



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIAS E
SUSTENTABILIDADE**

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DO SUBSTRATO VEGETAL *Hydrilla
verticillata* E PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGO *Trametes polyzona*
CCMIBA_19**

LEIBER JULIO GRANADA GALVIS

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DO SUBSTRATO VEGETAL *Hydrilla
verticillata* E PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGO *Trametes polyzona*
CCMIBA_19**

LEIBER JULIO GRANADA GALVIS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Energia e Sustentabilidade.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Becker.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

G182p

Galvis, Leiber Julio Granada.

Produção de biogás a partir do substrato vegetal *Hydrilla verticillata* e pré-tratamento biológico com fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19 / Leiber Julio Granada Galvis. - Foz do Iguaçu, 2026.
56 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E TERRITÓRIO, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIAS E SUSTENTABILIDADE.

Orientador: Márcia Regina Becker.

Coorientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

1. Digestão anaeróbia. 2. Biogás. 3. Plantas aquáticas. 4. Biomassa vegetal. I. Becker, Márcia Regina. II.
Santos, Rafaella Costa Bonugli. III. Título.

CDU 620.952

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DO SUBSTRATO VEGETAL *Hydrilla verticillata* E PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO COM FUNGO *Trametes polyzona*
CCMIBA_19

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa em Energias e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Energia e Sustentabilidade.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Becker.
UNILA

Coorientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos.
UNILA

Profa. Dra. Deborah Catharine de Assis Leite.
UTFPR-DV

Prof. Dr. Juan Masías Sanez Pacheco.
UNILA

Foz do Iguaçu, 08 de setembro de 2025.

Dedico este trabalho à minha esposa, por sua admirável determinação; à minha mãe, por sua força, coragem e exemplo; e ao meu irmão, por sempre estar ao meu lado quando precisei.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder as ferramentas, a força e a clareza necessárias ao longo desta jornada.

À minha mãe, Ana Lindelia Galvis Saa, sou profundamente grato por seu amor incondicional e por todos os sacrifícios que fez para que eu pudesse alcançar este título.

A minha amada esposa Márcia de Lima, pelo amor, incentivo e apoio incondicional que tem me oferecido durante esta etapa.

Ao meu inestimável irmão Osman Cesar Granada meu companheiro em todas as batalhas, tanto nos momentos felizes quanto nos desafiadores. Agradeço por seu amor, paciência e respeito.

A minha família e amigos da Colômbia que sempre torcem por mim e meus projetos. Sempre manifestando seu carinho e apreço.

À minha orientadora, Márcia Regina Becker, expresso minha sincera gratidão pelo apoio, incentivo, confiança e orientação, além da oportunidade de integrar o projeto de iniciação científica que deu origem a este trabalho.

Agradeço também a professora Rafaella Costa Bonugli Santos pela contribuição essencial no pré-tratamento biológico da macrófita, pelas orientações precisas e pela dedicação ao trabalho.

À UNILA, sou grato pelo suporte estudantil e pela excelência acadêmica. É uma honra ter meu diploma em uma universidade inclusiva, multicultural e de alta qualidade.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e institucional que foi fundamental para a realização deste trabalho. O incentivo e os recursos fornecidos pela Fundação permitiram o desenvolvimento deste projeto e possibilitaram o avanço das pesquisas, contribuindo de forma significativa para o meu crescimento acadêmico e profissional;

A equipe do Laboratório do Centro Internacional de Energias Renováveis - Biogás (CIBiogás), pela doação do inóculo;

A equipe do Refúgio Biológico Bela Vista (Itaipu), em especial Caroline Henn, pelo apoio imprescindível na coleta das macrófitas.

*Nossa maior fraqueza está em desistir.
A maneira mais certa de vencer
é tentar mais uma vez.*
Thomas Edison

RESUMO

A macrófita *Hydrilla verticillata*, conhecida por sua proliferação invasora em corpos d'água eutrofizados como o Lago Itaipu, na fronteira entre Brasil e Paraguai, representa um desafio ambiental significativo. A remoção dessa biomassa tornou-se imperativa para o controle ambiental e, ao mesmo tempo, configura uma oportunidade promissora para a geração de energia, especialmente na produção de biogás. Contudo, sabe-se que o pré-tratamento dessa biomassa vegetal pode tornar sua estrutura mais acessível aos microrganismos, aumentando a digestibilidade e a eficiência na produção de biogás. No pré-tratamento biológico, utilizam-se microrganismos, como bactérias e fungos, ou enzimas microbianas capazes de degradar eficientemente a matéria vegetal. Neste estudo, a biomassa da macrófita *Hydrilla verticillata*, abundante no lago Itaipu em Foz do Iguaçu (PR), foi submetida a um pré-tratamento para produção de biogás. Para isso, foi utilizado o extrato enzimático bruto com atividade de lacase extraído do fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19, com ou sem adição do mediador 2,6-dimetoxifenol. Posteriormente, a biomassa foi submetida ao processo de codigestão com dejetos bovinos para geração de biogás. A atividade enzimática foi quantificada por espectrofotometria, enquanto a produção de biogás foi avaliada pelo Potencial Bioquímico de Biogás (PBB). A análise demonstrou a atividade da lacase no cultivo do fungo, e os resultados evidenciaram a produção de biogás nos tratamentos com e sem mediador enzimático. No entanto, a rota sem pré-tratamento foi mais eficiente, gerando 49 LN/kgSv de biogás. O melhor desempenho entre os ensaios pré-tratados (MEA-T2) alcançou apenas 34 LN/kgSv. Esses resultados sugerem que, nas condições testadas, o pré-tratamento biológico não foi vantajoso, possivelmente devido à baixa concentração e eficiência do extrato enzimático bruto, que não apresenta a mesma atividade de uma enzima purificada, sugerindo a necessidade de otimizações futuras, como o aumento da carga enzimática, purificação da enzima.

Palavras-chave: digestão anaeróbia; codigestão; biogás; dejetos bovinos; *Hydrilla verticillata*; *Trametes polyzona*,

RESUMEN

La macrófita *Hydrilla verticillata*, conocida por su proliferación invasiva en cuerpos de agua eutrofizadas como el lago Itaipú, en la frontera entre Brasil y Paraguay, representa un importante desafío medioambiental. La eliminación de esta biomasa se ha convertido en algo imprescindible para el control medioambiental y, al mismo tiempo, supone una prometedora oportunidad para la generación de energía, especialmente en la producción de biogás. Sin embargo, se sabe que el pretratamiento de esta biomasa vegetal puede hacer que su estructura sea más accesible a los microorganismos, aumentando la digestibilidad y la eficiencia en la producción de biogás. En el pretratamiento biológico se utilizan microorganismos, como bacterias y hongos, o enzimas microbianas capaces de degradar eficazmente la materia vegetal. En este estudio, la biomasa de la macrófita *Hydrilla verticillata*, abundante en el lago Itaipu en Foz do Iguaçu (PR), fue sometida a un pretratamiento para la producción de biogás. Para ello, se utilizó el extracto enzimático bruto con actividad lacasa extraído del hongo *Trametes polyzona* CCMIBA_19, con o sin la adición del mediador 2,6-dimetoxifenol. Posteriormente, la biomasa se sometió al proceso de codigestión con desechos bovinos para la generación de biogás. La actividad enzimática se cuantificó mediante espectrofotometría, mientras que la producción de biogás se evaluó mediante el Potencial Bioquímico de Biogás (PBB). El análisis demostró la actividad de la lacasa en el cultivo del hongo, y los resultados evidenciaron la producción de biogás en los tratamientos con y sin mediador enzimático. Sin embargo, la ruta sin pretratamiento fue más eficiente, generando 49 LN/kgSv de biogás. El mejor rendimiento entre los ensayos pretratados (MEA-T2) alcanzó solo 34 LN/kgSv. Estos resultados sugieren que, en las condiciones probadas, el pretratamiento biológico no fue ventajoso, posiblemente debido a la baja concentración y eficiencia del extracto enzimático bruto, que no presenta la misma actividad que una enzima purificada, lo que sugiere la necesidad de optimizaciones futuras, como el aumento de la carga enzimática y la purificación de la enzima.

Palabras clave: digestión anaeróbica; codigestión; biogás; desechos bovinos; *hydrilla verticillata*; *trametes polyzona*.

ABSTRACT

The macrophyte *Hydrilla verticillata*, known for its invasive proliferation in eutrophicated water bodies such as Lake Itaipú, on the border between Brazil and Paraguay, represents a major environmental challenge. The removal of this biomass has become essential for environmental control and, at the same time, represents a promising opportunity for energy generation, especially in biogas production. However, it is known that pretreating this plant biomass can make its structure more accessible to microorganisms, increasing digestibility and efficiency in biogas production. Biological pretreatment uses microorganisms, such as bacteria and fungi, or microbial enzymes capable of effectively degrading plant matter.. In this study, biomass from the macrophyte *Hydrilla verticillata*, abundant in Lake Itaipu in Foz do Iguaçu (PR), was subjected to pretreatment for biogas production. For this purpose, crude enzyme extract with laccase activity extracted from the fungus *Trametes polyzona* CCMIBA_19 was used, with or without the addition of the mediator 2,6-dimethoxyphenol. Subsequently, the biomass was subjected to co-digestion with bovine manure to generate biogas. Enzymatic activity was quantified by spectrophotometry, while biogas production was evaluated by Biogas Biochemical Potential (BBP). The analysis demonstrated laccase activity in the fungus culture, and the results showed biogas production in treatments with and without enzymatic mediator. However, the route without pretreatment was more efficient, generating 49 LN/kgSv of biogas. The best performance among the pretreated tests (MEA-T2) reached only 34 LN/kgSv. These results suggest that, under the conditions tested, biological pretreatment was not advantageous, possibly due to the low concentration and efficiency of the crude enzyme extract, which does not have the same activity as a purified enzyme, suggesting the need for future optimizations, such as increasing the enzyme load and purifying the enzyme.

Keywords: anaerobic digestion; co-digestion; biogas; cattle manure; *Hydrilla verticillata*; *trametes polyzona*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo da digestão anaeróbia	17
Figura 2 - <i>Hydrilla verticillata</i>	21
Figura 3 - Métodos de controle de plantas invasoras de corpos d'água.	22
Figura 4 - Processo de pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica.	28
Figura 5 - Esboço da obtenção do extrato enzimático com o fungo <i>Trametes polyzona</i> CCMIBA_19.....	33
Figura 6 - Biodigestores em banho-maria.	40
Figura 7 - Produção acumulada do biogás.....	45
Figura 8 - Produção diária de biogás dos ensaios.....	46
Figura 9 - Micrografias da <i>Hydrilla verticillata</i> sem e com pré-tratamento.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas e parâmetros para ação dos microrganismos na digestão anaeróbia	18
Tabela 2 - Identificação das amostras pré-tratadas com diferentes extratos enzimáticos.	35
Tabela 3 - Quantidades das biomassas (dejetos bovinos e macrófita <i>H. verticillata</i>), água e inóculo adicionados nos ensaios PBB.....	39
Tabela 4 - Meio com solução de ágar extrato de malte - MEA.....	41
Tabela 5 - Teor de sólidos das amostras.....	43
Tabela 6 - Produção acumulada de biogás da macrófita com e sem pré-tratamento.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica para a produção de biogás.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-di [3-etilbenzo-tiazolin-sulfonato];

C – Carbono;

CCMIBA – Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental;

CH₄ – Metano;

CHP – Combined Heat and Power;

CIBiogás – Centro Internacional de Energias Renováveis e Biogás;

CO₂ – Dióxido de carbono;

CSTR – Reator de Tanque com Agitação Contínua (do inglês continuous stirred tank reactor);

DA – Digestão anaeróbia;

DB – Dejeito Bovino;

DQO – Demanda química de oxigênio;

FT – Farelo de trigo;

GLP – Gás Liquefeito de Petróleo;

H. Verticillata – *Hydrilla verticillata*;

H₂ – Hidrogênio;

H₂S – Ácido sulfídrico;

K – Porcentagem de sólidos totais que se pretende colocar nos reatores;

M – *Hydrilla Verticillata* sem pré-tratamento;

MEA – Ágar extrato de malte;

MEA – Extrato de Malte;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

mi – massa de inóculo;

mLN – Mililitro normal;

Ms – Massa seca das biomassas;

ms – massa úmida do substrato;

Msd – Massa seca do dejeito bovino;

Msm – Massa seca da macrófita;

MT1 – *H. Verticillata* pré-tratamento 1;

MT2 – *H. Verticillata* pré-tratamento 2;

MT3 – *H. Verticillata* pré-tratamento 3;

MT4 – *H. Verticillata* pré-tratamento 4;

Mu – Massa das biomassas que serão adicionadas nos reatores;

N₂ – Nitrogênio;

PBB – Potencial Bioquímico de Biogás;

pH – Potencial de hidrogênio;

SF – Sólidos Fixos;

ST – Sólidos Totais;

SV – Sólidos Voláteis;

ST – Sólidos totais das biomassas;

SVi – Sólidos voláteis do inóculo;

SVs – Sólidos voláteis dos substratos;

T – Temperatura;

VDI – *Verein Deutscher Ingenieure*;

W – Massa total das biomassas e água que serão adicionadas ao biodigestor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 BIOGÁS	15
2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA (DA).....	16
2.3 MONODIGESTÃO E CODIGESTÃO ANAERÓBIA	18
2.4 PLANTA INVASORA <i>Hydrilla verticillata</i>	19
2.5 MÉTODOS DE CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS	21
2.5.1 Métodos Físicos.....	22
2.5.2 Métodos Químicos	23
2.5.3 Métodos Biológicos	24
2.6 DESAFIOS NO APROVEITAMENTO DE PLANTAS AQUÁTICAS PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS	24
2.6.1 Pré-Tratamento Físico	26
2.6.2 Pré-Tratamento Químico.....	26
2.6.3 Pré-Tratamento Biológico	27
2.6.3.1 <i>Pré-tratamento Enzimático</i>	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 CULTIVO FÚNGICO	32
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS	32
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE	34
4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA <i>Hydrilla verticillata</i> COM O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	35
4.5 COLETA E ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO	36
4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SUBSTRATOS E INÓCULO.	36
4.6.1 Teor De Sólidos	36
4.6.2 Determinação das Proporções dos Substratos	37
4.6.3 pH.....	39
4.7 APARATO EXPERIMENTAL.....	39
4.8 TESTE DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS(PBB).....	40
5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV	41
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A crise climática que o planeta está enfrentando é uma consequência direta das ações humanas, como a queima de combustíveis fósseis, desmatamento e a poluição ambiental (Feigin *et al.*, 2023). Essas atividades aumentam significativamente a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera terrestre, provocando o aquecimento global, e afetando tanto economias como sociedades ao redor do mundo. De acordo com o relatório de 2018 do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas - IPCC, as atividades humanas têm provocado o aumento de cerca de 1,0 °C do aquecimento global acima do nível pré-industrial, com variações entre 0,8 °C a 1,2 °C.

