



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA-UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

DAYANE DE FREITAS SILVA

**Aplicação da Fermentação em Estado Sólido com *Aspergillus niger* ATCC
1004 em Casca de Mandioca para Produção de Biogás**

ITAPETINGA-BA

2021

DAYANE DE FREITAS SILVA

Aplicação da Fermentação em Estado Sólido com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em Casca de Mandioca para Produção de Biogás

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Nívio Batista Santana

Coorientador (es): Dr^a. Tercia Diniz Bezerra

Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA-BA

2021

665.776 Silva, Dayane de Freitas.

S579a Aplicação da fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em casca de mandioca para produção de biogás. / Dayane de Freitas Silva. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2021. 52 fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Nívio Batista Santana e coorientação dos Profs. D. Sc. Tercia Diniz Bezerra e D. Sc. Marcelo Franco.

1. *Aspergillus niger* ATCC 1004 – Produção de biogás. 2. Casca de mandioca – Fermentação em estado sólido – Produção de biogás. 3. Biogás – Produção – Resíduo de mandioca. 4. Mandioca – Reaproveitamento – Resíduos agrícolas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Santana, Nívio Batista. III. Bezerra, Tercia Diniz. IV. Franco, Marcelo. V. Título.

CDD(21): 665.776

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Aspergillus niger* ATCC 1004
2. Biogás : Produção
3. Casca de mandioca : Fermentação em estado sólido
4. Mandioca : Reaproveitamento de resíduos



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 10.825, de 04.07.2010



DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: APLICAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM *Aspergillus Niger* ATCC 1004 NA CASCA DE MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS.

Autor (a): DAYANE DE FRETAS SILVA

Orientador (a): Prof. Dr. Nívio Batista Santana


Coorientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Prof.ª Dr.ª Tércia Diniz Bezerra

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Luciano Brito Rodrigues
Examinador Interno – UESB


Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior
Examinador Externo – UESB


Prof. Dr. Nívio Batista Santana
Orientador – UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 07 de abril de 2021.

Tudo posso naquele que me fortalece.

(Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, simplesmente por ser indispensável em minha vida e por iluminar os meus passos e conceder força e coragem para a concretização dos meus sonhos. Agradeço a Ti Senhor por ter me abençoado nestes 26 anos de vida.

Aos meus pais Edna e Edvaldo, pelo infinito amor, dedicação, apoio, incentivo persistência e confiança de todos os dias.

À minha irmã Clédina, pelas energias positivas enviadas, por todo carinho e amor. Por compreender minha ausência em momentos importantes de sua vida.

Todos os meus familiares, em especial a família Freitas que sempre me apoiam e me acolhem tão bem nos momentos em que mais preciso.

Ao meu orientador, professor Dr^o. Nívio Batista Santana, pela orientação, ensinamentos, oportunidades, paciência, confiança, e total apoio para o desenvolvimento desse trabalho. O senhor é um ser de luz. A você minha gratidão!

À minha coorientadora, Dr^a. Tercia Diniz Bezerra, pela ajuda, apoio, paciência e por partilhar tanto conhecimento.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada, que mostraram a importância e o valor da amizade.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com esse trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudos.

Aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização desse sonho.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVEATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	17
2.1 Mandioca	17
2.2 Aproveitamento dos Resíduos da Mandioca	18
2.3 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	19
2.3.1 Microrganismos utilizados na FES	21
2.4 Pré – tratamento da Biomassa.....	22
2.5 Biodigestores	24
2.6 Digestão Anaeróbia.....	25
2.7.1. Hidrolise	26
2.7.2 Acidogênese	27
2.7.3 Acetogênese.....	27
2.7.4 Metanogênese.....	27
2.8 Biogás	27
2.9 Fatores que Influenciam na Produção do Biogás.....	28
2.9.1 Temperatura	28
2.9.2 pH.....	28
2.9.3 Teor de água	29
2.9.4 Relação C/N	29

3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Obtenção e Preparo da Amostra de Substrato	31
4.2 Fermentação em Estado Sólido.....	31
4.3 Determinação da Atividade Enzimática.....	32
4.3.1 Determinação da Atividade de Celulase.....	32
4.3.2 Determinação da Atividade de Amilase	33
4.3.3 Determinação da Atividade de Invertase.....	33
4.4 Caracterização da Casca de Mandioca	34
4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	34
4.6 Difractometria por Raios-X (DRX).	35
4.7 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	35
4.8 Digestão Anaeróbia.....	35
4.8.1 Obtenção da Microbiota Metanogênica	36
4.8.2 Preparação dos Substratos.....	36
4.8.3 Determinação da Composição do Biogás.....	38
4.9 Análise Estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Atividade Enzimática.....	40
5.2 Composição Físico –Química do Substrato.....	40
5.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	42
5.4 Difractometria por Raios-X (DRX).....	43
5.6 Produção de Biogás	44

5.7 Composição do Biogás	46
5.7.1 Amônia (NH ₃) e Ácido Sulfídrico (H ₂ S).....	46
5.7.2 Produção de Gás carbônico (CO ₂) e Metano (CH ₄).....	47
5.8 Teores sólidos totais, voláteis e pH no processo de biodigestão anaeróbica.....	49
5.9 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	50
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos.	21
Figura 2- Efeito do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.....	23
Figura 3- Fases da biodigestão anaeróbica	26
Figura 4- Esquema ilustrado do inoculo de <i>Aspergillus niger</i> , crescimento e procedimentos utilizados para obtenção da solução de esporo.	31
Figura 5. Esquema ilustrando a fermentação em estado sólido, obtenção do extrato enzimático bruto e a dosagem enzimática.....	32
Figura 6. Modelo de biodigestor laboratorial.	36
Figura 7. Atividade das enzimas invertase, celulase e amilase produzidas por <i>A. niger</i> ATCC 1004, em substrato de casca de mandioca submetida a FES em função do tempo de fermentação.	40
Figura 8- Espectros de FTIR das amostras da casca de mandioca obtidas sem fermentação (CSF) e após FES (CF).	42
Figura 9- Difractometria de raios x (DRX) das amostras da casca de mandioca sem fermentar (A) e fermentada (B).....	44
Figura 10- Produção volumétrica de biogás; média diária (mL) obtida por DA com dejetos de bovinos e casca de mandioca. (C: controle; CF: substrato submetido a FES; CSF: substrato sem fermentar).	44
Figura 11- Produção média diária de CO ₂ e CH ₄ obtida nos tratamentos A (controle), B (casca fermentada) e C (casca sem fermentar). C = Controle; CF= Casca Fermentada; CSF= Casca sem fermentar.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proporção de substratos utilizados.	37
Tabela 2- Composição centesimal da casca da mandioca antes e após o pré-tratamento em FES com <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.	41
Tabela 3- Concentrações de NH ₃ e H ₂ S detectadas nas amostras de biogás. Os resultados representam faixas de detecção definidas no kit da Alfakit.	46
Tabela 4- Teores médios de sólidos (ST), sólidos voláteis (SV) e pH.	49
Tabela 5- Dados médios das análises de DQO iniciais (afluente), finais (efluente) e suas respectivas taxas de remoção de matéria orgânica.	50

LISTA DE ABREVEATURAS

FTIR- Infravermelho com Transformada de Forrier

CF- Casca Fermentada

DA- Digestão Anaeróbica

CSF- Casca Sem Fermentar

C- Água e Esterco de bovino

ST- Sólidos Totais

SV- Sólidos Voláteis

CO₂- Gás Carbônico

CH₄- Metano

H₂S- Gás Sulfídrico

NH₃- Amônia

PPMV – Partes Por Milhões em Volume

FES- Fermentação em Estado Sólido

DRX- Difractometria por Raios -X

CAD – Controle da Digestão Anaeróbica

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

NmL – Normal Mililitros

O₂- Oxigênio

pH – Potencial Hidrogênio

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

EMPRABA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DNS – Ácido Dinitrosalisílico

SILVA, D.F. Aplicação da Fermentação em Estado Sólido com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em Casca de Mandioca para Produção de Biogás. Itapetinga, BA: UESB 2021, 63p. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

RESUMO

Agricultura é um dos setores que produz maior quantidade de resíduos agroindustriais. Vários estudos são voltados para as formas de reaproveitamento e diminuição do impacto causado pela disposição incorreta destes resíduos no meio ambiente. Grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos são geradas pelas indústrias de mandioca em toda escala. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004, em casca de mandioca, como pré-tratamento biológico na produção e composição do biogás em biodigestores em escala laboratorial. Foi utilizada a biomassa residual de mandioca fermentada e sem fermentar como substrato para geração de biogás. O resíduo da mandioca e dejetos de bovinos foram tratados em biodigestores de bancada em escala laboratorial utilizando esterco como controle positivo. O biogás produzido foi medido e armazenado em bolsas plásticas para análises de volume, teor de metano, gás carbônico, amônia e ácido sulfídrico. O delineamento foi o inteiramente casualizado e as médias foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, os dados foram avaliados pelo programa do Sisvar. Análise de espectroscopia do infravermelho médio com transformada de Forrier com reflectância total atenuada (FTIR-atr) mostrou que a fermentação foi eficiente pois, foi possível por meio dos seus espectros verificar a redução da lignina e o aumento dos carboidratos solúveis. E a difratometria por raios -X (DRX) identificou que as amostras estudadas apresentaram características amorfas. O tratamento que utilizou a fermentação em estado sólido apresentou maior produção e índices de metano mais altos e com maior redução de sólidos voláteis em comparação com não fermentado e ambos os tratamentos produziram um gás com concentrações mínimas de amônia e gás sulfídrico produziram mais que o controle. Verificou-se que os reatores que utilizaram a casca fermentada apresentaram melhores resultados de remoção da matéria orgânica na forma de DQO em relação ao controle. Os resultados obtidos evidenciaram que a fermentação em estado sólido é capaz de melhorar o rendimento e pode influenciar positivamente na produção de biogás e no teor de metano gerados por meio da biodigestão anaeróbica.

Palavra-Chave: Fermentação em Estado Sólido, Resíduos, Compostos Lignocelulósicos.

ABSTRACT

Agriculture is one of the sectors that produces the largest amount of agro-industrial waste. Several studies are focused on ways to reuse and reduce the impact caused by the incorrect disposal of these residues in the environment. Large amounts of solid and liquid waste are generated by the cassava industries on every scale. The objective of this study was to evaluate the influence of fermentation in solid state, using the fungus *Aspergillus niger* ATCC 1004, in cassava peel, as a biological pre-treatment for the production and composition of biogas in biodigesters on a laboratory scale. For this purpose, the physical-chemical and biochemical characterization of residues of cassava peel was initially carried out. The residual biomass of fermented and unfermented cassava was used as a substrate for the generation of biogas. Cassava residue and bovine manure were treated in bench-top biodigesters on a laboratory ladder. The biogas produced was measured and stored in plastic bags for analysis of volume, methane content, carbon dioxide, ammonia and hydrogen sulphide. The design was completely randomized and the means were compared using the Tukey test at 5% probability, the data were evaluated using the Sisvar program. The fungus was able to break down the lignocellulosic compounds, the FT-IR analysis of the fermented sample identified that there was biotransformation of the absorption compounds in the infrared with Fourier transform (FTIR) was able to verify the behavior of the samples through of spectral analysis showing that the fermentation was efficient making the breakdown of the lignocellulosic compounds and the X-ray diffraction (DRX) identified that the studied samples presented amorphous characteristics. higher and with greater reduction of volatile solids compared to unfermented and both treatments produced a gas with minimal concentrations of ammonia and hydrogen sulphide. It was found that the reactors that used the fermented bark showed better results in removing organic matter in the form of COD. The results obtained showed that solid state fermentation is able to improve yield and can positively influence the production of biogas and methane content generated by anaerobic digestion.

Keyword: Solid State Fermentation, Residues, Lignocellulosic Compounds.

1. INTRODUÇÃO

Agricultura é um dos setores que produz maior quantidade de resíduos agroindustriais. Aproximadamente 1,3 bilhões de toneladas de biomassa provenientes de alimentos são desperdiçados a cada ano durante as etapas de produção, manuseio, armazenamento, processamento, distribuição e consumo (DAHIYA et al., 2018). Os resíduos produzidos por esse setor contêm macromoléculas com quantidades significantes de carboidratos, proteínas, pectinas e cinzas, dependendo da característica do produto, espécie, condições de colheita, manipulação e conservação (KENNY et al., 2013).

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma fonte importante de amido no Brasil e possui uma cadeia produtiva que gera elevadas quantidades de resíduos, como exemplo, a casca da mandioca, obtida no decorrer do processamento desse alimento. Os resíduos de mandioca são divididos em casca, entrecasca e pontas, sendo considerada uma biomassa rica em macromoléculas que podem ser facilmente reaproveitados e convertidos em produtos de valor agregados, inclusive para produção de insumos como biogás e biofertilizantes, através da digestão anaeróbica (DINI et al., 2014).

