

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JESSICA JACINTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS E METANO NO
CONTEXTO DO APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA
SUCROALCOOLEIRA: CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA E PRÉ-TRATAMENTO
FÚNGICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *PLEUROTUS OSTREATUS***

POÇOS DE CALDAS/MG

2025

JESSICA JACINTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS E METANO NO
CONTEXTO DO APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA
SUCROALCOOLEIRA: CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA E PRÉ-TRATAMENTO
FÚNGICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *PLEUROTUS OSTREATUS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas. Linha de pesquisa: Tratamento de Efluentes.

Orientadora: Profa. Dr. Renata Piacentini Rodriguez

Coorientadora: Profa. Dr. Grazielle Santos Silva Andrade

POÇOS DE CALDAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Silva, Jessica Jacinta.

Avaliação do potencial de produção de biogás e metano no contexto do aproveitamento de subprodutos da indústria sucroalcooleira : co-digestão anaeróbia e pré-tratamento fúngico do bagaço de cana-de-açúcar com *Pleurotus ostreatus* / Jessica Jacinta Silva. - Poços de Caldas, MG, 2025.

74 f. : il. -

Orientador(a): Renata Piacentini Rodriguez.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Inovação. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Digestão anaeróbia. 5. *Pleurotus ostreatus*. I. Rodriguez, Renata Piacentini, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

JESSICA JACINTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS E METANO NO
CONTEXTO DO APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA
SUCROALCOOLEIRA: CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA E PRÉ-TRATAMENTO
FÚNGICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *PLEUROTUS OSTREATUS***

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Engenharia Ambiental da pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2025

Profa. Dra. Renata Piacentini Rodriguez
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maria Paula Cardeal Volpi
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Airton Kunz
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Documento assinado eletronicamente por **Renata Piacentini Rodriguez, Professor do Magistério Superior**, em 08/04/2025, às 07:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1492748** e o código CRC **0EC8C8D3**.

Dedico este trabalho à minha professora de física do ensino médio, Jacinta Maria Silva (*in memoriam*), a quem eu nunca tive a oportunidade de agradecer por todos os incentivos que me ajudaram a chegar onde estou. Você é minha principal inspiração como professora, e eu espero conseguir seguir seus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à

Universidade Federal de Alfenas, aos técnicos e professores do Instituto de Ciência e Tecnologia, e principalmente a todos os funcionários terceirizados do Campus, que conseguem manter a universidade linda com muita simpatia e sorriso no rosto, que alegam os meus dias.

A todos os colegas que conheci durante as aulas e no laboratório de pesquisa, que de forma indireta e direta me auxiliaram durante todo o período do mestrado. Em especial a Luíza que me auxiliou com os dados e testes de PBM.

Ao laboratório BIOMA da Unicamp por ter disponibilizado equipamentos para a realização de algumas análises deste trabalho, em especial a Ana Beatriz que me auxiliou com as análises.

Ao laboratório LarsBio da Unifal, no qual desenvolvi as etapas dos processos fúngicos realizados neste trabalho. Em especial, agradeço à minha coorientadora Grazi por toda a paciência do mundo para ensinar tudo o que eu aprendi sobre fungos, obrigada por me acolher.

À minha orientadora Renata, não existem agradecimentos que caibam aqui, obrigada por acreditar em mim e por me proporcionar oportunidades que esperei por tanto tempo. Obrigada por me enxergar, e obrigada mais ainda por ter me presenteado com a Aiko e a Bianca que chegaram e chegam nos momentos que mais preciso.

Em especial aos meus amigos Marcus, Ju, Anna e Jeca, vocês me fizeram sentir pertencente a um lugar. Obrigada por toda a amizade, pela ajuda psicológica e financeira durante todo esse percurso, quero ter sempre a presença de vocês em minha vida.

Agradeço a Deus, minha família, amigos e ao meu companheiro Erikson que esteve presente em todos os momentos desse percurso, obrigada pelas noites que passou acordado ao meu lado e pelo auxílio com as partes tecnológicas.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais-FAPEMIG, pela bolsa concedida, e aos membros da banca Airton Kunz, Maria Paula Volpi, Rachel Biancalana Costa e Rafael Brito de Moura por aceitarem o convite.

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

RESUMO

Com o agravamento das mudanças climáticas, a necessidade pelo uso de fontes de energias limpas e renováveis é crescente, bem como a redução das emissões de gases de efeito estufa. A digestão anaeróbia (DA) se destaca como uma solução promissora, permitindo o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como os da cana-de-açúcar, na produção de biogás. Este trabalho avaliou o potencial bioquímico de metano (PBM) a partir de diferentes resíduos da indústria sucroalcooleira, explorando a codigestão anaeróbia (Co-DA) e o pré-tratamento biológico. O estudo foi conduzido em três etapas distintas: **Etapa 1:** Nesta etapa, foi investigada a produção de biogás e metano através da Co-DA de vinhaça (V) e torta de filtro (TF), principais resíduos da indústria de etanol com esterco de aves (EA). Os resultados de PBM demonstraram que a monodigestão da V obteve 247 NmLCH₄/g SV, enquanto a Co-DA da TF com o EA apresentou 241 NmLCH₄/g SV, indicando uma alternativa para o período de entressafra. A combinação de V, TF e EA na Co-DA resultou em um rendimento de metano de 506 NmL CH₄/g SV, sendo um cenário promissor para uma maior geração de energia considerando a Co-DA de resíduos agroindustriais dentro das usinas de cana-de-açúcar. **Etapa 2:** Nesta etapa, avaliou-se o potencial energético do licor alcalino (LA), subproduto do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana, através de ensaios de PBM em monodigestão e Co-DA com a V. Os rendimentos de metano foram de 267 NmLCH₄/g SV para a monodigestão da V, 344 NmL CH₄/g SV para a Co-DA de V com LA, e 586 NmLCH₄/g SV para a monodigestão do LA. Esses resultados confirmam o potencial do LA como substrato para a DA, oferecendo uma alternativa energética e sustentável para sua destinação. **Etapa 3:** Esta etapa explorou o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*, visando aumentar sua biodegradabilidade para a produção de biogás via DA. Foram avaliadas a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES). Na FSm, os ensaios de PBM demonstraram que o bagaço pré-tratado sem agitação resultou na maior produção de biogás (591 mL g/SV), enquanto o cultivo com agitação produziu 480 mL g/SV, evidenciando o cultivo estático para a degradação da biomassa. A FES teve como objetivo avaliar a degradação do bagaço pelo fungo e a produção de cogumelos para análises futuras de produção de biogás. A frutificação de cogumelos foi mais evidenciada nas condições em que o bagaço de cana foi suplementado com farelo de milho, destacando a importância de fontes complementares de nutrientes. Portanto, este trabalho concluiu que a digestão anaeróbia (DA) é um processo promissor para o aproveitamento dos subprodutos da indústria sucroalcooleira, especialmente quando combinada com resíduos do setor pecuário e subprodutos de pré-tratamentos químicos, como o licor alcalino. Ademais, os resultados demonstram que o pré-tratamento biológico do bagaço de cana, associado à digestão anaeróbia, pode aumentar o rendimento energético do substrato, promovendo sua valorização e sustentabilidade.

Palavras-chave: inovação; biomassa lignocelulósica; resíduos agroindustriais; digestão anaeróbia; pré-tratamento biológico; *Pleurotus ostreatus*.

ABSTRACT

With the worsening of climate change, the need for the use of clean and renewable energy sources is increasing, as well as the reduction of greenhouse gas emissions. Anaerobic digestion (AD) stands out as a promising solution, allowing the utilization of agro-industrial residues, such as those from sugarcane, in biogas production. This work evaluated the biochemical methane potential (BMP) from different residues of the sugarcane industry, exploring anaerobic co-digestion (Co-AD) and biological pretreatment. The study was conducted in three distinct stages: **Stage 1:** This stage investigated the production of biogas and methane through the Co-AD of vinasse (V) and filter cake (FC), the main residues of the ethanol industry, with poultry manure (PM). The BMP results showed that the mono-digestion of V yielded 247 NmL CH₄/g VS, while the Co-AD of FC with PM presented 241 NmL CH₄/g VS, indicating an alternative for the off-season period. The combination of V, FC, and PM in Co-AD resulted in a methane yield of 506 NmL CH₄/g VS, proving to be a promising scenario for increased energy generation considering the Co-AD of agro-industrial residues within sugarcane mills. **Stage 2:** This stage evaluated the energy potential of alkaline liquor (AL), a byproduct of the alkaline pretreatment of sugarcane bagasse, through BMP assays in mono-digestion and Co-AD with V. The methane yields were 267 NmL CH₄/g VS for the mono-digestion of V, 344 NmL CH₄/g VS for the Co-AD of V with AL, and 586 NmL CH₄/g VS for the mono-digestion of AL. These results confirm the potential of AL as a substrate for AD, offering an energetic and sustainable alternative for its destination. **Stage 3:** This stage explored the biological pre-treatment of sugarcane bagasse using the fungus *Pleurotus ostreatus*, aiming to increase its biodegradability for biogas production via AD. Submerged fermentation (SF) and solid-state fermentation (SSF) were evaluated. In SF, BMP assays demonstrated that pre-treated bagasse without agitation resulted in the highest biogas production (591 mL/g VS), while cultivation with agitation produced 480 mL/g VS, highlighting static cultivation for biomass degradation. SSF aimed to assess bagasse degradation by the fungus and mushroom production for future biogas analysis. Mushroom fructification was more pronounced under conditions where sugarcane bagasse was supplemented with corn bran, emphasizing the importance of complementary nutrient sources. Therefore, this work concluded that anaerobic digestion (AD) is a promising process for the utilization of byproducts from the sugarcane industry, especially when combined with residues from the livestock sector and byproducts from chemical pretreatments, such as alkaline liquor. Furthermore, the results demonstrate that the biological pretreatment of sugarcane bagasse, associated with anaerobic digestion, can increase the energy yield of the substrate, promoting its valorization and sustainability.

Keywords: innovation; lignocellulosic biomass; agro-industrial waste; anaerobic digestion; biological pre-treatment; *Pleurotus ostreatus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Evolução da Oferta Interna de Energia (OIE) das principais fontes de matriz energética nacional, no período de 2013 a 2023	15
Figura 2- Fluxograma do processo simplificado da obtenção de açúcar e etanol e seus subprodutos gerados	17
Figura 3- Estrutura Lignocelulósica da biomassa vegetal	20
Figura 4- Relação da produção de energia elétrica a partir do bagaço de cana-de-açúcar entre os anos 2020 e 2023.....	21
Figura 5- Processos metabólicos envolvidas no processo de digestão anaeróbia	23
Figura 6- Fluxograma metodológico das etapas principais etapas desenvolvidas nesse trabalho	29
Figura 7- Crescimento do fungo <i>Pleurotus Ostreatus</i> em meio sólido e meio líquido.....	35
Figura 8- Colonização de Spawn do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
Figura 9- Fluxograma do pré-tratamento fúngico aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar.....	36
Figura 10- Etapas do crescimento fúngico: fermentação em estado sólido	38
Figura 11- Produção de biogás do cenário base.	43
Figura 12- Produção específica de metano.....	44
Figura 13- Volume acumulado da produção de biogás dos ensaios de PBM com licor alcalino	47
Figura 14- Produção específica de metano dos ensaios com licores (LNBR).....	48
Figura 15- Crescimento micelial em meio líquido sem agitação e com agitação	54
Figura 16- Cultivo líquido com crescimento estático.....	55
Figura 17- Volume acumulado da produção de biogás dos ensaios de PBM do pré-tratamento biológico	58
Figura 18- Produção de Spawn em grãos de milho	60
Figura 19- Presença de contaminantes nos cultivos	61
Figura 20-Colonização superficial completa dos sacos de cultivo com bagaço e controle negativo sem a presença visual de contaminantes.....	62
Figura 21- Construção de uma estufa para favorecer a frutificação dos cogumelos.....	63
Figura 22- Etapas da frutificação do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados da área plantada e da produtividade de cana de açúcar do Brasil (Safr 2023/24).....	16
Tabela 2- Principais subprodutos gerados a partir do beneficiamento da cana-de-açúcar e suas finalidades.....	18
Tabela 3- Pré-tratamentos biológicos para valorização da biomassa lignocelulósica.....	26
Tabela 4- Etapa 1: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630.....	32
Tabela 5- Etapa 2: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630, para os ensaios de PBM utilizando licor alcalino do bagaço de cana em mono e co-digestão com a vinhaça	32
Tabela 6- Etapa 3: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630, para os ensaios de PBM utilizando bagaço de cana in natura e após o pré-tratamento fúngico	33
Tabela 7- Condições estabelecidas para a fermentação submersa	37
Tabela 8- Condições estabelecidas para a fermentação em estado sólido.....	38
Tabela 9- Resultados médios da determinação dos parâmetros físico-químicos	41
Tabela 10- Média da composição do biogás do cenário base	44
Tabela 11- Parâmetros cinéticos do modelo de Gompertz modificado.....	46
Tabela 12- Média da composição do biogás nos ensaios com licor alcalino	48
Tabela 13- Parâmetros cinéticos do modelo de Boltzman	49
Tabela 14- Caracterização do bagaço após o pré-tratamento biológico em fermentação submersa	51
Tabela 15- Caracterização média dos substratos e inóculo	56
Tabela 16- Caracterização do bagaço após pré-tratamento biológico em FES	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	JUSTIFICATIVA	13
2	OBJETIVOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	O CENÁRIO SUCROALCOOLEIRO DO BRASIL	15
3.2	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DO SETOR SUCROALCOOLEIRO	17
3.2.1	Vinhaça	18
3.2.2	Biomassa Lignocelulósica	20
3.3	DIGESTÃO ANAERÓBIA	23
3.4	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25
3.5	USOS DO BIOGÁS E BIOMETANO NO BRASIL	27
4	METODOLOGIA	29
4.1	OBTENÇÃO DO INÓCULO E DOS SUBSTRATOS	30
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO E DO INÓCULO.....	31
4.3	ENSAIOS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM).....	31
4.3.1	Ensaio em mono e co-digestão para determinação do Potencial Bioquímico de Metano (PBM).....	32
4.3.2	Tratamento dos dados de produção de metano	33
4.4	PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	34
4.4.1	Fermentação Submersa	36
4.4.2	Fermentação em Estado Sólido.....	37
4.4.3	Determinação de açúcares redutores totais pelo método de DNS	39
4.4.4	Determinação da eficiência biológica e taxa de crescimento fúngico	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E INÓCULOS.....	41
5.2	PRODUÇÃO DE BIOGÁS E METANO.....	43
5.2.1	Etapa 1: Cenário base.....	43
5.2.2	Etapa 2: PBM com o licor alcalino.....	47
5.3	ETAPA 3 – PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO	50
5.3.1	Fermentação Submersa	50
5.3.2	Potencial Bioquímico de Metano a partir do pré-tratamento biológico	56

5.3.3	Fermentação em Estado Sólido.....	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7	SUGESTÕES FUTURAS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, discussões a respeito do uso de energias limpas, esgotamento de combustíveis provenientes de fontes não renováveis e o aumento da concentração de gases de efeito estufa (GEE) têm se intensificado. Essas preocupações se tornaram pautas discutidas em 1997, com a assinatura do protocolo de Quioto, que estabeleceu objetivos e metas para a redução dos GEE, e pelo Acordo de Paris, em 2015, que reforçou o compromisso global para combater as mudanças climáticas e mitigar essas emissões.

No Brasil, a crise do petróleo na década de 70 impulsionou o etanol como alternativa ao uso da gasolina, recebendo recursos do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) para expandir sua produção (Milanez; Faveret Filho; Rosa, 2008). Com o incentivo do BNDES, o clima tropical e a extensão territorial, o Brasil tornou-se líder mundial na produção de etanol a partir do plantio da cana-de-açúcar, de acordo com os dados divulgados pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) no ano de 2021.

O Brasil destaca-se também no setor pecuário, sendo o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e líder em exportações, com um total de 5 milhões de toneladas exportadas em 2023 (Embrapa, 2024). Com um rebanho de mais de 400 milhões de cabeças, o estado do Paraná se posiciona como o maior produtor do país (IBGE, 2024). Contudo, esse setor gera cerca de 230 milhões de toneladas de resíduos anualmente, agravando as emissões de GEE, neste caso, o metano e amônia liberados pela decomposição dos dejetos (Augusto; Kunz, 2011; Paranhos *et al.*, 2020).

Diante do agravamento das crises climáticas e da necessidade de reduzir a dependência de fontes de energia não renováveis, busca-se cada vez mais por fontes de energia limpas e sustentáveis. A digestão anaeróbia (DA) se destaca como uma solução promissora, aproveitando os resíduos agroindustriais, como os da cana-de-açúcar, para gerar energia e quando combinados com outros substratos do setor agrícola ou pecuário, agregam valor energético e econômico ao processo.

No entanto, a eficiência da DA de alguns resíduos agroindustriais, como a biomassa lignocelulósica é limitada pela sua estrutura recalcitrante, exigindo o uso de pré-tratamentos. Alguns pré-tratamentos são utilizados para o reaproveitamento energético, como é o caso do etanol de segunda geração (2G), que pode ser obtido a partir do pré-tratamento alcalino do bagaço da cana-de-açúcar. Apesar de eficaz, esse pré-tratamento gera subprodutos poluentes como o licor alcalino. Em contrapartida, o pré-tratamento biológico vem se tornando uma rota

promissora, um exemplo é a utilização de fungos da podridão branca, que é uma alternativa inovadora e limpa, capaz de degradar a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis e biocombustíveis (Rezania *et al.*, 2020) sem gerar resíduos poluentes. Entretanto, a aplicação desse pré-tratamento em subprodutos sucroalcooleiros ainda é pouco explorada na literatura.

Portanto, este trabalho buscou avaliar o potencial bioquímico de metano e biogás (PBM) a partir dos resíduos da indústria de etanol em co-digestão (Co-DA) com esterco de aves, em cenários utilizados pela indústria sucroalcooleira deste estudo. Além disso, foi avaliado o PBM de licores oriundos do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com foco na produção de metano e conseqüentemente na mitigação do impacto ambiental gerado por esse resíduo. Este estudo inova ao explorar rotas biológicas do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando fungos da podridão branca, visando a produção de biogás por meio de digestão anaeróbia.

1.1 JUSTIFICATIVA

A relevância desta proposta está tanto no avanço científico quanto no caráter inovador, contemplando o desenvolvimento de novas rotas de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar, com foco no aproveitamento global dos resíduos do setor sucroalcooleiro em integração com o setor aviário. O pré-tratamento alcalino do bagaço é amplamente utilizado para a obtenção de etanol 2G, e este trabalho explorou o potencial energético do licor alcalino gerado como resíduo, agregando valor e contribuindo para a sustentabilidade deste processo.

Além disso, nosso estudo avança ao propor tecnologias limpas de pré-tratamento utilizando rotas fúngicas para a degradação da biomassa lignocelulósica maximizando a produção de biogás. Assim, destacam-se os seguintes avanços científicos e tecnológicos que foram previstos para este trabalho:

- Aproveitamento do bagaço de cana, um resíduo lignocelulósico de baixo valor agregado, para a produção de bioenergia com foco na realidade das operações das usinas sucroalcooleiras. Essa abordagem representa uma excelente janela de oportunidade científica e tecnológica ainda pouco explorada na integração de resíduos para a geração e maximização de biogás;
- Integração de resíduos do setor sucroalcooleiro com o esterco de aves, com o objetivo de manter a produção de biogás estável e independente dos períodos de safra e entressafra;
- Desenvolvimento de rotas fúngicas de pré-tratamento, voltadas para a biomassa lignocelulósica, sendo uma alternativa limpa e inovadora, podendo ser aplicada tanto nas biorrefinarias de cana-de-açúcar quanto em outros setores industriais.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de metano e biogás a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira, integrando resíduos do setor agropecuário. Além disso, o estudo investigou o aproveitamento do licor alcalino, gerado durante o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana, como substrato em ensaios de digestão anaeróbia. Também foi avaliada estratégias de pré-tratamento biológico do bagaço de cana por meio de cultivo fúngico, visando aumentar a biodegradabilidade do resíduo lignocelulósico.