Em adição, o relatório mais recente referente a temperatura do planeta, publicado pela organização meteorológica mundial - OMM de 2024, informa que existe 80% de probabilidade de que em pelo menos nos próximos cinco anos a temperatura do planeta exceda de maneira transitória em 1,5 °C os níveis pré-industriais. Tal aumento pode resultar na intensificação de eventos climáticos extremos, como secas, inundações e tempestades severas, o que evidencia a urgência de alternativas inovadoras para mitigar esses impactos negativos.

Nesse contexto, os biocombustíveis podem ser uma estratégia com capacidade de mitigar as mudanças climáticas (IPCC, 2023). Estas fontes de energia sustentável são derivadas da biomassa vegetal que contam com características especiais como a não toxicidade, biodegradabilidade, eficiência econômica e abundância, o que os torna excelentes candidatos para a geração de energia frente a situação atual (Malik *et al.*, 2024). O biogás em particular, tem se destacado por sua capacidade de gerar energia a partir de resíduos orgânicos, contribuindo não apenas na redução da dependência de combustíveis convencionais, mas também no gerenciamento adequado dos resíduos (Sousa & Rizzato, 2022).

A geração de biogás, assim como sua utilização para fins energéticos, pode ser acessível ao público ou acontecer em escala industrial, sendo produzido em biodigestores de grande porte até os mais simples, feitos com materiais recicláveis. Isso demonstra que todos os cidadãos podem ter acesso a

essa fonte de energia, de forma direta ou indireta, e contribuir para com o desenvolvimento local e mudança climática (Lins *et al.*, 2022).

O biogás é produzido pela degradação da matéria orgânica em ausência do oxigênio, processo conduzido por diferentes grupos de microrganismos cuja atividade depende, sobretudo, de fatores como: pH, temperatura, tipo de substrato, carga orgânica e disponibilidade de oxigênio (Karlsson *et al.*, 2014). Esse processo acontece por meio da digestão anaeróbia (DA), que só funciona dentro de determinados parâmetros físico-químicos, permitindo transformar desde resíduos de alimentos, dejetos de animais, esgoto doméstico e biomassa vegetal em energia. A geração de biogás, por meio da digestão anaeróbia, é uma alternativa promissora para converter biomassa vegetal em energia renovável, contribuindo para a diversificação da matriz energética e o aproveitamento de resíduos orgânicos.

Dentre as diversas opções de biomassa vegetal, a macrófita *Hydrilla verticillata* destaca-se por sua proliferação invasora em corpos d'água eutrofizados, como o Lago Itaipu, na fronteira entre Brasil e o Paraguai. A remoção dessa biomassa, que se tornou um imperativo no controle ambiental, representa uma oportunidade para a geração de energia. Especialmente na produção de biogás, essa abordagem não apenas resolve o problema ecológico de sua proliferação descontrolada, mas também valoriza um resíduo vegetal como alternativa energética, contribuindo para a economia circular e para a redução da dependência de combustíveis fósseis.

O impacto ambiental causado pela presença desta macrófita constitui aspectos mais negativos do que positivos, pois pode causar prejuízos econômicos às usinas hidrelétricas devido à obstrução das grades de tomada de água nos reservatórios, pela contribuição para o assoreamento dos reservatórios, pela redução das taxas de trocas gasosas entre o ambiente aquático e a atmosfera, pela redução da turbulência das águas, pela perda da biodiversidade, pelo impedimento à navegação e por outros motivos (Henares *et al.*, 2011).

Apesar de a biomassa lignocelulósica apresentar um potencial considerável para geração de biometano, seu aproveitamento tem sido limitado. Essa dificuldade pode ser atribuída à natureza recalcitrante do substrato, que resiste à decomposição durante a digestão anaeróbia. Por isso, a utilização dessa matéria orgânica para a produção de biogás pode demandar pré-tratamento, para degradação de seu material recalcitrante, processo que visa aumentar a taxa de

degradação e, por consequência, o volume de produção do biogás.

Entre os pré-tratamentos que existem, como biológico, químico, físicos ou combinados, aquele que pode causar menor impacto ambiental é o biológico, pois não produzem subprodutos tóxicos ou inibidores que possam prejudicar a comunidade microbiana do biodigestor (Alokika *et al.*, 2023).

Este tipo de pré-tratamento pode fazer uso de fungos que, em função de suas características de reprodução e crescimento, são capazes de degradar tanto a celulose como a hemicelulose e utilizá-las como fonte de carbono e energia. Neste processo de degradação, alguns fungos podem produzir um grupo complexo de enzimas celulases capazes de clivar as ligações β -(1 \rightarrow 4) -glicosídicas presentes na celulose e seus derivados.

A combinação de enzimas de celulase com outras enzimas, como as hemicelulases, contribui para uma hidrólise mais eficiente da biomassa e para o aumento da produção de monossacarídeos, que são adequados para a digestão anaeróbia (Meenakshisundaram *et al.*, 2022). Entretanto, além da celulase e da hemicelulase, a presença de um consórcio de enzimas é fundamental para a formulação de um coquetel enzimático eficaz. A identificação de enzimas celulolíticas fúngicas adequadas e capazes de hidrolisar carboidratos na matriz vegetal continua sendo um desafio no pré-tratamento biológico (Liu *et al.*, 2021).

Além das celulases e hemicelulases, o pré-tratamento biológico envolve, frequentemente, a participação de enzimas ligninolíticas, tendo destaque as lacase no que se refere a degradação de biomassas lignocelulósicas, isto, devido a sua ação favorável na catálise relacionada a substratos fenólicos e não fenólicos, onde estes últimos reagem melhor com mediadores redox (Civzele; Stipniece-Jekimova; Mezule, 2023; Matei *et al.*, 2020).

Considerando o exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de biogás por meio da codigestão, com dejetos bovinos, da macrófita *Hydrilla verticillata*, previamente submetida ao pré-tratamento biológico. A abordagem proposta envolve o pré-tratamento fúngico utilizando o extrato enzimático do cultivo do fungo *Trametes Polyzona* CCMIBA_19 com ou sem a associação do mediador 2,6-dimetoxifenol, em dois meios distintos: MEA (extrato de malte com ágar) e FT (farelo de trigo). Em seguida, realizou-se a codigestão da macrófita previamente tratada com esterco bovino, em batelada mesofílica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOGÁS

O biogás é uma mistura gasosa, produto da decomposição anaeróbia de compostos orgânicos. Ele é predominantemente composto por 40-80% de metano (CH₄) e 30-50% de dióxido de carbono (CO₂), além de outros componentes como sulfeto de hidrogênio 1-4% (H₂S), amônia (NH₃), hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂), monóxido de carbono (CO) e oxigênio (O₂). A sua composição depende do tipo de substrato digerido e do processo de digestão biológica (Mignogna *et al.*, 2023).

A produção de biogás apresenta relevância ambiental, pois representa uma alternativa de fonte de energia renovável a partir de recursos amplamente disponíveis, como a biomassa vegetal. Além de contribuir para a diversificação da matriz energética, essa tecnologia favorece a economia circular ao viabilizar a reutilização de resíduos orgânicos, reduzindo a poluição e promovendo a sustentabilidade (Alves *et al.*, 2022).

Sua utilização para fins energéticos pode se dar de para geração de energia elétrica, térmica, cogeração e, cada vez mais, para a produção de biometano (Ashokkumar *et al.*, 2025). O uso mais comum do biogás ocorre em unidades de cogeração descentralizadas, conhecidas como CHP (*Combined Heat and Power*) (Kamusoko & Mukumba, 2025).

O biogás produzido é primeiro seco, dessulfurizado e, em seguida, utilizado em um motor a gás que aciona um gerador que fornece energia elétrica e calor. A energia normalmente é utilizada externamente e, portanto, alimentada na rede elétrica. Parte do calor gerado é necessária para operar o digestor (Riley *et al.*, 2020). O calor restante pode ser utilizado externamente, por exemplo, para aquecer edifícios ou para a secagem de colheitas. A eficiência elétrica geralmente está entre 30 e 40%, e a eficiência térmica correspondente é de 35 a 55% (Mertins & Wawer, 2022).

Através da queima direta, o biogás pode ser utilizado com campânulas para aquecimento de animais em granjas, ou em fogões domésticos como substituto do gás de cozinha (GLP - Gás Liquefeito de Petróleo). Já a sua conversão de biogás em biometano é considerada uma tecnologia madura. O

processo de conversão envolve principalmente a separação de várias impurezas (López *et al.*, 2024).

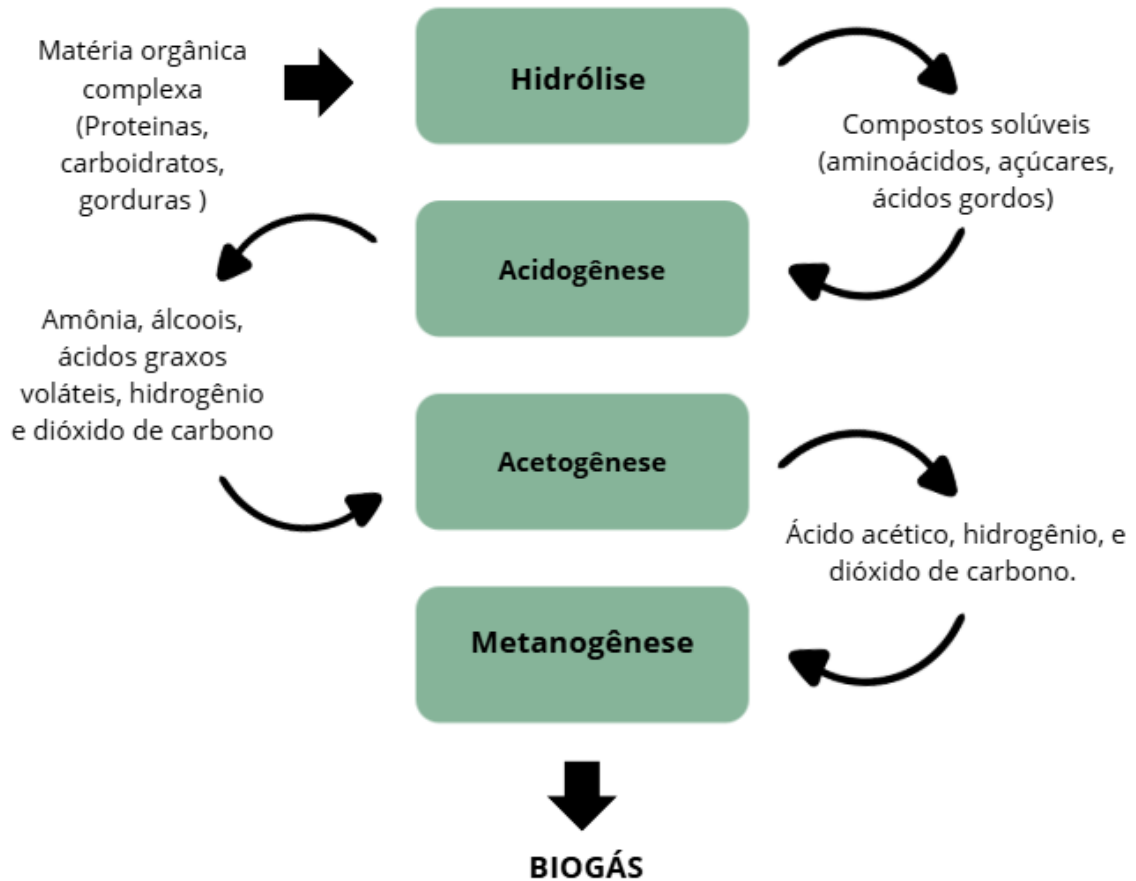
A parte mais importante do processo de conversão é a separação do gás carbônico, com o objetivo de aumentar o teor de metano do biogás. A ordem das etapas individuais para conversão depende das propriedades do gás e do método de captura do gás carbônico. Os métodos de conversão são lavagem com água, lavagem química, lavagem física, adsorção por oscilação de pressão e separação por membrana (Ardolino *et al.*, 2021).

O biometano oferece a vantagem de múltiplas aplicabilidades, podendo ser usado como combustível no setor de mobilidade, como substituto do gás natural no setor de aquecimento ou fora do local em uma unidade de cogeração (Ali *et al.*, 2024). A conversão leva a custos mais altos, maior consumo de energia e maior consumo de material. Após o enriquecimento (remoção de impurezas), o biogás pode ser utilizado em motores de veículos (Noussan *et al.*, 2024).

