximadamente 0,3 g de amostra (M_{BE}), base seca, e adicionados nos tubos de vidro. Foi adicionado 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m), em seguida a amostra e os tubos foram adicionados em banho termostático, previamente ajustado em 30°C. Utilizando um bastão de teflon, o material foi macerado a cada 5 – 10 min, para a solubilização da amostra, sem removê-la do banho termostático, permanecendo por 1 h. Após esse tempo, foram adicionados aos tubos 84 mL de água destilada, utilizando este volume para retirar todo o resíduo de amostra presente no bastão e nas paredes do tubo. Em seguida, os tubos foram fechados e autoclavados a 121°C por 1 h.

Após retirar os tubos da autoclave, foram resfriados até temperatura ambiente. A amostra foi filtrada à vácuo em cadinho de filtração previamente secos e pesados (M_C). A fração líquida foi utilizada para a quantificação de carboidratos (glicose, xilose, arabinose, celobiose), ácido acético, ácido levulínico, ácido fórmico, furfural e HMF e lignina solúvel. Já a fração sólida retida no cadinho, foi lavada com água destilada até pH neutro, assim como a parede do tubo e o bastão, para retirar toda a amostra remanescente. O cadinho de fundo poroso contendo os sólidos remanescentes previamente identificados permaneceram em estufa a 105°C até massa constante. Este material foi utilizado para a quantificação de lignina insolúvel e cinzas estruturais. Já o volume líquido filtrado, será utilizado posteriormente para determinação de lignina solúvel em meio ácido.

v. Determinação do Teor de Lignina Insolúvel

Os cadinhos de fundo poroso contendo o material do processo de hidrólise ácida, foram retirados da estufa e mantidos no dessecador até atingirem a

temperatura ambiente. Então foram pesados (M_{pfr}), e em seguidas transferidos para a mufla, realizando a mesma rampa de temperatura utilizada para determinação de cinzas totais. Após o tempo, a mufla foi desligada, e quando atingiu 105°C de temperatura, os cadinhos foram levados ao dessecador por 24 h. A massa do cadinho e das cinzas (M_{Cce}) foi registrada para determinação de cinzas na fração sólida ou cinzas insolúveis em meio ácido (Equação 3), e teor de lignina insolúvel em meio ácido (Equação 4).

$$M_{cinzas\ estruturais}(g) = M_{Cce} - M_C \quad (3)$$

Onde:

M_{Cce} : Massa do cadinho + cinzas estruturais (g);

M_C : Massa do cadinho (g).

$$Lignina_{insolúvel}(\%) = \left[\frac{M_{pfr} - (M_{cinzas\ estruturais} + M_{pf})}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{Extrativos}{100} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$

Onde:

M_{pfr} : Massa do resíduo após a filtração + cadinho (g);

$M_{cinzas\ estruturais}$: Massa de cinzas estruturais (g);

M_{pf} : Massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g);

Extrativos: teor de extrativos obtidos (%).

vi. Determinação do Teor de Lignina Solúvel

Após a hidrólise ácida, a fração líquida foi analisada para determinação do teor de lignina solúvel por espectrofotometria. Para ajustar o pH entre 12-12,5, utilizou-se

NaOH 6,5 mol.L⁻¹ em uma diluição necessária da solução, seguindo a Lei de Lambert-Beer. O fator de diluição (fd) foi registrado. Em seguida, uma alíquota foi colocada em um balão volumétrico de 25 mL juntamente com a solução de NaOH (aproximadamente 10 gotas) utilizando uma pipeta.

O balão volumétrico foi avolumado com água destilada. A medida de absorbância em 280 nm foi efetuada em um espectrofotômetro UV-Vis. A água destilada basificada foi usada como branco. A absorbância total da solução é a soma da absorbância da lignina e dos produtos de degradação furânicos (HMF e furfural) que absorvem na mesma região, seguindo as Equação 5 e 6.

$$A_{pd280} = [(C_{FUR} \times \epsilon_{FUR}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF})] \quad (5)$$

Onde:

A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (FURF e HMF), cujas concentrações foram determinadas previamente por HPLC;

C_{fur} : Concentração do furfural determinada por HPLC;

C_{HMF} : Concentração do HMF determinada por HPLC;

ϵ_{FUR} e ϵ_{HMF} : 146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, conforme determinado por Rocha et al., (1997);

$$C_{Lignina\ Solúvel} \left(\frac{g}{L} \right) = \left[\frac{(A_{280} - A_{pd280})}{\epsilon_L} \right] \times fd \quad (6)$$

Onde:

A_{280} : Absorbância total da solução obtida da hidrólise ácida em 280 nm;

A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (FURF e HMF), cujas concentrações foram determinadas previamente por HPLC;

ϵ_L : Absortividade da lignina determinada em meio alcalino em 280 nm, $23,7 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

fd: fator de diluição da amostra.