A casca da mandioca é formada por uma estrutura complexa, o que dificulta a biotransformação dos seus principais componentes, celulose, hemicelulose e lignina, em açúcares fermentescível. Por consequência disso, torna-se necessário empregar métodos de pré-tratamentos para diminuir a recalcitrância do material e melhorar, conseqüentemente, a eficiência e sacarificação dos polissacarídeos (MENON e RAO, 2012).

A finalidade desses tratamentos prévios é aumentar a taxa de hidrólise enzimática e conseguir rendimentos mais altos de açúcares fermentáveis, além de acelerar a produção de biomoléculas a partir desses substratos. Para obter estes resultados, alterações físicas, químicas, físico-química e biológicas são promovidas através dos processos de pré-tratamento no resíduo (MALAKAR et al., 2020).

A Fermentação em estado sólido (FES) pode ser usada como pré-tratamento biológico, sendo um processo fermentativo onde o crescimento do microrganismo e a formação do produto ocorre na superfície da matriz sólida, na ausência ou quase ausência de água livre (GARCIA et al., 2019).

Diversos agentes microbiológicos, incluindo fungos, têm sido utilizados para quebrar a lignina da biomassa. Durante a biodigestão, as bactérias e arqueas na biocenose do biogás não são eficazes na desintegração da camada de lignina, deixando intacta a porção considerável dos açúcares mais facilmente conversíveis. Rendimentos insatisfatórios de biogás, falhas no

processo causadas por fibras não digeridas e perdas financeiras deixam substratos ricos em lignocelulose sem atrativos para os operadores das usinas de biogás. As abordagens de pré-tratamento para desintegrar as estruturas recalcitrantes e melhorar a acessibilidade dos microrganismos celulolíticos permitem uma produção mais eficiente de biogás a partir de resíduos ricos em lignoceluloses (KALLIOINEN et al., 2013; MONLAU et al., 2013; ZHENG et al., 2014; PATINVOH et al., 2017).

A biodigestão anaeróbica (DA) é amplamente usada em todo o mundo para diminuir as cargas poluentes de vários tipos de resíduos orgânicos, estes incluem resíduos sólidos municipais ou industriais, efluentes agroalimentares e dejetos de animais. É um processo de fermentação pelo qual a matéria orgânica é gradualmente transformada em gases pela ação de microrganismos, na ausência de oxigênio. Os processos que ocorrem dentro do reator são divididos em quatro fases sendo elas: hidrólises, acidogênese, acetogênese, metanogênese e os produtos finais são o biogás e biofertilizantes (MIN et al., 2013; PENG et al., 2013). O biogás é majoritariamente composto de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), podendo conter quantidades variáveis de contaminantes como por exemplo de ácido sulfídrico (H_2S) e amônia (NH_3) (GHOSH et al., 2018).

Devido à disponibilidade de grande volume de resíduos gerados no processamento da mandioca, é interessante realizar estudos sob o ponto de vista da obtenção de biogás e biofertilizante, fazendo o reaproveitamento da casca da mandioca que na maioria das vezes é descartada de forma incorreta, e assim contribuir positivamente com o meio ambiente. Esse biogás pode ser aproveitado como gás de cozinha, produção de eletricidade ou energia mecânica em motores, combustível para veículos, usinas termoelétricas, caldeiras e para injeção de biometano em rede de gás. Além do biogás, o biofertilizante subproduto sólido da digestão, é rico em nutrientes, sendo excelente para ser incorporado no solo como adubo orgânico (KAPOOR et al., 2020).

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Mandioca

A mandioca pertence à classe das dicotiledôneas, ordem *Euphorbiales*, família *Euphorbiaceae*, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta subsp esculenta*. É uma espécie de grande importância econômica, presente por toda América. Possui uma boa adaptação em diferentes ambientes, podendo ser cultivada em áreas com baixa fertilidade e problemas do solo, como: alta fixação de fósforo, erosão, baixa base permutável e alto teor de alumínio, bem como tolera um grande intervalo sem chuvas. É conhecida popularmente como aipim, macaxeira, cassava, manioc, yuca, tapioca, sagu, mandioca doce, entre diversas outras nomenclaturas que variam de acordo com cada região. A raiz tem origem Ameríndia e brasileira, tendo sido levada para a África e Ásia pelos colonizadores portugueses e Espanhóis (MORGAN e CHOCT, 2016; WANAPAT e KANG, 2015; MARTINEZ e FEIDEN, 2017).

As raízes de mandioca são ricas em carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e carotenoides, desempenhando um importante papel na cultura e dieta alimentar dos brasileiros, devido a sua procedência e pelo seu alto valor energético (SOUZA et al., 2011). Essas raízes são classificadas em duas espécies, que são frequentemente usadas na alimentação humana. A primeira é chamada como mandioca doce ou de mesa (*Manihot utilissima*), sendo consumida de preferência na forma “*in natura*” para fritura ou cozida. A segunda espécie, nomeada como mandioca brava ou amarga (*Manihot esculenta*), possui alto teor de ácido cianídrico extremamente tóxico ao homem e aos animais sendo basicamente empregada na indústria para produção de farinha (OLIVEIRA, 2008; REIFSCHNEIDER et al., 2015).

Atualmente, essa planta é a sexta cultura alimentar mais importante do mundo, sustentando milhões de pessoas na África tropical e subtropical, na Ásia e na América Latina (TAPPIBAN et al., 2019). No Brasil, é a quarta cultura mais produzida, com 21,08 milhões de toneladas (CONAB, 2018). A área total plantada no Brasil em 2019 foi de 1.389.331 ha, tendo sido colhida uma área de 1.253.842 ha, com uma produção de 18.990.014 toneladas (IBGE, 2020). A produção encontra-se distribuída na região norte com 37%, no Nordeste com 24%, no Sul com 22%, Sudeste com 11% e no Centro Oeste com 6%. No estado da Bahia a mandioca é utilizada para o consumo humano, fabricação de farinha, polvilho azedo ou goma, havendo várias aplicações na culinária brasileira, como o pão-de-queijo e tapioca (SEAB, 2017-2018).

2.2 Aproveitamento dos Resíduos da Mandioca

A mandiocultura é uma atividade que proporciona uma grande formação de resíduos. No processamento de 100 kg de mandioca, cerca de 6 kg de casca de mandioca são formados como resíduos (EKUNDAYO, 1980). Segundo Vilhalva et al. (2011) os resíduos agroindustriais precisam ser tratados para que não se tornem contaminantes ambientais.

Esses resíduos possuem uma grande quantidade de moléculas que podem ser convertidas em produtos de valor agregado, uma vez que são constituídos por: celulose (25%), hemicelulose (7%), proteína bruta (5%), amido residual (60%), fibras (20%) e lignina (3%) (MOSHI et al., 2015). A literatura cita que ocorre um desperdício da casca da mandioca e ressalta que esse resíduo é rico em macromoléculas que podem ser facilmente reaproveitadas e convertidas em produtos de valor agregados para produção de energia, bioetanol, biogás, biofertilizantes entre outros (TSCHOEKE et al., 2017).

Segundo Camacho e Cabello (2012), há alternativas para a transformação dos resíduos da mandioca em fonte de energia, com a capacidade de ajudar no enfrentamento do problema da crise energética mundial. Também, a utilização de resíduos agrícolas para produção de biogás pode apresentar um efeito positivo na diminuição da emissão de gás do efeito estufa, contribuindo significativamente para desenvolvimento sustentável em áreas rurais, além de garantir uma nova oportunidade de renda aos agricultores (CAVINATO et al., 2010).

Zhang et al. (2011), fizeram a elaboração de um consórcio microbiano de alta degradação de celulose e aplicação deste consórcio no pré-tratamento de resíduos de mandioca com o intuito de aumentar a produção de metano. Os resultados, experimentais mostraram que a produção máxima de metano (259,46 mL g SV⁻¹) de resíduos de mandioca foi obtida por 12 h de pré-tratamento pelo consórcio microbiano, 96,63% superior ao controle (131,95 mL g SV⁻¹).

A análise de composição demonstrou que a *M. glaziovii* é uma matéria-prima adequada para a produção de bioetanol e biogás. A fermentação alcançou uma concentração de etanol de até 85 g L⁻¹ com uma eficiência de fermentação de 89%. A energia dos combustíveis bioetanol e metano da mistura de cascas de farinha variaram de 5 a 13 e 11 a 14 MJ kg SV₁, respectivamente. A coprodução de bioetanol e biogás, na qual as cascas foram adicionadas ao resíduo de fermentação antes da digestão anaeróbica, implicou em um rendimento energético máximo de combustível entre 15 e 23 MJ kg SV₁ (MOSHI et al., 2014).

Cheng et al. (2015), analisaram os efeitos do pré-tratamento com aquecimento por micro-ondas (MHAP) e Pré-tratamento com aquecimento a vapor (SHAP), sobre as alterações

microestruturais dos resíduos de mandioca. A produção de hidrogênio dos resíduos de mandioca com o MHAP foi superior ao do SHAP, demonstrando que o rendimento subsequente de metano em comparação com a energia total a eficiência de conversão aumentou para 24,7%.

Andrade et al. (2016), aferiram o processo de codigestão anaeróbica de dejetos de vacas leiteiras, aves poedeiras, suínos e ovinos com manipueira em codigestor anaeróbico semi-contínuo. Utilizou-se na fase inicial do experimento dejetos frescos de vacas leiteiras, ovelhas, frango de corte e suínos sendo os digestores alimentados diariamente com manipueira a uma concentração média de 5,5 % de sólidos totais (ST), com pH de 4,87, concentração total de amônia de 175 mg L⁻¹ de manipueira (10%, peso) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (0,5%, peso/peso). As produções médias de biogás acumuladas semanalmente foram de 0,00676, 0,1167, 0,01515 e 0,01856 m³, para substratos formados por dejetos de vacas leiteiras, ovinos, aves e suínos, respectivamente. A produção de biogás para os respectivos substratos foram 0,122, 0,275, 0,535 e 0,843 m³ kg⁻¹ de (SV). As maiores produções de biogás foram obtidas na codigestão anaeróbia de dejetos de suínos com 10 % volume de manipueira.

2.3 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um procedimento fermentativo executado em uma matriz sólida ou semi-sólida, cuja característica é a ausência ou quase ausência de água livre (COSTA et al., 2018).

Mesmo que a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, enriquecimento proteico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais e variações dos tradicionais alimentos fermentados. De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES podem ser divididos em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como aproveitamento de resíduos agroindustriais; 2) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas e enriquecimento proteico (PALMA, 2003).

Contudo, apesar do material se encontrar no estado sólido, o substrato deve apresentar umidade suficiente para o desenvolvimento microbiano e formação do produto de interesse. Numerosos produtos de origem microbiana podem ser conseguidos através da FES. As enzimas retratam bastante esses produtos, entre elas estão as amilases, proteases, xilanases, celulasas e pectinases (SILVA e ANDRADE., 2016).

A matriz sólida empregada na FES pode ser separada em duas categorias de acordo com a natureza da fase sólida utilizada: matriz sólida natural (como fonte de nutrientes) ou suporte inerte (impregnado de nutrientes que permite o desenvolvimento de microrganismos) (ROCHA, 2010).

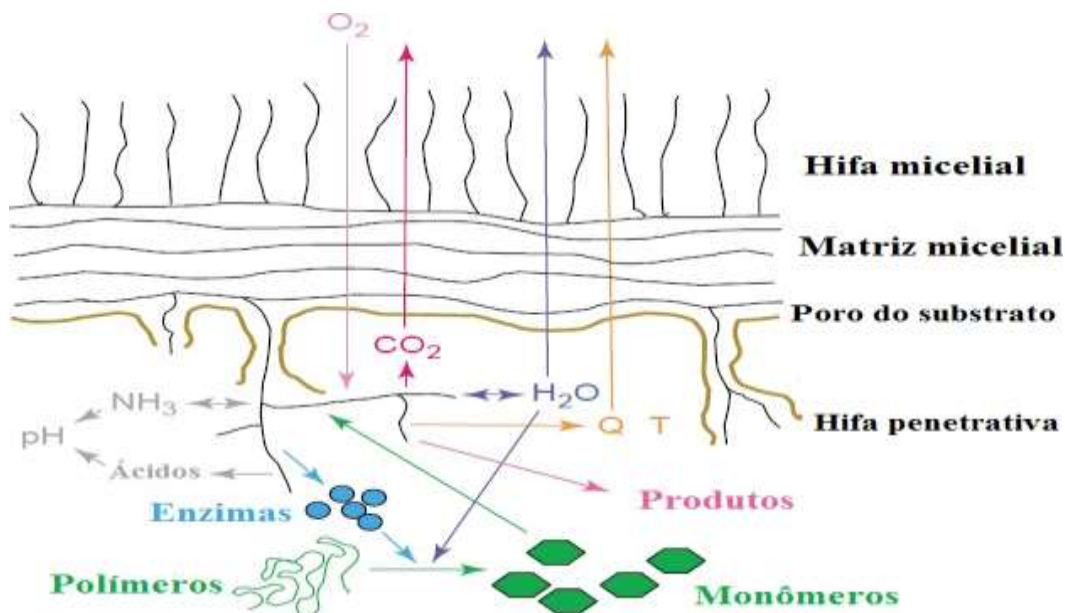
Diversos tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de crescer em substratos sólidos. Entretanto, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois possuem habilidades para crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (BÜCKA et al., 2015).