Constituem-se objetivos específicos:

- a) Determinar o potencial de produção de metano em um cenário de safra e entressafra no contexto da usina sucroalcooleira, em co-digestão com dejetos de aves;
- b) Avaliar o potencial de produção de biogás e metano a partir do licor alcalino proveniente do pré-tratamento químico do bagaço de cana;
- c) Desenvolver estratégias de cultivo de fungos de podridão branca utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato;
- d) Determinar o potencial de produção de biogás do bagaço de cana submetidos ao pré-tratamento utilizando fungos da podridão branca.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

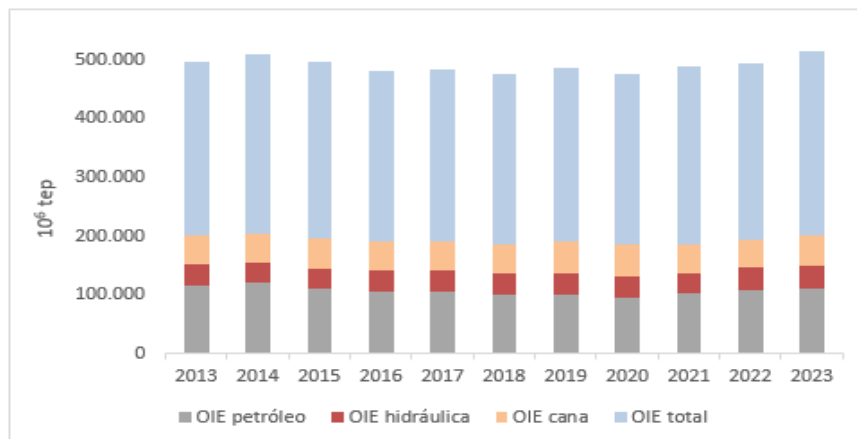
3.1 O CENÁRIO SUCROALCOOLEIRO DO BRASIL

A produção de cana-de-açúcar no Brasil teve início no período colonial no século XVI, pelos portugueses. Em 1532, no litoral de São Paulo, foi instalado o primeiro engenho de açúcar do país (Pereira *et al.*, 2019). Com a expansão canavieira pelo litoral do Nordeste e com a ascensão do consumo de açúcar na Europa, a produção açucareira brasileira desempenhou um importante papel no abastecimento do mercado Europeu e para o crescimento da economia do país, iniciando o ciclo da cana-de-açúcar (Flausinio, 2015).

Com a expansão tecnológica e a crise do petróleo na década de 70, o setor sucroalcooleiro ganha destaque na matriz energética brasileira. A criação do Programa Nacional do Álcool – Proálcool impulsionou a expansão canavieira para a produção do etanol como um potencial substituto da gasolina, tornando o Brasil líder na produção e utilização de etanol a partir da cana-de-açúcar (Cortez, 2016).

Na matriz energética do Brasil, a cana-de-açúcar corresponde a cerca de 16,9% da oferta interna de energia (OIE) de acordo com o Balanço Energético Nacional do ano de 2023 (EPE, 2024). O setor sucroenergético é composto principalmente pela produção de etanol, açúcar, bioeletricidade e biometano. Desde 2007, quando ultrapassou a energia hidráulica, o setor, a partir dos produtos derivados da cana, vem ganhando destaque na matriz energética, em comparação a utilização de outras fontes energéticas como a solar e a eólica, mesmo ainda permanecendo em níveis inferiores ao petróleo (Figura 1) (EPE, 2024; Flausinio, 2015).

Figura 1- Evolução da Oferta Interna de Energia (OIE) das principais fontes de matriz energética nacional, no período de 2013 a 2023



Fonte: EPE (2024)

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, segundo dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), a safra de 2024, foi estimada em 713 milhões de toneladas (IBGE, 2024). Cerca de 64,6% da produção canavieira vem da região Sudeste, tendo o Estado de São Paulo como o maior produtor da região e é responsável por mais da metade da produção brasileira (Tabela 1) (CONAB, 2024). Além disso, o Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de etanol, tendo atingido no ano de 2024 um recorde de produção estimado em 36,83 bilhões de litros, um aumento de mais de 4% em relação a 2023 (ÚNICA, 2025).

Tabela 1- Dados da área plantada e da produtividade de cana de açúcar do Brasil (Safra 2023/24)

Região/UF	Área (em mil ha)	Produção (em mil t)
Norte	48	3943
Nordeste	883	56477
Centro-Oeste	1778	145035
Sudeste	5098	469026
São Paulo	4091	383409
Sul	524	38730
Brasil	8333	713214

Fonte: Conab (2024).

Em um levantamento realizado pela Conab (2024), a safra 2024/2025 será afetada com uma queda de produção de aproximadamente -3,8% em relação à safra de 2023/24. Essa queda de produtividade tem relação direta com as condições climáticas, como as altas temperaturas que foram registradas em várias regiões do país, provocando o fenômeno de evapotranspiração e os baixos índices pluviométricos causando déficit hídrico nos solos (CONAB, 2024).

Entretanto, a produção canavieira tende a expandir cada vez mais, através do desenvolvimento tecnológico e dos novos incentivos fiscais que estão sendo destinados para o setor agropecuário, principalmente no desenvolvimento de energias sustentáveis através da biomassa. O Plano Nacional de Energia 2050, estabelece que até 2050 haja uma disponibilidade de biomassa provinda de resíduos agrícolas em 530 milhões de toneladas equivalentes de petróleo, tendo a cana-de-açúcar como uma de suas principais fontes (EPE, 2024).

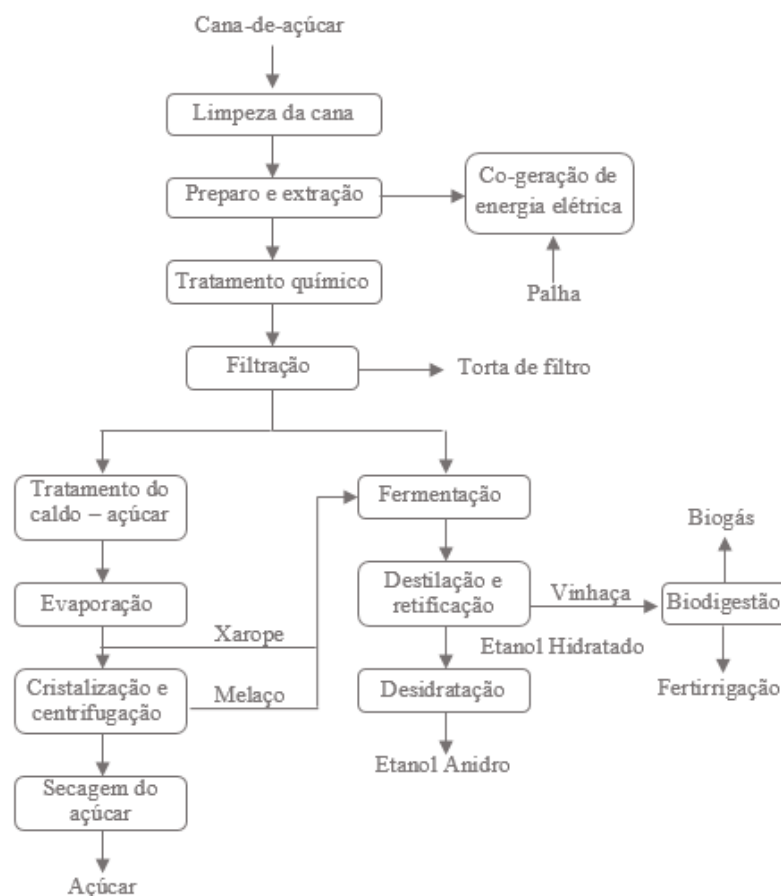
Porém, mesmo com os incentivos fiscais e o desenvolvimento tecnológico, ainda se faz necessário investimentos científicos, para que os estudos e processos que envolvem o aproveitamento e o balanço energético dos resíduos e, principalmente da biomassa lignocelulósica, sejam otimizados e viabilizados nas usinas sucroalcooleiras (Janke *et al.*, 2016; Volpi *et al.*, 2022). Nos próximos tópicos, serão apresentados os principais resíduos e

subprodutos que são gerados a partir da cana-de-açúcar.

3.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DO SETOR SUCROALCOOLEIRO

As usinas sucroalcooleiras têm sua cadeia de produção dividida entre a fase agrícola e a fase industrial, ou seja, a obtenção da cana-de-açúcar como matéria prima começa primeiro com o cultivo, seguido da colheita, beneficiamento, processos industriais e a comercialização dos produtos (Flausinio, 2015). Na Figura 2, é possível entender os processos que ocorrem de forma simplificada em uma usina sucroalcooleira, posteriormente à colheita da cana-de-açúcar.

Figura 2- Fluxograma do processo simplificado da obtenção de açúcar e etanol e seus subprodutos gerados



Fonte: Adaptado de Chiapa, Guelfi e Oliveira (2023)

Os principais subprodutos que são gerados a partir do beneficiamento da cana-de-açúcar são: vinhaça, bagaço, palha e a torta de filtro (Tabela 2). Esses subprodutos são gerados em grandes quantidades e podem ser aproveitados em diversas formas como, por exemplo, na

alimentação animal e humana, fertilização do solo e geração de energia.

Tabela 2- Principais subprodutos gerados a partir do beneficiamento da cana-de-açúcar e suas finalidades

Subprodutos	Quantidade produzida	Principais usos
Bagaço (Kg)	280	Produção de eletricidade; etanol 2G
Palha (Kg)	165	Etanol 2G; uso em artesanato; etanol 2G
Torta de Filtro (Kg)	30-40	Fertilizante; produção de biogás
Vinhaça (L)	10-15	Fertilizante; produção de biogás

Fonte: Castro (2019); Embrapa (2022)

Boa parte dos resíduos que são gerados nesse setor acabam ficando no próprio campo por falta de espaço para armazenamento ou formas de aproveitamento eficientes. Esses resíduos, em contato com o solo, além de agravar problemas ambientais, geram problemas de fertilização, como por exemplo, a não absorção de nutrientes, ou, em épocas de chuva, esses resíduos podem cair em cursos d'água, prejudicando a vida aquática do meio, pois são ricos em matéria orgânica e alguns minerais como o potássio

Dentre os vários resíduos que são gerados a partir da cana, a vinhaça é um dos subprodutos mais estudados, tanto por seu alto poder poluente, quanto pelo potencial de fertilização do solo e de geração de energia em processos de digestão anaeróbia (Janke *et al.*, 2016c).

3.2.1 Vinhaça

A vinhaça é obtida no processo de destilação do caldo fermentado, sendo produzidos, em média, entre 10 e 15 litros de vinhaça por litro de etanol (Hoarau *et al.*, 2018). Os estudos sobre a caracterização da vinhaça começaram na década de 50 e seu uso decorrente como fertilizante começou a ser potencializado em meados de 1999, quando o preço dos fertilizantes químicos aumentou devido à alta da taxa cambial (Flausinio, 2015).

Por possuir quantidades significativas de potássio, fósforo e nitrogênio, a vinhaça passou a ser utilizada como fertilizante na plantação da cana, processo este conhecido como fertirrigação (De Souza *et al.*, 2015). Entretanto, esse processo se torna caro devido a logística do transporte e essa prática deve ser controlada, pois mesmo em pequenas quantidades pode gerar saturação de cátions como potássio, causando a lixiviação do solo, contaminando águas subterrâneas, causando eutrofização dos corpos d'água, reduzindo a atividade de fotossíntese e a quantidade de oxigênio, prejudicando o meio aquático (Gebreyessus; Mekonnen;

Alemayehu, 2019).

A vinhaça possui um pH ácido que varia entre 3-5, com uma concentração de 30-40 g/L de DQO, 24 e 20 g/L de ST e SV respectivamente, e nitrogênio total entre 0,2-4,2 g/L (Hoarau *et al.*, 2018; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015). Entretanto, a composição da vinhaça pode variar ao longo da colheita, já que o período da safra possui uma duração média de 8 meses e o ciclo de uma planta de cana é de até 6 anos (Flausinio, 2015). Uma outra problemática gerada, está relacionada com a logística e armazenamento, já que a vinhaça possui potencial de produção de gases de alto poder poluente, como óxido nitroso e o gás metano, sendo este último responsável por 98% das emissões de GEE no manejo da vinhaça (Moraes *et al.*, 2017).

A digestão anaeróbia (DA) é uma alternativa promissora para tratar esse subproduto, pois a concentração de matéria orgânica é reduzida durante esse processo, produzindo biogás e agregando valor energético à vinhaça, além do aproveitamento do digestato como fertilizante, já que os nutrientes da vinhaça não são alterados na DA, mantendo o seu potencial de fertilização (Janke *et al.*, 2015; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

Em um levantamento realizado por Silva (2023) a fim de verificar a produção de metano da vinhaça em diferentes faixas de temperatura, o potencial bioquímico de metano (PBM) da vinhaça pode variar de acordo com a faixa de temperatura em operação, 240 NmL CH₄ g/DQO_{removida} em 35°C, 290 NmL CH₄ g/DQO_{removida} a 37°C, 239 NmL CH₄ g/DQO_{removida} em 40°C e 234 NmL CH₄ g/DQO_{removida} a 55°C.

Em um estudo comparando dois reatores *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) de um e dois estágios, inoculados com lodo anaeróbio adaptado para o tratamento da vinhaça em condições termofílicas no período de safra, o rendimento máximo de metano foi obtido no reator de dois estágios, 316 NmL CH₄ g/DQO_{removida}, enquanto no reator de estágio único foi obtido 250 NmL CH₄ g/DQO_{removida} (Júnior *et al.*, 2016).

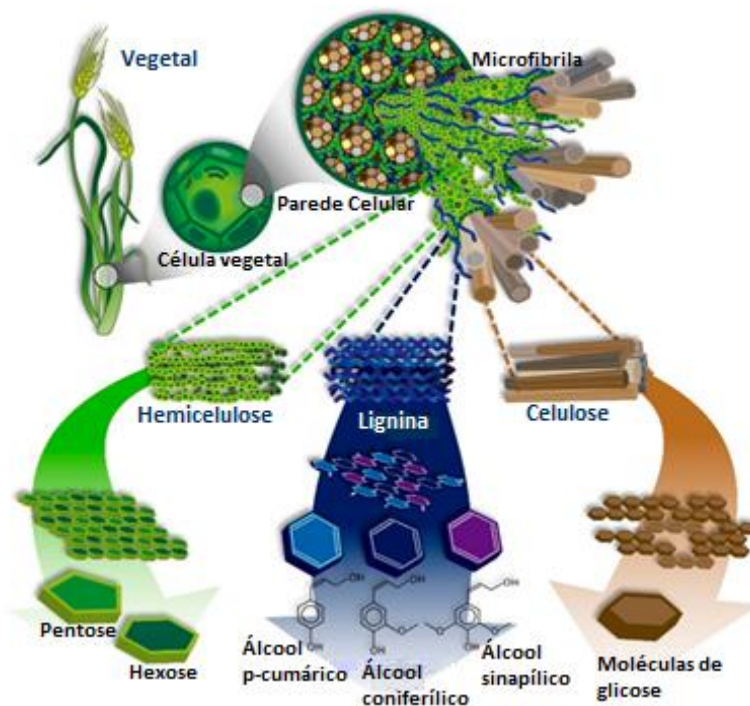
Ensaio de PBM foram utilizados para avaliar o rendimento de metano da vinhaça em diferentes razões de I/S (inóculo/substrato). O inóculo utilizado foi proveniente de um reator mesofílico de uma destilaria de cana-de-açúcar. Os ensaios foram conduzidos durante 50 dias e as relações I/S foram de 1, 2, 2,5 e 3, com rendimento de metano de 152,95, 181,72, 181,59, 181,91 NmL CH₄ g/DQO_{removida}, respectivamente (Caillet; Adeldard, 2021).

Porém, mesmo com estudos que mostram o desempenho da vinhaça na geração de biogás, ainda é necessário que haja a valorização dessa matriz energética no Brasil e estudos mais aprofundados sobre os bioprocessos que envolvem esse subproduto (Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

3.2.2 Biomassa Lignocelulósica

O uso de materiais lignocelulósicos provindos da biomassa de vegetais é uma alternativa na geração de bioenergia e biocombustíveis, devido à alta disponibilidade dessa biomassa. Entretanto, a presença de polímeros que constituem a estrutura celular dos vegetais como a lignina, celulose e hemicelulose na proporção 3:4:3, respectivamente, cria uma estrutura resistente e recalcitrante, que dificulta a biodegradabilidade da biomassa (Figura 3) (Khaire; Moholkar; Goyal, 2021; Sawatdeenarunat *et al.*, 2015).

Figura 3- Estrutura Lignocelulósica da biomassa vegetal



Fonte: Adaptado de Hernández-Beltrán *et al.* (2019)

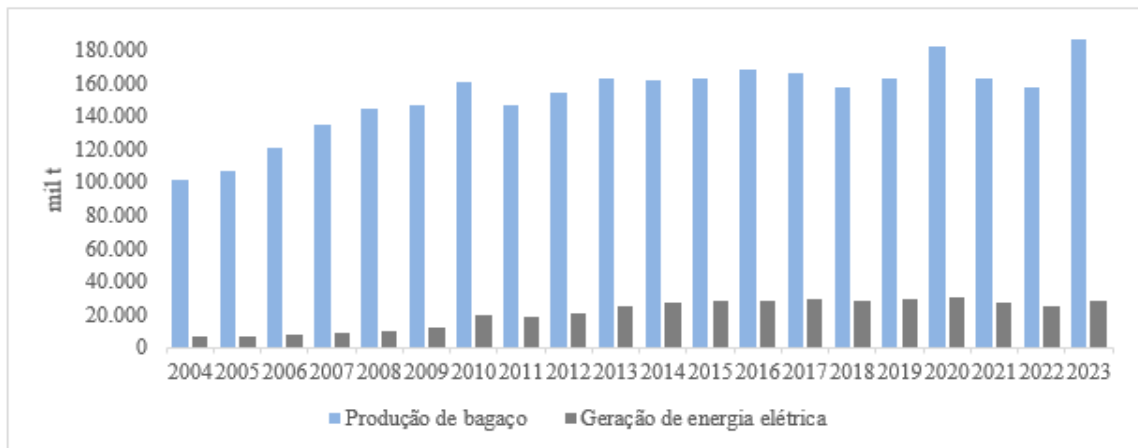
A celulose é o principal polímero constituinte da estrutura celular da biomassa lignocelulósica, formada por uma cadeia de glicose e corresponde a 50% da massa seca total (Aguiar; Ferraz, 2011; Sawatdeenarunat *et al.*, 2015). A hemicelulose constitui cerca de 20 a 25% da biomassa e são polissacarídeos constituídos de açúcares de 5 a 6 carbonos (Costa *et al.*, 2014). A lignina é uma macromolécula fenólica que compõe de 20 a 30% da biomassa, sendo responsável pela rigidez e impermeabilidade do tecido vegetal (Gao *et al.*, 2022).

No processamento da cana-de-açúcar, o bagaço é o subproduto lignocelulósico mais

abundante, com cerca de 280 kg de bagaço por tonelada de cana processada (EMBRAPA, 2022). O bagaço é um resíduo fibroso, obtido no processo de moagem da cana, para a extração do caldo, e apresenta em torno de 50% de umidade e 48% de fibras (EMBRAPA, 2022). A estrutura vegetal do bagaço é composta por cerca de 32-50% de celulose, 23-32% de lignina e 19-25% de hemicelulose (Carvalho *et al.*, 2013).

Cerca de 50% do bagaço é utilizado na produção de energia térmica nas usinas e o restante fica armazenado nos pátios. A energia térmica resultante da queima do bagaço é suficiente para suprir as necessidades energéticas de uma usina e pode até ser exportada às redes de energia elétrica (Batalha *et al.*, 2015; Silva, 2023). A utilização energética do bagaço no setor industrial representou 18,2% da energia total consumida no ano de 2023 e no ano de 2024 teve um aumento de 26,1% da produção energética a partir do bagaço para esse setor (EPE, 2024). Com o aumento da produção de etanol, o consumo do bagaço de cana no setor energético deve aumentar. A Figura 4 mostra uma série histórica da relação da produção de bagaço de cana-de-açúcar, com a geração de energia elétrica nos últimos 20 anos (EPE, 2024).

Figura 4- Relação da produção de energia elétrica a partir do bagaço de cana-de-açúcar entre os anos 2020 e 2023



Fonte: EPE (2024).

Além da produção de energia elétrica, há muito interesse econômico na utilização e recuperação do bagaço em refinarias para a produção de combustível de segunda geração (2G) (Batalha, 2015; Volpi *et al.*, 2022). Uma tonelada de bagaço seco de cana, pode gerar entre 158 a 335 litros de etanol 2G (Carpio; De Souza, 2017). Entretanto, para a produção de etanol 2G, assim como no processo de DA, o bagaço de cana-de-açúcar ainda é pouco utilizado, devido a limitação na fase de hidrólise, necessitando de pré-tratamento para a quebra da estrutura lignocelulósica (Silva, 2023).

O bagaço de cana-de-açúcar tem um potencial de produção de biogás estimado em 330 NmL CH₄ g/SV (PROBIOGÁS, 2015). O PBM é otimizado quando a biomassa passa por um pré-tratamento, em um estudo o rendimento de metano do bagaço sem pré-tratamento foi de 105,6 NmL CH₄ g/SV, enquanto para o pré-tratamento do bagaço com amônia etanólica, o rendimento final foi de 299,3 NmL CH₄ g/SV (Hashemi; Karimi, K.; Karimi, A., 2019).

Em um estudo utilizando o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (2,5%), ensaios de PBM foram conduzidos com um inóculo proveniente de uma estação de tratamento de esgoto em uma proporção de 2/1 (I/S) com o bagaço resultante do pré-tratamento e foram operados em condições mesofílicas durante 62 dias, tendo como resultado o rendimento máximo de metano estimado em 187,9 NmL CH₄ g/SV (Paulose; Kaparaju, 2021).