A Equação 7 é utilizada para determinação da concentração de lignina solúvel da biomassa.

$$Lignina_{solúvel} (\%) = \left[\frac{C_{Lignina\ Solúvel} \times V}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{Extrativos}{100} \right) \right] \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$C_{Lignina\ Solúvel}$: concentração de lignina solúvel (g/L);

V: volume final de filtração (0,087 L) (L);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g);

Extrativos: teor de extrativos obtido (%).

O valor de lignina total é a soma dos teores de lignina solúvel e insolúvel, conforme a Equação 8.

$$L_r = L_r(\%) + L_s \quad (8)$$

vii. Determinação do Teor de Celulose e Hemiceluloses

As concentrações de glicose, celobiose, HMF e ácido fórmico foram convertidas em celulose e as concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural foram convertidas em hemiceluloses empregando os seus respectivos fatores de conversão. O teor de celulose e hemiceluloses foram calculados a partir das Equações 9 e 10, respectivamente.

Celulose (%)

$$= \left[\frac{((0,90 * C_{Gli}) + (0,95 * C_{Celo}) + (1,29 * C_{HMF}) + (3,53 * C_{\acute{A}C.Form}) + (1,4 * C_{\acute{A}C.LEV}) * V}{M_{BE}} \right] x \quad (9)$$

$$\left[1 - \left(\frac{Extrativos}{100} \right) \right] x 100$$

Onde:

C_{Gli} : concentração de glicose (g/L);

C_{Celo} : concentração de celobiose (g/L);

C_{HMF} : concentração de HMF (g/L);

$A_{\acute{A}C.F\acute{o}rm}$: concentração de ácido fórmico (g/L)

$A_{\acute{A}C.LEV}$: concentração de ácido levulínico (g/L)

V : volume final da filtração (0,087 L) (L);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g);

Extrativos: teor de extrativos obtidos (%).

Hemicelulose (%)

$$= \left[\frac{((0,88 * C_{Xil}) + (0,88 * C_{Arab}) + (0,72 * C_{\acute{A}C.Ac\acute{e}t}) + (0,91 * C_{\acute{A}C.Glic}) + (1,37 * C_{FUR}) * V}{M_{BE}} \right] x \quad (10)$$

$$\left[1 - \left(\frac{Extrativos}{100} \right) \right] x 100$$

Onde:

C_{Xil} : concentração de xilose (g/L);

C_{Arab} : concentração de arabinose (g/L);

$C_{\text{Ác. Acéti}}$: concentração de ácido acético (g/L);

$A_{\text{Ác. Glic}}$: concentração de ácido glicurônico (g/L);

C_{FUR} : concentração de furfural (g/L);

V : volume final da filtração (0,087 L) (L);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g);

Extrativos: teor de extrativos obtidos (%).

APÊNDICE B – Massa de entrada de cada fração 2:1 SVT (substrato:inóculo)

Tabela I. Massa de entrada de cada um dos componentes do processo de DA e co-DA.

Controle			
Reator	Inóculo (g)	Biomassa (g)	Dejeto (g)
Inóculo	70,00	-	
Celulose	69,8583	0,1417	
DA			
Dejeto	69,1790		0,8210
In-natura	69,8317	0,1683	
HH 175°C	63,9819	6,0108	
HH 190°C	64,6800	5,3200	
HH 205°C	64,7222	5,2778	
Lama 175°C	68,7285	1,2715	
Lama 190°C	68,5699	1,4301	
Lama 205°C	68,3228	1,6772	
Co-DA			
In-natura + dejeto	69,5198	0,0879	0,3979
HH 175°C + dejeto	66,4597	3,1489	0,3914
HH 190°C + dejeto	66,7656	2,8183	0,3861
HH 205°C + dejeto	66,8336	2,7775	0,3889
Lama 175°C + dejeto	68,9355	0,6872	0,3773
Lama 190°C + dejeto	68,8507	0,7707	0,3785
Lama 205°C + dejeto	68,7195	0,9001	0,3804