Um das principais características da FES é a utilização de substratos com baixa atividade de água, em que as condições de crescimento se assemelham ao habitat natural dos fungos, o que possibilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas (RODRÍGUEZ-LEÓN ET AL., 2018). Os resíduos formados nos processos agroindustriais podem ser empregados como substrato para o crescimento celular neste sistema. A matéria orgânica existente neste material é utilizada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (BÜCKA et al., 2015).

Segundo Rocha (2010), na FES as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre. A Figura 1 ilustra o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

Na FES, a água está associada a dois fatores: o primeiro, a umidade, tem a ver com a porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água (A_w), de compreensão um pouco mais complicada, é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

Figura 1-Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos.



Fonte: Adaptado de Hölker e Lanz (2005).

De acordo com Rocha, Medeiros e Silva (2010) todos os processos de fermentação em estado sólido, requerem das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um micro-organismo específico, controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, separação em alguns casos e a purificação dos produtos.

A FES é um método que apresenta vantagens do ponto de vista econômico e ambiental pois, necessita de uma menor quantidade de energia, maior rendimento de produto, menor produção de águas residuais associado a redução dos riscos de contaminação bacteriana, agregação de valor a produtos oriundos da fermentação de resíduos agroindustriais, uso de reatores pequenos ou biorreatores de bandejas, que ocupam menos espaço e redução nos gastos energéticos (ALJAMMAS e ALKHALAF, 2018).

2.3.1 Microrganismos Utilizados na FES

Diversos tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. No entanto, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, porque estes podem crescer dentro ou sobre a superfície do substrato, em baixa Aw de modo semelhante ao seu crescimento em habitat natural (PIROTA, 2016).

Os fungos filamentosos possuem hifas penetrativas e aéreas que formam o micélio. As hifas penetrativas são fundamentais no processo fermentativo, pois estas permitem a colonização entre as partículas sólidas e a obtenção dos nutrientes necessários para as atividades

metabólicas (GOMES, 2018). Entre os gêneros de fungos mais empregados na FES para produção de enzimas pode-se citar; *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* (JIANG et al., 2013). Dentre estes, o gênero *Aspergillus* é capaz de produzir diferentes enzimas e outros compostos de valor agregado pela FES de resíduos agroindustriais (SINGHANIA et al., 2010).

2.4 Pré – tratamento da Biomassa

A biomassa lignocelulósica é composta especialmente de três diferentes tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. Os resíduos agrícolas apresentam material lignocelulósico entre aproximadamente 30-45% de celulose, 10-40% hemicelulose e 5-25% de lignina (WADHWA e BAKSHI, 2013; PAUDEL et al., 2017).

Pelo fato de apresentar rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques aos tecidos vegetais, a digestão anaeróbia desses constituintes lignocelulósicos se tornam limitada para produção de biogás (COSTA et al, 2014).

A celulose é apontada como o principal composto constituinte dos resíduos lignocelulósicos. É um polissacarídeo linear de glicose formada por ligações glicosídicas β -1,4. Sendo encontradas em diferentes estruturas, denominadas cristalinas e amorfas, em que nas cristalinas as moléculas encontram-se bem organizadas, dispostas próximas umas das outras em longos seguimentos, enquanto que as regiões amorfas são menos organizadas. Essas duas estruturas estão presentes nos resíduos, porém em proporção diferentes o que determina o tratamento degradativo a ser utilizado, uma vez que as regiões mais organizadas se tornam mais resistentes na penetração de solvente (TAHERZADEH; KARIMI, 2008, ZHENG et al., 2014).

A Hemicelulose está presente em sua maior parte nas duas primeiras camadas na parede celular funcionando como barreira física que envolve a celulose dificultando o ataque enzimático e a digestão anaeróbica. Se classifica como um polissacarídeo heterogêneo amorfo com massa molecular menor que a celulose. Possui baixa resistência a hidrólise, sendo mais vulnerável a hidrólise térmica e química de seus compostos poliméricos (TAHERZADEH; KEIKHOSRO KARIMI, 2008; LIMAYEM; RICKE, 2012; ZHENG et al, 2014).

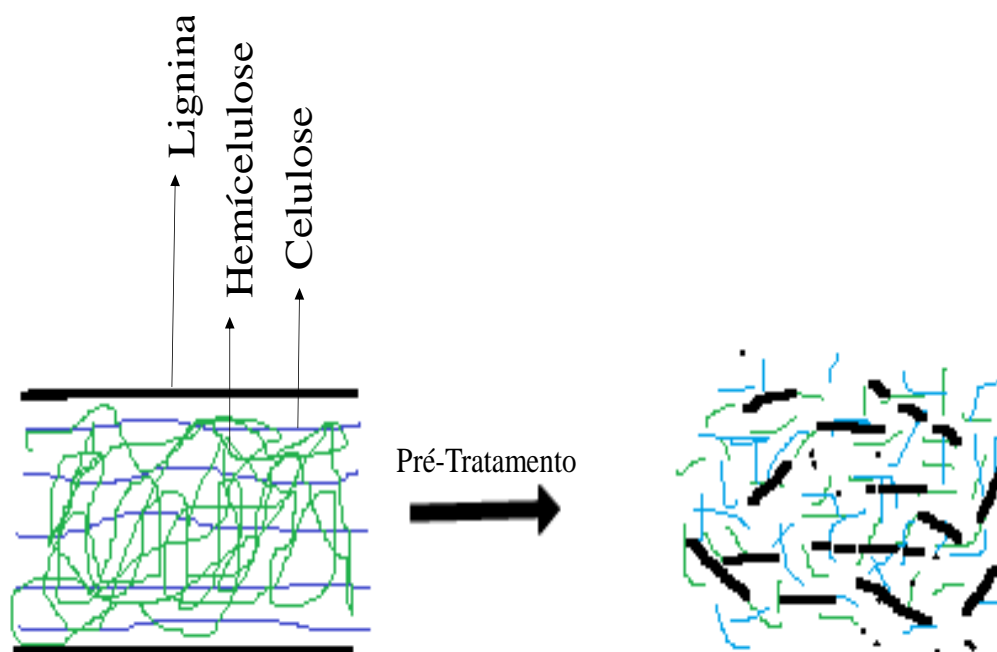
A lignina é uma molécula complexa constituída por heteropolímero amorfo aromático e hidrofóbico, integrado por unidades fenilpropânicas (álcool coniferílico e álcool sinapílico com grupos funcionais hidroxilo, metoxilo e carbonilo) ligadas em uma matriz tridimensional. Ela envolve a celulose e hemicelulose sendo responsável pela integridade, rigidez estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque enzimático. É o composto mais recalcitrante da parede celular vegetal, dessa forma sua maior proporção resulta em maior resistência da biomassa

frente a degradação química e biológica. A conversão da biomassa lignocelulósica em matéria fermentável é dificultada principalmente pela presença da lignina que funciona como barreira física a quebra tanto microbiana quanto enzimática (DOLLHOFER et al., 2015).

Devido a isso, a formação de biogás através da biomassa lignocelulósica necessita da aplicação de métodos de pré-tratamentos para que as fibras de celulose se tornem acessíveis para o processo de digestão anaeróbia (RABELO, 2010). Desse modo, os métodos de pré-tratamento têm entre seus objetivos, quebrar a lignina e tornar os açúcares acessíveis aos agentes de hidrólise, buscando por maiores rendimentos (CHATURVEDI e VERMA, 2013).

Existem diferentes tipos de pré-tratamentos que são utilizados para alterar a composição química e estrutura física de materiais lignocelulósicos, rompendo a ligação entre polissacarídeos e lignina e consequentemente deixando a celulose e hemiceluloses mais disponível aos microrganismos hidrolíticos (Figura 2), (MUSTAFA et al., 2016).

Figura 2- Efeito do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Sharma et al. (2019).

Os pré-tratamentos físicos podem ser a moagem, explosão a vapor, pré-tratamento com água quente líquida (hidrotermólise), extrusão e irradiação (ultrassom e microondas). O pré-tratamento físico visa aumentar a área de superfície diminuindo o tamanho das cadeias poliméricas da biomassa e não faz uso de produtos químicos ou micro-organismos durante os processos de pré-tratamento (ZHENG et al., 2014).

No pré-tratamento químico usam-se produtos químicos, como ácidos, bases fortes e soluções iônicas, para modificar as características químicas da biomassa lignocelulósica removendo ou deslocando hemiceluloses e lignina, fazendo com que ocorra quebra da estrutura da rede de lignina e hemicelulose (WAGNER et al., 2018).

É muito aplicada a combinação de métodos físicos ou químicos. Nestes métodos as principais desvantagens são o alto consumo de energia e/ou possíveis reduções de qualidade dos resíduos da digestão, dificultando assim o uso subsequente como biofertilizante acompanhado de custos crescentes para a sua eliminação (WAGNER et al., 2018).

O pré- tratamento biológico consiste na despolimerização da biomassa lignocelulósica por enzimas produzidas por microrganismos, principalmente fungos, deixando os açúcares mais disponíveis para as etapas de hidrólise e fermentação. Sendo um dos procedimentos seguros para o meio ambiente, consome menos energia e reagentes químicos (ZHENG et al., 2014). A finalidade desse tratamento prévio é fazer a quebra e remover o selo da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose e deixando mais suscetível ao ataque enzimático ou microbiano, diminuindo a perda de carboidratos para digestão anaeróbia (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; WAGNER et al., 2018).

A deslignificação e a decomposição da hemicelulose aumentam a disponibilidade de celulose e monômeros resultantes, o que pode incentivar o processo geral de digestão anaeróbia. O pré-tratamento biológico eficiente preserva as frações da pentose (hemicelulose), impedindo o surgimento de produtos de degradação como acontece nos pré-tratamentos químicos e termoquímicos que atrapalha o crescimento de micro-organismos fermentativos, diminuindo as demandas de energia e reduzem os custos (WAGNER et al., 2018).

2.5 Biodigestores

O biodigestor é o reator onde ocorre a biodigestão, formado basicamente por um recipiente fechado, um gasômetro ou campânula em que se acumula o gás, uma entrada para o armazenamento dos resíduos e uma saída destinada para liberação do digestato. Dentro desse sistema vai acontecer o processo bioquímico de fermentação anaeróbica da matéria orgânica, como resultado desta fermentação vai resultar na formação de biogás e biofertilizante (KARLSSON et al., 2014).

Há duas principais formas de fazer a alimentação de um biodigestor, mediante da alimentação em batelada ou contínua. No método em batelada o reator é alimentado somente uma única vez no início do processo e o material presente dentro daquele sistema só é

substituído ao final da degradação. Já no modo contínuo o material é inserido continuamente no reator e só será retirado uma quantidade igual à que já está estabilizando pelo fato de ter ficado o tempo suficiente dentro do biodigestor para que a biodigestão anaeróbia acontecesse (KOTHARI et al., 2014).

Entre os diversos modelos de biodigestores existentes, cada um deles apresenta suas vantagens e paralelamente suas desvantagens da mesma forma que características próprias de operação. A determinação do modelo que será instalado deve ser feita de acordo com as exigências do local de instalação, do tipo de resíduo que será usado e da relação custo versus benefício apresentado, no entanto todos eles terão aos mesmos produtos finais (AIRES, 2014).

2.6 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbica (DA) é um processo microbiológico complexo levado a cabo por um consórcio de microrganismos que gradualmente converte a matéria orgânica na ausência de oxigênio. A degradação da matéria-prima ocorre gerando entre outros sub-produtos, uma mistura de gases, principalmente, o metano (CH_4) e o dióxido de carbono (CO_2) (ANJUM et al., 2018). Essa tecnologia é comprovadamente eficaz no manejo de resíduos orgânicos sólidos e líquidos (ACHINAS et al., 2017).

A biodigestão anaeróbica é vista como uma possibilidade para o tratamento e reciclagem energética dos nutrientes contidos nos dejetos animais e resíduos vegetais, diminuindo o potencial poluidor e os riscos sanitários, além de proporcionar a geração do biogás e de biofertilizante (RODRIGUES et al., 2014). De acordo com Cremonez (2019), o estudo dessa técnica aumentou através das preocupações com a crise energética, como o agravamento do efeito estufa e com os problemas ambientais.