A produção de metano, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, assim como em outros substratos pode variar de acordo com a espécie de cana cultivada, variabilidade mecânica durante o beneficiamento e a época da colheita. Em um estudo foi realizado testes de PBM utilizando duas amostras de bagaço produzidos e colhidos em estados e estações diferentes. Os resultados obtidos de produção máxima de metano para cada amostra foram de 236 e 326 NmL CH₄ g/SV, ao longo de 35 dias de operação (Janke *et al.*, 2015).

O processo de clarificação do caldo gera como resíduo a torta de filtro (TF), com cerca de 30 a 40 kg por tonelada de cana moída (Embrapa, 2022). A composição da torta de filtro pode variar de acordo com a região e as condições de plantio da cana-de-açúcar, mas apresenta quantidade significativas de minerais (CaO, N, P₂O₅ e K₂O) e matéria orgânica, tornando esse subproduto muito utilizado como fertilizante (Janke *et al.*, 2016).

O PBM de três amostras de torta de filtro, obtidas a partir de diferentes espécies de cana-de-açúcar, tiveram potencial máximo de metano entre 245 e 281 NmL CH₄ g/SV e em comparação com a vinhaça que neste mesmo estudo apresentou o potencial de metano entre 246 e 273 NmL CH₄ g/SV, demonstra que os resultados do teor energético, expressa em massa fresca da torta de filtro, foram de 7 a 10 vezes maiores que o teor energético da vinhaça em comparação a quantidade que é gerada de torta e vinhaça (Janke *et al.*, 2015).

Na DA, a torta de filtro é muito utilizada como um co-substrato, pois apresenta condições que favorecem o balanço energético de outros substratos. Um exemplo da utilização da torta de filtro é com o bagaço de cana que apresenta uma relação C:N de 90-101:1, enquanto relação C:N da torta de filtro é 26:1 (Janke *et al.*, 2016b). O potencial de produção de biogás estimado da torta de filtro é de 262 NmL CH₄ g/SV (PROBIOGAS, 2015).

Um estudo comparativo utilizando torta de filtro, vinhaça e licor alcalino, demonstram

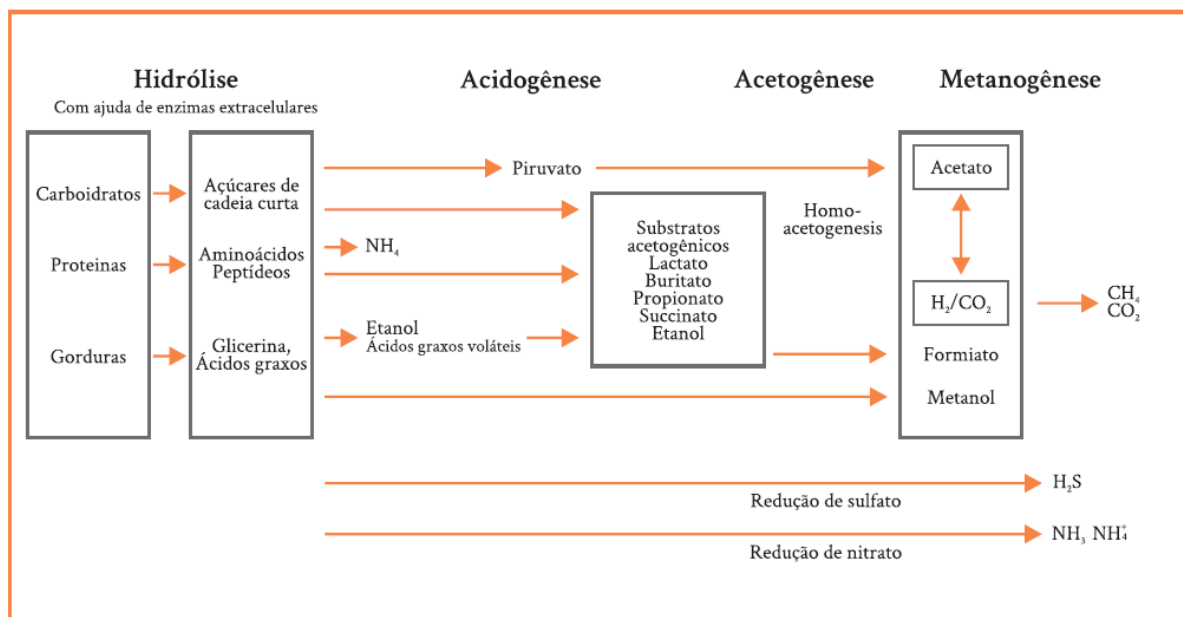
que a co-digestão desses substratos aumentou a produção de metano em relação a monodigestão dos mesmos. Neste estudo, o valor máximo produzido de metano da co-digestão desses substratos foi de 660 NmL CH₄ g/SV, enquanto a mono-digestão da torta de filtro, vinhaça e do licor foram respectivamente 353, 476 e 610 NmL CH₄ g/SV (Volpi *et al.*, 2022).

Os valores máximos de metano dos subprodutos da usina sucroalcooleira podem variar com a espécie da cana cultivada, a localização do plantio ou o sistema de mecanização do processo de beneficiamento, como já comentado anteriormente. Esses subprodutos possuem um grande potencial para a produção de metano na DA, e os resultados podem ser otimizados quando submetidos a pré-tratamentos e estratégias de co-digestão, que equilibram os nutrientes e favorecem a integração de outros resíduos.

3.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia (DA) é um processo que envolve rotas metabólicas que ocorrem em etapas sequenciais, tendo como principal resultado a oxidação da matéria orgânica em gás carbônico e metano. As rotas metabólicas do processo de digestão anaeróbia ocorrem em 4 etapas (Figura 5).

Figura 5-Processos metabólicos envolvidas no processo de digestão anaeróbia



Fonte: Kunz; Steinmetz; Amaral (2022, p.14).

Na primeira etapa, bactérias fermentativas hidrolisam os polímeros complexos em monômeros orgânicos simples (Madigan *et al.*, 2016). A segunda etapa da DA é realizada por

bactérias acidogênicas que convertem compostos orgânicos simples em ácidos orgânicos de cadeia curta (menor que 5 carbonos). Os ácidos orgânicos formados são oxidados por bactérias acetogênicas em acetato, gás carbônico e hidrogênio, constituindo a terceira etapa da DA. A produção de metano ocorre na última fase desta rota metabólica, em que há um grupo específico de microrganismos denominados arqueias metanogênicas, que oxidam os produtos formados na rota anterior em CH_4 e CO_2 (Kunz; Steinmetz; Amaral, 2022).

O processo da digestão anaeróbia da biomassa lignocelulósica inicia-se pela etapa de hidrólise, entretanto, a estrutura complexa desses materiais dificulta e muitas vezes inibe essa etapa da rota metabólica, sendo necessário realizar um pré-tratamento, para que ocorra a quebra da estrutura cristalina dessa biomassa (Sawatdeenarunat *et al.*, 2015). Esses pré-tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Para otimizar o processo da digestão anaeróbia e aumentar a produção de metano a partir da combinação de um ou mais substratos, a co-digestão anaeróbia (coDA) pode ser utilizada (Coelho *et al.*, 2018). A CoDA é o processo em que há conversão simultânea de dois ou mais substratos no processo de degradação anaeróbia, melhorando o rendimento de biogás, através do equilíbrio nutricional, otimizando a DA (Pagés-Díaz *et al.*, 2014).

A coDA pode aumentar a produção de metano da biomassa lignocelulósica, favorecendo a relação C:N dos substratos, adicionando macro e micronutrientes, contribuindo com a capacidade tamponante do meio e com o aumento da atividade microbiológica (Aboudi; Álvarez; Romero, 2016). A utilização de esterco como substratos na coDA da biomassa lignocelulósica, favorece os processos da metanogênese e aumenta a produção energética desses resíduos (Wang *et al.*, 2012).

No processo da co-digestão, o esterco de aves pode ser utilizado como fonte de nitrogênio, equilibrando a relação C:N da biomassa lignocelulósica e fornecendo nutrientes para o processo da DA, aumentando a produção de metano (Hakimi *et al.*, 2023). O esterco de galinha, possui uma relação C:N entre 6,7-10, apresentado em sua composição lignina (1,7-5,1 %ST), hemicelulose (4,4-24,3 %ST), celulose (4-24,3 %ST) e proteínas (15,4-16,3 %ST) (Hamiki *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024; Matheri *et al.*, 2017).

A monodigestão do esterco de aves, não é uma opção promissora para a produção de metano, pois esse substrato possui alto teor de nitrogênio, que favorecem a produção de amônia e inibem a produção de metano (Hakimi *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2018). Alguns estudos que utilizaram esterco de aves em monodigestão obtiveram valores máximos de metano estimados em 114,5, 126,9 e 132 NmL CH_4 g/SV (Johannesson *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022; Wijaya *et al.*, 2020;). Por outro lado, a co-digestão do esterco de aves com serragem, utilizando

uma relação C:N de 30:1, aumentou em 65% a produção de metano, enquanto a mono-digestão do esterco de aves resultou em 20,5% dessa produção (Kok; Shamsuddin; Aqsha, 2020).

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica começou a ter seu potencial energético estudado devido sua alta disponibilidade e por não competir com a produção de alimentos e ração, diferente de matérias-primas como a cana-de-açúcar e o milho (Sawatdeenarunat *et al.*, 2015). Entretanto, sua utilização é limitada e exige pré-tratamentos para romper a estrutura recalcitrante da biomassa para que os processos bioquímicos, como a fermentação dos açúcares ocorram (González *et al.*, 2021).

Pré-tratamentos físicos alteram a estrutura da biomassa, aumentando a superfície de contato através da moagem, facilitando a ação por agentes químicos ou biológicos e rompendo a estrutura cristalina da celulose (Konde *et al.*, 2021). A utilização de fonte de calor e aumento de pressão em pré-tratamentos hidrotérmicos alteram as ligações químicas da biomassa, promovendo a ruptura das cadeias dos polímeros, aumentando a biodegradabilidade na etapa da hidrólise. As vantagens da utilização do pré-tratamento físico, é que durante o processo não são liberadas substâncias inibitórias, o que favorece e otimiza a obtenção de biocombustíveis (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019).

Os pré-tratamentos químicos possuem bastante eficácia e baixo custo e incluem a utilização de agentes ácidos, alcalinos e solventes orgânicos, que rompem as estruturas da lignina e hemicelulose, diminuindo também o grau de cristalização da celulose (Sawatdeenarunat *et al.*, 2015). Entretanto, a utilização de alguns agentes químicos pode agravar problemas ambientais como a salinização do solo, além de influenciar na obtenção do gás metano, uma vez que o pré-tratamento químico produz compostos inibitórios, como os derivados do furfural (Gao *et al.*, 2022; Konde *et al.*, 2021). Já a utilização de solventes orgânicos é o método de escolha quando se quer obter ou isolar cada polímero da biomassa lignocelulósica, como por exemplo, o pré-tratamento organossolve que pode isolar a lignina que possui um maior valor agregado (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019).

Pré-tratamentos alcalinos utilizando NaOH são comumente empregados para obtenção de combustível 2G a partir de resíduos lignocelulósicos. Esse processo rompe a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica deixando a disponível para ser hidrolisada, contribuindo para a remoção da lignina e hemicelulose (Aditya *et al.*, 2016). A eficiência desse método pode ser otimizada ajustando a temperatura e tempo de operação durante o pré-

tratamento (Volpi, 2022). Esse processo gera como resíduo o licor alcalino com pH próximo a 12, rico em alguns compostos como acetato, frações de lignina e açúcares monoméricos e oligoméricos (Brenelli *et al.*, 2020).

Diversos microrganismos podem ser utilizados no pré-tratamento biológico de biomassas lignocelulósicas. Os microrganismos mais utilizados são fungos brancos, marrons, fungos da podridão mole e parda e fungos da podridão branca, sendo este último muito eficiente no processo da deslignificação (Konde *et al.*, 2021). Os fungos causadores da podridão branca apresentam dois comportamentos distintos em que, em um estágio podem degradar os componentes da parede celular e, no outro, atacam a lignina nos estágios iniciais da colonização (Abolore; Jaiswal, S.; Jaiswal, A., 2023; Aguiar; Ferraz, 2011). As desvantagens do uso do pré-tratamento biológico estão relacionadas à lentidão do processo e dependendo das condições e do microrganismo utilizados, a baixa obtenção de metano (Gao *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Gao *et al.* (2022) traçou os microrganismos mais utilizados no pré-tratamento biológico e seus principais efeitos sobre a biomassa lignocelulósica (Tabela 3).

Tabela 3- Pré-tratamentos biológicos para valorização da biomassa lignocelulósica

Categoria	Biomassa	Cepas	Resultados
Fungos	Serragem	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i>	Hidrólise 20 vezes melhorada
	Palha de trigo	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Hidrólise aprimorada
	Madeira	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Deslignificação aprimorada
	Bagaço de cana	<i>Aspergillus niger</i>	Alta atividade da endoxilânase

Fonte: Adaptado de Gao *et al.* (2022)

A produção de metano a partir de biomassa lignocelulósica da palha de milho se mostrou bastante eficiente após o pré-tratamento biológico utilizando esporos de *Trichoderma viride* e *Aspergillus sp.*, no qual a atividade enzimática desses microrganismos foi suficiente para hidrolisar a celulose e hemicelulose (Zhao *et al.*, 2020). Em comparação com os reatores em que não foram adicionadas as enzimas, a taxa de rendimento inicial do metano, após um dia de fermentação, foi 50% maior (Zhao *et al.*, 2020). Logo, entende-se que a biomassa, quando pré-tratada biologicamente, possui um maior potencial de produção de biogás (Gao *et al.*, 2022).

Em um estudo comparativo entre o pré-tratamento físico e biológico no processo de DA para a produção de biogás, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar, os ensaios que continham consórcio microbiano contendo fungos e bactérias (*Streptomyces sp.*, *Geobacillus sp.* e o fungo *Trichoderma*), observou-se um aumento na produção de biogás e na relação C:N, quando comparado somente a moagem do bagaço no pré-tratamento físico (Sumardiono *et al.*, 2023).

A lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar apresentou percentuais de degradação

de 7,49%, 5,48% e 5,58% após o pré-tratamento com fungos da podridão branca dos gêneros *Pleurotus florida*, *Coriolopsis caperata* e *Ganoderma sp* respectivamente (Deswal *et al.*, 2014). Quando a estrutura cristalina da biomassa lignocelulósica é rompida e a lignina é degradada, o processo de hidrólise na digestão anaeróbia é facilitado.

A utilização da combinação de pré-tratamentos químicos e biológicos pode aumentar o rendimento de metano na DA. Em um estudo, a palha de milho foi inicialmente pré-tratada com NaOH a 1%, seguida de um tratamento biológico com os fungos *Aspergillus sp.* e *T. harzianum*. O rendimento de metano após esses pré-tratamentos foi de 276,29 e 261,3 L/Kg SV respectivamente (Meenakshisundaram *et al.*, 2022).

Entretanto, o rendimento de metano após o pré-tratamento biológico depende diretamente dos fungos utilizados e da biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento fúngico é um processo lento, mas a combinação com outros pré-tratamentos podem otimizar os resultados. Nesse contexto, compreender as estratégias de pré-tratamento e da co-digestão anaeróbia para esses resíduos lignocelulósicos é essencial para potencializar a produção de biogás e metano.

3.5 USOS DO BIOGÁS E BIOMETANO NO BRASIL

Desde a elaboração da Agenda 2030 e a consolidação dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), muitas são as discussões e movimentações para conseguir atingir as metas e os objetivos propostos pelos ODS, através da elaboração de políticas públicas. No Brasil, em 2010, foi aprovado o Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura - Plano ABC, que consiste em políticas públicas de adoção de medidas para uma agropecuária sustentável (Brasil, 2012).

O Brasil, por se destacar no setor agropecuário, possui um grande potencial para o desenvolvimento da agroenergia, potencializando a geração de biogás através de biodigestores. Entretanto, as iniciativas para a produção de biogás no Brasil ainda são incipientes (Mathias; Silva, 2023). Os biodigestores anaeróbios, além de serem eficientes energeticamente, contribuem para a redução GEE e a produção de biogás gerado tem influência positiva nos aspectos econômicos e sociais (Costa *et al.*, 2023).

Em 2023 houve um aumento de 728 mi Nm³/ano na produção de biogás no Brasil, 21% a mais em relação ao ano de 2022. Esse aumento na produção de biogás ocorreu através das 338 novas plantas que foram cadastradas no país, totalizando 1365 plantas de biogás

(CIBIOGAS, 2024). Cerca de 86% do biogás gerado pelas usinas é destinado à produção de energia elétrica. Entretanto, mesmo com a expansão do setor, o país opera apenas com 4,29% da capacidade de produção (Costa *et al.*, 2023).

A matriz energética brasileira tem o potencial de ser a mais renovável do mundo (Mathias; Silva, 2023). O setor sucroalcooleiro tem um grande potencial para geração de biogás, em decorrência dos subprodutos que são obtidos, principalmente a vinhaça. Segundo Costa *et al.* (2023), o biometano gerado em uma usina, tem a capacidade de processar 10 milhões de toneladas de cana por safra, tendo o potencial de substituir o diesel utilizado em veículos.

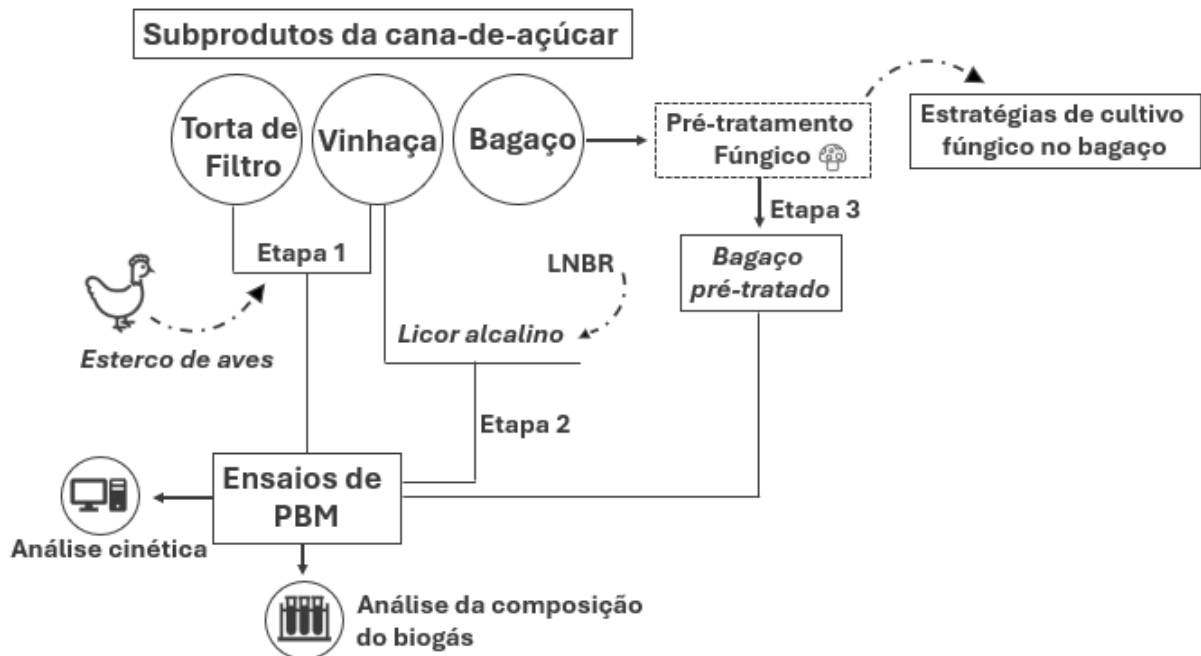
Mesmo o Brasil possuindo potencial para gerar biogás através de biodigestores e com as vantagens ambientais e econômicas no uso energético, a obtenção de biogás ainda apresenta desvantagens em relação a custos de manutenção e construção apresentando-se inviável dependendo da região (Mathias; Silva, 2023).

Desta forma, o referencial teórico abordado neste trabalho destaca o potencial dos resíduos da indústria sucroalcooleira, como a torta de filtro, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de biogás e biometano, além das alternativas promissoras para o aprimoramento dessa produção, como a co-digestão anaeróbia com resíduos do setor pecuário e o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica utilizando fungos da podridão branca. A metodologia deste trabalho permitiu explorar a relevância dessas estratégias experimentais, buscando evidenciar os benefícios ambientais e o aproveitamento energéticos desses processos. A seção metodológica a seguir detalha os procedimentos adotados para o desenvolvimento deste estudo.

4 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho foi delineada considerando diferentes estratégias de aproveitamento dos subprodutos da usina sucroalcooleira na digestão anaeróbia, considerando a integração com resíduos do setor pecuário e explorando rotas de pré-tratamento biológico para o bagaço de cana-de-açúcar. Além do aproveitamento do licor alcalino, resíduo gerado a partir do pré-tratamento químico do bagaço. Este trabalho foi dividido em três etapas principais conforme o fluxograma metodológico da Figura 6.