2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA (DA)

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico complexo e degradante no qual resíduos e resíduos orgânicos são convertidos na ausência do oxigênio (O₂) (Silva & Abud, 2016). Os produtos resultantes podem ter enorme valor econômico e ambiental, como o metano e o digestato, o qual é um líquido efluente e que pode ser utilizado como fertilizante já que tem muitos nutrientes para o solo e planta na agricultura (Resende *et al.*, 2015). A DA conta com a sinergia de consórcios microbianos e o processo pode ser dividido em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, cada etapa é realizada por diferentes grupos de micróbios e sob condições específicas (Kunz *et al.*, 2022). A Figura 1, mostra o esquema das diferentes etapas da DA.

Figura 1 - Etapas do processo da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Karlsson *et al.* (2014).

Na primeira etapa, o processo de hidrólise, como resultado da atividade de enzimas liberadas pelos microrganismos, as ligações das moléculas complexas são quebradas, resultando na formação de moléculas menores e mais simples. A produção de ácidos, conhecida como acidogênese, é um processo realizado por bactérias no hidrolisado. Elas transformam essas moléculas em ácidos orgânicos (como ácido acético, butírico e propiônico) além de outros compostos como acetona, etanol, dióxido de carbono e hidrogênio. Durante a produção dos ácidos, as moléculas produzidas na etapa anterior são convertidas por bactérias acetogênicas (acetogênese) em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Finalmente, a metanogênese é o estágio em que as archaeas produzem gás metano. Esse grupo de microrganismos é dividido em dois tipos, um chamado de bactérias metanogênicas hidrogenotróficas (*Methannospirillum*, *Methanoculleis* e

Methanoculleus), que utilizam hidrogênio e dióxido de carbono, e outro que corresponde às bactérias metanogênicas acetoclásticas, que utilizam ácido acético (*Methanosarcina* e *Methanosaeta*) e metanol para produzir gases metano e dióxido de carbono (Caldas Alencar, 2017; Albuquerque & Araújo, 2016; Christy, Gopinath & Divya, 2014; Xu *et al*, 2018).

A Tabela 1 especifica os parâmetros ambientais, como a temperatura, o pH e a relação C:N:P:S (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre), essenciais para a atuação dos microrganismos em cada fase do processo de digestão anaeróbia. (Kunz, 2019).

Tabela 1 - Etapas e parâmetros para ação dos microrganismos na digestão anaeróbia

Parâmetro	Hidrólise/ Acidogênese	Metanogênese
Temperatura (°C)	25 - 35	32 - 42
pH	5,2 - 6,3	6,7 - 7,5
Relação C:N	10-45	20-30
Relação de C:N:P:S necessária	500: 15: 5: 3	600: 15: 5: 3

Fonte: Adaptado de Kunz, 2019

2.3 MONODIGESTÃO E CODIGESTÃO ANAERÓBIA

A monodigestão anaeróbia, definida como a digestão de um único substrato, é frequentemente limitada por fatores como as características intrínsecas dos componentes orgânicos e a baixa diversidade microbiana encontrada no meio (Mata-Alvarez *et al.*, 2014).

A codigestão, também conhecida como "co-fermentação", é o processo de digestão simultânea de uma mistura de diferentes tipos de substratos,

usados em conjunto para obter maiores rendimentos de fermentação anaeróbia (DA), ou seja, a codigestão anaeróbia é uma técnica de tratamento de resíduos em que diferentes tipos de materiais fermentáveis são combinados e processados simultaneamente, permitindo uma decomposição conjunta e eficiente dos resíduos (Ağdağ & Sponza, 2007).

A codigestão pode apresentar algumas limitações, como o aumento da demanda química de oxigênio (DQO). A DQO, que mede a quantidade de oxigênio necessária para decompor os poluentes na água, pode aumentar, tornando o efluente mais difícil de ser tratado antes do descarte. Por essa razão, o efluente pode precisar de pré-tratamento antes de ser enviado para o seu destino final (SARATALE *et al.*, 2018). Por outro lado, a codigestão pode favorecer o aumento da diversidade de espécies microbianas, provenientes dos diferentes substratos, ajudando a estabilizar o sistema no biodigestor (Noonari *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2014) e favorecendo a produção de biometano.

Embora a monodigestão seja frequentemente limitada por sua baixa eficiência, a codigestão anaeróbia, ao combinar diferentes substratos, pode aumentar significativamente a produção de biogás. Yu e colaboradores (2024), estudaram o efeito da codigestão de resíduos de repolho e dejetos bovinos na produção de metano. Experimentos em batelada foram conduzidos usando os substratos puros e diferentes proporções de mistura. Os resultados indicaram que a codigestão apresentou um efeito sinérgico, com proporção apropriada de resíduos de repolho para esterco bovino de 3:1 e produziu uma quantidade máxima de metano de 440 mL/g SV que foi 28,3%, 19,6%, 41,1% e 51,2% maior do que as proporções de mistura 1:0, 3:1, 1:1 e 0:1, respectivamente (Malik *et al.*, 2023).

2.4 PLANTA INVASORA *Hydrilla verticillata*

Os tipos de biomassa que podem produzir biocombustíveis incluem biomassa vegetal ou lignocelulósica, que consiste em vários componentes, como celulose, hemicelulose e lignina, dispostos em agregados estruturais tridimensionais complexos (Irmak, 2019). Essas estruturas tornam o substrato vegetal muito resistente ao ataque de microrganismos. Diante dessas dificuldades, geralmente é necessário o pré-tratamento desses substratos para a geração de biogás (Zheng *et*

al., 2014).

Entre os diversos tipos de biomassa vegetal estão as macrófitas, plantas aquáticas encontradas nas margens e águas rasas de rios, lagos, reservatórios e cachoeiras, bem como em outros corpos d'água mesmo em profundidades superiores a 10 m (Abranches, 2013). Segundo o relatório anual da Itaipu Binacional (2024), foram identificadas 53 espécies de plantas aquáticas. Em 2024 continuou a tendência de declínio na população de certas espécies invasoras, para *Hydrilla verticillata* foi registrada uma frequência similar a 2023, uma das menores já registrada na série histórica. Normalmente, esses tipos de plantas crescem em locais distantes da área central do reservatório, mais frequentemente em pequenas margens de rios nos ramais do reservatório, para se proteger do vento (Thomaz & Bini, 2003).

Esta planta invasora é uma monocotiledônea de angiosperma que prospera em água doce quente ou fria. O caule pode ter 1-2 m de comprimento. Suas folhas estão dispostas em 2-8 espirais ao redor do caule, cada folha com 5-20 mm de comprimento e 0,7-2 mm de largura, com espinhos dentados ou pequenos ao longo da margem da folha; os nervos centrais das folhas frescas são geralmente vermelhos, monóicos (às vezes dióicos), flores masculinas e femininas aparecem separadamente em uma planta. As flores são pequenas, com três sépalas, três pétalas de 3-5 mm de comprimento, transparentes, com listras vermelhas. Reproduz-se principalmente por fragmentação, rizomas e turbidez (no inverno) e raramente são vistas as flores (Sousa, 2011). A Figura 2 mostra a estrutura de uma *Hydrilla verticillata* removida de um corpo d'água (Jain & Kalamdhad, 2018).

Figura 2 - *Hydrilla verticillata*



Fonte: Acervo pessoal Rodrigues, 2019.

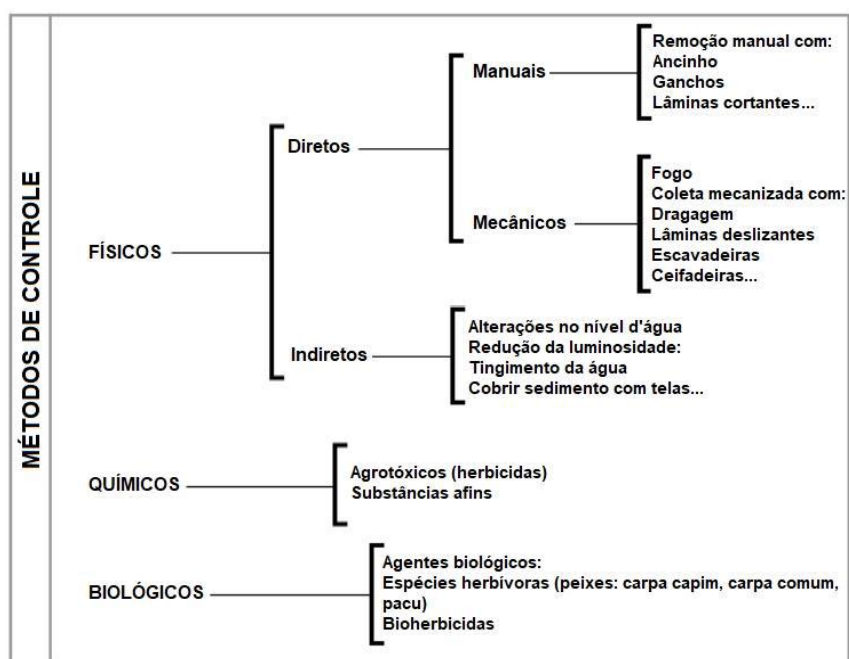
2.5 MÉTODOS DE CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS

Devido ao crescimento exacerbado de algumas plantas aquáticas, programas de monitoramento e controle devem ser implementados para mitigar os problemas gerados por essa proliferação. Esses programas têm como objetivo obter conhecimento sobre a diversidade, o desenvolvimento e dinâmica das espécies, a fim de apoiar um manejo racional desses organismos (Abranches, 2013; Pompêo, 2017). Antes de iniciar o controle, é fundamental considerar os níveis em que a abundância pode ser considerada problemática (Thomaz & Bini, 2003).

É preciso fazer uma análise abrangente ao fazer monitoramento e controle considerando as características biológicas e ecológicas das espécies que se encontram nesse habitat, desta maneira se deve considerar a área colonizada, nível de infestação, procurando assim um método para o controle da planta. Para saber se o controle foi eficaz se deve observar se existe uma redução total ou parcial das macrófitas, além de isso, se deve observar se existe uma coexistência equilibrada entre a planta e o meio depois da manutenção. Dessa forma, para um controle mais eficiente, são empregados diferentes métodos que podem ser implementados de forma isolada ou integrada. Tais abordagens são classificadas em

três grupos principais: métodos físicos, químicos e biológicos (Figura 3) (Abranches, 2013).

Figura 3 - Métodos de controle de plantas invasoras de corpos d'água.



Fonte: Adaptado de Pompêo, 2017.

2.5.1 Métodos Físicos

O método físico, é o método mais utilizado para o controle de plantas aquáticas, mesmo sendo este método um dos mais custosos. Ele consiste na extração manual ou com maquinaria da biomassa vegetal, ajudando assim a reduzir consideravelmente a infestação por esta planta invasora. Mas, ao extrair a planta do meio aquático o seguinte passo é a eliminação da biomassa extraída. Pelo geral o biomaterial é descartado em aterros sanitários ou ser aproveitado na biossorção, fitorremediação, fitoquímico ou ser aproveitado pelos animais (Pompêo, 2017).

Os métodos físicos utilizados para o controle de macrófitas, podem ser aplicados tanto diretamente como indiretamente. O controle direto utiliza técnicas como a recolha de macrófitas, aplicação de calor (fogo) e poda. As técnicas podem ser implementadas manualmente em áreas pequenas e mecânicas em áreas de

maior tamanho, ao utilizar técnicas mecanizadas inclui desde maquinaria ligeira até dispositivos de grande envergadura de acordo com a infestação da planta. É importante que depois de implementar uma das técnicas é preciso retirar as macrófitas da água, porque os fragmentos podem regenerar-se originando assim novas infestações (Pompêo, 2017; Jain & Kalamdhad, 2018).

O método indireto tem como objetivo reduzir o bloquear a quantidade de luz que está disponível para o desenvolvimento da macrófita. A técnica utilizada neste método consiste em utilizar barreiras físicas, ou diminuir o nível da água do reservatório para desestabilizar o habitat e reduzir a proliferação das plantas (Jain & Kalamdhad, 2018).

Os pesquisadores propõem que o melhor método de controle é a colheita mecânica sendo mais eficaz no controle da *Hydrilla verticillata* invasora. Como resultado, se tem a biomassa que pode ser utilizada para a produção de bioenergia e biofertilizantes (Evans & Wilkie, 2010).

2.5.2 Métodos Químicos

Os métodos consistem no uso de herbicidas ou outras substâncias similares que podem ser aplicados no ambiente aquático. O herbicida é considerado o mais rápido e eficaz porque atua em um curto período de tempo. Mesmo que seja uma das mais rápidas, este método pode ter um impacto negativo a outras plantas que não sejam o alvo. Dentre os impactos que podem gerar este tipo de herbicidas estão: qualidade da água, diminuição da biodiversidade, entre outras limitantes. Para mitigar os impactos negativos ao implementar as substâncias químicas é preciso analisar a dosagem; número de aplicações; tipos de herbicidas; a eficácia do produto (Pompêo, 2017).

De acordo com a literatura, herbicidas como o Diquat afetam principalmente as partes aéreas das plantas, o que impede seu impacto em estruturas submersas, como rizomas e tubérculos. Outro herbicida frequentemente utilizado, é o Fluridone, que precisa de várias aplicações para que sua eficácia seja alcançada (Jain & Kalamdhad, 2018).