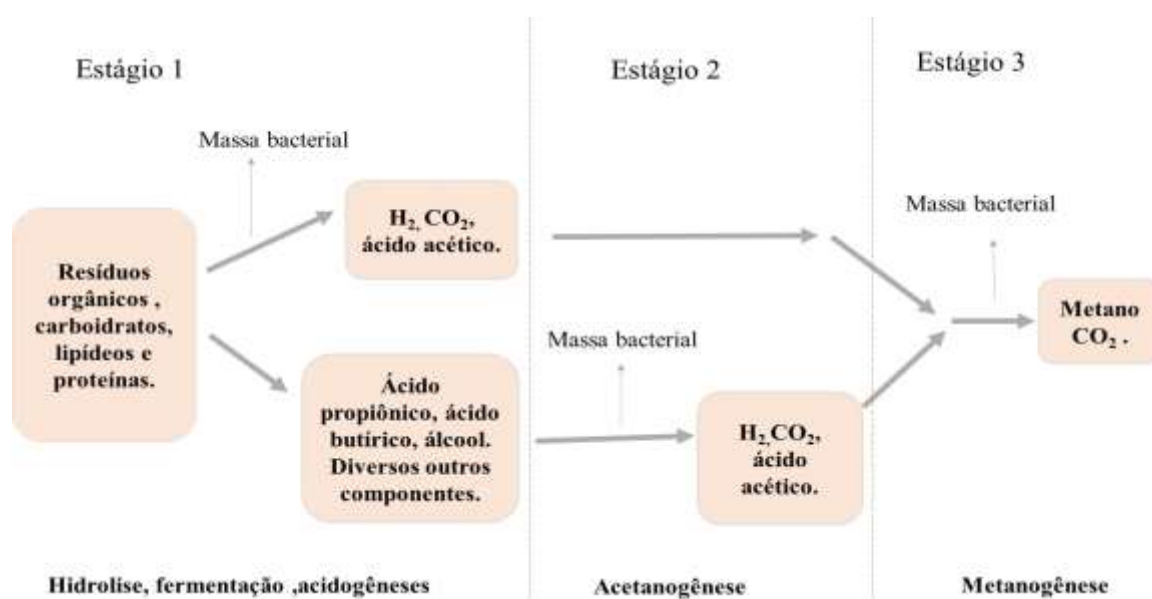
Um das maneiras de conseguir um maior rendimento e melhoria no processo e aumentar a produção de biogás, é utilizar-se da co-digestão, que conforme Valenti et al. (2018); Zahan et al. (2018), refere-se em fazer a união de dois ou mais substratos durante o processo, usando-se instalações iguais, visto que promove o equilíbrio das cargas orgânicas, os tempos de retenção hidráulica e os níveis de umidade no biodigestor.

Boldrin et al., (2016) salienta que a digestão anaeróbia é uma das técnicas mais eficaz para a extração de energia limpa e renovável a partir de biomassa, tanto térmica quanto elétrica, além de ser adequado para reciclagem de nitrogênio e fósforo a partir de substrato animal, nutrientes que são indispensáveis para agricultura, tornando-se também uma tecnologia de redução dos gases de efeito estufa.

No final do processo de DA, sob condições ideais ocorre a produção de biogás sendo formado essencialmente de metano (CH_4), gás carbônico (CO_2) e quantidades variáveis de ácido sulfídrico (H_2S) e amônia (NH_3). Ao final tem-se também, a produção de biofertilizante, um subproduto rico em nutrientes e material orgânico humificado.

O Processo da digestão anaeróbica é separado em quatro estágios (Figura 3) sendo elas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (ZHANG et al., 2014). Os microrganismos exercem um papel muito importante no processo de DA, sendo realizado por microrganismos dos domínios Bactéria e Archeae (WANG et al., 2018).

Figura 3- Fases da biodigestão anaeróbica



Fonte: Adaptado de Gerardi (2003, p. 52).

2.7.1. Hidrolise

É a primeira fase do processo, onde as bactérias anaeróbicas facultativas (bactérias hidrolíticas) vão fazer a quebra dos compostos complexos e insolúveis em substâncias simples e solúveis de menor peso molecular (monômeros), como monossacarídeos, ácidos graxos, aminoácidos e outros compostos. A etapa da hidrolise ocorre de uma maneira lenta, sendo um fator limitante para o processo de digestão anaeróbia (LEUNG e WANG, 2016). Pois é um período mais demorado e depende de alguns parâmetros, especialmente da composição do substrato e complexidade estrutural do mesmo, uma vez que se for complexo (como no caso dos materiais lignocelulósicos). Os microrganismos envolvidos nesta fase encontrarão maiores dificuldades para desfazer o complexo de ligações e alcançar moléculas menores, porque essa

transformação é catalisada por exoenzimas excretadas por micro-organismos facultativos ou acidogênicos (anaeróbios estritos), (INSAM et al., 2010).

2.7.2 Acidogênese

A segunda etapa as moléculas menores decorrentes da hidrólise são metabolizadas pelas bactérias acidogênicas fermentativas em ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGV), álcoois, ácido láctico, dióxido de carbono, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio (ZHANG et al., 2015).

2.7.3 Acetogênese

É uma fase reguladora do processo onde as moléculas orgânicas são convertidas em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, pelas bactérias acetogênicas, que serão os substratos para as bactérias metanogênicas (KOTHARI et al., 2014).

2.7.4 Metanogênese

É a etapa final do processo da digestão anaeróbica, onde as bactérias metanogênicas usam acetato, CO₂, H₂ provenientes da fase acetogênica para a produção de dióxido de carbono e metano (LEUNG e WANG, 2016).

2.8 Biogás

O biogás é a mistura dos gases produzidos pela digestão anaeróbia de biomassa, sendo insolúvel, incolor, de baixa densidade desde que não apresente impurezas em excesso. É constituído basicamente por 60 % de metano (CH₄) e 40% dióxido de carbono (CO₂), com mínimas quantidades de ácido sulfídrico (H₂S) e amônia (NH₃), traços de hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂), monóxido de carbono (CO), e oxigênio (O₂), (variações das concentrações), (IEA BIOENERGY TASK 37, 2018). O rendimento e a qualidade do biogás produzido durante o processo da digestão anaeróbica variam de acordo com a matéria-prima que será usada (GE et al, 2014).

O biogás é considerado como uma das melhores fontes de energia renovável. O metano presente no biogás, quando queimado, disponibiliza energia útil ao homem, seja pelo uso direto do calor (aquecimento, geração de vapor, secagem em geral) ou ainda empregado para conversão em outra forma de energia, como elétrica, por meio do uso em geradores ou turbinas,

ou energia cinética, mediante da utilização do gás em motores ou moto bombas adaptadas (WEILAND, 2010; OECHSNER et al.; 2012).

Segundo Karthikeyan et al. (2018), a tecnologia de digestão anaeróbia está sendo empregada para diversos fins, não somente para o tratamento de resíduos orgânicos, mas também para o tratamento de águas residuais. Para a instalação de usinas de biogás em grande escala, Alemanha e a Suíça são exemplos importantes a serem seguidos na indústria global de biogás. Já os Estados Unidos têm cerca de 2.100 atuais plantas operacionais de digestão anaeróbia, enquanto a Ásia tem os maiores números de digestores anaeróbicos domésticos de pequena escala que são usados em áreas rurais para iluminação e cozinha (VASCO-CORREA et al., 2018).

2.9 Fatores que Influenciam na Produção do Biogás

2.9.1 Temperatura

As bactérias que atuam no processo de DA são muito sensíveis á variação de temperatura e seu controle no sistema de produção é um fator determinante para um bom desempenho do sistema. As faixas de temperaturas ideais para a taxa de crescimento dos microrganismos são: psicofílico (cerca de 25°C), mesofílico (cerca de 35°C) e termofílico (cerca de 55°C) (KWIETNIEWSKA e TYS; 2014). Membere e Sallis (2018) estudaram o efeito da temperatura (entre 25- 55°C) na cinética de produção de biogás em amostras de macroalgas laminárias, e os resultados apontaram que a temperatura mesofílica de 35°C foi a melhor para produção acumulativa de biogás.

2.9.2 pH

A faixa de pH mais favorável para obter a produção máxima de biogás é entre 6,8-8,0, sendo ótima entre 7,0 e 7,2 (MATOS, 2016). Enquanto as bactérias presentes nas fases iniciais da digestão anaeróbia são responsáveis pela geração dos ácidos, as metanogênicas os consomem, tornando o meio neutro. Geralmente, o valor do pH indica que as condições de operação do sistema estão controladas e adequadas ao consorcio microbiano que estão dentro do biodigestor (BENLIN et al., 2015).

2.9.3 Teor de Água

O teor da água varia de acordo com as diferenças apresentadas pelas matérias-primas destinadas à fermentação. Tanto o excesso de água quanto a falta são prejudiciais ao sistema, sendo que o teor de água presente no biodigestor deve variar entre 60% e 90% do peso do conteúdo total (CASSINI et al., 2014).

2.9.4 Relação C/N

Os nutrientes de maior demanda pelos microrganismos são carbono e nitrogênio, pois, estão relacionados ao balanço da disponibilidade da matéria orgânica e inorgânica presente no substrato (MAYER, 2013). É necessário que o substrato orgânico apresente uma relação C/N adequada para o processo de digestão anaeróbia. Deublein e Steinhauser, (2008), propõem que a relação C/N esteja na faixa de 20 a 30. Bajpai et al. (2017), declaram que relação C/N deve ser de no mínimo 25 para uma produção de gás ideal. Kondusamy e Kalamdhad (2014), indicam uma relação de 25 a 30 para melhor desempenho da digestão anaeróbia. A produção de biogás será bem-sucedida se ambos nutrientes estiverem presentes na relação ideal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a influência do pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em casca de mandioca na produção e composição do biogás utilizando biodigestores de laboratório.

3.2 Objetivos Específicos:

- a. Caracterizar o efeito do pré-tratamento na composição físico-química da casca de mandioca.
- b. Aplicar a FES usando como substrato a casca de mandioca, agindo como pré-tratamento biológico.
- c. Avaliar a produção e composição do biogás a partir de casca de mandioca tratada com *Aspergillus niger* ATCC 1004.
- d. Estudar a composição do biogás produzido a partir de casca de mandioca tratada com *Aspergillus niger* ATCC 1004.
- e. Caracterizar os digestato obtido através de análises físico-químicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

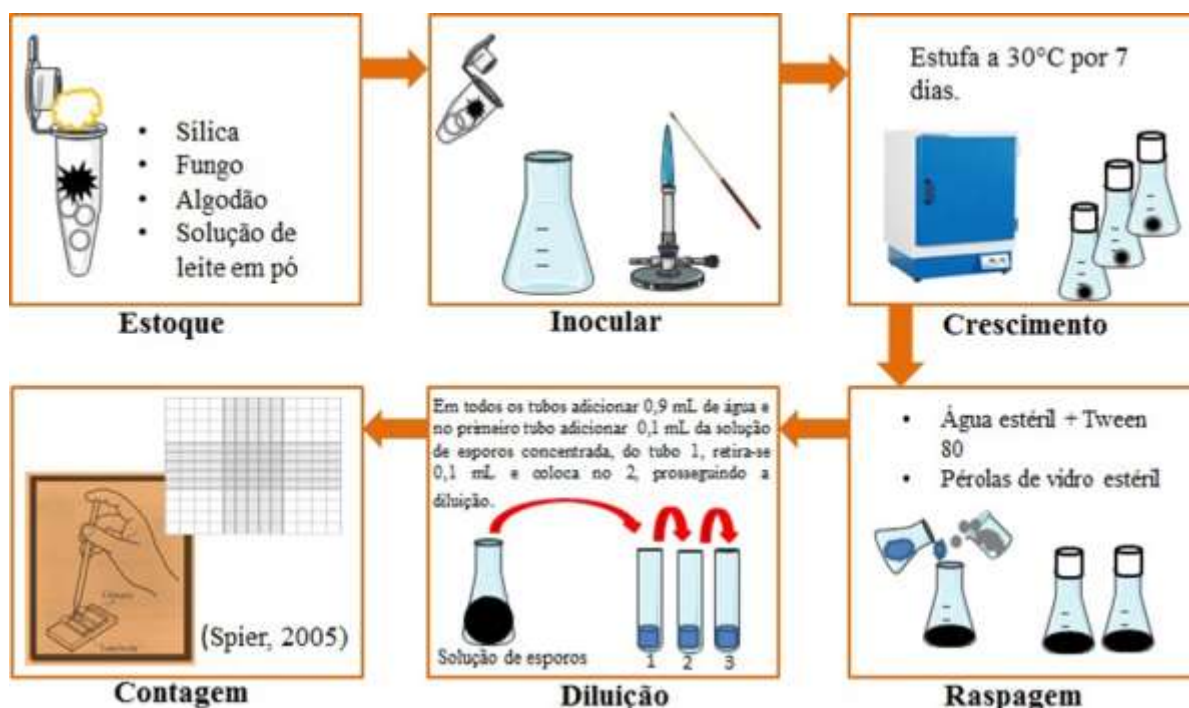
4.1 Obtenção e Preparo da Amostra de Substrato

As cascas da mandioca foram coletadas na feira livre do município de Itapetinga-Ba, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Forragicultura da UESB onde foram processadas e analisadas. As amostras foram lavadas, secas em estufa (SOLAB modelo SL-101/27), a 60°C por 72 horas e posteriormente trituradas em moinho de facas tipo Wiley, com granulometria de 2 mm.