Figura 6- Fluxograma metodológico das etapas principais etapas desenvolvidas nesse trabalho



Fonte: Autor (2025)

Na etapa 1, também chamada de cenário base, foram realizados ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) com a integração de subprodutos da cana-de-açúcar, como a torta de filtro e vinhaça, em co-digestão anaeróbia com esterco de aves. A escolha do esterco de aves foi fundamentada nos padrões operacionais da Usina Cocal, que incorporava este resíduo em seus processos, reforçando a relevância e a aplicabilidade do estudo. O objetivo desta etapa foi otimizar as proporções e combinações destes substratos para maximizar a produção de biogás e biometano, garantindo a continuidade da produção durante o período de entressafra, quando a vinhaça, principal substrato da usina, não está disponível.

A segunda etapa do trabalho, foi a utilização de licor alcalino proveniente do pré-tratamento do bagaço de cana com NaOH, fornecidos pelo Laboratório Nacional de

Biorrenováveis (LNBR). O licor foi submetido a ensaios de PBM em sistemas de mono e co-digestão com a vinhaça. O objetivo foi avaliar o PBM do licor alcalino, investigando sua contribuição no processo de digestão anaeróbia, além de propor uma estratégia para o tratamento desse resíduo.

Na terceira etapa, foi realizado o pré-tratamento fúngico do bagaço de cana-de-açúcar, o qual foi submetido ao cultivo com o fungo *P. ostreatus* (fungo da podridão branca) para realizar o pré-tratamento biológico. O objetivo foi avaliar estratégias de pré-tratamento biológico do bagaço e o seu potencial de produção de biogás, avaliando os efeitos do pré-tratamento na digestão anaeróbia. Adicionalmente, foram exploradas estratégias de cultivo visando otimizar o pré-tratamento fúngico e realizar futuros ensaios para determinar o potencial de produção de biogás e metano.

4.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO E DOS SUBSTRATOS

O inóculo e os substratos utilizados – vinhaça e torta de filtro – para os testes de potencial bioquímico de metano (PBM) da etapa 1, assim como o bagaço de cana-de-açúcar utilizado na etapa 3, foram fornecidos pela Usina Cocal, localizada em Narandiba-SP. O inóculo utilizado nessas etapas foi obtido de um reator de mistura completa (CSTR), adaptado para o tratamento de vinhaça e torta de filtro. A coleta foi realizada em maio de 2023 e março de 2024.

O esterco de aves utilizado como co-substrato na etapa 1 foi proveniente de um sistema de produção de aves poedeiras comerciais e foi fornecido pela Usina Cocal. Embora não seja um resíduo gerado pela usina, o esterco é adquirido e utilizado em seus processos, integrando as estratégias de aproveitamento de subprodutos agropecuários.

As amostras de licor alcalino, obtidas a partir do pré-tratamento alcalino do bagaço com NaOH, foram cedidas pelo Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR). É importante destacar que, neste trabalho, apenas o licor alcalino foi utilizado como substrato nos ensaios de PBM, enquanto o bagaço pré-tratado com NaOH não foi avaliado.

O inóculo utilizado na etapa 2 foi um lodo granular proveniente de um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), adaptado para o tratamento de resíduos de matadouro de aves, cedidos pela Avícola Ideal, localizado na cidade de Pereiras –SP.

O fungo da podridão branca *P. ostreatus*, utilizado no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (etapa 3) foi obtido do laboratório de Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de linhagem 4809. Este microrganismo foi isolado a partir do bagaço de cana e conservado em meio BDA (batata dextrose ágar).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO E DO INÓCULO

Os substratos e inóculos foram caracterizados, em relação às suas características físico-químicas, de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2022). As amostras foram caracterizadas em termos de Sólidos Totais (ST), Sólidos Voláteis (SV), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Carbono Total (CT), Nitrogênio Total (NT) e pH.

4.3 ENSAIOS DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO (PBM)

Os ensaios de PBM foram conduzidos conforme a metodologia VDI 4630, que estabelece uma proporção 2:1 entre sólidos voláteis (SV) do inóculo e do substrato, respectivamente. Para as etapas 1 e 2, os ensaios foram realizados em frascos de vidro borossilicato de 250 mL com tampa de rosca e septo de borracha para vedação. Em cada frasco, foram adicionados 125 mL de volume líquido, composto por uma mistura de substratos conforme as condições experimentais propostas no item 4.4.1. O volume de headspace dos frascos foi de 125 mL, destinado ao acúmulo de biogás. Testes de controle positivo e negativo foram realizados: no controle positivo, utilizou-se celulose microcristalina como único substrato, enquanto no controle negativo, foi utilizado apenas o inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicatas, com pH ajustado para 7 (corrigido com NaOH 1M), em condições mesofílicas a 35° C, com agitação em shaker orbital a 20 RPM para o cenário base (etapa 1) e 80 RPM para o ensaio com licor alcalino (etapa 2).

Para os ensaios da etapa 3, foram utilizados frascos de penicilina de 120 mL, vedados com septo de borracha e lacre de alumínio. Em cada frasco, foram adicionados 70 mL de volume líquido, conforme as condições experimentais estabelecidas e 50 mL de headspace. Esses ensaios foram realizados em triplicata, com pH ajustado para 7, sem agitação e acondicionados em estufa a 35°C.

A determinação do volume e a coleta de biogás foram realizadas utilizando uma seringa da marca Hamilton S500, com volume total de 500 mL (etapa 1 e 2), e uma seringa hipodérmica de 60 mL da marca Descarpack (etapa 3). O biogás obtido foi acondicionado em tubos de coleta ao longo do experimento, com frequência diária nos primeiros dias de ensaios e quinzenalmente no final do experimento. O biogás armazenado foi analisado por cromatografia gasosa, utilizando o equipamento GC-2030 Nexis da Shimadzu®.

4.3.1 Ensaios em mono e co-digestão para determinação do Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

O tratamento anaeróbio do conjunto de resíduos (torta de filtro, vinhaça, esterco de aves, licor alcalino e bagaço de cana) e seu potencial energético foram avaliados em escala de laboratório, por meio de ensaios de PBM. Os ensaios realizados foram divididos em três etapas.

A etapa 1, envolveu quatro sistemas em mono e co-digestão, com variações nas proporções e combinações dos resíduos, baseadas nas práticas operacionais que eram utilizadas pela Usina Cocal. Os dados foram ajustados para otimizar a produção de biogás e avaliar estratégias para o período de entressafra. (Tabela 4). As condições B5 e B6 são os controles negativos e positivos respectivamente.

Tabela 4- Etapa 1: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630

Ensaio	Torta de Filtro (g)	Vinhaça (mL)	Esterco de aves (g)	Inóculo (mL)	Celulose (g)
B1	-	84	-	41	-
B2	3	74	-	48	-
B3	21	-	14	90	-
B4	2	70	2	51	-
B5	-	-	-	125	-
B6	-	-	-	120	5,2

Fonte: Autor (2023)

Legenda: B1 (100% vinhaça); B2 (4% torta de filtro e 96% vinhaça); B3 (60% torta de filtro e 40% esterco de aves); B4 (94% vinhaça, 3,5% torta de filtro e 2,5% esterco de aves); B5 (inóculo); B6 (celulose).

Na etapa 2, foram avaliados sistemas utilizando o licor alcalino (L), oriundo do pré-tratamento do bagaço com NaOH, e a vinhaça (V), em condições de mono e co-digestão anaeróbia (Tabela 5). Nestes ensaios, também foram realizados controles negativos (CN) e positivos (CP).

Tabela 5- Etapa 2: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630, para os ensaios de PBM utilizando licor alcalino do bagaço de cana em mono e co-digestão com a vinhaça

Ensaio	Vinhaça (mL)	Licor alcalino (mL)	Inóculo (mL)	Celulose (g)
L	-	82	43	-
V	60	-	65	-
V+L	35	35	55	-
CN	-	-	125	-
CP	-	-	122	3,46

Fonte: Autor (2023)

Na etapa 3 (Tabela 6), os ensaios em monodigestão foram realizados utilizando o bagaço de cana-de-açúcar in natura sem pré-tratamento (BI) e após o pré-tratamento fúngico sob fermentação submersa, realizado em duas condições distintas: pré-tratamento fúngico com agitação (BC) e sem agitação (BS), conforme descrito detalhadamente no item 4.5.

Tabela 6- Etapa 3: Parâmetros operacionais em termos de % SV para a proporção 2:1 (I/S) de acordo com a VDI 4630, para os ensaios de PBM utilizando bagaço de cana in natura e após o pré-tratamento fúngico

Ensaio	Bagaço in natura (g)	Bagaço pré-tratado (mL)	Inóculo (mL)
BI	4,2	-	65,8
BC	-	32	38
BS	-	32	38
CN	-	-	70

Fonte: Autora (2025)

4.3.2 Tratamento dos dados de produção de metano

Cinética

Com base nos dados experimentais da produção acumulada de metano em cada condição experimental, a equação modificada de Gompertz (Equação 1) e equação de Boltzmann (sigmoide dupla) (Equação 2), foram utilizadas para estimar dados dos parâmetros experimentais: potencial de produção de metano, taxa máxima de produção de metano e tempo da fase lag, das etapas 1 e 2 respectivamente.

$$P_{CH_4}(t) = P_{max} * \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{R_{max} * e}{P_{max}} \right) * (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Onde:

$P_{CH_4}(t)$ = é produção cumulativa de metano (NmLCH₄) no tempo,

P_{max} = é potencial produção de metano (NmLCH₄),

R_{max} = é taxa produção máximo de metano (NmLCH₄/d),

λ = é fase lag(d).

$$V_{CH_4}^{STP}(t) = V_{CH_4}^{max} \times \left(\frac{p}{1 + e^{\frac{4r_1 \times (t_1 - t)}{V_{CH_4}^{max} \times p}}} + \frac{1 - p}{1 + e^{\frac{4r_2 \times (t_2 - t)}{V_{CH_4}^{max} \times (1 - p)}}} \right) \quad (2)$$

Onde:

$V_{CH_4}^{STP}$ = é produção específica de metano (NmLCH₄/g SV) no tempo,

$V_{CH_4}^{max}$ = é volume máximo de produção de metano (NmLCH₄/g SV),

p = é a proporção dos valores da primeira e segunda sigmóide,

t_1 e t_2 = é o tempo em que a primeira e segunda sigmóide atingem os valores máximos de metano (d),

r_1 e r_2 = são os valores máximos de produção de metano que as sigmóides atingem (NmLCH₄/g SV d).

4.4 PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado utilizando o fungo *P. ostreatus*. A partir desta linhagem, conservada em meio sólido composto por BDA (batata dextrose ágar), foi realizada sua multiplicação em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (KASVI®). O meio foi preparado conforme as instruções do fabricante, sendo diluído em água destilada e autoclavado em frasco Duran a 121°C por 30 minutos. Após a esterilização, 10 mL do meio BDA foram vertidos em placa de Petri dentro de uma cabine de fluxo laminar, previamente esterilizada com álcool 70% e luz UV.

Após o esfriamento do meio de cultura, as placas foram inoculadas com fragmentos da linhagem 4809 do fungo *P. ostreatus*. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa com circulação de ar a 30°C por 7-10 dias, até a completa colonização do meio. As culturas colonizadas foram então armazenadas sob refrigeração, para posterior utilização no pré-tratamento fúngico.

A partir das culturas colonizadas, também foi realizado o crescimento do fungo em meio líquido (Figura 7). Esse crescimento foi realizado em duplicata em Erlenmeyer de 1 L, contendo 200 mL de meio composto por 2,4% de caldo de batata e 0,7% de extrato de levedura, previamente autoclavado a 121°C por 30 minutos. A inoculação foi realizada em uma cabine de fluxo laminar. Após o resfriamento do meio, 20 discos de 8 mm do micélio cultivado em placa foram adicionados a cada Erlenmeyer. Os frascos foram incubados por 15 dias a 27°C sob duas condições distintas: incubação estática e incubação com agitação a 170 RPM.

Figura 7- Crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* em meio sólido e meio líquido



Fonte: Autora (2025)

Legenda: A- Crescimento do fungo em meio sólido; B- Crescimento do fungo em meio líquido sem agitação; C- Crescimento do fungo em meio líquido com agitação.

Um método adicional de colonização, denominado de *Spawn* ou sementes, foi realizado para a inoculação do fungo. Esse método foi escolhido por ser uma alternativa mais econômica em relação ao uso de ágar, permitindo a produção de maiores quantidades de micélio colonizados. Em frascos Duran, foram adicionados cerca de 50 g de grãos de milho previamente cozidos. Os frascos contendo os grãos foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento, em uma cabine de fluxo laminar, foi realizada a inoculação dos grãos, adicionando em cada frasco três discos de 5 mm do micélio cultivado em placa de Petri. Os frascos foram fechados e armazenados ao abrigo da luz por 15 dias, até a completa colonização dos grãos pelo fungo. A Figura 8 ilustra a colonização dos grãos de milho antes da etapa de inoculação e 15 dias após o crescimento fúngico.

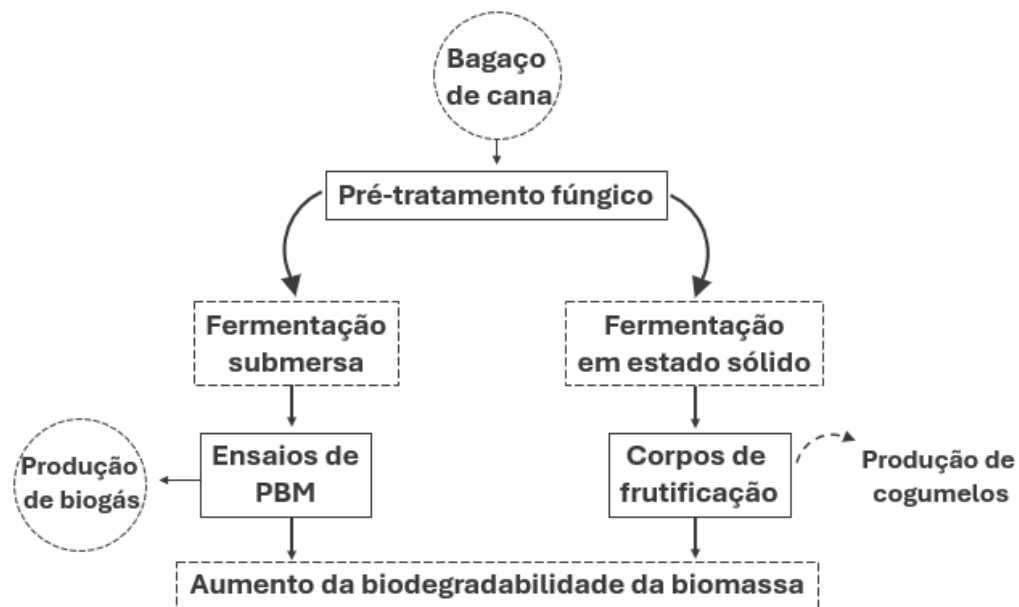
Figura 8- Colonização de Spawn do fungo *Pleurotus ostreatus*



Fonte: Autora (2025)

O pré-tratamento fúngico do bagaço de cana-de-açúcar se sucedeu a partir de duas estratégias distintas: fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). Essas abordagens tiveram como objetivo aumentar a biodegradabilidade do bagaço de cana e, conseqüentemente, melhorar seu aproveitamento em diferentes aplicações conforme o fluxograma da Figura 9.

Figura 9- Fluxograma do pré-tratamento fúngico aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Autora (2025)

4.4.1 Fermentação Submersa

A fermentação submersa foi realizada visando o crescimento do fungo em estudo em meio líquido com o bagaço de cana-de-açúcar. Esse método foi utilizado com objetivo final para obtenção do material destinado aos ensaios de PBM, avaliando sua conversão em biogás. O bagaço utilizado nesses ensaios foi triturado e peneirado em uma peneira de malha fina de 0,5 mm.

O meio de cultivo foi preparado a partir de uma solução salina proposta por Mandels e Reese (1957), composta por: 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,1 g/L de ureia; 0,3 g/L de MgSO_4 ; 0,3 g/L de CaCl_2 ; 5,0 mg/L de FeSO_4 ; 1,56 mg/L MnSO_4 ; 2,0 mg/L de CaCl_2 e 1,4 mg/L de ZnSO_4 . O meio foi enriquecido com 2% de glicose e 2% de extrato de levedura.

Após a preparação, o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 30 minutos em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio e bagaço de cana, nas condições descritas na Tabela 7. Após o resfriamento, a inoculação foi realizada em cabine de fluxo laminar, e os

frascos foram incubados por 30 dias a 26°C, de acordo com as condições experimentais estabelecidas. Nos ensaios que requeriam agitação, a incubação foi realizada a 170 RPM em shaker orbital.

Tabela 7- Condições estabelecidas para a fermentação submersa

Ensaio	Meio de cultivo	Concentração de bagaço (%m/v)	Fonte de inoculação	Condição de incubação
E1	Solução Salina	2	6 discos de 5mm	Estática
E2	Solução Salina	2	6 discos de 5mm	Agitação
E3	Solução Salina	2	10 mL do cultivo líquido em agitação	Agitação
E4	Solução Salina	2	10 mL do cultivo líquido estático	Agitação
E5	Solução Salina	2	10 mL do cultivo líquido suplementado* em agitação	Agitação
E6	Solução Salina	2	10 mL do cultivo líquido suplementado* estático	Agitação
E7	Cultivo Líquido	2	6 discos de 5mm	Agitação
E8	Cultivo Líquido	1	6 discos de 5mm	Agitação

Fonte: Autora (2025).

Legenda: *meio suplementado com 2% de glicose.

Ao final do experimento, os ensaios foram submetidos a análises de açúcares redutores totais conforme o método adaptado pela Embrapa (2013), massa seca e taxa de crescimento fúngico através da perda de matéria orgânica, a fim de verificar crescimento biológica na biomassa (Rajarithnam; Bano; Steinkraus, 1989).

Nestes ensaios, foram realizados controles experimentais em 3 condições distintas: Controle 1- solução salina sem inoculação; Controle 2- solução salina e bagaço de cana, sem inoculação; Controle 3- solução salina inoculada com seis discos de 5 mm do micélio fúngico. Esses controles foram incluídos nos ensaios para averiguar possíveis variações nas condições do meio de cultura, além de garantir que os efeitos observados fossem decorrentes da atividade fúngica sobre o bagaço de cana-de-açúcar.

4.4.2 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido foi utilizada para avaliar a capacidade do fungo *P. ostreatus* de colonizar o bagaço de cana e promover a formação de corpos de frutificação. Futuramente ensaios de PBM serão realizados a partir do bagaço pré-tratado e dos cogumelos obtidos. O bagaço foi previamente triturado e peneirado (0,5 mm), exceto na condição B5, em que foi utilizado sem trituração.

O bagaço foi suplementado em duas condições distintas:

- Bagaço + farelo de trigo: 30% (m/m) de farelo de trigo
- Bagaço + mix: 15% (m/m) de farelo de trigo + 15% (m/m) de farelo de milho.

Para tamponar o meio, em ambas as condições foi adicionado 2% (m/m) de Na_2CO_3 . A mistura foi umidificada a 80% com água destilada, acondicionada em sacos transparentes de polietileno de 500g vedados e autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento, a inoculação foi realizada em cabine de fluxo laminar, em condições axênicas, seguindo as condições estabelecidas na Tabela 8.

Tabela 8- Condições estabelecidas para a fermentação em estado sólido

Ensaio	Composição do substrato	Método de inoculação
B1	Bagaço + 30% farelo de trigo	10 discos de 8 mm
B2	Bagaço + 30% farelo de trigo	1% de Spawn
B3	Bagaço + 15% farelo de trigo + 15% farelo de milho	10 discos de 8 mm
B4	Bagaço e mix Bagaço + 15% farelo de trigo + 15% farelo de milho	1% de Spawn
B5	Bagaço sem trituração	10 discos de 8 mm

Fonte: Autora (2025).

Após a inoculação os sacos contendo o bagaço foram mantidos fechados em uma caixa, na ausência de luz, em temperatura ambiente e umidade a 80% por 30 dias, até a completa colonização do substrato. Após o período da corrida do micélio (colonização), os sacos de cultivo foram abertos e deixas sob a exposição de luz (fotoperíodo com baixa luminosidade) e circulação de ar, mantendo a umidade controlada entre 80 e 60%, até o surgimento dos corpos de frutificação (Figura 10).

Figura 10- Etapas do crescimento fúngico: fermentação em estado sólido



Fonte: Autora (2025).

Legenda: A-Bagaço de cana acondicionado no saco de polietileno; B- Sacos incubados armazenados em uma caixa; C- Desenvolvimento dos corpos de frutificação.

Ao final do período de frutificação, os cogumelos foram colhidos, e os substratos foram analisados quanto ao teor de açúcares redutores totais, eficiência biológica do cultivo em estado sólido e taxa de crescimento fúngico.

Além dos ensaios inoculados, foi realizado ensaio controle, em que o bagaço de cana foi preparado e incubado sem a inoculação, permitindo avaliar possíveis interferências externas durante o período de incubação e contaminação dos substratos.