2.5.3 Métodos Biológicos

Outra alternativa utilizada para o controle de macrófitas é o método biológico, que consiste na utilização de agentes biológicos que neutralizam naturalmente o avanço da infestação desta espécie invasora. Uma das técnicas utilizadas é introduzir espécies herbívoras que sejam capazes de se alimentar das macrófitas diminuindo a propagação das plantas. O uso mais comum é da espécie *Ctenopharyngodon Idella* conhecida pelo nome popular carpa herbívora, os resultados mostram que foi efetivo em várias regiões (Abranches, 2013). Outras alternativas são as espécies *Hydrellia pakistanae*, onde as larvas se alimentam de folhas, do mesmo jeito que a espécie *Hydrellia balciunas* (Udugamasuriyage; Kahandawa; Tennakoon, 2024). Além disso, existe a aplicação de bioherbicidas, que consiste em utilizar microrganismos patógenos como os fungos, bactérias e vírus que infectam especificamente a planta invasora (Pompêo, 2017; Thomaz & Bini, 2003).

O método não pode ser utilizado a grande escala pelo qual limita o método de controle das macrófitas. Sendo assim, é preciso fazer pesquisas sobre a ecologia de agentes biológicos na bioprospecção para identificar novas espécies, viabilidade econômica e o uso do método para ser utilizado a grande escala. Além disso, é preciso testar seu impacto a longo prazo (Abranches, 2013).

2.6 DESAFIOS NO APROVEITAMENTO DE PLANTAS AQUÁTICAS PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

O pré-tratamento de biomassa vegetal visa a desconstrução da lignina e hemicelulose na célula vegetal, com o fim de aumentar a superfície de contato e deixá-la exposta à ação dos microrganismos. Entre os distintos pré-tratamentos, mecânico, térmico ou químico, o biológico emprega bactérias e fungos para degradar matéria orgânica. Por meio da ação de enzimas extracelulares, esses microrganismos quebram moléculas poliméricas recalcitrantes, convertendo compostos de elevado peso molecular em moléculas simples, o que possibilita a produção de biogás (Ferdeş *et al.*, 2020). Em comparação com os outros métodos, esta abordagem requer menos energia para sua execução e não gera resíduos

nocivos, tornando-a um procedimento ecologicamente correto (Olatunji & Ahmed Ogun Kunle, 2021).

A biomassa lignocelulósica apesar de ser abundante é difícil de biodegradar, representando um grande obstáculo para a produção de biogás a partir dessa biomassa, requerendo que a matéria prima passe por pré-tratamento. Ao ser pré-tratada adequadamente, pode contribuir com uma produção de biogás mais eficaz. Além disso, ao utilizar matéria orgânica como matéria prima pode ajudar a produzir o biogás reduzindo a contaminação ambiental tornando uma produção de energia renovável (Olatunji; Ahmed; Ogunkunle, 2021). Diferentes pré-tratamentos podem ser empregados, como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, tal como indicados na Tabela 2, onde todos eles têm com o objetivo de promover a deslignificação, solubilização de açúcares e a redução da cristalização da celulose, em substratos lignocelulósicos (Ali; Abomohra; Sun, 2017).

Quadro 1 - Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica para a produção de biogás.

Pré-tratamento	Tipo de Pré-tratamentos	Vantagens	Desvantagens
Físico	Fresagem	Redução da cristalinidade da celulose e do tamanho das partículas da área superficial, fácil gerenciamento do substrato.	Alta demanda de eletricidade.
	Irradiação	Rompimento das ligações de hidrogênio e cristalinidade da celulose, incremento da área da superfície, transferência de calor rápida, tempo de reação curto.	Alta demanda de energia, problemas de escalabilidade.
Físico-químico	Extrusão	Destruição da estrutura de celulose, aumento da área de superfície;	Alto consumo de energia.
	Hidrotérmico	Hidrólise da hemicelulose e lignina, destruição da estrutura de celulose	Alto consumo de água, alta entrada de energia.
	Explosão a vapor	Hidrólise de hemicelulose e lignina, destruição da cristalinidade da celulose.	Alta demanda da energia, formação de compostos recalcitrantes.
Químico	Ácido	Hidrólise da hemicelulose, alteração da estrutura da celulose.	Alto custo dos ácidos, formação de inibidores.

	Alcalino	Hidrólise da lignina, alteração da estrutura da celulose.	Formação de inibidores.
	Oxidativo	Remoção da hemicelulose e lignina	Custo dos químicos, formação de inibidores.
	Organo-solventes	Solubilização de hemicelulose/lignina e celulose.	Custo do solvente, etapas de remoção do solvente.
Biológico	Microbiano	Hidrólise de lignina e hemicelulose, alteração da estrutura da celulose. Sem formação de compostos inibitórios, baixo consumo de energia.	Processo lento, perdas de carbono, necessidade de uma grande área estéril.
	Enzimas	Alteração da estrutura da celulose, deslignificação, hidrólise parcial da hemicelulose, processo rápido, baixa demanda de energia.	Alto custo das enzimas, adição contínua pode ser necessária.

Fonte: Adaptado de Abraham *et al.* (2020).

2.6.1 Pré-Tratamento Físico

Os pré-tratamentos físicos reduzem o tamanho das partículas, aumentando a área de superfície da biomassa. Essa diminuição no tamanho da partícula aumenta a acessibilidade da biomassa, tornando-a mais suscetível à agressão por micróbios ou enzimas durante o processo de digestão anaeróbia (Abraham *et al.*, 2020). Os procedimentos de pré-tratamento físico incluem moagem, explosão a vapor (autohidrólise), pré-tratamento com água líquida quente (hidrotermólise), extrusão e irradiação (ultrassom e micro-ondas). É fundamental destacar que essa abordagem não produz resíduos perigosos que interferem na digestão anaeróbia (Zheng *et al.*, 2014), embora seja um usuário significativo de energia.

2.6.2 Pré-Tratamento Químico

O pré-tratamento químico é um dos procedimentos mais preferidos quando comparado às abordagens físicas e biológicas, devido à sua eficácia e

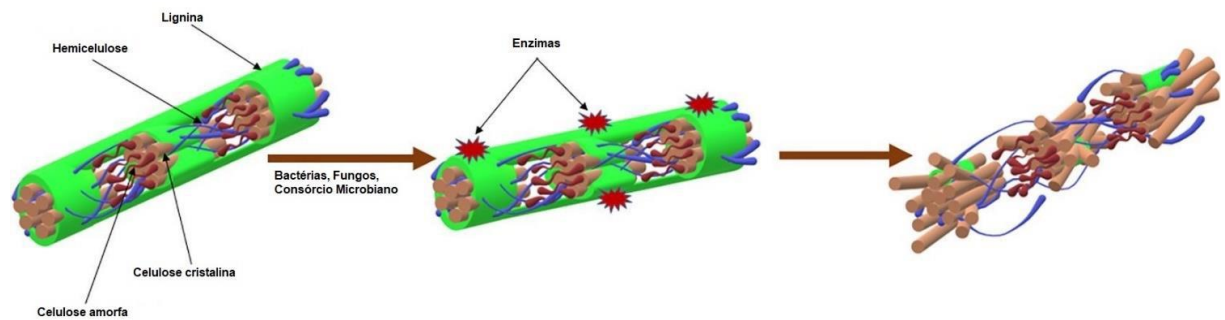
capacidade de facilitar a digestão de matérias-primas complicadas. Os solventes de pré-tratamento químico são classificados como ácidos, alcalinos, oxidativos e orgânicos. Os agentes de pré-tratamento químico incluem ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido acético (CH_3COOH), ácido fórmico (CH_2O_2), ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e amônia (NH_3). Esse tratamento funciona principalmente removendo a lignina ou a hemicelulose da biomassa, e o mecanismo de ação é determinado pelo produto químico utilizado, bem como pelos parâmetros operacionais do processo (Abraham *et al.*, 2020; Olatunji; Ahmed; Ogunkunle, 2021; Zheng *et al.*, 2014).

2.6.3 Pré-Tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico concentra-se no uso de microrganismos, principalmente fungos, na forma de consórcios microbianos, que podem ser aplicados diretamente à biomassa. Em comparação com outros métodos de terapia, como o tratamento físico-químico, esse processo consome menos energia e não utiliza produtos químicos, o que o torna um procedimento ecologicamente benéfico. No entanto, o tempo necessário para realizar essas técnicas têm limitado seus usos comerciais (Olatunji; Ahmed; Ogunkunle, 2021; Zheng *et al.*, 2014). As estratégias que incorporam esse tipo de terapia são mais compatíveis com a DA porque não produzem subprodutos tóxicos ou inibidores que possam prejudicar o processo, resultando em vantagens para o processo (Wagner *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2014). O objetivo fundamental do tratamento biológico é a deslignificação, ou seja, a quebra da lignina para revelar a celulose e a hemicelulose (holocelulose), o que favorece a DA (Abraham *et al.*, 2020).

Pré-tratamentos biológicos com fungos ligninolíticos, seguidos de codigestão anaeróbia, tem a capacidade de desenvolver altos rendimentos de biometano (Meraj *et al.*, 2021). O pré-tratamento biológico pode melhorar a digestibilidade, tornando a celulose e a hemicelulose mais disponíveis para as enzimas que convertem carboidratos em açúcares livres fermentáveis durante a fase de hidrólise (Figura 4) (Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020).

Figura 4 - Processo de pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de ABRAHAM *et al* (2020).

Os fungos são microrganismos com alto potencial biotecnológico devido à sua atividade enzimática. Os microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, produzem enzimas que degradam materiais lignocelulósicos. Dentro dos organismos que destroem rapidamente a lignocelulose estão os fungos de podridão branca, podridão marrom e podridão mole, os fungos de podridão branca e mole atacam a lignina e, até certo ponto, a celulose, enquanto os fungos de podridão marrom têm como alvo a celulose (Wagner *et al.*, 2018). Os basidiomicetos de podridão branca estão entre os fungos mais eficientes, pois podem quebrar a lignina na superfície da holocelulose (celulose e hemicelulose), enquanto os fungos de podridão marrom e mole degradam apenas uma pequena quantidade de lignina (Nadir, N; Ismail, N. L.; Hussain, A. S., 2019).

Os fungos basidiomicetos exigem atenção especial, pois podem produzir grandes concentrações e diversas enzimas que atuam sobre o polímero de celulose, iniciando assim o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (Florencio; Badino; Farinas, 2017). De acordo com (Olatunji *et al.*, 2021), um dos principais problemas com o pré-tratamento biológico empregando cultura de fungos é o desenvolvimento lento do fungo que pode alcançar até, aproximadamente, 30 dias.

Apesar do desafio do desenvolvimento lento, estudos têm demonstrado que o pré-tratamento biológico pode ser otimizado para gerar resultados satisfatórios na produção de biogás. Em uma pesquisa realizada por Yadav e Vivekenand (2020), o pré-tratamento de palha de trigo e milho com o fungo *Curvularia lunata* resultou em um aumento significativo de biogás. A produção do

biocombustível aumentou 19%, passando de 449 para 533 mL/gVs. Já na palha de milho, o aumento foi de 28% com a produção subindo de 360 para 463 mL/gVs. Esses resultados indicam que o pré-tratamento, quando otimizado, é uma via eficaz para aprimorar a digestibilidade da biomassa e, conseqüentemente, a produção de biogás.

2.6.3.1 Pré-tratamento Enzimático

As enzimas lignolíticas incluem a lignina peroxidase, manganês peroxidase e a lacase. As lacases são classificadas como oxidases de cobre múltiplo porque contém quatro átomos de cobre dispersos em três locais de ligação (Baldrian, 2006). Essas enzimas catalisam a oxidação de uma série de compostos aromáticos doadores de hidrogênio, incluindo a lignina, e a subsequente redução de oxigênio à água. Elas têm baixa especificidade para seus substratos redutores, o que significa que podem realizar ações em uma variedade de substratos (Baldrian, 2006; Majeau; Brar; Tyagi, 2010). A maioria das laccases identificadas na literatura pode ser isolada de fungos, principalmente dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. (Baldrian, 2006).

Estudos como os de Sarnthima & Khammuang, (2018) e Deng e colaboradores (2019) mostram os efeitos do pré-tratamentos feitos com a enzima lacase em substratos como palha de trigo e arroz, evidenciando a hidrólise de estruturas como a lignocelulose e/ou modificação da estrutura da mesma. Esse comportamento foi evidenciado por microscopia de infravermelho, que mostrou uma redução na intensidade dos picos associados ao grupo carbonila da hemicelulose e à vibração do anel aromático da lignina, confirmando a modificação da estrutura da biomassa.

Complementando estudos sobre o pré-tratamento enzimático, Matei *et al.* (2020) descreve o tratamento de biomassa com lacase produzida pelo fungo *Trametes villosa*. O processo foi otimizado com o uso do mediador 2,6-dimetoxifenol, o que resultou em um aumento de mais de 10 vezes na liberação de açúcares. A importância do mediador se dá por sua capacidade de penetrar na estrutura complexa da lignina, que a enzima por si só não consegue alcançar. Ao ser oxidado pela lacase, o mediador age com um transportador de elétrons entre a enzima e o

substrato, promovendo uma degradação da lignina mais eficiente e permitindo acesso dos microrganismos ao substrato.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia da planta aquática invasora, *Hydrilla verticillata*, pré-tratada com o extrato enzimático do fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19 e dejetos bovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade da enzima lacase nos extratos enzimáticos brutos obtidos a partir dos meios de cultivo, Extrato de malte (MEA) e Meio com farelo de trigo (FT).
- Caracterizar os substratos (*Hydrilla verticillata* e dejetos bovinos) e o inóculo quanto aos teores de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF).
- Avaliar a eficácia do pré-tratamento biológico, com e sem mediador enzimático 2,6-dimetoxifenol, no aumento do rendimento do biogás.
- Quantificar o potencial bioquímico de biogás (PBB) das diferentes rotas (pré-tratadas e não tratadas) de codigestão da macrófita com dejetos bovinos.
- Identificar as alterações morfológicas na superfície da *H. verticillata* induzidas pelo pré-tratamentos biológico, com e sem mediador.