4.2 Fermentação em Estado Sólido

A cepa *A. niger* ATCC 1004 foi adquirida da Vigilância Sanitária Coleção de Microorganismos de Referência (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e acondicionada em sílica a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ até o momento do experimento. O microrganismo foi ativado em meio de cultura sólido Potato Dextrose Agar (HIMEDIA) a 30°C por 7 dias. Foram inoculados 10^7 esporos/grama de resíduo preparados como suspensão de esporos em Tween 80 (VETEC) a 0,01% e padronizado em câmara de Neubauer (Figura 4).

Figura 4- Esquema ilustrado do inoculo de *Aspergillus niger*, crescimento e procedimentos utilizados para obtenção da solução de esporo.

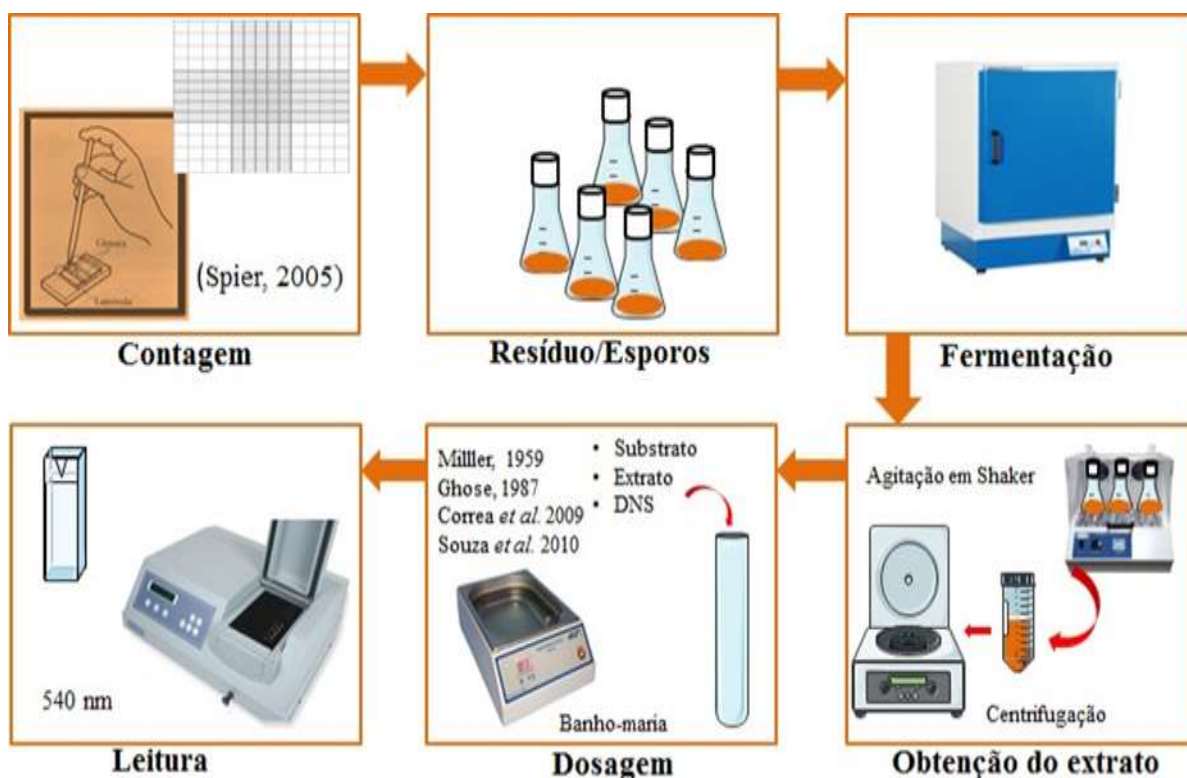


Fonte: Ribeiro (2017).

4.2.1 Obtenção do Extrato Bruto Enzimático

Foi adicionado ao resíduo fermentado, 50mL de água destilada e a suspensão foi agitada em agitador rotatório Solab SL 222, a 30 °C e 160 rpm, por 30 minutos. O extrato bruto enzimático foi obtido por filtração com malha 13 fios / cm² 100% algodão, seguido de centrifugação em centrífuga (TECNAL) a 6000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado como extrato bruto enzimático (Figura 5).

Figura 5. Esquema ilustrando a fermentação em estado sólido, obtenção do extrato enzimático bruto e a dosagem enzimática.



Fonte: Ribeiro (2017).

4.3 Determinação da Atividade Enzimática

4.3.1 Determinação da Atividade de Celulase

A atividade da enzima celulase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) a 1% (p/v), diluído, previamente em solução tampão acetato de sódio (100 mM), pH 5,0 utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller, (1959).

O meio reacional para determinação da atividade de celulase, foi constituído de 0,25 mL de uma solução de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato (100 mM) a pH 5,0 adicionado

a 0,35 mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada a 50°C por 15 minutos em banho-maria (Cientec CT-266). Após esse período, o volume de 0,6 mL de DNS foi adicionado e a solução incubada a 100°C por 5min. Após resfriamento, foram adicionados 6 mL de água destilada e realizada leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics SP 2000 UV) através da metodologia adaptada de Ghose, (1987). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 $\mu\text{mol/g/min}$ de produto. A atividade espectrofotométrica foi expressa em U/g.

4.3.2 Determinação da Atividade de Amilase

A atividade da enzima amilase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise do amido solúvel a 1% (p/v), diluído previamente em solução tampão acetato de sódio (100 mM), pH 5,0 utilizando o método do DNS, conforme descrito por Miller, (1959).

Para determinação da atividade de amilase, 0,25 mL de uma solução amido solúvel 1% em tampão de acetato (100 mM) a pH 5,0 foi adicionado a 0,35 mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada a 50°C por 15 minutos banho-maria (Cientec CT-266). Após esse período, 0,6 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico foi adicionado e a solução incubada a 100°C por 5min. Após resfriamento, foram adicionados 6 mL de água destilada e realizada a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics SP 2000 UV) segundo metodologia de Ghose, (1987). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 $\mu\text{mol/g/min}$ de produto. A atividade espectrofotométrica foi expressa em U/g.

4.3.3 Determinação da Atividade de Invertase

A atividade da enzima invertase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise da sacarose solúvel a 2% (p/v), diluído previamente em solução tampão acetato de sódio (100 mM), pH 5,0 utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller, (1959).

Para determinação da atividade de invertase, 0,25 mL da solução de sacarose solúvel 2% em tampão de acetato (100 mM), pH 5,0, foi adicionado a 0,35mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada a 50 °C por 15 minutos banho-maria (Cientec CT-266). Após esse período, 0,6 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico foi adicionado e a solução incubada a

100 °C por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6mL de água destilada e realizada a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics SP 2000 UV) através da metodologia adaptada de Ghose, (1987). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 $\mu\text{mol/g/min}$ de produto. A atividade espectrofotométrica foi expressa em U/g.

4.4 Caracterização da Casca de Mandioca

A composição da casca de mandioca incluiu os valores de matéria seca (MS), material mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), seguindo a metodologia descrita por Van Soest et al. (1991) e Silva & Queiroz (2002).

As medidas de pH foram realizadas seguindo a metodologia descrita por APHA et al., (2005), utilizando um potenciômetro de bancada (Quimis, modelo Q 400 A).

Os sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e os sólidos fixos (SF) foram determinados pelo método gravimétrico, seguindo a metodologia descrita por APHA et al., (2005). Para a obtenção da concentração de sólidos totais, as amostras foram acondicionadas em cadinhos de porcelana e secas em estufa a 105 °C até peso constante. O material resultante nos cadinhos foi utilizado para a quantificação dos sólidos fixos, utilizando a técnica de incineração em forno mufla (modelo 315 SE) a 550°C. Os sólidos voláteis foram obtidos por diferença entre os sólidos totais e os sólidos fixos.

4.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros foram obtidos utilizando o equipamento (Cary 630 FT-IR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de Reflectância Total Atenuada (ATR) e detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS), sob a faixa do infravermelho médio (MIR), sendo empregado o número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} . Foram obtidos espectros no modo de absorbância com resolução de 4 cm^{-1} , varredura de 64 scans. Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo (background), em condições padronizadas. As amostras das cascas de mandioca foram colocadas no cristal ATR coberta com a tampa para garantir um bom contato da amostra com o cristal e analisadas, gerando o espectro. As máximas absorbâncias associadas à sua faixa de número de onda foram utilizadas como variáveis de estudos para análise estatística. Após a obtenção dos espectros e identificados

os principais picos (máximas absorbâncias) os mesmos foram relacionados aos grupos funcionais com dados da literatura.

4.6 Difractometria por Raios-X (DRX).

A cristalinidade da casca de mandioca sem e com e sem pré- tratamento foi avaliada por difração de raios-X (DRX), em equipamento (XRD-6000, Shimadzu, São Paulo, Brasil) com radiação $\text{Cu.K}\alpha = 0,1518 \text{ nm}$ (40 kV, 30 mA). A faixa analisada foi de $2\theta = 2^\circ$ a 50° com passo de $0,05^\circ$ e tempo de integração 2 s. Na forma de pó, as amostras foram devidamente colocadas em porta amostras e levadas à câmara de radiação do aparelho (FRENCH, 2014).

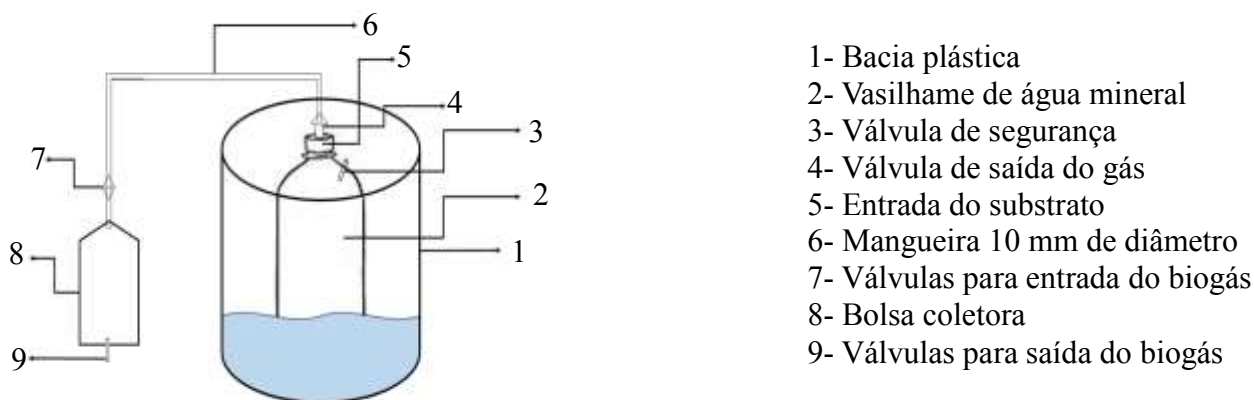
4.7 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO do afluente e efluente da biodigestão foi determinada pelo método Titulométrico do Refluxo Fechado conforme a metodologia descrita no Standard Methods (APHA, 1995).

4.8 Digestão Anaeróbia

Foram empregados biodigestores construídos com garrafas plásticas de água mineral de 5 L, em que se acoplou uma válvula de escape na tampa da garrafa. Um esquema da montagem experimental é apresentado na figura 6. Para a vedação das laterais do pino utilizou-se material de borracha e cola de silicone tanto na parte inferior quanto na parte superior da tampa. Foi encaixada uma mangueira de silicone de 20 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro na válvula para transferência de gás do interior da garrafa para a bolsa coletora (2000 ml da marca BIO BAG modelo 13034). Também, foi acoplada uma válvula de segurança na lateral da garrafa, conectada a uma mangueira de 5 cm por 4 mm de diâmetro. Este dispositivo também serviu como ponto de coleta de amostras de gás.

Figura 6. Modelo de biodigestor laboratorial.



Fonte: Autora

Os biodigestores foram mantidos em banho-maria, submersos em água até o nível do substrato, dentro de uma bacia de plástico com capacidade de 80 litros (31 cm de altura e 61 cm de diâmetro). Um aquecedor de aquário com termóstato foi utilizado para manter a temperatura da água em 35 °C, a qual foi monitorada com um termômetro. Foi utilizado um medidor de gás da marca Model DC modelo 24036 para monitorar o volume do biogás produzido diariamente. Esse equipamento contém linha de entrada e saída de gás, sendo que na entrada, era acoplada uma bolsa coletora contendo o biogás de cada garrafa e na saída o saco amostrador do kit Biogás Alphakit. Os volumes acumulados foram utilizados na execução do kit de análise do biogás seguindo as instruções do fabricante.