4.4.3 Determinação de açúcares redutores totais pelo método de DNS

A determinação de açúcares redutores totais foi determinada pelo método espectrofotométrico com Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O preparo do reagente e análise das amostras seguiram o procedimento metodológico adaptado pela Embrapa (2013).

A concentração de açúcares redutores totais (ART), expressa em g/L, foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$ART = abs \times f \times d \quad (3)$$

Onde:

abs= é a média das absorbâncias lidas em 540 nm

f= é o fator de concentração

d= a diluição da amostra

O fator de concentração (Equação 4) foi determinado a partir da equação da reta da curva de calibração construída com padrões de glicose, conforme o método adaptado pela Embrapa (2013).

$$Fator = \frac{1}{coef.angular} \quad (4)$$

A determinação de açúcares redutores da fermentação submersa foi realizada a partir do caldo do cultivo, enquanto na fermentação em estado sólido essa determinação foi feita a partir do caldo extraído da biomassa. Para isso, a extração ocorreu em banho-maria a 65°C por 60 minutos, onde 1 g da biomassa foi adicionada a um béquer de 50 mL contendo 10 mL de água destilada. Após esse período, o conteúdo do béquer foi filtrado, e o caldo extraído foi utilizado para a análise de DNS.

4.4.4 Determinação da eficiência biológica e taxa de crescimento fúngico

Os substratos resultantes da fermentação em estado sólido, foram submetidos à análise de eficiência biológica do substrato (EB) (Equação 5) (Stamets, 1993). A taxa de crescimento fúngico (TCF) foi avaliada através do cálculo da perda de matéria orgânica (Equação 6) (Rajarithnam; Bano; Steinkraus, 1989).

O substrato sólido resultante da fermentação submersa foi filtrado e analisado quanto à taxa de crescimento fúngico (TCF), avaliando o crescimento da biomassa ao final do experimento.

$$EB (\%) = \frac{\text{massa fresca do cogumelo (g)}}{\text{Massa seca do substrato inicial (g)}} \times 100 \quad (5)$$

$$TCF (\%) = \frac{\text{massa seca inicial do substrato (g)} - \text{massa seca final do substrato (g)}}{\text{massa seca inicial do substrato}} \times 100 \quad (6)$$

A determinação de massa seca (Equação 7) e o teor de umidade do substrato (Equação 8) foi realizada por secagem em estufa a 105°C por 24 horas, até atingir peso constante (Rajarithnam; Bano; Steinkraus, 1989).

$$MS (\%) = \frac{\text{massa seca final (g)}}{\text{massa úmida inicial (g)}} \times 100 \quad (7)$$

$$U (\%) = \frac{\text{massa úmida inicial (g)} - \text{massa seca final (g)}}{\text{massa úmida inicial (g)}} \times 100 \quad (8)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas diferentes etapas do nosso estudo.

A etapa 1 corresponde aos ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) do cenário base, no qual foram avaliadas diferentes proporções e combinações de subprodutos da indústria sucroalcooleira e resíduo do setor pecuário em mono e co-digestão anaeróbia.

Na etapa 2, foram realizados PBM utilizando o licor alcalino cedidos pelo Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), obtidos a partir do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar em mono e co-digestão anaeróbia com a vinhaça.

Por fim, a etapa 3 avaliou o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o fungo *P. ostreatus*. Ensaios de PBM foram conduzidos com o objetivo de explorar se as rotas biológicas do pré-tratamento fúngico tiveram influência na biodegradabilidade do bagaço tratado. Ademais, nesta etapa também foram investigadas estratégias de cultivo para otimizar o pré-tratamento.

Os resultados de cada uma dessas etapas são analisados nos próximos tópicos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E INÓCULOS

A caracterização dos substratos e inóculos, em termos de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (SV), pH, demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9- Resultados médios da determinação dos parâmetros físico-químicos

Parâmetros	ST (%)	SV (%)	pH	DQO (g O ₂ /L)	COT (mg/mg)	NT _{Kjeldahl} (%)	C/N
Esterco de Aves	30±0,1	15±0,05	7,4±0,01	-	0,14±0,021	1,20	12
Inóculo Cocal	16,7±1,4	8,4±0,6	7,7±0,01	46,7±0,5	0,21±0,013	-	-
Inóculo Pereiras	5,0±2,2	4,0±2,7	7,6±0,01	46,9±0,03	-	-	-
Licor Alcalino	2,2±0,21	1,0±0,13	10,6±0,01	8,45±0,03	-	-	-
Torta de Filtro	27±0,03	17±0,02	-	-	0,25±0,001	2,30	11
Vinhaça	3,0±0,05	2,0±0,05	3,4±0,01	33,2±1,7	6,47±0,035	0,35	18

Fonte: Autor (2024)

Os inóculos provenientes da Usina Cocal e da Avícola Ideal apresentaram pH neutro, enquanto a vinhaça um pH ácido, como já esperado, devido à adição de ácido sulfúrico durante a produção de etanol na fase da fermentação.

O teor de SV é um parâmetro que indica a quantidade de material biodegradável disponível para a conversão em biogás, desde que haja equilíbrio no sistema. Quanto mais concentrado é um substrato em relação ao teor de SV, maior o potencial de produção de biogás (Hasan *et al.*, 2019). Os parâmetros recomendados para a concentração de SV para a produção de metano é 10-20 g/L (Filer; Ding; Chang, 2019).

Todos os substratos e inóculos utilizados neste estudo ficaram acima desse valor recomendado, indicando alto potencial energético desses substratos e a presença de materiais lignocelulósicos que aumentam esse teor de sólidos no caso do esterco de aves e torta de filtro.

O inóculo da Usina Cocal pode conter resíduos lignocelulósicos, o que explicaria os elevados teores de sólidos totais e voláteis observados. A presença desses materiais lignocelulósicos é corroborada pelas análises de COT, em que os valores obtidos para o inóculo foram similares aos da torta de filtro, sugerindo sua presença no inóculo. Realizar uma caracterização mais detalhada desse inóculo pode fornecer informações adicionais sobre sua composição e sua eficiência no processo de digestão anaeróbia.

Os valores de DQO da vinhaça (33,2 g O₂/L) se aproximam dos valores encontrados na literatura (20-30 g O₂/L) (Hoarau *et al.*, 2018; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015), confirmando seu alto potencial como substrato para a produção de biogás. Por outro lado, o licor alcalino apresentou um valor de DQO de 8,45 g O₂/L, o que pode estar relacionado com a presença de resíduos lignocelulósicos insolúveis em sua composição, afetando a confiabilidade deste parâmetro (Leite *et al.*, 2015; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015). Análises adicionais da composição desse licor, principalmente em termos de lignina podem fornecer justificativas dos baixos valores de DQO e sólidos observados.

Um outro parâmetro que pode ser avaliado a partir dos valores COT e NT é a relação carbono/nitrogênio (C:N) dos substratos. A relação C:N da vinhaça, se aproximou de valores encontrados na literatura, sendo que, o valor ideal da relação C:N para a produção de metano está entre 20-40:1 (Hamiki *et al.*, 2023; Janke *et al.*, 2016). O cálculo da relação C:N da torta de filtro apresentou valores inferiores aos encontrados na literatura (24-41:1) (Leite *et al.*, 2015).

O esterco de aves apresentou uma relação C:N próxima dos valores encontrados na literatura (6,7-10) (Hakimi *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024; Matheri *et al.*, 2017). Seu elevado teor de nitrogênio pode favorecer a produção de amônia durante a DA, o que pode inibir a obtenção de metano. A co-digestão anaeróbia com substratos ricos em carbono equilibra a relação C:N,

reduzindo os efeitos da produção de amônia e favorecendo a obtenção de metano.

5.2 PRODUÇÃO DE BIOGÁS E METANO

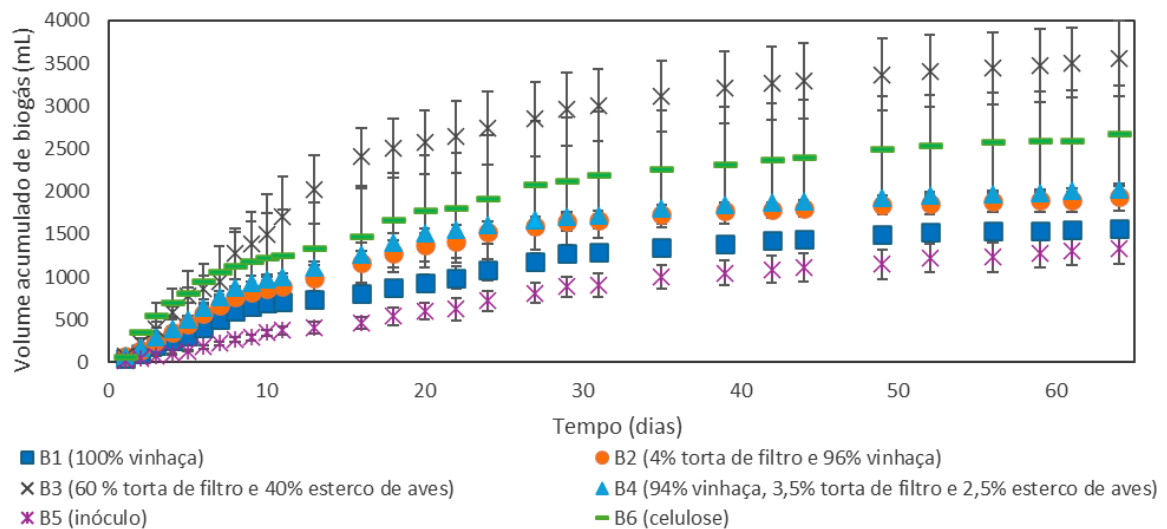
Nesta seção, são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) e análise cinética para as etapas 1 e 2 deste estudo.

5.2.1 Etapa 1: Cenário base

A Figura 11 apresenta o volume acumulado de biogás ao longo de 65 dias de operação dos ensaios de PBM do cenário base. Todos os sistemas avaliados, tanto em mono quanto em co-digestão, resultaram em produção de biogás.

A condição que apresentou o maior volume acumulado de biogás foi o ensaio B3 (60% torta de filtro + 40% esterco de aves), que atingiu 3555 mL. Em contrapartida, a monodigestão de vinhaça (B1) apresentou o menor desempenho, com 1567 mL, comportamento semelhante ao controle negativo (B5), cuja produção máxima foi de 1333 mL. O controle positivo (B6) resultou em uma produção acumulada de 2665 mL, sendo a segunda maior produção observada.

Figura 11- Produção de biogás nas diferentes proporções e combinações dos substratos avaliados na Etapa 1



Fonte: Autor (2024)

A composição do biogás, em termos de CO₂ e CH₄, está apresentada na Tabela 10. Os demais gases presentes no biogás não foram determinados. O percentual de metano variou entre

41,6% e 51,6%, com a maior concentração de CH₄ no sistema B4 (51,6%). Já a monodigestão de vinhaça (B1) resultou na menor proporção de metano (41%).

Tabela 10- Média da composição do biogás do cenário base

Composição (%)	B1	B2	B3	B4	B5	B6
CO ₂	58,4	54,5	54,8	48,4	50,6	55,0
CH ₄	41,6	45,5	45,2	51,6	49,4	45,0

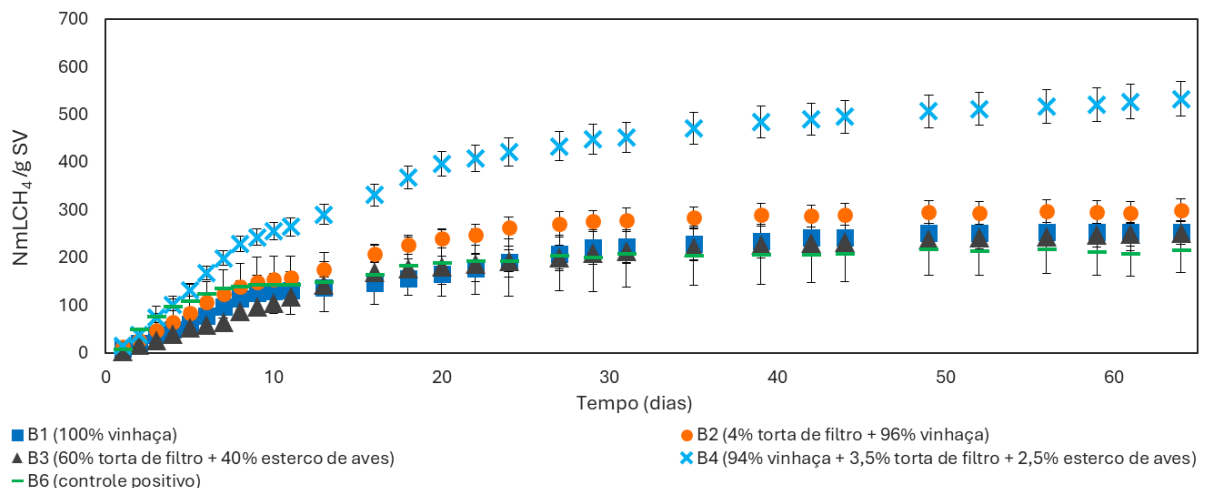
Fonte: Autor (2023)

O inóculo da Usina Cocal, coletado no reator de mistura completa (CSTR), é uma biomassa adaptada às condições de operação da usina, que envolvem a co-digestão de vinhaça, torta de filtro e pequenas proporções de esterco de aves. Dessa forma, é provável que a baixa resposta do inóculo ao sistema de monodigestão de vinhaça pode estar relacionada à falta de adaptação da biomassa à presença isolada de vinhaça como único substrato.

Por outro lado, o ensaio B4 contendo vinhaça, torta de filtro e estrume de aves, que possui maior proximidade em termos de operação com a usina, resultou no maior percentual de metano (51,6%), mesmo não sendo o cenário com o maior volume de biogás acumulado. Esse resultado sugere que a composição do substrato influencia tanto na produção de biogás quanto na qualidade do biogás produzido.

Em termos de produção específica de metano, aquela que considera a produção de gás metano em termos da quantidade de sólidos voláteis do(s) substrato(s), os resultados foram distintos dos observados para o volume acumulado de biogás (Figura 12).

Figura 12- Produção específica de metano (NmL CH₄/g SV) para as diferentes proporções e combinações de substratos da Etapa 1



Fonte: Autor (2024)

O sistema com a maior produção específica de metano foi o ensaio B4, atingindo 505 mL CH₄/g SV, seguido dos ensaios B2 (292 mL CH₄/g SV), B1 (247 mL CH₄/g SV) e B3 (241 mL CH₄/g SV).

A torta de filtro, presente na condição B2 (96% V + 4% TF), aumentou a produção de metano em relação ao cenário B1 operado em mono-digestão com a vinhaça. Esse aumento na produção de metano resultante da adição de TF pode estar atrelado a um equilíbrio nutricional na co-digestão destes substratos. No entanto, uma caracterização mais detalhada dos substratos, considerando macro e micronutrientes e frações lignocelulósicas, seria essencial para verificar sua influência na DA.

A monodigestão da vinhaça (B1) apresentou uma relação C:N de 18:1, próxima das condições ideais para a produção de metano (20-40:1) (Janke *et al.*, 2016). No entanto, sua produção específica de metano foi semelhante aos resultados das condições B2 e B3, que apresentaram valores de C:N abaixo do ideal (15 e 14, respectivamente). Esses resultados sugerem que a co-digestão desses substratos pode ter contribuído para o equilíbrio nutricional e favorecido a eficiência do processo de digestão anaeróbia. Ainda assim, análises mais detalhadas da composição dos substratos, incluindo macro e micronutrientes, podem trazer justificativas adicionais sobre a influência desses substratos na Co-DA.

O ensaio B4 (94% V + 3,5% TF + 2,5% EA) apresentou o maior rendimento de metano (505 mL CH₄/g SV), possivelmente por possuir maior proximidade com o cenário que é operado na usina, favorecendo a adaptação do inóculo. Deste modo, a sinergia entre os substratos pode ter melhorado o balanço energético do sistema e otimizado a produção de metano.

Um outro cenário que pode justificar os resultados de produção específica de metano nas condições B2 e B3 é a presença de materiais recalcitrantes na composição da TF, uma vez que, durante o processo de clarificação do caldo, há adição de pequenas quantidades de bagaço para otimizar a recuperação da sacarose durante a filtração (Janke *et al.*, 2016). No processo da DA, a hidrólise pode ser limitada pela presença de compostos como a lignina e, conseqüentemente, a produção de metano é reduzida. No entanto, no cenário B3, em que há uma maior proporção de TF (60%) em co-digestão com o EA (40%), o valor foi próximo ao cenário B2 (TF 4% + V 96%) e B1 (V 100%) esses resultados podem estar atrelados a alta proporção de material lignocelulósico (TF e EA), que pode ter causado resistência à transferência de massa, devido à maior solidez e recalcitrância desses materiais, dificultando o acesso do inóculo aos compostos biodegradáveis do substrato e conseqüentemente limitando a produção de metano.

Em um estudo foi realizado ensaios de PBM utilizando dois inóculos diferentes. O primeiro inóculo, adaptado para o tratamento de vinhaça, apresentou os seguintes resultados para a monodigestão da vinhaça e da torta de filtro: 476 e 353 NmL CH₄ g/SV, respectivamente. Utilizando um inóculo proveniente de um abatedouro de aves, os resultados obtidos para os mesmos substratos e condições foram de 507 e 262 NmL CH₄ g/SV (Volpi *et al.*, 2022). Neste estudo, a torta de filtro apresentou baixa biodegradabilidade, possivelmente devido às limitações físicas desse substrato lignocelulósico, como a maior concentração de sólidos que pode ter afetado negativamente a transferência de massa entre o inóculo e o substrato, reduzindo as interações microbiológicas essenciais ao processo da digestão anaeróbia e resultando em menores valores de PBM (Volpi *et al.*, 2022).

Análise Cinética

A análise cinética dos ensaios da Etapa 1, utilizando o modelo cinético de Gompertz modificado, apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com coeficiente de determinação (R²) acima de 95% para todas as condições avaliadas. Os parâmetros cinéticos obtidos estão representados na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos do modelo de Gompertz modificado

Ensaio	V _{máx} NmLCH ₄ /g SV	V _{Máx.} NmL CH ₄ /g SV/dia	Fase Lag λ (dia)	R ²
B1(100% vinhaça)	246,89	10,53	0	0,970
B2 (4% TF + 96% V)	292,56	15,07	0	0,991
B3 (60% TF + 40% EA)	241,13	10,28	0,14	0,989
B4(94% V+3,5% TF+2,5% EA)	505,72	23,40	0	0,983

Fonte: Autor (2024)

O ensaio B4 teve o melhor desempenho na produção de metano, alcançando um potencial máximo de 505,72 NmL CH₄/g SV e uma velocidade máxima de produção de 23,4 NmL CH₄/g SV/dia, esses resultados sugerem que a combinação desses substratos teve um bom equilíbrio nutricional e sinergia entre os substratos, sendo um cenário ideal visando um maior aproveitamento de metano no período de safra.

O ensaio B2 alcançou o máximo de produção de metano em aproximadamente 15 NmL CH₄/g SV/dia. E em ambos os cenários da etapa 1, não houve a presença de fase lag pronunciada, demonstrando a biodisponibilidade dos substratos ao inóculo na digestão anaeróbia. Os ensaios B1 e B3, obtiveram uma produção máxima de aproximadamente 10 NmL CH₄/g SV/dia, indicando que, no período de entressafra, essas condições podem ser operadas, na ausência de vinhaça. A torta de filtro apresenta alta disponibilidade de carbono, enquanto o

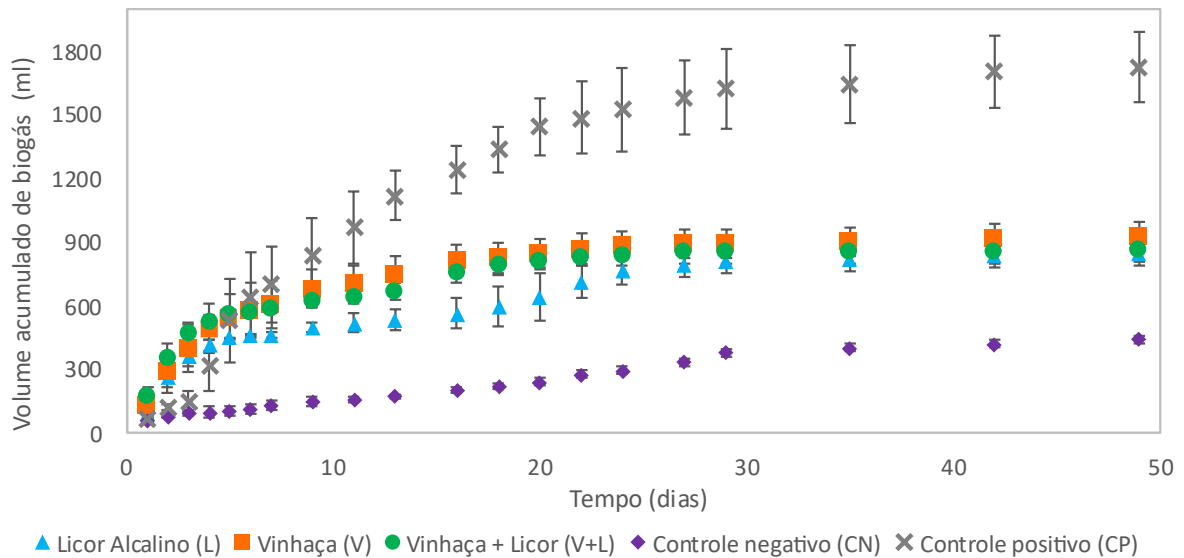
esterco de aves contém altas concentrações de nitrogênio. Essa relação pode favorecer a CoDA, atividade microbiana e o balanço energético do meio (Hakimi *et al.*, 2023; Janke *et al.*, 2016).