4 METODOLOGIA

A metodologia detalha os procedimentos adotados para o pré-tratamento da *Hydrilla verticillata*, incluindo a inoculação do fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19, a obtenção do extrato bruto enzimático, a análise da atividade enzimática nos meios Extrato de malte (MEA) e Malte enriquecido com farelo de trigo (FT), e o pré-tratamento da planta para a produção de biogás.

Este trabalho também detalha os procedimentos para a coleta e caracterização de biomassas, tanto vegetal quanto animal, além do digestato. Os substratos utilizados nos ensaios foram a macrófita *Hydrilla verticillata*, o dejetos bovino e a celulose, com os dois últimos servindo como controle positivo e negativo, respectivamente.

4.1 CULTIVO FÚNGICO

O fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19 depositado na Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental, CCMIBA, da Unila foi reativado em meio sólido contendo 20 g/L de ágar extrato de malte, 10 g/L de peptona e 5 g/L extrato de levedura (MEA) a 28 °C. por 7 dias em estufa, conforme o método descrito por Baldrian, (2009).

Após o crescimento do fungo nas placas, 3 *plugs* de aproximadamente 1 cm do micélio foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL, para a pré-inoculação, totalizando 12 ensaios. Desses ensaios, seis continham 50 mL de MEA (extrato de malte, 20 g/L; peptona, 10 g/L; e extrato de levedura, 5 g/L) e os outros seis continham 50 mL de Meio Malte enriquecido com farelo de trigo (FT) (5 g de farelo de trigo; 100 mg de NH₄Cl/g; 50 mg de extrato de malte e 12 mL de água destilada). Foram preparados, ainda, dois controles negativos (meios de cultura sem o fungo) para cada meio de cultivo utilizado. O fungo nos diferentes meios e os seus controles negativos foram incubados por 4 dias em agitação (28 °C, 140 rpm).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

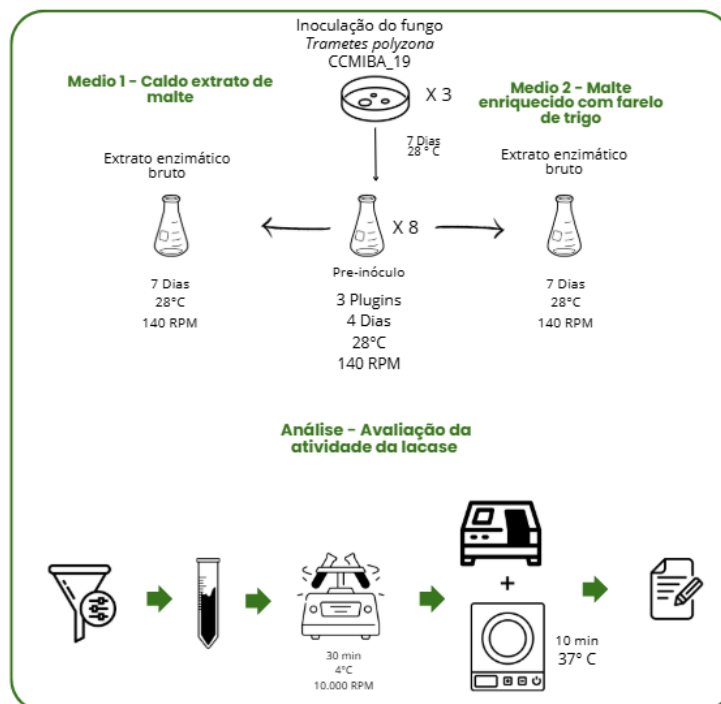
Para a obtenção do extrato enzimático bruto a partir do fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19, os ensaios do cultivo em MEA após incubação foram transferidos para frascos estéreis e submetidos à centrifugação a 10.000 rpm, 4 °C,

durante 30 minutos. Em seguida, a solução resultante, o extrato enzimático livre de biomassa, foi transferida para um novo tubo. Uma alíquota dessa solução foi analisada por espectrofotometria para determinação da atividade da enzima lacase, enquanto o volume resultante foi armazenado a 4 °C para posterior uso no pré-tratamento da macrófita.

Para as amostras com meio Malte enriquecido com farelo de trigo por se tratar de um meio semissólido, foi necessário um o pré-tratamento para obtenção do extrato enzimático. Após o cultivo, foi adicionando uma solução de acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5), em uma proporção de 1/1 (p/v). Em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação por 1 h. Após esse tempo, o material foi transferido para tubos esterilizados e centrifugado a 10.000 rpm (4 °C) por 30 minutos. Depois de separada a fase líquida da sólida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a 4 °C para sua posterior análise de atividade enzimática e pré-tratamento da macrófita.

O processo da obtenção do extrato enzimático pode ser observado de forma integral na Figura 5, que mostra de forma resumida o processo de inoculação até o processo de análise com os meios caldo extrato de malte e malte enriquecido com farelo de trigo.

Figura 5 - Esboço da obtenção do extrato enzimático com o fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19.



Fonte: Autoria própria 2025.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE

Nesta etapa, para cada um dos extratos provenientes da inoculação do fungo nos meios (MEA e Malte Farelo de trigo), foi avaliada a atividade enzimática por meio de espectrofotometria UV-VIS. Para isso, foram tomados microtubos correspondentes a cada meio, sendo adicionado 600 µL de solução tampão de acetato de sódio 1M, 1200 µL de solução enzimática e 1200 µL de ABTS 2,2'-azino-di [3-etilbenzo-tiazolin-sulfonato] (0,03%). Em seguida, foi configurado o espectrofotômetro em 420 nm, zerado com 1mL de água destilada, e 1mL do controle negativo do respectivo experimento, sendo realizado na proporção de (1:1). Assim sendo, foram transferidos os microtubos para a cubeta e posterior análise.

O procedimento para determinar a atividade enzimática da lacase consistiu em duas etapas de medição. Primeiramente, as amostras foram submetidas a uma leitura inicial. Em seguida, após 10 min de incubação a 37 °C, foi realizada a leitura final de absorvância. Utilizando esses dados, a atividade enzimática foi calculada com base na Lei de Lambert-Beer (Equação 1), seguindo a adaptação proposta por Baltierra-Trejo; Márquez-Benavides; Sánchez-Yáñez, (2015). A atividade da lacase foi quantificada em unidade por litro (U/L), onde uma unidade equivale à oxidação de 1 µmol de ABTS por minuto.

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)}{(t)(\varepsilon)(V_s)} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

U = Atividade Enzimática ($\mu \text{ mol } \text{min}^{-1} \text{L}^{-1}$)

ΔA = Absorvância final - absorção inicial

V_t = Volume total da reação (mL)

D_f = Fator de diluição

t = Tempo de reação (min)

ε = Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$ ou $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

V_s = Volume da amostra (mL)

4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA *Hydrilla verticillata* COM O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

A *Hydrilla verticillata* previamente coletada foi submetida a quatro tratamentos enzimáticos (Tabela 2), conforme Curran *et al.* (2022) e modificações. No primeiro e terceiro tratamento (MEA T1 e FT 3), foram adicionados 2 g de macrófita, 5 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5; 10 mL de extrato enzimático do cultivo em MEA ou do cultivo em Malte enriquecido com farelo de trigo; 2,5 mL de peróxido de hidrogênio (2 nM) e 2,5 mL do mediador redox 2,6-dimetoxifenol (1 mM). No segundo e quarto tratamento (MEA T2 e FT 4), foram acrescentados 2 g da macrófita, 10 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5; 10 mL de extrato enzimático preparado com MEA ou com o Malte enriquecido com farelo de trigo, sem o mediador redox. Foram preparados os controles negativos, substituídos 10 mL do substrato enzimático, por 10 mL de caldo de controle negativo.

Tabela 2 - Identificação das amostras pré-tratadas com diferentes extratos enzimáticos.

Nome da amostra	Extrato enzimático utilizado	Mediador 2,6-dimetoxifenol
MT1	Extrato de Malte (MEA)	Com mediador
MT2	Extrato de Malte (MEA)	Sem mediador
MT3	Farelo de trigo (FT)	Com mediador
MT4	Farelo de trigo (FT)	Sem mediador

MT1: meio com extrato de malte e mediador. MT2: meio com extrato de malte sem mediador. MT3: meio com farelo de trigo e mediador. MT4: meio com farelo de trigo sem mediador.

Fonte: Autoria própria, 2025.

Os ensaios foram montados em triplicata. Após a preparação, os pré-tratamentos foram incubados a 37 °C sob agitação de 170 rpm por 24 horas. Ao final do período de incubação, as biomassas foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo, e a fração insolúvel foi lavada com água destilada. Em seguida, as amostras

foram secar em estufa a 40 °C até atingir peso constante para uso como substrato pré-tratado no processo de digestão.

4.5 COLETA E ACLIMATAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi obtido do biodigestor de mistura completa (CSTR) da empresa Centro Internacional de Energias Renováveis e Biogás (CIBiogás), que é principalmente um lodo anaeróbio estabilizado. Após a coleta, o material foi armazenado em frascos de 2 L e mantido sob refrigeração a 4 °C (Caldas Alencar, 2017; Jankovičová *et al.*, 2025).

Antes do início das reações experimentais, o inóculo foi aclimatado por um período de 15 dias em temperatura de $37,0 \pm 1,0$ °C. (Caldas Alencar, 2017; VDI 4630, 2006).

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SUBSTRATOS E INÓCULO.

A caracterização físico-química dos substratos dejetos bovino, *H. verticillata* pré-tratada ou não, da celulose e inóculo dos biodigestores, foi realizada pela determinação dos teores de sólidos totais (ST), fixos (SF) e voláteis (SV). As análises seguiram as recomendações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), utilizando o método 2540-B para ST e o 2540-E para SF e SV, permitindo comparar os substratos e monitorar a eficiência da degradação.

4.6.1 Teor De Sólidos

Os sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (SF) foram determinados conforme a VDI, (2006). As amostras analisadas foram nominadas conforme descrito: M: *Hydrilla verticillata*; MT1: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 1; MT2: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 2; MT3: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 3; MT4: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 4; DB: Dejetos Bovino; inóculo e; celulose.

As amostras, em triplicata, foram secas em estufa a 105°C até atingir a massa constante. Posteriormente, procedeu-se para determinação dos sólidos

voláteis (SV) e fixos (SF) das amostras, após serem secas em estufa a 105 °C, foram levadas para a mufla a 570 °C por 1h.

O teor de sólidos das amostras utilizadas foram calculados de acordo com Apha (2005), através das seguintes fórmulas:

Sendo:

$$ST \% = \frac{A - B}{C - B} \times 100 \quad \text{Equação 02}$$

$$SV \% = \frac{A - D}{A - B} \times 100 \quad \text{Equação 03}$$

$$SF \% = \frac{D - B}{A - B} \times 100 \quad \text{Equação 04}$$

Onde:

A = Peso da amostra seca

B = Peso do cadinho

C = Peso da amostra úmida

D = Peso da amostra calcinada

4.6.2 Determinação das Proporções dos Substratos

A determinação das proporções dos substratos foi feita segundo as orientações da norma alemã VDI (2006) e Yavini *et al.* (2014). Todos os reatores de 121 mL possuíam 24 g de substratos e água (W), com teor de 9% de ST, massa seca (K). Então, cada reator recebeu 2,16 g de massa seca (Equação 5), distribuídas entre a massa seca do dejetos bovino e da macrófita, na proporção de 2:1 (Equação 6). Logo, para atender a proporção de massa seca nas biomassas, foram calculadas as suas massas úmidas conforme Equação 7.

$$M_s = \frac{(K \cdot W)}{100} \quad \text{Equação 05}$$

$$M_s = 2 \times M_{sd} + 1 \times M_{sm} \quad \text{Equação 06}$$

$$M_u = \left(\frac{M_{sd}}{ST} \times 100 \right) + \left(\frac{M_{sm}}{ST} \times 100 \right) \quad \text{Equação 07}$$

Onde:

M_s = Massa seca das biomassas;

W = Massa total das biomassas e água que serão adicionadas ao biodigestor;

K = Porcentagem de sólidos totais que se pretende colocar nos reatores;

M_{sd} = Massa seca dos dejetos bovinos;

M_{sm} = Massa seca da macrófita;

M_u = Massa das biomassas que serão adicionadas nos reatores;

ST = sólidos totais das biomassas.

Depois de calcular as quantidades de cada um dos substratos, foi adicionada a água até completar 24 g.

A proporção de inóculo foi de 0,9:1, inóculo:substrato, com base nos SV, conforme Equação 08. As massas dos substratos, da água e do inóculo estão descritas na Tabela 4.

$$2 = \frac{m_i \times SV_i}{m_s \times SV_s} \quad \text{Equação 08}$$

Onde:

m_i = massa de inóculo a ser utilizada;

m_s = massa úmida do substrato (24 g);

SV_i = Sólidos voláteis do inóculo;

SVs = Sólidos voláteis dos substratos conforme suas contribuições na mistura.

Tabela 3 - Quantidades das biomassas (dejetos bovinos e macrófita *H. verticillata*), água e inóculo adicionados nos ensaios PBB.

Amostras	DB (g)	Macrófita (g)	Água (g)	Inóculo (g)
DB + M + H2O + Inóculo	8,0	0,8	15,2	10,2
DB + MT1 + H2O + Inóculo	8,0	0,8	15,2	10,2
DB + MT2 + H2O + Inóculo	8,0	0,8	15,2	10,2
DB + MT3 + H2O + Inóculo	8,0	0,8	15,2	10,2
DB + MT4 + H2O + Inóculo	8,0	0,8	15,2	10,2
Inóculo	--	--	--	12,7

M: macrófita sem pré-tratamento. MT1: pré-tratamento com meio ágar extrato de malte e mediador. MT2: pré-tratamento com meio com ágar extrato de malte sem mediador. MT3: pré-tratamento com meio com farelo de trigo e mediador. MT4: pré-tratamento com meio com farelo de trigo sem mediador. DB: dejetos bovinos. Inóculo: controle negativo

Fonte: Autoria própria, 2024.