4.8.1 Obtenção da Microbiota Metanogênica

Esterco bovino fresco foi utilizado como fonte de microbiota metanogênica, que foi cedido pelo setor de bovinocultura da UESB. O material foi coletado e armazenado em sacos plásticos até o momento do experimento.

4.8.2 Preparação dos Substratos

O experimento foi realizado em batelada, sendo os biorreatores abastecidos uma única vez com os tratamentos avaliados, a saber:

Controle DA: esterco fresco e água (C);

Controle da fermentação em estado sólido: esterco fresco, água e casca sem fermentar (CSF);

Teste da casca fermentada (FES): esterco fresco, água e casca após a fermentação em estado sólido (CF).

As proporções dos substratos utilizados nos tratamentos da digestão foram estimadas de acordo com Gomes et al. (2001) e visam estabelecer a quantidade de partes de material rico em carbono e nitrogênio a serem utilizados nas misturas para atender a relação C/N de 30/1. A equação 1 apresenta o cálculo aplicado nessa determinação.

Equação 1:

$$PMRC = \frac{(30 \times Nc) - Cn}{Cc - (30 \times Nc)}$$

Onde:

PMRC = partes de material rico em carbono;

Nn= teor de N do material rico em nitrogênio;

Cn= teor de carbono (C) do material rico em nitrogênio;

Cc= teor de carbono do material rico em carbono;

Nc= teor de N do material rico em C.

Assim, seguindo a relação, uma proporção de 70 partes de esterco para 30 partes de casca de mandioca foi utilizada para atender a relação C/N de 30/1.

A partir dos resultados observados na análise de sólidos totais, determinou-se a quantidade de esterco, água e cascas de mandioca a ser adicionada, a fim de se obter uma concentração de 10% de sólidos totais em todos os biodigestores. As composições adotadas em cada caso são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1- Proporção de substratos utilizados.

Composição	Tratamentos		
	C (Controle DA)	CSF (Casca sem fermentar)	CF (Casca após FES)
Esterco fresco	2 kg	1,400 kg	1,400 kg
Água	2 kg	2,427 kg	2,427 kg
Casca sem fermentar	-	-	0,173 kg
Casca após FES	-	0,173 kg	-
Total	4 kg	4 kg	4 kg

FES- Fermentação em estado sólido.

Fonte: Autora

O período total do ensaio foi de 43 dias, compreendidos entre inoculação e parada foram divididos em três etapas onde foram realizados os seguintes procedimentos:

Do dia 0 ao dia 14: inoculação e colonização: Neste tempo as válvulas e as linhas do biodigestor permaneceram fechadas, o medidor de volume do gás ficou conectado na linha do tratamento C A e as garrafas foram agitadas suavemente todos os dias.

Dia 15: foi medido a concentração de metano em todas as garrafas, sendo essas realizadas no ponto da saída de emergência da garrafa. Esse gás foi armazenado nas bolsas para poder ser utilizado nas etapas seguintes.

Dia 25: carregamento da batelada com os diferentes substratos. Antes o volume de biogás de cada garrafa foi medido e a sua composição foi aferida segundo instruções do fabricante do kit Biogás Alphakit. Uma amostra do digestato acumulado também foi tomada para monitoramento de temperatura e pH. Os substratos foram previamente preparados seguindo informação da Tabela 1. Foram tomadas as medidas de temperatura, pH e DQO em cada diluição. A água que foi usada nas diluições foi aquecida até 40 °C evitando o choque de temperatura na microbiota do biodigestor. Feito isso, as garrafas foram carregadas com os substratos e fechadas.

Ainda no dia 25, após carregar as garrafas, as válvulas de segurança foram conectadas às bolsas de gases contendo biogás produzido previamente. Então as válvulas de cada conjunto foram abertas forçando-se o biogás a passar de volta para as garrafas. Desta forma lavou-se o *headspace* em cada garrafa com o próprio biogás acumulado. Em seguida as saídas de segurança foram fechadas mantendo-se somente as válvulas de entrada das bolsas abertas. O contador de gás foi mantido conectado no biodigestor controle tendo sido redirecionado diariamente para as linhas de gás das demais garrafas a fim de medir os volumes gerados e armazenados nas respectivas bolsas de coleta.

Do dia 26 dias ao dia 43: A medição do biogás ocorreu diariamente. Anotou-se a produção em volume de biogás e a concentração de metano, gás carbônico, amônia e ácido sulfídrico em cada tratamento. Após isso o biogás foi descartado.

4.8.3 Determinação da Composição do Biogás

Foram realizadas determinações H_2S , NH_3 , CO_2 e CH_4 , utilizando o Kit Biogás Alphakit, composto por tabela colorimétrica para determinação das concentrações dos gases, reagentes para realização das análises, seringas amostradoras, frascos para as reações químicas e comparação de cor, saco amostrador para coleta das amostras do biogás e conjunto de seringas

para medir a concentração de metano através do método volumétrico. As medições foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Para a análise de amônia e gás sulfídrico, a técnica consistiu em borbulhar o biogás em uma solução, envolvendo reagentes específicos, e após um tempo pré-estabelecido de 10 minutos, realizam-se as medidas. Os valores são encontrados pela comparação da intensidade de cor desenvolvida com as cores de uma curva padrão pré-estabelecida, fornecida pelo fabricante, na qual obtém-se as concentrações dos respectivos gases.

A determinação de CO₂ e CH₄ do Kit biogás Alfakit segue uma adaptação do método de Orsat (KUNZ, 2005). As amostras do biogás foram retiradas pelas seringas do kit, onde ocorreu a mistura com o reagente específico por agitação em um tempo pré-estabelecido de 2 minutos. Utilizou-se então a escala auxiliar no suporte Orsat para medir a porcentagem aproximada de gás carbônico e gás metano.

4.9 Análise Estatística

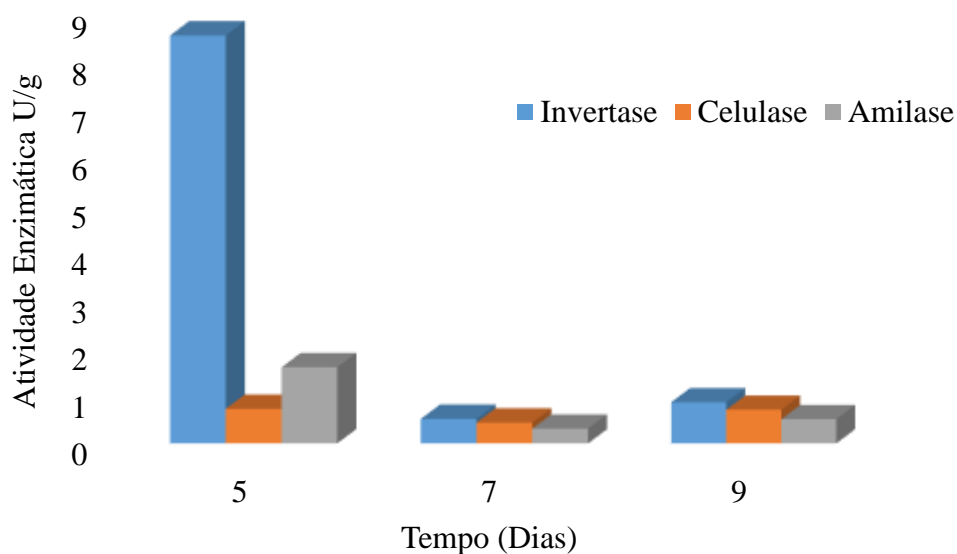
O experimento foi planejado seguindo Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquemas de parcelas subdividas, onde a primeira parcela foi dividida em sub parcelas de tratamento 1, 2 e 3 e a segunda parcela foi divididas em períodos de 15 a 43 dias. Os dados foram organizados em programas de Excel Office, analisados com auxílio do programa Sistema de Análises Estatística (Sisvar 5.6).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Enzimática

A análise da figura 7 permite afirmar que dentre o período avaliado no qual houve maior produção de enzimas invertase, celulase e amilase durante a fermentação em estado sólido, usando *Aspergillus niger* ATCC 1004 como microrganismo e casca de mandioca como substrato, foi o tempo de 5 dias, e, após esse tempo, as atividades tenderam a diminuir. Também, os resultados demonstram que a maior atividade foi de invertase, quando comparada a amilase e celulase. Isso pode ser explicado, pois a utilização de açúcares mais simples (sacarose) é preferencial a de polímeros como celulose e amido. Por isso a atividade de invertase é maior neste ponto (BATISTA,2018).

Figura 7. Atividade das enzimas invertase, celulase e amilase produzidas por *A. niger* ATCC 1004, em substrato de casca de mandioca submetida a FES em função do tempo de fermentação.



Fonte: Autora

5.2 Composição Físico –Química do Substrato

A Tabela 2 apresenta os resultados da caracterização da casca de mandioca (CSF e CF) em termos de matéria seca, mineral, proteína bruta, extrato etéreo, pH e teor de fibras (Celulose, hemicelulose e lignina).

Tabela 2- Composição centesimal da casca da mandioca antes e após o pré-tratamento em FES com *Aspergillus niger* ATCC 1004.

COMPONENTE (%)	CSF	CF
Matéria seca	92±0,01	94±0,05
Matéria Mineral	5,20±0,12	5,60±0,21
Proteína Bruta	8,93±0,18	16,75±0,02
Extrato Etéreo	1,02±0,11	1,04±0,08
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	25,75±0,03	16,45±0,40
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	18,00±0,07	9,71±0,53
Celulose	5,75±0,02	4,47±0,12
Hemicelulose	7,75±0,01	6,74±0,03
Lignina	12,63±0,04	5,24±0,01
pH	5,10±0,52	5,07±0,06

CSF= Casca sem fermentar; CF= Casca fermentada

Fonte: Autora

Os teores de cinzas encontrados estão em consonância com o que está disposto na literatura. Alves (2014), analisando material semelhante, encontrou teor de 5,7%. Nos estudos de Carvalho (2005), caracterizando a casca e entrecasca da mandioca, os teores encontrados foram iguais a 3% e 4%, respectivamente. De acordo com Cipriano (2015) e Oliveira (2015), as cinzas presentes nos resíduos podem variar dependendo da espécie, estágio de maturação, propriedades do solo, clima ou até a forma de lavagem do material. A análise das cinzas é importante pois fornece informações da quantidade de substâncias inorgânicas ainda presentes na biomassa. Já a casca de mandioca fermentada apresentou um maior teor de proteína e isso pode estar associado à secreção das enzimas (invertase, celulase e invertase) que auxiliam na conversão de fibras em monômeros simples, durante as atividades metabólicas do microrganismo (YALEMTESFA et al., 2010).

Com relação ao teor de lignina, o tratamento CSF apresentou 12,63% enquanto CF apresentou 5,24%. Desta forma observa-se que o pré-tratamento foi crucial para o metabolismo da lignina e diminuição de seu teor, modificando assim a estrutura da biomassa (ADEKUNLE et al., 2016; GUPTA e VERMA, 2016). Ao comparar estes resultados com outros estudos relacionados aos resíduos do processamento da mandioca vemos que em Moshi *et al.* (2015) foram encontrados teores de 16% de lignina total, enquanto Adekunle et al. (2016), 11%, sendo

estes valores próximos aos da casca de mandioca *in natura*. A ação do fungo pode ser entendida como um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (LEE; MOON, 2003; MANE *et al.*, 2007).

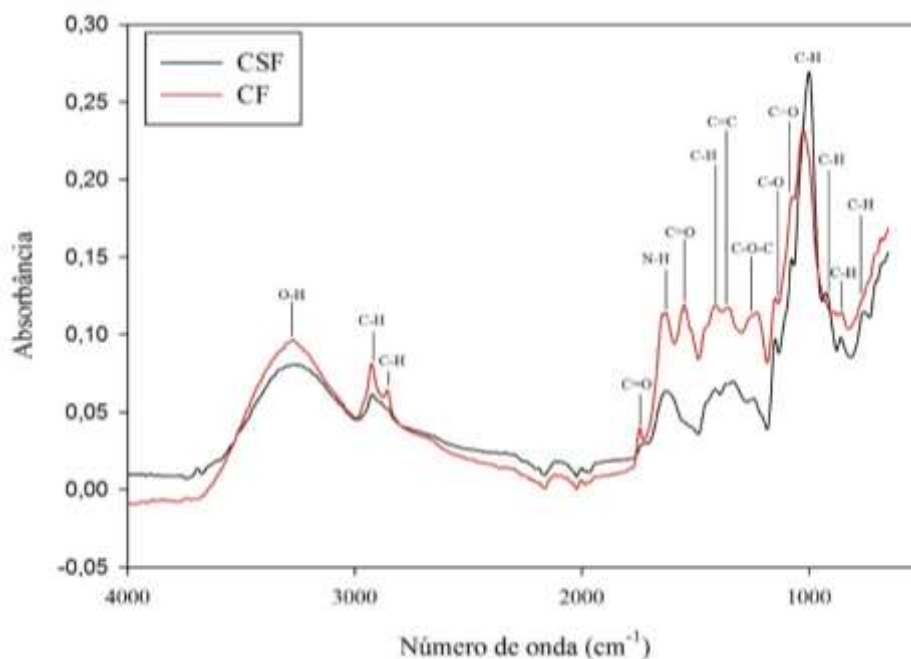
No presente estudo foi verificado que a casca de mandioca *in natura* apresentou 25,75% de FDN e 18,00% de FDA enquanto a casca fermentada apresentou 16,45% FDN e 9,71% de FDA. Esse fato se deve ao consumo de carboidratos não fibrosos pelo microrganismo durante a síntese de proteínas (ARAÚJO *et al.*, 2017).