O cenário B3 teve uma fase lag de aproximadamente 0,14 dias, que pode estar relacionada com os teores de sólidos desses substratos (torta de filtro e esterco de aves), e uma composição de materiais lignocelulósicos que foram limitantes no processo da hidrólise, ocasionando a fase lag e possivelmente uma menor produção de metano. Ademais, por serem substratos sólidos, pode ter ocorrido interferências na transferência de massa, limitando a degradação e homogeneização desses substratos como também relatado por Volpi *et al.* (2022).

5.2.2 Etapa 2: PBM com o licor alcalino

A Figura 13 apresenta o volume acumulado de biogás ao longo de 49 dias de operação nos ensaios de PBM utilizando o licor alcalino, cedido pela LNBR.

Figura 13- Volume acumulado da produção de biogás dos ensaios de PBM com licor alcalino



Fonte: Autor (2024)

Os ensaios de monodigestão da vinhaça (V), do licor alcalino (L) e a co-digestão da vinhaça com o licor (V+L) resultaram, respectivamente, 923, 845 e 863 mL de volume acumulado de biogás.

Os percentuais de metano obtidos estão descritos na Tabela 12. O ensaio em co-digestão da (V+L) apresentou o maior percentual de metano (48%), seguido da monodigestão da vinhaça (46%), enquanto o ensaio em monodigestão do licor alcalino (L) resultou em 44% de metano.

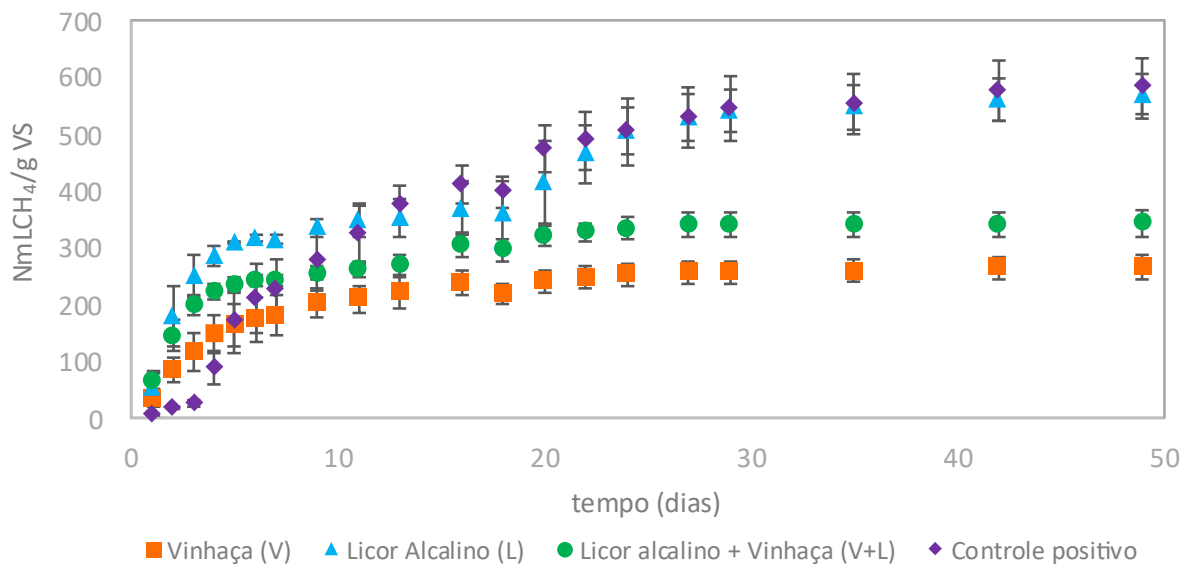
Tabela 12- Média da composição do biogás nos ensaios com licor alcalino

Composição (%)	V	L	V+L	CN	CP
CH ₄	46	44	48	40	44
CO ₂	54	56	52	60	56

Fonte: Autor (2024)

Os resultados da produção específica de metano em termos da quantidade de sólidos voláteis do(s) substrato(s) apresentaram um comportamento gráfico diferentes aos observados para o volume acumulado de biogás (Figura 14). O ensaio em monodigestão do licor alcalino (L), obteve o maior resultado na produção específica de metano (568 mL CH₄/g SV), seguida da co-digestão da vinhaça com o licor (V+L) (344 mL CH₄/g SV), enquanto a monodigestão da vinhaça (V), apresentou valor de 267 mL CH₄/g SV.

Figura 14- Produção específica de metano dos ensaios com licor em co-digestão com vinhaça



Fonte: Autor (2024)

A produção específica de metano do licor alcalino é caracterizada por um padrão de duas fases sigmoides. No sistema de co-digestão, a presença desse padrão sigmoidal duplo foi menos observada em comparação com o formato da curva observado no sistema de monodigestão do licor alcalino. O formato da curva com duas fases distintas de produção de metano pode ser atribuído à presença de compostos lignocelulósicos insolúveis como a lignina, que podem se tornar solúveis ao longo dos ensaios de PBM, influenciando a disponibilidade de substratos para as *arqueas* metanogênicas.

Análise cinética

A análise cinética dos ensaios da Etapa 2, com o licor alcalino, foi realizada aplicando o método de Boltzmann, devido a presença de uma dupla sigmoide, que indica que há duas fases de produção específica de metano. Esse método de análise é considerado o mais adequado para o ajuste dos dados de PBM, conforme estudos de Volpi *et al.* (2022).

Os dados apresentaram um bom ajuste ao modelo cinético de Boltzman, conforme os parâmetros descritos na Tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros cinéticos do modelo de Boltzman

Ensaio	$V_{\text{máx}}$ (NmL CH ₄ g/ SV)	t_1 (d)	t_2 (d)	$CH_4 \text{ max}$ (NmL CH ₄ g/ SV d)		R^2
				r_1	r_2	
V	267,5	3,0	4,4	193,2	7,7	0,97
L	568	2,8	11,3	109,7	10,0	0,97
V+L	344,6	2,8	2,1	107,3	7,9	0,97

Fonte: Autor (2024)

No processo de DA, a vinhaça é um substrato de fácil degradação, possuindo respostas rápidas à produção de metano, pois a etapa de hidrólise não é limitante para esse substrato, tendo sua fase de estabilização rapidamente alcançada. O licor alcalino, diferentemente da vinhaça, não possui rápida biodegradabilidade, possuindo uma maior disponibilidade de compostos orgânicos inibidores, como os derivados do furfural e resíduos lignocelulósicos que podem ser gerados durante o pré-tratamento alcalino.

Esse resultado pode ser observado a partir dos parâmetros cinéticos dos tempos de inflexão das curvas sigmoidais (t_1 e t_2), onde o ensaio com licor alcalino (L) apresentou um tempo de produção máxima de metano mais prolongada. Esse resultado pode estar associado a presença de compostos inibidores, como os derivados de furfural ou resíduos lignocelulósicos, que podem dificultar a etapa inicial da hidrólise e retardar ou inibir a conversão dos substratos em metano.

Entretanto, a menor taxa de degradação inicial observada no licor alcalino (109,7 NmL CH₄ g/ SV d) em comparação com a taxa de degradação inicial da vinhaça (193,2 NmL CH₄ g/ SV d) pode estar relacionada ao maior volume acumulativo de metano do ensaio com licor (L). Esse resultado sugere que, ao longo do tempo de operação, os substratos se tornaram mais biodisponíveis para a degradação no processo da digestão anaeróbia, compensando a limitação inicial imposta pela presença de compostos inibidores e ou recalcitrantes no licor alcalino.

O licor alcalino (L) teve sua máxima de produção de metano, atingindo 568 NmLCH₄/g

SV. A co-digestão (V+L) obteve um valor intermediário de 345 NmLCH₄/g SV, enquanto a monodigestão da vinhaça resultou em 268 NmLCH₄/g SV. Esses resultados indicam que a integração desses substratos influenciou significativamente a produção de metano. Entretanto, para entender a influência desses substratos na obtenção de metano, análises mais detalhadas de caracterização do licor alcalino e da vinhaça, bem como do inóculo utilizado neste ensaio são necessárias para aprimorar essa discussão.

5.3 ETAPA 3 – PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

O pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado utilizando o fungo *P. ostreatus*, visando aumentar a biodegradabilidade da biomassa para produção de biogás. Nesse contexto, foram abordadas duas estratégias de cultivo fúngico no bagaço: Fermentação submersa (FSm) e Fermentação em estado sólido (FES) conforme descrito no item 4.4.

A partir dos testes realizados na FSm, duas condições foram selecionadas para os ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM), permitindo a comparação da produção de biogás entre as condições de pré-tratamento e com o bagaço sem pré-tratamento. Futuramente, serão realizadas ensaios de PBM a partir das condições resultantes da FES.

Logo, esta seção está organizada em três partes principais: i- Fermentação submersa; ii- Produção de biogás a partir do pré-tratamento biológico; iii-Fermentação em estado sólido.

5.3.1 Fermentação Submersa

Neste estudo, após 30 dias, oito condições de cultivos realizadas no bagaço de cana-de-açúcar e três condições de controle foram avaliadas após a fermentação submersa (FSm) (item 4.4.1). Os cultivos foram caracterizados quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART) no caldo de fermentação, taxa de crescimento fúngico (TCF) e massa seca (MS), conforme apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Caracterização do bagaço após o pré-tratamento biológico em fermentação submersa

Ensaio	ART (g/L)	MS (%)	TCF (%)
E1	0,9±0,01	12,64±0,20	29,78±0,01
E2	6,7±0,16	9,28±0,13	-4,78±0,02
E3	0,5±0,01	10,27±0,01	-1±0,01
E4	0,3±0,01	4,9±0,01	-11±0,3
E5	0,6±0,01	5,46±0,02	-13±0,21
E6	0,4±0,21	7,63±0,01	-22±0,02
E7	1,3±0,01	3,44±0,34	-15±0,1
E8	0,8±0,01	9,64±0,32	32±1,4
C1	3,0±0,11	-	-
C2	5,4±0,14	-	-
C3	5,9±0,11	-	-

Fonte: Autor (2025)

A fermentação submersa é amplamente utilizada quando se quer obter e avaliar extratos enzimáticos (Datsomor *et al.*, 2022). Porém, neste trabalho não foi avaliada atividade enzimática nem quantificado possíveis extratos enzimáticos produzidos durante a FSM.

A avaliação da concentração de açúcares redutores totais (ART) nos controles, foi necessária para a comparação com os cultivos fúngicos. O C1 representa o controle abiótico, contendo apenas a solução salina, e apresentou 3,0 g/L de ART. Essa concentração de açúcares possivelmente são resultantes do enriquecimento de 2% de glicose e extrato de levedura que foram adicionados à solução salina (item 4.4.1).

Já o C2 (abiótico) que contém a solução salina e o bagaço de cana, apresentou uma concentração de 5,4 g/L de ART, este resultado indica que durante o período do ensaio, foi liberado açúcares da biomassa, além dos açúcares que já estavam presentes na solução salina conforme o resultado de ART do C1. A liberação desses açúcares pelo bagaço, pode ter ocorrido logo no início do processo, após a autoclavagem, ou pode ter sido favorecida pela agitação vigorosa e o longo tempo de cultivo. Essa discussão pode ser complementada fazendo uma análise periódica da produção de açúcares desse ensaio ao longo de 30 dias, incluindo uma logo após o processo de autoclavagem.

O C3 foi realizado para avaliar o comportamento do fungo na presença da solução salina sem a adição do bagaço. Os resultados desse ensaio foi de 5,9 g/L de ART, indicando que além da concentração de açúcares presente no meio, conforme os resultados do controle C1, houve atividade metabólica do fungo no meio, possivelmente associada à produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas, características dos fungos causadores de podridão branca (Datsomor *et al.*, 2022).

Os ensaios E7 e E8 foram os únicos em que a solução salina não foi utilizada como meio

de cultura. Nesses ensaios, o cultivo do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em meio líquido com caldo de batata e extrato de levedura, conforme detalhado na metodologia (item 4.4.1). A principal variável nesses cultivos foi a quantidade de massa de bagaço que foi adicionada. No ensaio E7 foram adicionadas 2% (m/v) e no ensaio E8 1% (m/v) de bagaço, o que pode ter influenciado a taxa de crescimento fúngico (TCF) e na disponibilidade de açúcares no meio.

Os resultados de TCF do ensaio E7, mostram que não houve crescimento fúngico e o resultado negativo indica que houve perda de massa durante o processo. A perda de massa pode estar relacionada com falhas durante o processo de filtração, em que a biomassa pode ter ficado aderida nas paredes do Erlenmeyer ou no funil de filtração. No entanto, o ensaio E8 apresentou uma TCF de 32%, esse resultado sugere que houve atividade fúngica na FSm. Contudo, esse resultado pode estar relacionado somente ao crescimento micelial do fungo e não pela interação com os componentes lignocelulósicos do bagaço, pois o meio utilizado para crescimento (caldo de batata e extrato de levedura) é uma fonte nutricional para o desenvolvimento do fungo (Rawte; Diwan, 2011), favorecendo as condições de crescimento.

O ensaio E7 não apresentou crescimento, mesmo sendo realizado nas mesmas condições que o ensaio E8, com exceção da massa de bagaço que foi adicionada. A primeira hipótese para a diferença desses resultados é que ao adicionar o bagaço em maior quantidade, o meio de cultivo pode ter ficado supersaturado de nutrientes, causando a inibição do fungo. Essa hipótese pode ser justificada pela concentração de açúcares redutores no meio. O ensaio E8 teve crescimento positivo e uma concentração de açúcares redutores totais de 0,8 g/L, enquanto o ensaio E7 teve o dobro de bagaço adicionado, sem resposta de crescimento fúngico e uma concentração maior de ART (1,3 g/L), indicando que o meio pode ter ficado supersaturado de nutrientes causando a inibição do microrganismo.

Uma segunda hipótese pode ser sugerida que, ao adicionar o dobro de bagaço no ensaio E7, o mesmo pode ter criado barreiras físicas no meio, dificultando a disponibilidade de oxigênio e a dispersão do micélio no meio líquido. Para testar essas hipóteses, sugere-se a realização de ensaios de controle abiótico, desse cultivo com análise de concentração de ART, a fim de avaliar a concentração de açúcares presentes no meio. Ademais, ensaios variando a quantidade de bagaço adicionada também são recomendadas, pois podem fornecer respostas mais conclusivas sobre o impacto desse parâmetro no crescimento fúngico.

Por outro lado, os ensaios com bagaço que foram cultivados com solução salina, tanto em cultivo estático (E3) quanto sob agitação (E4), quando comparados com ensaios suplementados com glicose (E5 e E6) em incubação estática e em agitação, respectivamente, não apresentaram crescimento fúngico. Os valores negativos da taxa de crescimento fúngico

(TFC) nesses ensaios, sugerem que houve perda da massa inicial do bagaço adicionada ao meio. Esse resultado pode ser consequência de perda de biomassa durante a filtração ou até uma possível biodegradação parcial do bagaço sem crescimento fúngico expressivo.

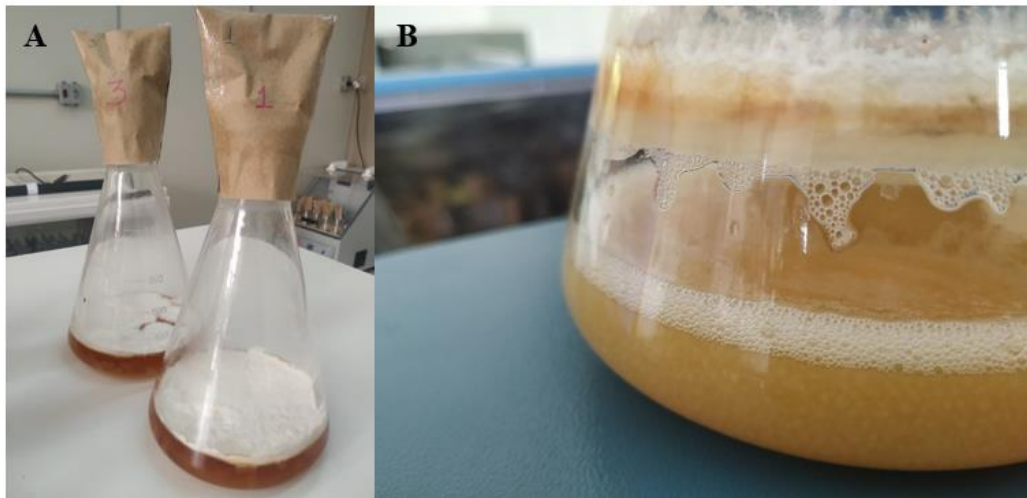
Nos ensaios E3, E4, E5 e E6, a inoculação foi realizada a partir de 10 mL do cultivo em meio líquido, esse meio normalmente proporciona condições ideais para o crescimento fúngico, como sugerido nos resultados do ensaio E8. Uma hipótese, que pode estar relacionada ao baixo crescimento nesses ensaios, é que, ao ser adicionado ao meio de cultura, o fungo já está com seu metabolismo ativo, consumindo rapidamente todo o açúcar disponível no meio. Como não houve mais fontes nutricionais de fácil degradação provenientes do bagaço, o metabolismo do fungo foi inibido rapidamente, não conseguindo degradar a biomassa. Essa hipótese explica a redução dos ART presentes na solução salina e o não crescimento representativo na TCF.

Por outro lado, o metabolismo do fungo pode ter sido inibido pela presença do bagaço, pois outro fator que pode estar atrelado a essa condição é a relação C/N do meio nutricional, que pode causar repressão catabólica quando a concentração de um desses elementos estão em maiores concentrações (Durán-Sequeda *et al.*, 2021). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta uma relação C:N de 90-101:1 (Janke *et al.*, 2016b), logo possivelmente a atividade metabólica do fungo pode ter sido inibida pela presença de altas concentrações de carbono no meio.

Entretanto, para melhor clareza e fundamento dessas discussões, sugere-se que análises estatísticas sejam realizadas para verificar se há diferenças significativas entre esses cultivos em relação às variáveis de agitação e suplementação. Além disso, análises de extrativos enzimáticos e metabólitos do fungo também podem ajudar nas discussões desses ensaios, bem como a relação C/N do bagaço e do meio de cultivo ao longo do processo experimental.

O crescimento fúngico em cultivo líquido, pode apresentar crescimento disperso ou formar aglomerados micelial. A Figura 15 ilustra o crescimento do fungo *P. ostreatus* em meio líquido sem agitação (A), em que houve a formação de um crescimento aglomerado superficial e crescimento em meio líquido com agitação (B), onde o crescimento micelial foi mais disperso no meio (formação de pellets).

Figura 15- Crescimento micelial em meio líquido sem agitação e com agitação



Fonte: Autora (2025)

Em estudo foi comparado a produção de metabólitos secundários gerados do crescimento micelial fúngico, a partir de crescimento em meio líquido, crescimento sólido em ágar e crescimento sólido em ágar com esferas de vidro, o crescimento sólido obteve os melhores resultados de produção de metabólitos secundários, enquanto no cultivo líquido não foi determinado a presença de metabólitos secundários (Droce *et al.*, 2013).

Os ensaios E1 e E2, tiveram como fonte de inoculação fragmentos do micélio cultivados em ágar. Embora a taxa de crescimento fúngico não tenha sido relevante na condição E2, o ensaio E1 teve crescimento expressivo, resultado este próximo ao observado no ensaio E8. A variante entre os ensaios E1 e E2 está na forma de incubação, onde o ensaio E1 foi incubado de maneira estática e o ensaio E2 em agitação.