4.6.3 pH

Foi avaliado o pH das amostras e/ou substratos que foram adicionados aos reatores, antes e depois do processo de biodigestão com papel indicador universal.

4.7 APARATO EXPERIMENTAL

A avaliação de produção de biogás foi realizada em frascos de penicilina de 121 mL, como biodigestores. Os afluentes foram colocados nos biodigestores e submetidos a atmosfera de nitrogênio (N₂). Depois, os frascos foram

lacrados com um septo de borracha e tampa de alumínio com o auxílio de um alicate recravador. Para manter uma temperatura mesofílica, os frascos foram mantidos em um banho-maria a $37,0 \pm 1,0$ °C, conforme VDI 4630 (2006) e mostrados na Figura 6.

Figura 6 - Biodigestores em banho-maria.



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.8 TESTE DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS(PBB)

Foram realizados os ensaios do Potencial Bioquímico de Biogás, conforme a norma VDI 4630 (2006). Os ensaios foram feitos em batelada e em triplicata, ocorrendo em temperatura mesofílica ($37,0 \pm 1,0$ °C), em reatores contendo de 9% de sólidos totais (O'Sullivan *et al.*, 2010). Foram avaliadas a codigestão do dejetto bovino e da macrófita (razão 2:1) com inóculo. Também foi feita a codigestão do dejetto bovino com a celulose, para controle. Os ensaios foram feitos com inóculo na razão de 0,9:1 (inóculo: substratos), com base nos sólidos voláteis. As proporções de substrato utilizados nos ensaios de Potencial Bioquímico de Biogás (PBB) foram definidas com base nas recomendações metodológicas apresentadas por Albuquerque & Araújo, (2016). Os ensaios de PBB foram mantidos por 40 dias e, durante esse processo, foram realizadas leituras diárias (de segunda a sábado e exceto feriados), das pressões de biogás produzido, com o auxílio do manômetro Greisinger GMH-3100.

5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV

A morfologia da superfície da *Hydrilla verticillata* sem e com os pré-tratamentos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o microscópio eletrônico de varredura Zeiss Evo-MA10 com aproximação de 500 vezes (10 μm).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a geração de biogás foi avaliada a partir do pré-tratamento biológico do substrato vegetal *H. verticillata*, utilizando o extrato enzimático do fungo *T. polyzona* CCMIBA_19. A Produção do biocombustível foi conduzida por meio da codigestão da *H. verticillata* com o dejetos bovino. Para fins de comparação, a celulose foi utilizada como controle positivo, e o próprio inóculo serviu como controle negativo.

A atividade enzimática do fungo avaliada foi a lacase produzida em dois meios de cultivo diferentes, um em caldo Extrato de malte (MEA) e outro em Malte enriquecido com farelo de trigo. Somente o meio extrato de malte (Tabela 4) resultou na atividade da enzima lacase, 2,90 U/L. Apesar do segundo meio não ter apresentado atividade enzimática para a enzima lacase, não se descarta a possibilidade da presença de outras enzimas. Neste sentido, mesmo sem lacase, o extrato enzimático do meio FT também foi selecionado para o pré-tratamento da macrófita.

Tabela 4 - Meio com solução de ágar extrato de malte - MEA.

Vias Inoculadas	Concentração de lacase (U/L)
A	5,06 \pm 0,16
B	3,63 \pm 0,08
C	0,09 \pm 0,13

Fonte: Autoria própria, 2024.

Vários estudos confirmam que diferentes espécies de *Trametes* produzem quantidades significativas de lacase quando cultivadas em meios contendo farelo de trigo, seja como substrato principal ou como co-substrato. Tanto os métodos de fermentação em estado sólido quanto os de fermentação submersa têm sido utilizados com sucesso (Corrêa *et al.*, 2024; RUSITASHVILI *et al.*, 2024). A ausência de atividade de lacase em *Trametes* cultivado em farelo de trigo geralmente se deve a condições de cultivo subótimas, à falta de indutores ou nutrientes necessários, ou a limitações intrínsecas da cepa. A otimização da composição do substrato, dos parâmetros ambientais e a adição de indutores podem aumentar significativamente a produção de lacase.

O pré-tratamento contou com ensaios com a adição de 2,6-dimetoxifenol, um mediador considerado eficiente na degradação de material lignocelulósico. Este composto atua como um mediador redox, facilitando a transferência de elétrons entre a enzima lacase e os compostos fenólicos do substrato, aumentando dessa forma a eficiência da degradação da lignina (Matei *et al.*, 2020). Este fator aumenta a expectativa de que a lignina do substrato em questão seja quebrada, fazendo com que os microrganismos tenham maior acesso aos açúcares do vegetal para a geração do biogás.

Os SV são definidos como o material carbonáceo passível de virar energia mediante a biodigestão anaeróbia e os sólidos fixos como a matéria mineral ou inorgânica (Rodrigues *et al.*, 2020). A produção de biogás é inerente à presença dos SV, resultando num processo proporcional, ou seja, quanto maior a quantidade de sólidos voláteis, maior a possibilidade de geração do biocombustível. A determinação do teor de sólidos totais dos substratos de entrada no biodigestor, resulta de vital importância, com o fim de evitar a sobrecarga de matéria orgânica no sistema. Portanto, de acordo com a diretriz VDI (2006), os ST da mistura dos substratos, não devem ultrapassar os 10%.

Os dados obtidos mediante o teor de sólidos das amostras encontram-se representados na Tabela 7.

Tabela 5 - Teor de sólidos das amostras.

Amostra	ST (%)	SV (%)	SF (%)
M	90,18 ± 0,07	77,9 ± 1	23 ± 1
MT1	91,8 ± 0,1	70,1 ± 0,4	29,9 ± 0,4
MT2	91,4 ± 0,3	75,1 ± 0,4	24,9 ± 0,4
MT3	83,0 ± 0,1	73,3 ± 0,3	26,7 ± 0,3
MT4	92,9 ± 0,1	76,7 ± 0,6	23,3 ± 0,6
DB	18,8 ± 0,7	77 ± 1	23 ± 1
Inóculo	4,2 ± 0,6	60 ± 2	40 ± 2

M: *Hydrilla verticillata*; MT1: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 1; MT2: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 2; MT3: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 3; MT4: *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 4; DB: Dejeito Bovino.

Fonte: Autoria própria, 2024.

A análise de sólidos realizada neste estudo para a *Hydrilla verticillata* e o dejeito bovino encontra-se em consonância com os dados da literatura. Para a *H. verticillata*, o teor de Sólidos Totais (ST) obtido (90%) está alinhado com o valor de 92% reportado por Chen *et al.* (2016). Da mesma forma, o teor de Sólidos Voláteis (SV) de 77% (Autoria Própria, 2024) é similar ao 72,4% encontrado na literatura (Chen *et al.*, 2016). Em relação ao Dejeito Bovino, o teor de ST (18%) e SV (76) obtido nos ensaios (Autoria Própria, 2024) demonstrou se comparável aos valores de referência (19,13% de ST e 23,2 de SV) descritos por Rodrigues (2019). Esses resultados confirmam que as biomassas utilizadas neste trabalho apresentam um elevado teor de sólidos voláteis, indicando seu potencial para a produção de biogás

O pH foi avaliado no início e no final do experimento de biodigestão, e observou-se que ele permaneceu estável entre 7 a 8. Essa faixa é reconhecida como ótima para o desenvolvimento de microrganismos metanogênicos, um intervalo consistente com os estudos de Mata-Alvarez *et al.* (2014) e Xu *et al.* (2018).

Também, foi avaliada a capacidade de geração de biogás na codigestão do dejeito bovino e a *H. verticillata* com e sem o pré-tratamento. Os resultados da produção acumulada de biogás são mostrados na Tabela 7 e indicam que a biomassa da macrófita HV (M), sem o pré-tratamento biológico, foi apropriada para produção de biogás, produzindo 49 LN/kgSV. Com relação aos pré-tratamentos,

o MT2 foi quem melhor produção teve, sendo de 34 LN/ kgSV. Os demais produziram abaixo desse valor (MT1: 29 LN/ kgSV; MT3: 27 LN/ kgSV; MT4: 26 LN/ kgSV). Os tratamentos (MT1 e MT3) que continham o mediador não mostraram bom desempenho como esperado, pois, obtiveram uma produção abaixo da macrófita sem pré-tratar. Esses resultados sugerem que a lacase pode não ser a principal responsável pela variação observada na biomassa pré-tratada, indicando que outros metabólitos ou enzimas podem estar envolvidos no processo.

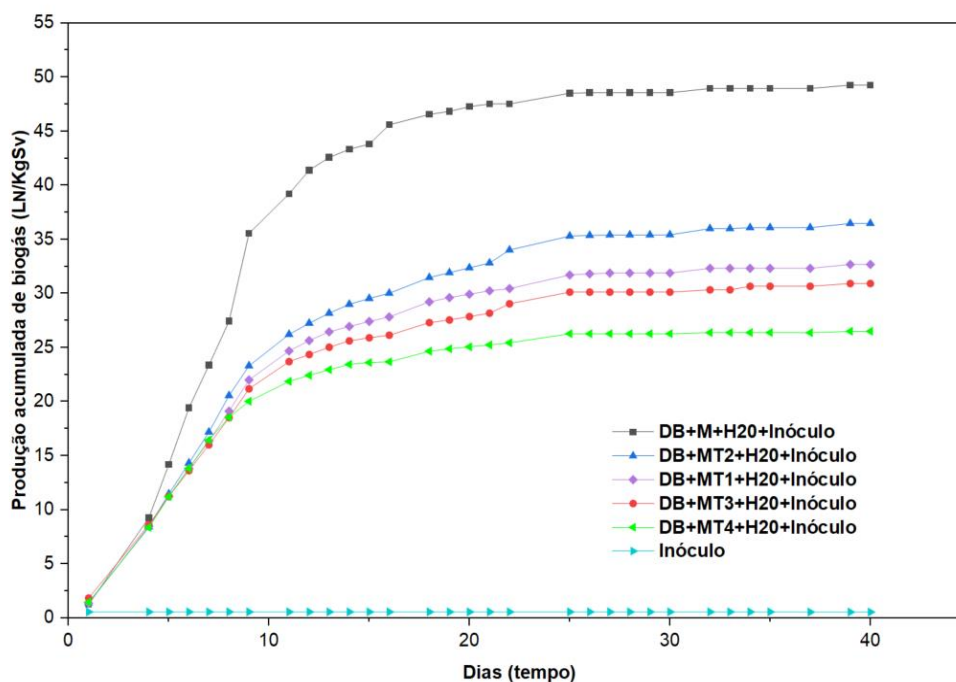
Tabela 6 - Produção acumulada de biogás da macrófita com e sem pré-tratamento

Tipo de Substrato	Vol L N / kg Sv
DB + M + H₂O + Inóculo	49 ± 1
DB + MT1 + H₂O + Inóculo	29 ± 4
DB + MT2 + H₂O + Inóculo	34 ± 1
DB + MT3 + H₂O + Inóculo	27 ± 2
DB + MT4 + H₂O + Inóculo	26 ± 1

Fonte: Autoria própria, 2024.

A Figura 7 também mostra a produção de biogás acumulada num período de 41 dias, onde foram analisadas a produção de 6 vias (4 vias com pré-tratamento; 1 via com inóculo; e uma via sem pré-tratamento). Conforme o gráfico, a amostra sem pré-tratamento teve uma maior produção de biogás em comparação com aquelas submetidas ao pré-tratamento (MT1, MT2, MT3 e MT4). Este fenômeno pode ter sido causado por diferentes fatores, um deles é que o fungo usado no pré-tratamento, não produz suficiente enzima lacase como era esperado fazendo com que o substrato se mantivesse na sua estrutura complexa, impossibilitando o acesso à comunidade de microrganismos durante a digestão anaeróbia, tendo impacto de forma direta na geração de biogás.

Figura 7 - Produção acumulada do biogás.