5.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização espectral das amostras da casca de mandioca com e sem fermentação é apresentada na figura 8. Foram detectados 15 picos nas amostras CSF e CF. A partir da literatura consultada foi possível fazer a distinção das bandas encontradas nos espectros das amostras (BARBOSA, 2013).

Na figura 8 pode -se observar que o aparecimento dos picos 3271 cm^{-1} é associado ao grupo funcional OH, os picos 2925 cm^{-1} , 2857 cm^{-1} , 1416 cm^{-1} , 999 cm^{-1} , 925 cm^{-1} , 886 cm^{-1} , 859 cm^{-1} e 758 cm^{-1} estão associados a CH, o pico 1748 cm^{-1} está associado com C=O, 1633 cm^{-1} está associada a NH, 1553 cm^{-1} e 1352 cm^{-1} C=C, 1230 cm^{-1} associado a C-O-C e 1150 cm^{-1} está associada a C-O.

Figura 8- Espectros de FTIR das amostras da casca de mandioca obtidas sem fermentação (CSF) e após FES (CF).



Na amostra do material sem fermentar (CSF) é possível verificar a formação somente de um pico situado no número de ondas 1416 cm^{-1} relacionados a compostos hemicelulose e lignina (TOMAS et al, 2015), já na amostra fermentada houve o aparecimento de um novo pico, compreendido no número de ondas 1352 cm^{-1} sugerindo que houve a transformações de carboidratos estruturais em carboidratos solúveis não estruturais resultante da quebra de celulose e hemicelulose pelo fungo (ROUCHES et al., 2016).

Houve o aparecimento de um pico característico de N-H, nos comprimentos de ondas 1630 cm^{-1} , que foram relacionados à proteínas, nos espectros da casca fermentada (CF). Segundo Pontes 2009, Silveira e Furlong (2007) os níveis de proteína aumentam com a fermentação no estado sólido e isso foi constatado no presente trabalho, a partir das observações feitas no espectro. Segundo Leite et al. (2017), a banda mais característica para lignina, água e fenóis, que foram encontrados na casca de mandioca, está entre 3600 a 3000 cm^{-1} . No presente estudo foram encontradas bandas com mesmas características daquelas encontradas pelo referido autor, sendo essa em formato arredondado situada nos números de ondas 3271 cm^{-1} .

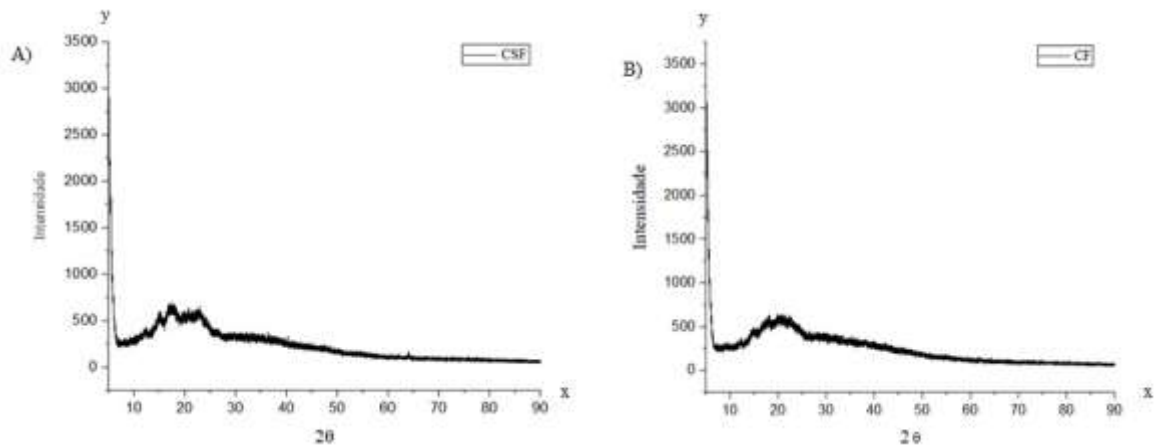
5.4 Difractometria por Raios-X (DRX)

O DRX é uma técnica empregada para fazer a identificação da cristalinidade dos compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. Este índice é um dos fatores importantes para determinar as propriedades mecânicas dos materiais lignocelulósicos.

Os halos amorfos presentes nos ângulos entre de $2\theta = 15^\circ$ e 18° são característicos da presença de lignina e o halo em $2\theta = 20$ e 25° pode ser atribuído a celulose contida no resíduo, sendo estes compostos característicos de materiais lignocelulósicos existente no resíduo da casa de mandioca (ANDRADE-MAHECHA, 2012; MORAES, 2013).

Na figura 9b, pode observar-se apenas um halo amorfo entre $2\theta = 15^\circ$ e 22° , que se apresenta de forma menos intensa quando comparados a figura 9a antes do processo de fermentação, podendo indicar a quebra desses materiais lignocelulosicos durante processo de FES, em especial a lignina (MADADI e ABBAS, 2017). Corroborando assim, como os resultados da análises físico-química, pode-se afirmar a eficiência do uso do pré-tratamento biológico para redução da cristalinidade do material, o que auxilia no processo de biodigestão.

Figura 9- Difratometria de raios x (DRX) das amostras da casca de mandioca sem fermentar (A) e fermentada (B)



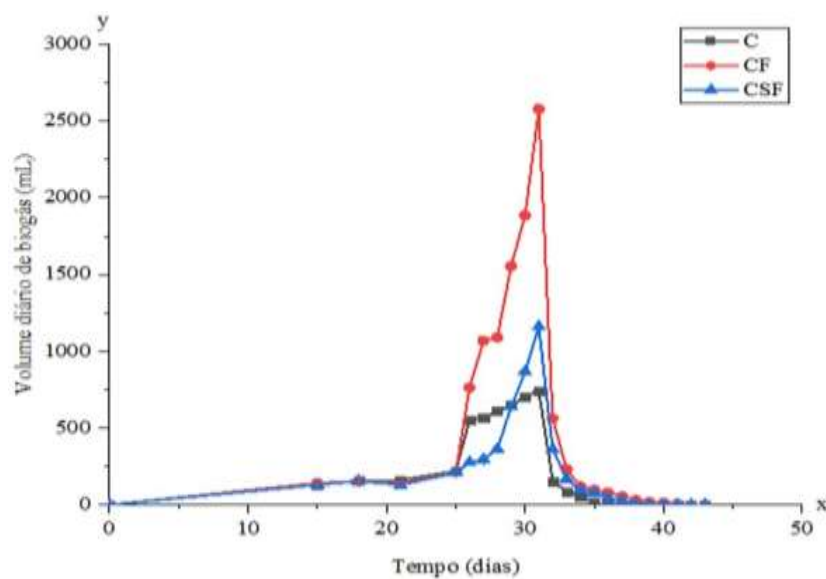
CSF= Casca sem fermentar; CF= Casca fermentada

Fonte: Autora

5.6 Produção de Biogás

Na figura 10 pode observar que, do dia 0 até 25 dias, a produção média diária de biogás para os três tratamentos foi muito similar, não apresentando diferença estatística significativa ($P=0,05$). Baixa produção de biogás no início do processo, devido ao período de estabilização e adaptação dos microrganismos no sistema.

Figura 10-Produção volumétrica de biogás; média diária (mL) obtida por DA com dejetos de bovinos e casca de mandioca. (C: controle; CF: substrato submetido a FES; CSF: substrato sem fermentar).



Fonte: Autora

A partir do dia 26 até os 32 dias, o tratamento CF destacou-se claramente na produção de biogás, apresentando volumes superiores aos observados no controle (C) e no substrato não fermentado (CSF). Verificou-se ainda que, o seu o maior pico de produção foi no 32° dia de biodigestão apresentando uma produção de 2579 ml, sendo esse valor mais que o dobro daqueles aferidos em C e CSF no período de 31 dias. Esses achados indicam duas coisas, primeiro que a hidrólise enzimática foi alcançada mais rapidamente e segundo que houve maior eficiência na conversão levando também a um maior volume de produção no dia 32. Ambos fatores são resultado de uma aceleração ocorrida na biodisponibilização de substrato para a hidrólise observada desde o dia 27 aproximadamente, como consequência do pré-tratamento (WAGNER,2018).

Entre 25 e 28 dias, CSF produziu menos biogás do que o controle (C) devido a mudança na DA. Provavelmente o esgotamento do material de mais fácil fermentação levou a microbiota a agir sobre outros substratos de degradação mais lenta e conseqüentemente produzindo uma menor quantidade de biogás nesses dias.

A partir do dia 29 até o dia 31 o tratamento CSF passou a apresentar uma maior produção de biogás em relação ao controle (C) mostrando que a codigestão de substratos provenientes da casca da mandioca bruta, no decorrer dos dias. Assim foi possível inferir que neste período a codigestão, pôde melhorar a produção de biogás. Este resultado foi provavelmente decorrente do efeito sinérgico estabelecido no meio da digestão e da melhoria no balanço de nutrientes (VALENTI *et al.*, 2018; ZAHAN *et al.*, 2018).

Entre os dias 34 e 43, o volume de biogás aferido nos três tratamentos foi bastante reduzido e não difeririam estatisticamente ($P = 0,05$), havendo um decaimento da produção no final do processo. Isto se deve ao fato de que o substrato ao longo do tempo foi consumido pelas bactérias metanogênicas. Quando se constatou a paralização na produção de biogás, o ensaio foi imediatamente encerrado. Tal fato ocorreu após 43 dias do início da operação.

Em resumo, a maior produção de biogás foi obtida a partir do substrato previamente tratado (CF) o que indica que a fermentação em estado sólido com *A. niger* ATCC 1004 foi eficiente. Foi confirmando que houve degradação na estrutura lignocelulósica do resíduo fermentado, de modo que a hidrólise dentro do biodigestor fosse alcançada mais rapidamente e com maiores rendimentos, o que está de acordo com a literatura (MADADI e ABBAS, 2017).

5.7 Composição do Biogás

5.7.1 Amônia (NH₃) e Ácido Sulfídrico (H₂S)

Os resultados das análises de concentração de NH₃ e H₂S demonstraram que, durante o período experimental a produção foi baixa, dentro do esperado, em todos os tratamentos C, CF e CSF (tabela 3).

Tabela 3-Concentrações de NH₃ e H₂S detectadas nas amostras de biogás. Os resultados representam faixas de detecção definidas no kit da Alfakit.

Dias	C		CF		CSF	
	NH ₃ (ppm _v)	H ₂ S (ppm _v)	NH ₃ (ppm _v)	H ₂ S (ppm _v)	NH ₃ (ppm _v)	H ₂ S (ppm _v)
15	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	20-30	0	0
26	15-45	20-30	0	20-30	15-45	0
27	15-45	20-30	0	0	15-45	20-30
28	15-45	20-30	0	0	15-45	20-30
29	0	0	0	0	15-45	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	15-45	0	15-45	0
32	0	20-30	15-45	0	15-45	20-30
33	15-45	20-30	0	0	15-45	20-30
34	0	20-30	15-45	20-30	15-45	20-30
35	0	20-30	15-45	40-65	15-45	40-65
36	0	0	15-45	40-65	0	40-65
37	0	0	0	40-65	0	40-65
38	0	0	0	40-65	0	40-65
39	0	0	0	40-65	0	40-65
40	0	0	0	40-65	0	0
41	0	0	0	0	0	40-65
42	0	0	0	0	0	0

C = Controle; CF= Casca Fermentada; CSF= Casca sem fermentar

Fonte: Autora

Durante o experimento foi observada uma baixa produção de NH₃ em todos os tratamentos. É possível observar pequenos intervalos de tempo onde surgiram este gás nos tres tratamentos. Entre nos dias 31 a 35 foi possível observar um pequeno acréscimo na produção de deste gás tanto em CF em CSF. Observando-se o perfil de produção de biogás na figura 10

pode-se constatar que este período coincidiu com aquele de queda na produtividade geral do biodigestor. Possivelmente os episódios de produção de NH_3 estejam relacionados a processos metabólicos próprios das bactérias.