O ensaio E1 apresentou uma concentração de açúcares redutores totais (ART) de 0,9 g/L, indicando atividade fúngica e consumo de açúcares presentes no meio, o que se refletiu na taxa de crescimento fúngico (TFC) de 29,8%. Uma possível explicação para esse resultado é que o fungo foi inoculado a partir de micélio previamente cultivado em placa de Petri, que permanece armazenado sob refrigeração para conservação. Embora o cultivo tenha ocorrido a 26°C, o micélio armazenado em temperaturas mais baixas pode ter possivelmente apresentado uma retomada metabólica mais lenta no início do ensaio, favorecendo uma adaptação mais gradual ao meio estático e, conseqüentemente, à degradação progressiva dos açúcares

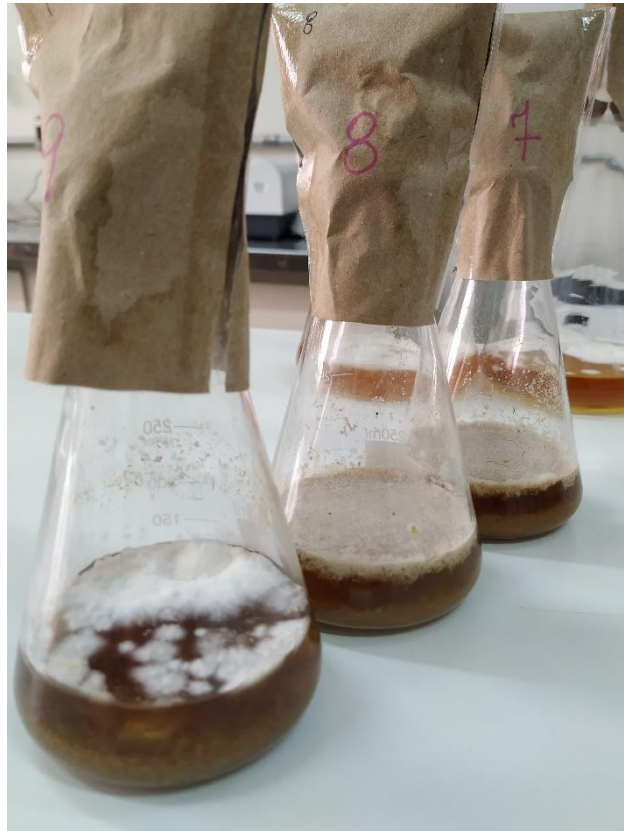
Em contrapartida, o ensaio E2, ocorre sob agitação vigorosa, podendo ter promovido o cisalhamento das hifas fúngicas e não tendo atividade de crescimento neste ensaio. Essa hipótese pode ser reforçada pela concentração de açúcares retores totais, que não foi consumido ao longo do experimento, logo, o fungo não teve crescimento nesse meio e conseqüentemente

não houve efeitos na degradabilidade no bagaço.

No entanto, sugere-se análises complementares para compreender esses cenários, como análises de atividade enzimáticas e caracterização em termos de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, que podem fornecer informações sobre o potencial de degradação da biomassa.

Durante o crescimento estático, os micélios fúngicos não ficam em contato direto com o bagaço, por serem microrganismos aeróbios, o crescimento ocorre acima do líquido, em que há maior disponibilidade de oxigênio. Logo, uma análise enzimática para verificar se há atividade lignocelulolítica no meio, e o quanto essas enzimas conseguem degradar a biomassa sem a necessidade de agitação são necessárias. A Figura 16, demonstra essa preocupação em relação ao cultivo estático, em que é possível observar que o crescimento fúngico ocorre principalmente na superfície do meio de cultura, sem contato direto com o bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 16- Cultivo líquido com crescimento estático



Fonte: Autora (2025)

Um estudo investigou a influência de fatores físico-químicos na produção de lipase com o fungo *B. bassiana*, que foi cultivado sob cinco condições distintas de agitação: cultivo

estático, 50, 100, 150 e 200 RPM. Os resultados desse estudo demonstraram um aumento de 98 vezes na atividade da lipase em 100 RPM comparado ao cultivo estático, tendo esta produção inibida com o aumento da agitação, possivelmente ocasionado pelo cisalhamento das hifas do microorganismo (Vici *et al.*, 2013).

Na literatura, não foram encontrados estudos que investiguem diretamente os efeitos da agitação na biodegradabilidade de fungos causadores da podridão branca na biomassa lignocelulósica. No entanto, a produção de lacases por fungos da podridão branca, pode ser influenciada por agitações e ou aerações altas, diminuindo sua produção enzimática (Tinoco-Valencia *et al.*, 2014). Dessa forma, deve haver um equilíbrio entre a agitação e o crescimento do micélio, visto que, esse pode ser um dos fatores que influenciam na eficiência do metabolismo fúngico e conseqüentemente, na degradação da biomassa lignocelulósica.

Portanto, considerando que a condição E1 apresentou a melhor taxa de crescimento fúngica, e que a condição E2 manteve a concentração de açúcares redutores sem consumo significativo, essas condições foram escolhidas para conduzir os ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM), permitindo a comparação entre esses pré-tratamentos e com o bagaço sem pré-tratamento.

5.3.2 Potencial Bioquímico de Metano a partir do pré-tratamento biológico

Os ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) foram conduzidos utilizando os ensaios E1 e E2, que neste tópico, terão sua nomenclatura alterada para BS (bagaço sem agitação) e BC (bagaço com agitação), respectivamente.

Os substratos e o inóculo foram caracterizados em termos de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e pH. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

É importante destacar que a caracterização e os ensaios de PBM foram conduzidos utilizando todo o cultivo resultante do pré-tratamento (caldo e bagaço), sem nenhuma filtração prévia. Os frascos foram homogeneizados antes de realizar os experimentos para garantir uma distribuição homogênea do caldo e do bagaço.

Tabela 15- Caracterização média dos substratos e inóculo

Parâmetros	ST (%)	SV (%)	pH
Bagaço pré-tratado sem agitação	4,1±0,8	3,5±0,6	5,83±0,01
Bagaço pré-tratado com agitação	4,0±1,5	3,4±1,1	6,36±0,01
Bagaço sem pré-tratamento	95±0,03	90±0,05	-
Inóculo Cocal	10,1±1,8	5,8±1,4	7,2±0,01

Fonte: Autor (2025)

O inóculo utilizado apresentou valores de sólidos voláteis acima dos recomendados por Filer, Ding e Chang (2019). Esse resultado pode estar atrelado a presença de materiais lignocelulósicos no reator CSTR da Usina Cocal, conforme já discutido anteriormente (item 5.1).

Os valores de pH dos cultivos após o pré-tratamento biológico do bagaço apresentaram valores relativamente próximos. O pH mais baixo observado no bagaço pré-tratado sem agitação pode estar associado à produção de ácido orgânicos e outras substâncias metabólicas pelo fungo *P. ostreatus* durante o pré-tratamento, sendo comum em processos de degradação lignocelulósica realizada por microorganismos (Khan; Ahring, 2019).

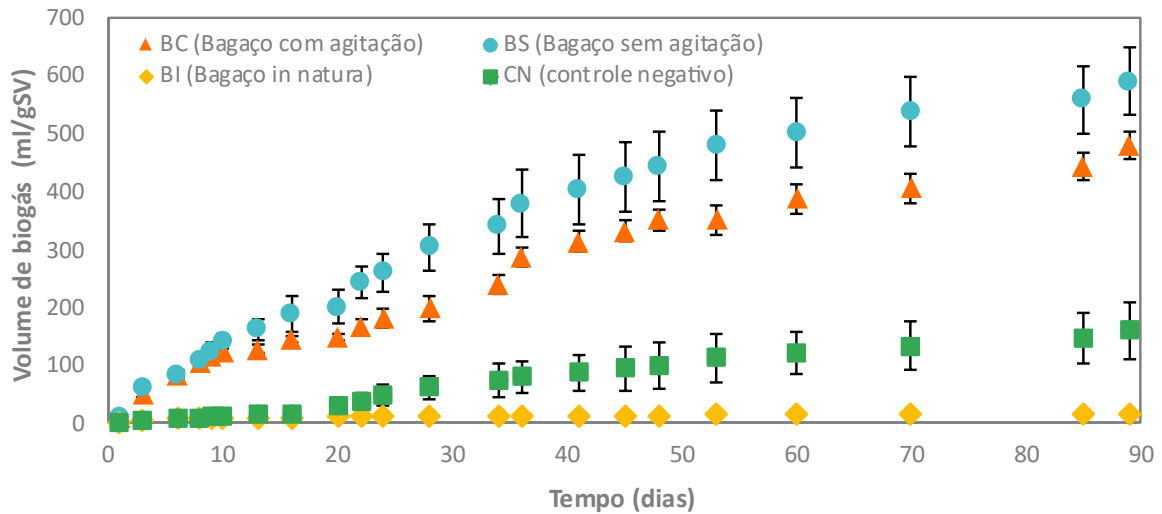
Os valores de ST e SV após o pré-tratamento fúngico foram semelhantes nas condições sem agitação e com agitação. Os valores correspondentes ao ensaio sem agitação, foram um pouco maiores devido a taxa de crescimento fúngico observados nestes ensaios, entretanto uma análise estatística seria interessante para verificar se há diferença significativa do ponto de vista experimental entre os sólidos do cultivo.

O bagaço in natura (sem pré-tratamento) apresentou valores altos de ST e SV, visto que, 70 a 85% de sua estrutura é composta por compostos lignocelulósicos recalcitrantes (Sawatdeenarunat *et al.*, 2015). Contudo, os resultados de sólidos obtidos do bagaço in natura, não devem ser comparados diretamente com os sólidos do cultivo do pré-tratamento, pois como mencionado anteriormente, o pré-tratamento fúngico foi conduzido utilizando todo o cultivo (caldo e bagaço).

Um dado interessante, para estudos futuros seria a realização de análises separadas do caldo e do bagaço filtrado, permitindo resultados mais promissores sobre a eficiência do pré-tratamento e substratos enzimáticos que podem estar solubilizados no meio líquido. No entanto, no presente estudo, esta abordagem não pode ser adotada, pois a quantidade de bagaço adicionado aos cultivos é pouca (2% m/v). Para que essa análise fosse mais promissora, seria necessário realizar os cultivos em biorreatores de maior escala, para obter uma quantidade significativa de biomassa suficientes para as análises replicadas de sólidos.

A Figura 17 apresenta o volume acumulado de biogás em termos de sólidos voláteis dos ensaios de PBM, utilizando o bagaço pré-tratado com e sem agitação e o bagaço in natura.

Figura 17- Volume acumulado da produção de biogás dos ensaios de PBM do pré-tratamento biológico



Fonte: Autora (2025)

Os ensaios conduzidos com o bagaço in natura obtiveram volume acumulado de biogás de 14,55 mL g/SV. Esses ensaios foram realizados de forma paralela, com o objetivo de compor a discussão comparativa dos dados obtidos nos ensaios com bagaço pré-tratado.

Por outro lado, os ensaios conduzidos com o bagaço pré-tratado (com agitação e sem agitação) e o controle negativo, apresentaram uma produção acumulada de biogás de 480 mL g/SV para os ensaios BC (com agitação) e 591 mL g/SV para o ensaio BS (sem agitação).

Os ensaios com o bagaço pré-tratado sem agitação demonstraram mais eficiência na produção de biogás, quando comparado ao ensaio conduzido em agitação e ao ensaio com o bagaço sem pré-tratamento já encerrado. Esse resultado do ensaio BS pode estar relacionado com a degradação da biomassa lignocelulósica, visto que, no cultivo, o fungo já havia consumido boa parte dos açúcares presentes na solução (0,9 g/L de ART). Esse comportamento sugere que o consórcio microbiano da digestão anaeróbia, pode estar utilizando a biomassa degradada pelo fungo para a produção de biogás.

Diferente do resultado observado no BS, o ensaio BC (realizado com agitação), apresentou ao final do cultivo 6,7 g/L de açúcares redutores totais. Como os carboidratos solúveis, são hidrolisados rapidamente no processo da digestão anaeróbia, é então provável que o resultado da produção de biogás no ensaio BC seja resultado dos açúcares que estavam disponíveis na solução.

Os resultados indicam que houve eficiência na biodegradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar, e que comparado ao ensaio em agitação, o pré-tratamento estático é o que demonstrou maior conversão da biomassa lignocelulósica em biogás. Entretanto, análises de

caracterização antes e após o pré-tratamento fúngico em termos de lignina, celulose, hemicelulose, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises de atividade enzimática, são fundamentais para entender se ocorreu a quebra da estrutura lignocelulósica após o pré-tratamento e sua relação na produção de biogás. Ademais, análises da composição do biogás também são necessárias determinar a concentração de metano no biogás, relacionando todos os parâmetros com a biodegradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar.

5.3.3 Fermentação em Estado Sólido

Em termos de produção e recuperação de enzimas extracelulares, a fermentação submersa (FSm) permite um maior controle dos parâmetros operacionais, o que facilita a quantificação e determinação enzimática. No entanto, do ponto vista comercial, a FSm é limitada devida à baixa concentração dos extratos enzimáticos produzidos, tornando este processo mais caro (Yoon *et al.*, 2014).

Por outro lado, a fermentação em estado sólido (FES) pode reduzir custos operacionais e suprir as lacunas que são encontradas na FSm. A FES é um processo que ocorre na ausência livre de água em que o microrganismo se desenvolve em uma fonte natural de carbono como por exemplo, a biomassa lignocelulósica (Sala *et al.*, 2019).

Neste estudo, foram avaliadas cinco condições distintas de fermentação em estado sólido no bagaço de cana-de-açúcar, conforme descrito no item 4.4.2. O bagaço derivado da FES foi caracterizado quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART), taxa de crescimento fúngico (TCF) após a corrida micelial e a eficiência biológica (EB). Os resultados da caracterização estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Caracterização do bagaço após pré-tratamento biológico em FES

Ensaio	ART (g/L)	TCF (%)	EB (%)
B1	0,7±0,01	23±0,01	5,0±0,01
B2	-	18±0,01	11,0±0,01
B3	0,5±0,001	27±0,01	41,62±0,01
B4	-	18±0,01	35,6±0,01
B5	-	47±0,01	-
CN	0,3±0,003	-	-

Fonte: Autor (2025)

A determinação da taxa de crescimento fúngico (TCF%) foi adaptada para uma base de cálculo considerando a massa úmida do bagaço (6,8%). Como os sacos de cultivo foram mantidos em condições axênicas, a realização de análises diretas da massa seca ao longo do

experimento não foi realizada. Além disso, o volume elevado de substrato nos sacos dificulta a estimativa precisa do consumo ao longo do tempo. Ainda assim, os valores obtidos refletem o comportamento do crescimento fúngico dentro das condições estabelecidas.

Em relação à determinação de açúcares redutores totais (ART), os valores obtidos referem-se aos açúcares solubilizados em água (item 4.4.3), no entanto, não foi possível determinar os ART nos sólidos da biomassa, uma vez que a extração foi realizada apenas nos açúcares solúveis na água.

Essas desvantagens presenciadas na FES, também são relatados em um estudo realizado por Sala *et al.* (2019), em que parâmetros de operação como pH, temperatura, umidade, condições nutricionais etc. foram acusados como desvantagem desse processo.

Desta forma, por se tratar de um estudo inicial, os resultados apresentados serão baseados apenas na descrição do procedimento metodológico e dos resultados visuais observados ao longo do tempo.

O processo de inoculação mais usual no processo de FES é a inoculação da cultura fúngica em grãos de cereais cozidos, esse processo é conhecido como Spawn ou produção de sementes fúngicas. Neste estudo a produção de sementes foi realizada a partir de grãos de milho, previamente cozidos, que foram incubados por 15 dias até a sua completa colonização. A Figura 18, demonstra a colonização dos grãos de milho durante 15 dias, antes do cozimento do grão do milho (A), cinco dias após a incubação (B) e após 15 dias até a completa colonização dos grãos pelo fungo *P. ostreatus* (C).

Figura 18- Produção de Spawn em grãos de milho

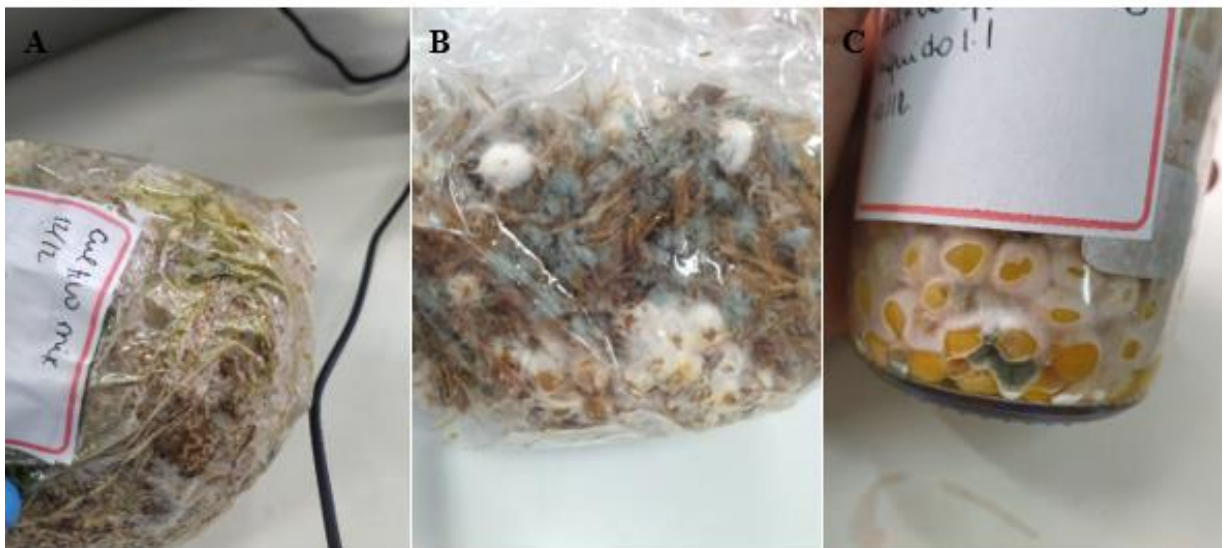


Fonte: Autora (2025)

As sementes de grãos, geralmente são utilizadas como meio suporte, pois grande parte dos cereais apresentam condições nutricionais essenciais para o desenvolvimento do micélio fúngico, além de reduzir custos e serem mais disponíveis. Porém, Sala *et al.* (2019), aponta o uso de grãos como uma desvantagem desse processo, pois representa uma redução na quantidade de alimentos disponíveis para consumo.

Em nosso estudo, dois cultivos com o bagaço inoculado com as sementes apresentaram contaminações. Essas contaminações podem ser decorrentes de um processo de autoclavagem com tempo de esterilização ineficaz para os grãos de milho, visto que é comum a presença de agentes patogênicos nesses grãos. Essa contaminação foi confirmada visualmente em um dos cultivos de sementes, em que foi observada a presença de contaminantes, conforme a Figura 19.

Figura 19- Presença de contaminantes nos cultivos



Fonte: Autora (2023)

Legenda: A: contaminação 10 dias após o processo de incubação no bagaço suplementado com farelo de milho e trigo. B: contaminação no bagaço de cana após 12 dias da incubação. C: contaminação das sementes de milho observados após 8 dias do período de incubação

A inoculação dos sacos de cultivos, também foram realizadas com fragmentos de micélio inoculados em placa de Petri, e não foram observadas fontes de contaminação a partir desse método. Entretanto, como não foi realizada nenhuma análise eficiente dos substratos, não é possível comparar se houve diferenças em termos de biodegradabilidade ou taxa de crescimento fúngico relevantes entre essas duas formas de incubação.

O processo de incubação foi realizado ao longo de 30 dias, armazenados em uma caixa organizadora escura, de forma que, durante o período de incubação não houvesse exposição à

luz. Após 30 dias, foi possível verificar uma maior colonização fúngica no substrato na superfície dos sacos de cultivo, que foram abertas para permitir a evolução dos primórdios e frutificação dos cogumelos (Figura 20). Nos casos em que a concentração micelial ocorreu de forma axial nos sacos de polietileno, um corte foi realizado na lateral dos sacos para favorecer a evolução dos primórdios e crescimento dos cogumelos.

Figura 20- Colonização superficial completa dos sacos de cultivo com bagaço e controle negativo sem a presença visual de contaminantes



Fonte: Autora (2025)

Para a fase de frutificação, uma estufa de cultivo foi construída a partir de telas aramadas para acomodação dos sacos de cultivo para a frutificação (Figura 21). O suporte foi envolvido com papel filme, com o objetivo de ajudar a manter a umidade no interior da estufa e evitar a entrada de insetos. Diferente da incubação, que ocorre na ausência de luz e com baixa oxigenação, a etapa de frutificação requer condições específicas, como exposição a baixa luminosidade, temperatura controlada entre 22 e 26°C e umidade entre 80 e 60% (Magalhães; Moreira; Zied, 2018). Para o monitoramento dessas variáveis, um termo-higrômetro foi alojado dentro da estufa, permitindo o acompanhamento da temperatura e umidade.

Figura 21- Construção de uma estufa para favorecer a frutificação dos cogumelos



Fonte: Autora (2025)

Durante a fase de frutificação, a manutenção da umidade no interior da estufa foi inicialmente realizada por aspersões manuais de água, utilizando um borrifador uma vez ao dia. Entretanto, esse método não foi o suficiente para manter a umidade mínima necessária de 60%.

Para solucionar esse problema, foi utilizado um umidificador de ar acoplado a um controlador Arduino, programado para nebulizar água por um minuto a cada hora. Com essas modificações, a umidade foi mantida de forma constante em torno de 80%, garantindo condições ideais para o desenvolvimento dos cogumelos.