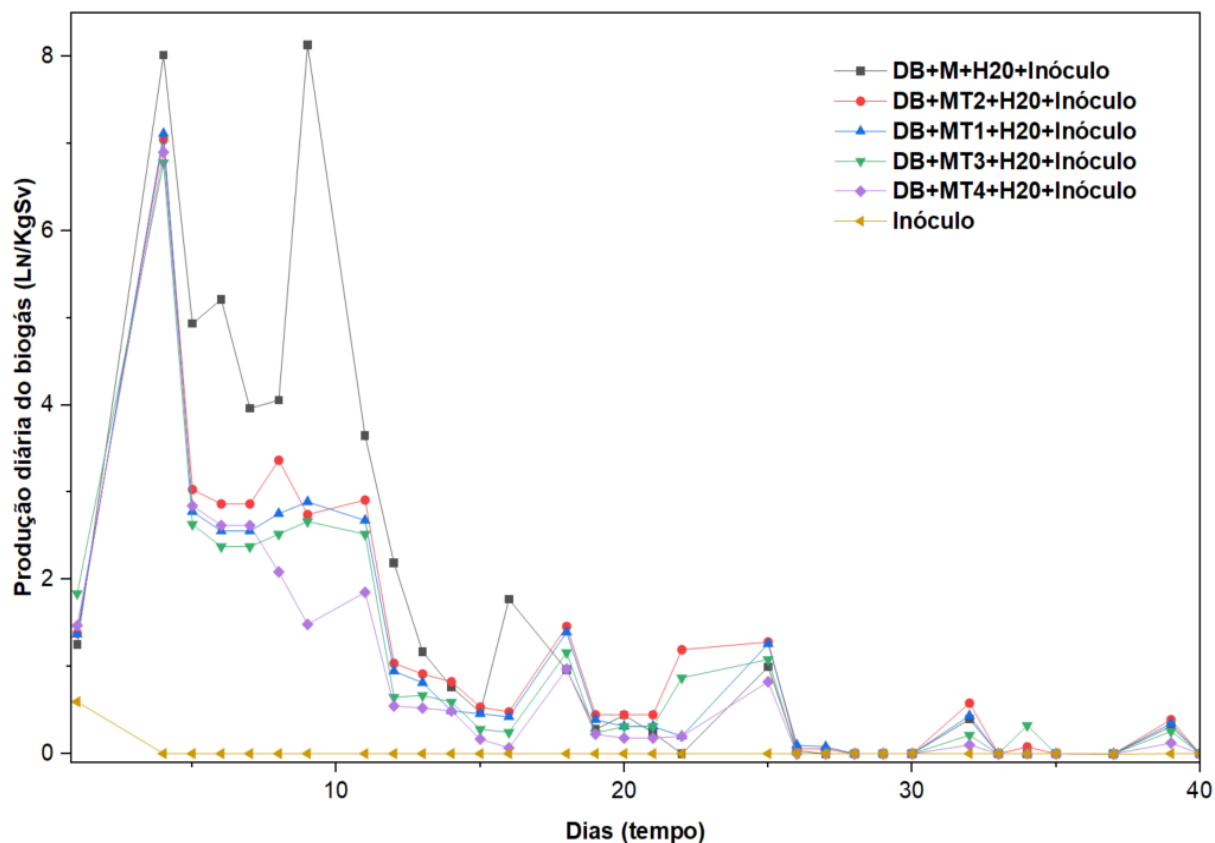


Fonte: Autoria própria, 2025.

A Figura 8 apresenta a produção diária das biodigestões. O máximo da produção de biogás ocorreu nos primeiros 14 dias da biodigestão (Pugliese *et al.*, 2015). Após esse período, houve a diminuição da produção diária até atingir os 40 dias, tempo no qual a produção foi menor ou igual a 1% do total acumulado. Os resultados encontrados são similares aos de Rodrigues *et al.* (2020) que também obteve o máximo da produção diária na primeira semana da experimentação e utilizando *H. verticillata*.

Na Figura 8, também é possível observar que, durante esse período inicial, a rota sem pré-tratamento apresentou o melhor desempenho em termos de produção. Entre as rotas com pré-tratamento, a MT2 se destacou pela maior geração de biocombustível, enquanto a MT4 apresentou os valores mais baixos.

Figura 8 - Produção diária de biogás dos ensaios.

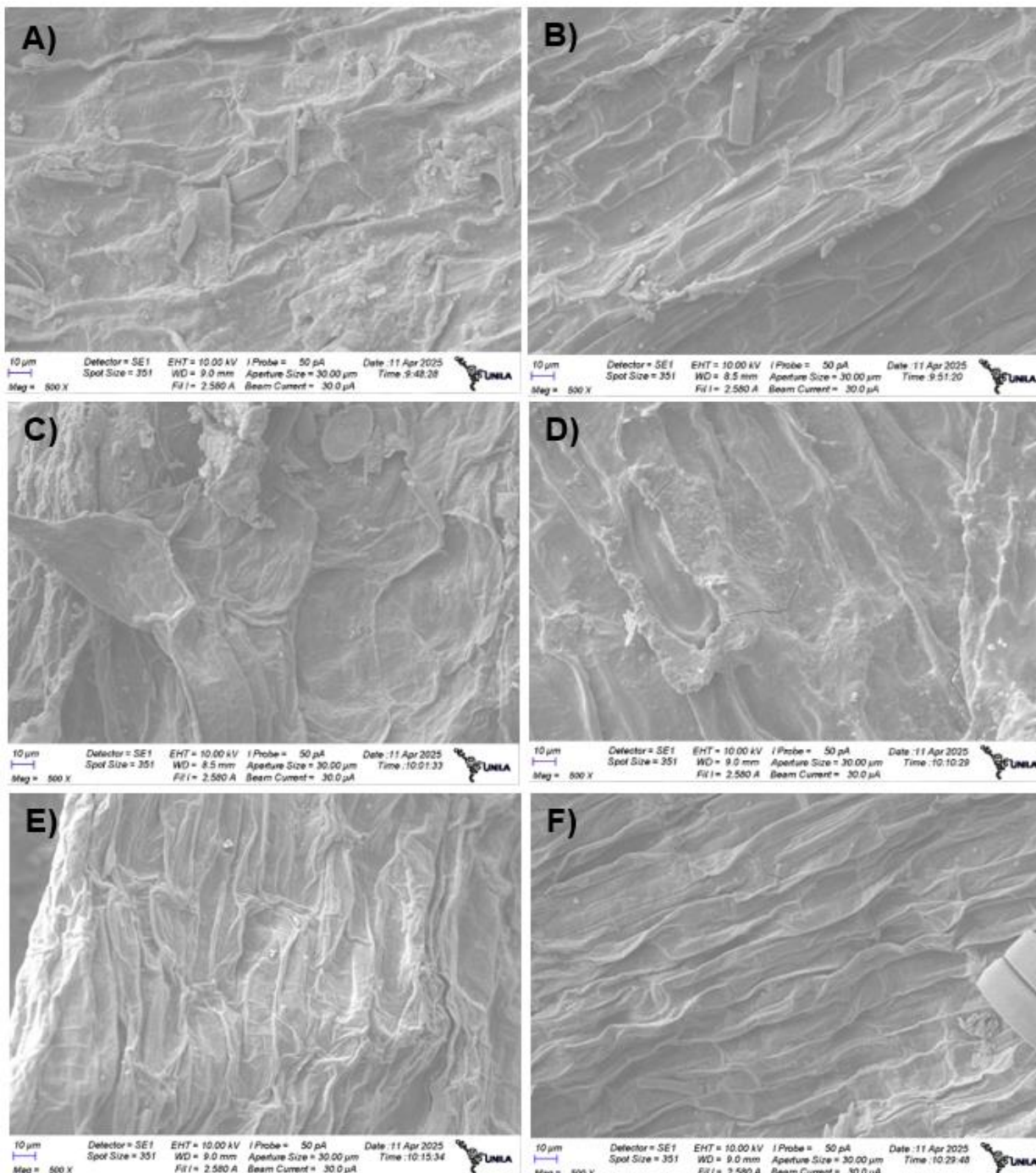


Fonte: Autoria própria, 2025.

A biodegradação do substrato vegetal, após o pré-tratamento biológico, foi avaliada pela sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias da *Hydrilla verticillata* sem e com os diferentes pré-tratamentos podem ser vistas na Figura 9. Os resultados da MEV revelaram que a integridade estrutural da *Hydrilla verticillata* foi amplamente preservada mesmo após os processos de pré-tratamento biológico. Esses resultados mostram a eficácia limitada do pré-tratamento usado para aumentar a biodegradabilidade desse substrato. As micrografias A e B correspondem à *Hydrilla verticillata* sem pré-tratamento, apresentando uma superfície compacta e firme nas ampliações de 500 X (10 μ m). As imagens C e D referem-se ao pré-tratamento com MEA sem sinais evidentes de degradação. De forma semelhante, as imagens E e F correspondem aos tratamentos com farelo de trigo. FT-T1 (imagem E) e FT-T2 (imagem F), que igualmente não apresentaram degradação satisfatória da parede celular da planta.

Esses resultados estruturais são consistentes com os baixos rendimentos de biogás nas rotas pré-tratadas.

Figura 9 - Micrografias da *Hydrilla verticillata* sem e com pré-tratamento.



A) *Hydrilla verticillata* sem pré-tratar 10 μm . B) *Hydrilla verticillata* sem pré-tratar 10 μm . C) MEA - T1 - *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 1. 10 μm . D) MEA - T2 - *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 2. 10 μm . E) FT-T1 - *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 1. 10 μm . F) FT-T2 - *Hydrilla verticillata* pré-tratamento 2. 10 μm .

Fonte: Autoria própria, 2025.

Apesar dos resultados encontrados neste estudo, o uso de agente biológicos (fungos) no pré-tratamento de *H. verticillata* para geração de biogás não deve ser descartado. A literatura científica sustenta que pré-tratamentos biológicos degradam satisfatoriamente o material lignocelulósico, resultado em aumentos significativos na produção de biogás, com rendimentos que podem variar entre 19% e 28%, conforme demonstrado no trabalho de Yadav e Vivekanand (2020).

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi avaliado o potencial de produção de biogás do pré-tratamento biológico do substrato de *Hydrilla verticillata* com o extrato enzimático do fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19. A produção de biogás foi obtida por meio da codigestão com esterco bovino. A celulose foi usada como controle positivo, e o inóculo foi usado como controle negativo. A atividade enzimática da lacase foi avaliada em Extrato de Malte (MEA) e Malte enriquecido com farelo de trigo. O meio MEA apresentou atividade enzimática de até 5,05 U/L, enquanto o meio de farelo de trigo não apresentou atividade enzimática para a lacase.

A codigestão de *Hydrilla verticillata* com dejetos bovinos, sem aplicação de pré-tratamento, resultou em uma produção de 49 49 LN/kgSV de biogás, demonstrando que a biomassa da macrófita apresenta potencial para a geração de biocombustível. O sistema de codigestão apresentou desempenho satisfatório, favorecendo a formação de uma comunidade microbiana estável, resultando em um fator essencial para a eficiência da digestão anaeróbia, como evidenciado pelas tendências observadas ao longo do período experimental.

Por outro lado, os pré-tratamentos biológicos com e sem adição do mediador redox não apresentaram os resultados esperados. Tal desempenho limitado pode ser atribuído à baixa atividade da enzima lacase detectada nos extratos enzimáticos obtidos a partir do fungo *Trametes Polyzona* CCMIBA_19. Ainda assim, não se pode descartar a possível atuação de outras enzimas ligninolíticas no processo.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a *Hydrilla verticillata* é uma candidata promissora para a produção de biogás. No entanto, o pré-tratamento

biológico utilizando o fungo *Trametes polyzona* CCMIBA_19 associado ao mediador 2,6-dimetoxifenol mostrou-se ineficaz na otimização do processo, provavelmente devido aos baixos níveis de lacase apresentados.

Recomenda-se que pesquisas futuras se concentrem na otimização das condições de pré-tratamento, bem como na caracterização mais detalhada da atividade enzimática envolvida. Além disso, a investigação dos benefícios ambientais associados ao uso de plantas aquáticas, como a *Hydrilla verticillata*, pode contribuir para o desenvolvimento de soluções sustentáveis para a produção de biogás.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; PARK, A.; SANG, B. : Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 301, p. 122725, abr. 2020.
- ABRANCHES, K. Avaliação dos Impactos Ambientais devido ao uso de Mecanismos de Controle de Macrófitas em Reservatórios. Itajubá: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ, 2013.
- AĀDAĀ, O. N. SPONZA, D. T. Co-digestion of mixed industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. *Journal of Hazardous Materials*, v. 140, n. 1, p. 75–85, 9 fev. 2007.
- ALI, S. S.; ABOMOHRRA, A. E.; SUN, J. Effective bio-pretreatment of sawdust waste with a novel microbial consortium for enhanced biomethanation. *Bioresource Technology*, v. 238, p. 425–432, 1 ago. 2017.
- ALI, F.; DAWOOD, A.; HUSSAIN, A.; ALNASIR, M. H.; KHAN, M.; BUTT, T.; JANJUA, N.; HAMID, A. Fueling the future: biomass applications for green and sustainable energy. *Discover Sustainability*, v. 5, n. 1, p. 156, 17 jul. 2024.
- ALOKIKA, A.; KUHAD, R. C.; RAPOPORT, A.; KUMAR, V.; SINGH, D.; KUMAR, V.; TIWARI, S. K.; AHLAWAT, A.; BIJENDER. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass: An environment-benign and sustainable approach for conversion of solid waste into value-added products. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 54(10), 771–796. 2023.
- ALVES, J. L.; CHAGAS, M.; FARIA, E.; CALDEIRA-PIRES, A. Economia Circular e Energias Renováveis: uma análise bibliométrica da literatura internacional. *Interações (Campo Grande)*, v. 23, p. 267–283, 2022.
- ARDOLINO, F.; CARDAMONE, G. F.; PARRILLO, F.; ARENA, U. Biogas-to-biomethane upgrading: A comparative review and assessment in a life cycle perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 139, p. 110588, 1 abr. 2021.
- ASHOKKUMAR, V.; KUMAR, G.; LAKSHMANAN, H.; CHANDRAMUGHU, V. P.; FLORA, G., KOTHARI, R.; PIECHOTA, G. A critical review of biogas production and upgrading from organic wastes: Recent advances, challenges and opportunities. *Biomass and Bioenergy*, v. 194, p. 107566, 1 mar. 2025.
- BALDRIAN, P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment*, v. 55, n. 9, p. 370–378, 30 set. 2009.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, v. 30, n. 2, p. 215–242, mar. 2006.
- BALTIERRA-TREJO, E.; MÁRQUEZ-BENAVIDES, L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M. I. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase.

Journal of Microbiological Methods, v. 119, p. 126–131, dez. 2015.

CALDAS ALENCAR, L. Potencial bioquímico da produção de metano da fração biodegradável dos resíduos sólidos urbanos de Campinas-SP. Mestre em Engenharia Química—Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 22 fev. 2017.

CHEN, X.; CHEN, Z.; WANG, X.; HUO, C.; HU, Z.; XIAO, B.; HU, M. Application of ADM1 for modeling of biogas production from anaerobic digestion of *Hydrilla verticillata*. Bioresource Technology, v. 211, p. 101–107, 1 jul. 2016.

CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 34, p. 167-173, 2014.

CIVZELE, A.; STIPNIECE-JEKIMOVA, A. A.; MEZULE, L. Fungal Ligninolytic Enzymes and Their Application in Biomass Lignin Pretreatment. Journal of Fungi, v. 9, n. 7, p. 780, 24 jul. 2023.

CORRÊA, A.; RODRIGUES, P.; AZEVEDO, L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. Reuse of Grape Pomace and Wheat Bran for Biosynthesis of On-site Lignocellulose-degrading Enzymes by *Trametes villosa* and *Trichoderma asperellum* Under Solid State Fermentation. Waste and Biomass Valorization, v. 15, n. 8, p. 4747–4760, 1 ago. 2024.

CURRAN, L. K.; PHAM, L.; SALE, K.; SIMMONS, B. Review of advances in the development of laccases for the valorization of lignin to enable the production of lignocellulosic biofuels and bioproducts. Biotechnology Advances, v. 54, p. 107809, 2022.

DOS SANTOS FERREIRA, J.; OLIVEIRA, D.; MALDONADO, R.; KEMIMURA, E.; FURIGO, A. J. Enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion as a new technology to high-methane production. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 104, n. 10, p. 4235–4246, maio de 2020.

DENG, Z.; XIA, A.; LIAO, Q.; ZHU, X.; HUANG, Y.; FU, Q. Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis. Biotechnology for Biofuels, v. 12, n. 1, p. 159, 24 jun. 2019.

EVANS, J. M.; WILKIE, A. C. Life cycle assessment of nutrient remediation and bioenergy production potential from the harvest of hydrilla (*Hydrilla verticillata*). Journal of Environmental Management, v. 91, n. 12, p. 2626–2631, 1 dez. 2010.

FEIGIN, S. V.; WIEBERS, D. O.; LUEDDEKE, G.; MORAND, S.; LEE, K.; KNIGHT, A.; FEIGIN, V. L.; WHITFORT, A.; MARCUM, J.; SHACKELFORD, T. K.; SKERRATT, L. F.; WINKLER, A. S. Proposed solutions to anthropogenic climate change: A systematic literature review and a new way forward. Heliyon, v. 9, n. 10, p. e20544, 1 out. 2023.

FERDEȘ, M.; DINCĂ, M.; MOICEANU, G.; ZĂBAVĂ, B. S.; PARASCHIV, G. Microorganisms and Enzymes Used in the Biological Pretreatment of the Substrate to Enhance Biogas Production: A Review. Sustainability, v. 12, n. 17, p. 7205, jan.

2020.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios Relacionados À Produção E Aplicação Das Enzimas Celulolíticas Na Hidrólise Da Biomassa Lignocelulósica. *Química Nova*, v. 40, p. 1082–1093, nov. 2017.

HENARES, M. N. P.; REZENDE, F.R.L.; GOMES, G.R.; CRUZ, C.; PITELLI, R.A. Eficácia do diquat no controle de *Hydrilla verticillata*, *Egeria densa* e *Egeria najas* e toxicidade aguda para o Guaru (*Phallocerus caudimaculatus*), em condições de laboratório. *Planta Daninha*, v. 29, p. 279–285, 2011.

LÓPEZ, A. F.; RODRÍGUEZ, T. L.; ABDOLMALEKI, S. F.; MARTÍNEZ, M. G.; BUGALLO, P. M. B. From Biogas to Biomethane: An In-Depth Review of Upgrading Technologies That Enhance Sustainability and Reduce Greenhouse Gas Emissions. *Applied Sciences*, v. 14, n. 6, p. 2342, jan. 2024.

IPCC - PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS. Aquecimento Global de 1,5°C. Relatório especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas. 2018.

IPCC. Climate Change 2023: Synthesis Report, Summary for Policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. 2023. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/>>. Acesso em: 21 jul. 2025.

IRMAK, S. Challenges of Biomass Utilization for Biofuels. *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen. Abd El-Fatah Abomohra. p. 12. 2019.

JAIN, M.; KALAMDHAD, A. A review on management of *Hydrilla verticillata* and its utilization as potential nitrogen-rich biomass for compost or biogas production. *Bioresource Technology Reports*, v. 1, p. 69–78, 1 mar. 2018.

JANKOVIČOVÁ, B.; HUTŇAN, M.; SAMMARAH, M. Enhancing Biogas Production: Pre-Treatment of Lignocellulosic Biomass Using Biogas Plant Digestate. *Sustainability*, v. 17, n. 9, p. 3898, jan. 2025.

KAMUSOKO, R.; MUKUMBA, P. Valorization of Maize Stover into Biogas for Heat and Power Generation: A South African Perspective. *Fermentation*, v. 11, n. 6, p. 338, jun. 2025.

KARLSSON, T.; KONRAD, O.; LUMI, M.; SCHMEIER, N.; MARDER, M.; CASARIL, C. E.; KOCH, F. F.; PEDROSO, A. G. Manual básico de biogás. p. 69, 11 mar. 2014.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R.; AMARAL, A. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogas, uso e tratamento do digestato. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves. 2° ed. Concórdia, SC. p. 16-17. 2022.

ALBUQUERQUE, L.; ARAÚJO, J. Produção De Biogás Por Co-Digestão Utilizando Uma Mistura De Dejetos Bovinos E Casca De Café Conilon. v. 2, 2016.

LINS, L. P. Produção De Biogás A Partir De Resíduos De Bovinocultura Leiteira Por Meio Da Codigestão Com Macrófitas Da Espécie *Salvinia*. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2017.

LINS, L. P.; FURTADO, A. C.; MITO, J.Y. L.; PADILHA, J. C. O aproveitamento energético do biogás como ferramenta para os objetivos do desenvolvimento sustentável. *Interações (Campo Grande)*, p. 1275–1286, 22 dez. 2022.

LIU, Y.; TANG, Y.; GAO, H.; ZHANG, W.; JIANG, Y.; XIN, F.; JIANG, M. Challenges and Future Perspectives of Promising Biotechnologies for Lignocellulosic Biorefinery. *Molecules*, v. 26, n. 17, p. 5411, jan. 2021.

MAJEAU, J.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 7, p. 2331–2350, 1 abr. 2010.

MLAIK, N.; SAYADI, S.; MNASRI, N.; KECHAOU, S.; LOUKIL, S.; ALOUI, F.; KHOUFI, S. Dry mesophilic anaerobic co-digestion of vegetable wastes with animal manures using leach bed reactor. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 13, n. 2, p. 697–707, 1 jan. 2023.

MALIK, K.; CAPAREDA, S. C.; KAMBOJ, B. R.; MALIK, S.; SINGH., ARYA, S.; BISHNOI, D. K. Biofuels Production: A Review on Sustainable Alternatives to Traditional Fuels and Energy Sources. *Fuels*, v. 5, n. 2, p. 157–175, 2 maio 2024.

MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GUIZA, M. S.; FENOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 36, p. 412–427, 1 ago. 2014.

MATEI, J. C.; SOARES, M.; BONATO, A. C. H.; FREITAS, M. P. A.; HELM, C. V.; MAROLDI, W. H.; MAGALÃES, W. I. E.; HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M. Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in saccharification. *Renewable Energy*, v. 157, p. 987–997, set. 2020.

MEENAKSHISUNDARAM, S.; FAYEULLE, A.; LÉONARD, E.; CEBALLOS, C.; LIU, X.; PAUSS, A. Combined Biological and Chemical/Physicochemical Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol and Biomethane Energy Production—A Review. *Applied Microbiology*, v. 2, n. 4, p. 716–734, dez. 2022.

MERTINS, A.; WAWER, T.. How to use biogas?: A systematic review of biogas utilization pathways and business models. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 9, n. 1, p. 59, 28 maio 2022.

MERAJ, S.; LIAQUAT, R.; NAQVI, S. R.; SHEIKH, ZESHAN.; ZAINAB. A.; KHOJA. A. H.; JUCHELKOVA, D.; ATABANI, A. Enhanced Methane Production from Anaerobic Co-Digestion of Wheat Straw Rice Straw and Sugarcane Bagasse: A Kinetic Analysis. *Applied Sciences*, v. 11, n. 13, p. 6069, jan. 2021.

MIGNOGNA, D.; CECI, P.; CAFARO, C.; CORAZZI, G.; AVINO, P. Production of Biogas and Biomethane as Renewable Energy Sources: A Review. *Applied*

Sciences, v. 13, n. 18, p. 10219, jan. 2023.

NADIR, N.; ISMAIL, N.; HUSSAIN, A. Fungal Pretreatment of Lignocellulosic Materials. *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84239.

NOUSSAN, M.; NEGRO, V.; PRUSSI, M.; CHIARAMONTI, D. The potential role of biomethane for the decarbonization of transport: An analysis of 2030 scenarios in Italy. *Applied Energy*, v. 355, p. 122322, 1 fev. 2024.

NOONARI, A.; MAHAR, R. B.; SAHITO, A. R.; BROHI, K. M. Effects of isolated fungal pretreatment on bio-methane production through the co-digestion of rice straw and buffalo dung. *Energy*, v. 206, p. 118107, 1 set. 2020.

SARNTHIMA, R.; KHAMMUANG, S. Laccase from *Lentinus Polychrous* Increases the Efficiency of Cellulose Hydrolysis of Rice Straw to Glucose. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 34, n. 4, p. 1961–1967, 25 ago. 2018.

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

O'SULLIVAN, C.; ROUNSEFELL, B.; GRINHAM, A.; CLARKE, W.; UDY, J. Anaerobic digestion of harvested aquatic weeds: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), cabomba (*Cabomba Caroliniana*) and salvinia (*Salvinia molesta*). *Ecological Engineering*, v. 36, n. 10, p. 1459–1468, out. 2010.

OMM - Relatório Global Anual da Organização Meteorológica Mundial. 2024 Disponível em: <<https://library.wmo.int/records/item/68910-wmo-global-annual-to-decadal-climate-update>> Acesso em 20 de sep de 2024.

POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais brasileiros. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, 2017.

ITAIPU BINACIONAL. Relatório Anual 2024. Disponível em: <<https://www.itaipu.gov.br/publicacoes/relatorio-anual-2024>> Acessado em 06/06/2022.

RESENDE, J. A.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; CARNEIRO, J.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; OTENIO, M. H. Dejetos bovinos para produção de biogás e biofertilizante por biodigestão anaeróbica. - Portal Embrapa. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1025416/dejetos-bovinos-para-producao-de-biogas-e-biofertilizante-por-biodigestao-anaerobica>>. Acesso em: 7 ago. 2025.

RILEY, D.; TIAN, J.; GÜNGÖR-DEMIRCI, G.; PHELAN, P.; PHELAN, J. R.; MILCAREK, R. J. Techno-Economic Assessment of CHP Systems in Wastewater Treatment Plants. *Environments*, v. 7, n. 10, p. 74, out. 2020.

RODRIGUES, L. N.; GALVIS, L. J. G.; SANTOS, R. C. B.; BECKER, M. R. BIOFUEL PRODUCTION FROM INVASIVE AQUATIC PLANT (*Hydrilla verticillata*). 2020.

- SARATALE, R. G.; KUMAR, G.; BANU, R.; XIA, A.; PERIYASAMY, S.; SARATALE, G. D. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresource technology*, v. 262, p. 319-332, 2018.
- SILVA, C. E. de F.s; ABUD, A. K. de S. Anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse under mesophilic conditions using manure as inoculum. *Revista Ambiente & Água*, v. 11, p. 763–777, dez. 2016.
- SOUSA, A.; RIZZATTO, M. Produção de biogás a partir de resíduos orgânicos: uma revisão. *Scientific Electronic Archives*, v. 15, n. 2, 31 jan. 2022.
- SOUSA, W. T. Z. *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae), a recent invader threatening Brazil's freshwater environments: a review of the extent of the problem. *Hydrobiologia*, v. 669, n. 1, p. 1–20, 1 jul. 2011.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2005.
- THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. *Ecologia e Manejo de Macrófitas*. Maringá: EDUEM, 2003. p. 261-338.
- YAVINI, T.; CHIA, A.; JOHN, A. Evaluation of the Effect of Total Solids Concentration on Biogas Yields of Agricultural Wastes. v. 3, 2014.
- UDUGAMASURIYAGE, D.; KAHANDAWA, G.; TENNAKOON, K. Nonchemical Aquatic Weed Control Methods: Exploring the Efficacy of UV-C Radiation as a Novel Weed Control Tool. *Plants*, v. 13, n. 8, p. 1052, jan. 2024.
- VDI 4630. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. 92 p. Germany Verein Deutscher - VDI, 2006.
- WAGNER, A. O.; LACKNER, N.; MUTSCHLECHNE, M.; PREM, E. M.; MARKT, R.; ILLMER, P. Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production. *Energies*, v. 11, n. 7, p. 1797, jul. 2018.
- XU, R.; ZHANG, K.; LIU, P.; KHAN, A.; XIONG, J.; TIAN, F.; LI, X. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 1119–1127, 1 jan. 2018.
- YADAV, M.; VIVEKANAND, V. Biological treatment of lignocellulosic biomass by *Curvularia lunata* for biogas production. *Bioresource Technology*, v. 306, p. 123151, 1 jun. 2020.
- YU, X.; YAN, L.; WANG, H.; BI, S.; ZHANG, F.; HUANG, S.; WANG, Y.; WANG, Y. Anaerobic co-digestion of cabbage waste and cattle manure: Effect of mixing ratio and hydraulic retention time. *Renewable Energy*, v. 221, p. 119743, 1 fev. 2024.
- ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for

enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 42, p. 35–53, 1 jun. 2014.