No 7º dia após o início da frutificação, foi observado o surgimento dos primeiros corpos de frutificação, que atingiram sua maturidade ao 10º dia. No 14º dia, os cogumelos foram colhidos, pesados e armazenados em congelamento para possíveis análises futuras. A Figura 22 ilustra as fases de frutificação: (A) início da frutificação, (B) desenvolvimento completo do fruto e (C) colheita do cogumelo.

Figura 22- Etapas da frutificação do fungo *Pleurotus ostreatus*



Fonte: Autora (2025)

Diferentes fases de frutificação foram observadas diferentes tamanhos e massas de cogumelos, sendo que nas condições em que o bagaço de cana foi suplementado com 15% de farelo de trigo e 15% de farelo de milho, o peso médio dos cogumelos colhidos variou entre 25 e 27g. Nas demais condições, o peso médio dos cogumelos colhidos foi de aproximadamente 10g. Para obter resultados mais conclusivos sobre a relação da suplementação, são necessárias futuras análises para avaliar a qualidade nutricional dos cogumelos, incluindo teores de proteínas e carboidratos, e a relação com o substrato e meio de suplementação.

Portanto, os resultados obtidos até o momento indicam que a suplementação do substrato com fontes adicionais de carbono e nitrogênio, tiveram um melhor desempenho na frutificação dos cogumelos, auxiliados pelo controle de umidade durante a fase de frutificação. Porém, são necessárias análises complementares para avaliar a influência de outros fatores, como a biodegradabilidade dos compostos recalcitrantes do substrato, caracterização detalhada da composição do bagaço antes e após o pré-tratamento, testes de PBM e análise da composição do biogás e a eficiência do pré-tratamento biológico na digestão anaeróbia. A partir desses dados, será possível discutir e compreender o potencial de aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar em processos biotecnológicos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossa pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial de produção de biogás e metano a partir de subprodutos do setor sucroalcooleiro, avaliação do potencial energético do licor alcalino e pré-tratamento do bagaço de cana utilizando fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*.

A primeira etapa, avaliou o potencial de produção máxima de metano e biogás a partir dos resíduos da indústria de etanol em co-digestão com esterco de aves, em proporções e combinações para garantir a continuidade da produção no período de safra e entressafra. Os resultados mostraram que, os ensaios operados na ausência de vinhaça, com 60% de torta de filtro e 40% de esterco de aves obteve um resultado de 241 NmLCH₄/g SV, enquanto o ensaio operado com 100% de vinhaça obteve 247 NmLCH₄/g SV. Sugerindo que no período de entressafra, quando não há disponibilidade de vinhaça, a usina consegue manter sua produção com esse cenário. Porém, a maior produção de metano foi observada na co-digestão de 94% vinhaça + 3,5% de TF + 2,5 EA, atingindo 505 NmLCH₄/g SV, evidenciando a eficiência desses compostos na DA.

A segunda etapa avaliou o potencial energético do licor alcalino oriundo do pré-tratamento químico do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH, em ensaio de mono e co-digestão com a vinhaça com foco na produção de metano e biogás e consequentemente na mitigação do impacto ambiental gerado por esse resíduo. Os resultados demonstram o alto potencial energético deste substrato 568 NmLCH₄/g SV, enquanto sua co-digestão com a vinhaça obteve 344 NmLCH₄/g SV. Neste cenário a monodigestão da vinhaça apresentou 267 NmLCH₄/g SV. Esses valores reforçam o potencial energético desse resíduo oferecendo uma rota de destinação para a produção energética mitigando os impactos associados a esse resíduo.

Na terceira etapa, foram exploradas rotas biológicas do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando fungos da podridão branca. Os resultados indicaram que, em fermentação submersa, o cultivo sem agitação apresentou melhores condições na produção de biogás produzindo um volume de 591 mL/gSV, enquanto o cultivo em agitação obteve um volume máximo de 480 mL/gSV de biogás. Na fermentação em estado os corpos de frutificação foram mais volumosos na condição suplementada com farelo de trigo e milho atingindo uma eficiência biológica de 41%, enquanto na condição em que a suplementação ocorreu apenas com farelo de trigo a eficiência biológica foi de 11%. Esses resultados serão utilizados para um PBM futuro para verificar e comparar o potencial de produção de biogás e metano do bagaço pré-tratado em FES, FSm e sem pré-tratamento.

7 SUGESTÕES FUTURAS

Como parte a complementar esse trabalho e ou para trabalhos futuros sugiro,

- Caracterização detalhada dos substratos torta de filtro, vinhaça, esterco de aves, licor alcalino e dos licores
- Análise de viabilidade energética, econômica e ambiental
- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar antes e depois do pré-tratamento, em termos de lignina, celulose e hemicelulose
- Determinação e atividade enzimática dos cultivos em fermentação submersa e em estado sólido
- Avaliação da influência da agitação nos cultivos
- Avaliação do digestato resultantes dos ensaios de PBM e seu potencial de fertilização
- Avaliação da biomassa pré-tratada em estado sólido em ensaio de PBM

REFERÊNCIAS

- ABOLORE, R. S.; JAISWAL, S.; JAISWAL, A. K. Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: a review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [s. l.], v. 7, p. 100396, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>. Acesso em: 07 set. 2024.
- 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**, [s. l.], v. 121, n. 5, p. 566-572, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.005>. Acesso em: 07 set. 2024.
- ADITIYA, H. B. *et al.* Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and sustainable energy reviews**, [s. l.], v. 66, p. 631-653, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, p. 1729-1738, dez. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/xksqWzK9xjPGvXqKKYpJFQL/?lang=pt#>. Acesso em: 07 set. 2024.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 24. ed. Washington DC: APHA, 2022.
- AUGUSTO, K. V. Z.; KUNZ, A. Tratamento de dejetos de aves Poedeiras comerciais. In: KUNZ, A.; HIGARASHI, M.M.; OLIVEIRA, P.A.V. **Tecnologias para o tratamento de resíduos animais: biodigestão e compostagem**. Brasília: Embrapa, 2011. p. 155-173.
- BATALHA, L. A. R. *et al.* Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 180, p. 97–105, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.060>. Acesso em: 07 set. 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento - MAPA. **Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura**. Brasília, DF: MAPA, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/planoabc-abcmais/plano-abc/historico>. Acesso em: 07 set. 2024.
- BRENELLI, L. B. *et al.* An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: from lab to pilot scale. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 313, p. 123637, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123637>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- CAILLET, H.; ADELARD, L. Start-up strategy and process performance of semi-continuous anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 12, p. 185-198, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00964-z>. Acesso

em: 18 jan. 2025.

CARPIO, L. G. T.; DE SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions.

Renewable energy, [s. l.], v. 111, p. 771-780, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.05.015>. Acesso em: 18 jan. 2025.

CARVALHO, L. *et al.* Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 530, 2013.

CASTRO, J. M.. **Estudo do potencial de geração de bioeletricidade a partir de biogás proveniente de biodigestão de vinhaça no estado de Minas Gerais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/RAOA-BCZHRY>. Acesso em: 07 set. 2024.

CHIAPA, F; GUELF, G. H.; OLIVEIRA, L. P. F. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de biocelulose e energia**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2023. Disponível em: <https://repositorio.maua.br/handle/MAUA/562>. Acesso em: 07 set. 2024.

CIBIOGAS. **Panorama do Biogás no Brasil 2023**. Relatório Técnico nº 001/2024 – Foz do Iguaçu, CIBiogás, 2024. Disponível em: <https://materiais.cibiogas.org/panorama-do-biogas-2023-material>. Acesso em: 07 set. 2024.

COELHO, S. T. *et al.* **Tecnologias de produção e uso de biogás e biometano**: Part. I Biogás e Part. II Biometano. São Paulo: IEE-USP, 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, v. 11, n. 4 abr. 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 07 set. 2024.

CORTEZ, L. A. B. **Proálcool 40**. São Paulo: Blucher, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788521210634>. Acesso em: 07 set. 2024.

COSTA, A. G. *et al.* Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista Dae**, Fortaleza, v. 1, n. 194, p. 36-51, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/dae.2014.003>. Acesso em: 07 set. 2024.

COSTA, J.M., AGUIAR, A.B.S., MONTANARI, A.F.P. *et al.* Environmental Aspects and Perspectives of the Brazilian Market for Biogas and Biomethane from Anaerobic Digestion: a Review. **Bioenergy Research**, [s. l.], v.17, n. 1, p. 59-72, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10657-9>. Acesso em: 07 set. 2024.

DATSOMOR, O. *et al.* Effect of Different Inducer Sources on Cellulase Enzyme Production by White-Rot Basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under Submerged Fermentation. **Fermentation**, [s. l.], v. 8, p. 561, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8100561>. Acesso em: 30 jan. 2025.

DESWAL, D. *et al.* Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 99, p. 264-269, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.045>. Acesso em: 18 jan. 2025.

DEUTSCHER. VDI 4630 - Fermentation of organic materials characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. **Düsseldorf: Verein Deutscher Ingenieure**, [s. l.], 2006.

DE SOUZA, J. K. C. *et al.* Fertirrigação com vinhaça na produção de cana-de-açúcar. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 11, n. 2, p. 7-12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.30969/acsa.v11i2.532>. Acesso em 08 set. 2024.

DROCE, A. *et al.* Glass bead cultivation of fungi: combining the best of liquid and agar media. **Journal of microbiological methods**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 343-346, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.005>. Acesso em 30 jan. 2025.

DURÁN-SEQUEDA, D. *et al.* Effect of nutritional factors and copper on the regulation of laccase enzyme production in *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8010007>. Acesso em: 03 fev. 2025

EMBRAPA. Central de inteligência de aves e suínos – CIAS. **Estatísticas de frango de corte**. Brasília, DF: CIAS, 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas-frangos>. Acesso em: 18 jan. 2025.

EMBRAPA. Agência de Informação Tecnológica. **Cana**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana>. Acesso em: 07 set. 2024.

EMBRAPA. Embrapa Hortaliças. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/956032>. Acesso em 15 dez. 2024.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Recursos Energéticos: Potencial dos Recursos Energéticos no Horizonte 2050**. Nota técnica, PR 04/18, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/sntep/publicacoes/estudos-do-pne-2050/02-relatorios-epe/03-potencial-de-recursos-energeticos-no-horizonte-2050-nt-pr-004-2018.pdf/view>. Acesso em: 07 set. 2024.

FILER, J.; DING, H. H.; CHANG, S.. Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. **Water**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 921, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w11050921>. Acesso em: 10 set. 2024.

FLAUSINIO, B. F. P. G. **Produção de energia elétrica a partir do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar gerado no setor sucroalcooleiro de Minas Gerais**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências e Técnicas Nucleares) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AB7FWF>. Acesso em: 07 set. 2024.

GAO, Z. *et al.*. Advances in biological techniques for sustainable lignocellulosic waste

utilization in biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 170, p. 112995, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112995>. Acesso em: 07 set. 2024.

GEBREEYESSUS, G. D.; MEKONNEN, A.; ALEMAYEHU, E. A review on progresses and performances in distillery stillage management. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 232, p. 295-307, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.383>. Acesso em: 07 set. 2024.

GONZÁLEZ, C *et al.* Biomass to value-added products using microbial consortia with white-rot fungi. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 16, p. 100831, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100831>. Acesso em: 07 set. 2024.

HAKIMI, M. *et al.* Co-anaerobic digestion of sawdust and chicken manure with plant herbs: Biogas generation and kinetic study. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17096>. Acesso em: 07 set. 2024

HASHEMI, S.; KARIMI, K.; KARIMI, A. M. Ethanolic ammonia pretreatment for efficient biogas production from sugarcane bagasse. **Fuel**, [s. l.], v. 248, p. 196–204, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.03.080>. Acesso em: 18 dez. 2024.

HASSAN, C. *et al.* Produção de biogás a partir de resíduos agroindustriais: Análise dos teores de sólidos totais, voláteis e fixos em amostras pré e pós digestão anaeróbia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Cascavel, v.8, n.1, p. 257- 273, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/rber.v8i1.56321>. Acesso em: 07 set. 2024.

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U. *et al.* Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: current state, challenges, and opportunities. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 18, p. 3721, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9183721>. Acesso em: 07 set. 2024.

HOARAU, J. *et al.* Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of water process engineering**, [s. l.], v. 24, p. 11-25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.003>. Acesso em: 07 set. 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agropecuária**. 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?edicao=37818&t=destaques>. Acesso em: 07 set. 2024.

JANKE, L. *et al.* Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 235-244, 2016a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.117>. Acesso em: 07 set. 2024

JANKE, L. *et al.* Comparison of start-up strategies and process performance during semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane filter cake co-digested with bagasse. **Waste management**, [s. l.], v. 48, p. 199-208, 2016b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.007>. Acesso em: 07 set. 2024

JANKE, L. *et al.* Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 217, p. 10-20, 2016c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.110>. Acesso em: 07 set. 2024

JANKE, L. *et al.* Biogas production from sugarcane waste: assessment on kinetic challenges for process designing. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 20685-20703, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/20685>. Acesso em: 07 set. 2024.

JOHANNESSON, G.r H. *et al.* Estimation of biogas co-production potential from liquid dairy manure, dissolved air flotation waste (DAF) and dry poultry manure using biochemical methane potential (BMP) assay. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 25, p. 101605, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101605>. Acesso em: 18 jan. 2025.

JÚNIOR, A. D. N. F. *et al.* Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 89, p. 245-252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.064>. Acesso em: 18 jan. 2025.

KHAIRE, K. C.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. **Materials Science for Energy Technologies**, [s. l.], v. 4, p. 54-68, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.12.004>. Acesso em: 07 set. 2024.

KHAN, M. U.; AHRING, B. K. Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications-A review. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 128, p. 105325, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105325>. Acesso em: 03 fev. 2025.

KOK, H. Y.; SHAMSUDDIN, M. R.; AQSHA, A. Anaerobic treatment of chicken manure co-digested with sawdust. In: Advances in Manufacturing Engineering: Selected articles from ICMMPE 2019. **Lecture Notes In Mechanical Engineering**, [s. l.], p. 741-748, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-5753-8_69. Acesso em: 07 set. 2024.

KONDE, K. S. *et al.* Sugarcane bagasse based biorefineries in India: potential and challenges. **Sustainable Energy & Fuels**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 52-78, 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/se/d0se01332c>. Acesso em 03 fev. 2025.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera- Embrapa Suínos e Aves, 2022.

LEITE, A. F. *et al.* Assessment of the variations in characteristics and methane potential of major waste products from the Brazilian bioethanol industry along an operating season. **Energy & Fuels**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 4022-4029, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ef502807s>. Acesso em 07 set. 2024.

LI, K. *et al.* Anaerobic co-digestion of animal manures with corn stover or apple pulp for enhanced biogas production. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 118, p. 335-342, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.11.023>. Acesso em: 07 set. 2024.

LI, Y. *et al.* Genome-centric metagenomics and methanogenic pathway analysis for acclimated anaerobic digestion of chicken manure with high ammonia stressed under thermophilic condition. **Environmental Research**, [s. l.], v. 258, p. 119453, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119453>. Acesso em: 10 set. 2024.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGALHÃES, A. C.; MOREIRA, B. R. de A.; ZIED, D. C. Axenic cultivation of *Pleurotus ostreatus* var. Florida in supplemented sugarcane bagasse briquettes. **Engenharia Agrícola**, [s. l.], v. 38, p. 835-843, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v38n6p835-843/2018>. Acesso em: 03 fev. 2025.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 269-278, 1957.

MATHERI, A. N. *et al.* Optimising biogas production from anaerobic co-digestion of chicken manure and organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 80, p. 756-764, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.068>. Acesso em 10 set. 2024.

MATHIAS, J. F. C. M.; SILVA, S. S. Agroenergia como vetor para a agricultura sustentável: oportunidades e desafios da produção de biogás no Brasil. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 3701-3716, 2023. Disponível em: <https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/858>. Acesso em: 07 set. 2024.

MEENAKSHISUNDARAM, S. *et al.* Combined Biological and Chemical/Physicochemical Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol and Biomethane Energy Production—A Review. **Applied Microbiology**, [s. l.], v.2 n.4, p. 716-734, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2040055>. Acesso em: 18 jan. 2025.

MILANEZ, A. Y.; FAVERET FILHO, P. S. C.; ROSA, S. E. S. Perspectivas para o etanol brasileiro. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, 27, pp. 21-38, mar. 2008. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2421>. Acesso em: 07 set. 2024.

MORAES, B. S. *et al.* Reduction in greenhouse gas emissions from vinasse through anaerobic digestion. **Applied Energy**, [s. l.], v. 189, p. 21-30, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.009>. Acesso em: 07 set. 2024.

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**, [s. l.], v. 44, p. 888-903, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>. Acesso em: 07 set. 2024.

PAGÉS-DÍAZ, J. *et al.* Co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos de matadouros com agro-resíduos: Interações sinérgicas e antagônicas determinadas em ensaios de digestão em batelada. **Revista de Engenharia Química**, [s. l.], v. 245, p. 89-98, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.008>. Acesso em: 07 set. 2024

PARANHOS, A. G. *et al.* Methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: Kinetic and energy assessment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 300, p. 122588, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122588>. Acesso em: 18 jan. 2025.

PAULOSE, P.; KAPARAJU, P. Anaerobic mono-digestion of sugarcane trash and bagasse with and without pretreatment. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 170, p. 113712, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113712>. Acesso em: 18 jan. 2025.

PEREIRA, Isabela Zanon *et al.* Uma breve revisão sobre a indústria sucroalcooleira no Brasil com enfoque no potencial de geração de energia. **Revista Brasileira de Energia**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.47168/rbe.v25i2.477>. Acesso em: 07 set. 2024.

PROBIOGÁS. **Tecnologias de digestão anaeróbia com relevância para o Brasil: Substratos, digestores e uso de biogás**. 2015. Ministério das Cidades, Brasília, DF, 2015. Disponível em: https://antigo.mdr.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&layout=edit&id=3736. Acesso em: 07 set. 2024.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z.; STEINKRAUS, K. H. Pleurotus mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.

RAWTE, H.; DIWAN, R. Growth response of Pleurotus spp. on different basal media and different pH levels. **Journal of Ecobiotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2011.

REZANIA, S. *et al.* Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: an overview. **Energy**, [s.l.], v. 199, p. 117457, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>. Acesso em: 09 de mar. 2025.

SALA, A. *et al.* Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. **Critical Reviews. Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 655-694, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1557497>. Acesso em: 03 fev. 2025.

SAWATDEENARUNAT, C. *et al.* Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: challenges and opportunities. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 178, p. 178-186, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>. Acesso em: 07 set. 2024.

SILVA, D. H. **Produção de metano a partir de substratos das biorrefinarias de etanol e biodiesel**. 2023. Tese (Doutorado em Planejamento de Sistemas Energéticos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2023. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalle/1373787>. Acesso em: 07 set. 2024.

STAMETS, P. **Psilocybin mushrooms of the world**. Berkeley: Ten Speed Press, 2023.

SUMARDIONO, S. *et al.* Effect of physical and biological pretreatment on sugarcane bagasse waste-based biogas production. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 87, p. 41-44, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.01.372>. Acesso em: 07 set. 2024.

TINOCO-VALENCIA, R. *et al.* Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 177, p. 67-73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.013>. Acesso em: 03 fev. 2025.

ÚNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar e Bioenergia. Etanol atinge maior oferta da história em 2024. **Única**, 2025. Disponível em: <https://unica.com.br/noticias/etanol-atinge-maior-oferta-da-historia-em-2024/>. Acesso em: 29 jan. 2025.

VICI, A. C. *et al.* Produção de lipases de *Beauveria bassiana* sob influência da agitação e da luz. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 10.; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 19., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais [...]** Foz do Iguaçu/ PR: ABEQ, 2013.

VOLPI, M. P. C. **Biogas production integrated to the concept of biorefinery for lignocellulosic biomass: operational aspects and use of nanoparticles.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2022.

VOLPI, M. P. C. *et al.* Use of lignocellulosic residue from second-generation ethanol production to enhance methane production through co-digestion. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 602-616, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10293-1>. Acesso em: 07 set. 2024.

WANG, T. *et al.* Anaerobic codigestion of excess sludge with chicken manure with a focus on methane yield and digestate dewaterability. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 19, p. 101127, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101127>. Acesso em: 08 jan. 2025.

WANG, X. *et al.* Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 120, p. 78-83, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.058>. Acesso em: 07 set. 2024.

WIJAYA, A. S. *et al.* Biochemical methane potential (BMP) of cattle manure, chicken manure, rice straw, and hornwort in mesophilic mono-digestion. **International Journal of Integrated Engineering**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1-8, 2020. Disponível em: <https://publisher.uthm.edu.my/ojs/index.php/ijie/article/view/2693/3381>. Acesso em: 18 jan. 2025.

YOON, L. W. *et al.* Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and bioenergy**, [s. l.], v. 67, p. 319-338, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>. Acesso em: 03 fev. 2025.

ZHAO, X. *et al.* Accelerated biomethane production from lignocellulosic biomass: Pretreated by mixed enzymes secreted by *Trichoderma viride* and *Aspergillus sp.* **Bioresource technology**, [s. l.], v. 309, p. 123378, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123378>. Acesso em: 07 set. 2024.