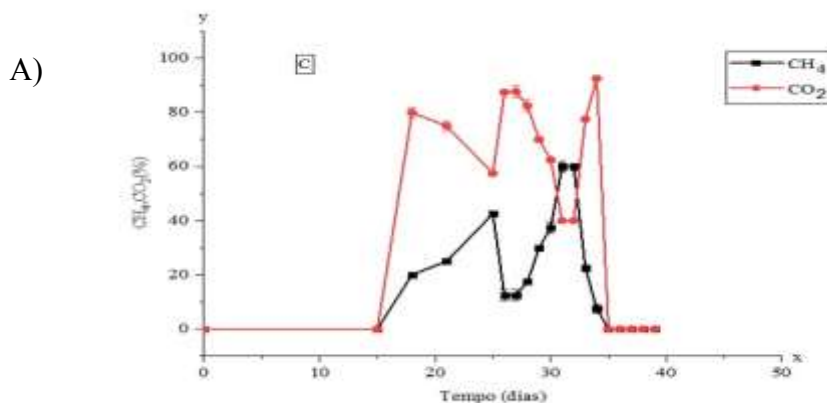
Os resultados da detecção de H_2S reunidos na tabela 3 mostram perfis parecidos para os três tratamentos, com dois intervalos de tempo onde foram observados incremento na concentração deste gás. De acordo com Schirmer (2015) a presença de gás sulfídrico ocorre, muito provavelmente, devido a uma redução na produção de ácidos orgânicos provocada pela atividade microbiana durante a fase ácida da digestão anaeróbia, precursora da fase metanogênicas. A quantidade de gás sulfídrico no biogás depende da quantidade de enxofre disponível na matéria orgânica. Nos dois tratamentos com casca de mandioca (CS) e (CSF) observou-se a partir do dia 30, um incremento na composição de H_2S , fato que pode estar relacionado ao cometabolismo de proteínas e outros substratos ricos em enxofre presentes na casca de mandioca durante a DA.

Esses dois parâmetros, NH_3 e H_2S são considerados pela literatura técnica como impurezas, sendo que somente acima de determinadas concentrações interferem negativamente na qualidade do biogás.

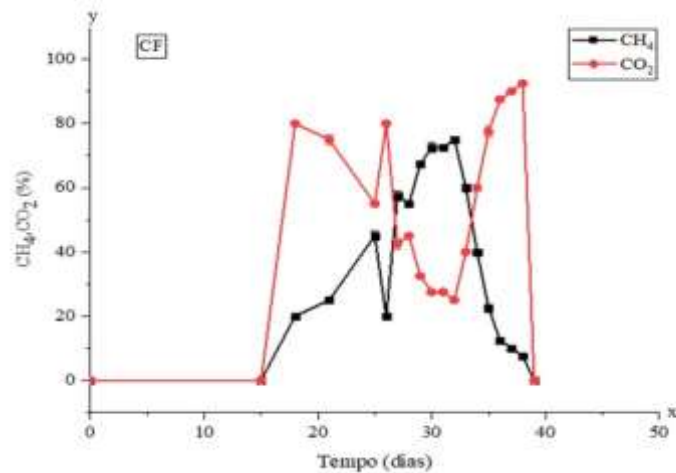
5.7.2 Produção de Gás Carbônico (CO_2) e Metano (CH_4)

Durante o período a produção de CO_2 foi maior nos tratamentos C e CSF em comparação com CF (figura 11), enquanto, por lógica, a produção de metano apresentou resultados inversos a estes.

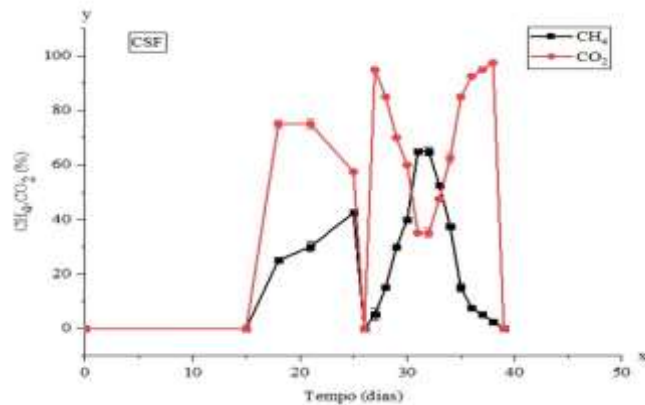
Figura 11-Produção média diária de CO_2 e CH_4 obtida nos tratamentos A (controle), B (casca fermentada) e C (casca sem fermentar). C = Controle; CF= Casca Fermentada; CSF= Casca sem fermentar.



B)



C)



Fonte: Autora

Neste contexto podemos verificar que os tratamentos C e CSF apresentaram porcentual de metano apropriados somente nos dias 31 e 32 com teores de 60 e 65 % de CH₄. O tratamento CF conseguiu atingir a maior concentração volumétrica de CH₄ mais rapidamente do que os demais, indicando melhor rendimento do ponto de vista energético. Nos dias 29 até 33 foram obtidos teores de 72,5, 72,5 e 75 % de CH₄ com um aumento de 15 % em comparação aos cenários de casca de mandioca não tratadas, confirmando que a fermentação em estado sólido empregada como pré- tratamento biológico foi eficiente. O potencial energético do biogás está diretamente relacionado a quantidade de metano em sua composição, ou seja, quanto maior a porcentagem de metano, maior o valor agregado do biogás.

Conforme literatura estabelecida na área de biogás, sua composição depende de fatores como o tipo e a composição bromatológica do substrato a ser biodegradado, sendo que sua

concentração pode variar de 40 a 70% de CH₄, 30 a 40% de CO₂, traços de nitrogênio, hidrogênio e gás sulfídrico. (FREITAS et al., 2019).

Hepp (2016), em seus estudos diz que a composição média em volume do biogás utilizando dejetos de bovinos e suínos pode variar entre 60 a 70 % de metano. Sendo assim, os valores encontrados neste trabalho condizem com os valores descritos na literatura.

Martin et al. (2010) e Forgács et al. (2012) avaliaram a digestão anaeróbia de casca e resíduos de laranja utilizando o pré-tratamento de explosão a vapor em condições mesofílicas e termofílicas em reatores semi-contínuos e batelada e obtiveram um aumento de 44,3% e 42,9% de concentração metano em relação aos tratamentos não tratados.

Zhang et al. (2011), estudaram a construção de um consórcio microbiano para alta degradação de celulose e aplicaram este consórcio no pré-tratamento de resíduos de mandioca com a finalidade de aumentar o rendimento de metano. Os resultados, experimentais mostraram que a produção máxima de metano (259,46 mL g SV⁻¹) de resíduos de mandioca foi obtida por 12 h de pré-tratamento pelo consórcio microbiano, 96,63% superior ao controle (131,95 ml g SV⁻¹).

5.8 Teores Sólidos Totais, Voláteis e pH no Processo de Biodigestão Anaeróbica

A Tabela 4 mostra os resultados de sólidos totais, voláteis (%) e pH antes (afluente) e após (efluente) o processo de biodigestão. Os dados indicam que o processo de DA favoreceu a redução dos sólidos totais e voláteis em ambos os tratamentos, indicando boa eficiência na conversão da matéria orgânica em biogás.

Tabela 4- Teores médios de sólidos (ST), sólidos voláteis (SV) e pH .

	Tratamentos		
	C	CF	CSF
ST(%)/A	10	10	10
ST(%)/E	7,25	6,35	8,22
SV(%)/A	1,67	1,89	1,72
SV(%)/E	1,35	1,15	1,29
PH /A	7,0	7,0	7,0
PH /E	6,8	7,2	7,5

A= Afluente; E = Efluente; C= controle; CF= Casca Fermentada; CSF= Casca Sem Fermentar.

Fonte: Autora

Os valores médios de pH no final da digestão nos três tratamentos variaram de 6,7 a 7,5, conforme apresentados na Tabela 4. Entretanto, nota-se que os afluentes apesar de próximos da neutralidade, apresentaram-se levemente alcalinos. O pH é de importância crucial, pois pode afetar a atividades dos microrganismos acidogênicos e metanogênicos, afetando diretamente a produção de biogás (JABEEN et al., 2015). O digestato ou efluente final da DA, pode ser utilizado como biofertilizante quando apresenta pH básico de aproximadamente 7,5. Desta forma pode atuar também como corretivo do pH do solo, além de não propagar mau cheiro e não ser poluente (BARROS, 2019). A partir dos resultados encontrados, pôde-se observar que o pH em ambos os tratamentos esteve dentro da faixa favorável aos microrganismos metanogênicos possibilitando assim, a estabilidade para o funcionamento do sistema anaeróbico. A faixa de do pH ideal para o processo de biodigestão anaeróbica ocorrer de forma eficiente é entre 6,0 e 8,0. (QUADROS et al., 2010; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

5.9 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para avaliar a eficácia do processo de digestão, analisou-se a performance dos respectivos reatores a partir das amostras de entrada (afluente) e saída (efluente), em relação as demandas químicas de oxigênio (DQO). Os resultados estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5-Dados médios das análises de DQO iniciais (afluente), finais (efluente) e suas respectivas taxas de remoção de matéria orgânica.

	Tratamentos		
	C	CF	CSF
DQO(mg/L) A	90446,65 ±0,01	87200,61±0,05	87101,35±0,07
DQO(mg/L) E	65290,04 ±0,03	22750,58±0,02	44548,25±0,04
REMOÇÃO%	27,81±0,07	73,91±0,04	48,85±0,06

A= Afluente; E = Efluente; C= Agua e Esterco; CF= Casca Fermentada; CSF= Casca Sem Fermentar.

Fonte: Autora

Nota-se pela referida tabela que o tratamento CF foi a condição que apresentou menor valor final de DQO (22750,58±0,02) e maior taxa de remoção de 73,91±0,04. Possível dizer que o pre- tratamento foi capaz de auxiliar no processo de redução da carga poluidora, auxiliando o processo de biodigestão. Essa etapa ajudou na redução da fração menos biodegradável

tornando-a mais acessível aos microrganismos, promovendo, portanto, a sua degradação graças a maior facilidade dos microrganismos em degradar e consumir o substrato.

Em relação aos resultados dos tratamentos C e CSF, observou-se diminuições gradativas na concentração do efluente e remoções de $27,81 \pm 0,07$ e $48,85 \pm 0,06$ %, respectivamente.

Alguns autores relatam que alta carga orgânica pode acarretar diversas consequências aos processos de bioconversão, desde resultados favoráveis como o alto rendimento de metano a desfavoráveis como a instabilidade do sistema ou até mesmo a falha do processo (D'AQUINO et al., 2019; DUAN et al., 2019; ZHANG et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a aplicação da fermentação em estado sólido como pré-tratamento biológico utilizando o fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004 em casca de mandioca foi eficiente pois, houve redução da cristalinidade, degradação da lignina e diminuição dos sólidos totais e voláteis indicando boa eficiência do processo de digestão anaeróbia na conversão da matéria orgânica em biogás. Isso promoveu uma produção de gás de forma mais rápida, em maior volume, e com maior concentração de metano nos tratamentos do que no controle. A digestão da casca de mandioca fermentada aos 31 dias, com adição de esterco bovino apresentou maior geração de biogás equivalente a 2579 ml e 75 % de metano em comparação aos outros ensaios avaliados.

A mistura da casca de mandioca fermentada com o dejetos bovino influenciou significativamente na concentração de matéria orgânica dos reatores na forma de DQO indicando que esses reatores tendem a diminuir a concentração de substrato inicial e com isso gerar diferentes performances de remoção da matéria orgânica.

Existe uma disponibilidade de matérias-primas sustentáveis muito grande, cujo potencial técnico para a produção de biogás e biometano é enorme e, ao mesmo tempo, inexplorado. O biogás produzido a partir de resíduo de casca de mandioca pode ser aplicado em diversas situações, dentre as quais podemos citar: lampiões, aquecimento de fogões, combustível para motores de combustão interna, geladeiras, chocadeiras, secadores de grãos ou secadores diversos, geração de energias elétrica, térmica e mecânica. A principal intenção é utilizar o biogás para substituir os gases de origem mineral, como o GLP (Gás Liquefeito de Petróleo), usado como gás de cozinha, GN (Gás Natural), usado em equipamentos domésticos e quando purificado, em GNV (Gás Natural Veicular).

REFERÊNCIAS

- ACHINAS, S.; ACHINAS, V.; EUVERINK, G.J.W. A Technological Overview of Biogas Production from Biowaste. **Engineering**, v.3, p.299-307, 2017.
- AIRES, A.; DA SILVA, F.M.; DE CASTRO, V. M. U; WENZEL, B. M. Avaliação do desempenho de um biodigestor canadense modificado no tratamento de dejetos de suínos. **ENGEVISTA**, v. 16, p.329-338, 2014.
- ALJAMMAS, H. A.; ALKHALAF, H.A.F.W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using soli-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, p. 213-216, 2018.
- ANDRADE-MAHECHA, M. M. Microcompósitos, nanocompósitos e coberturas a base de materiais biodegradáveis obtidos a partir do biri (*Canna indica* L.). 2012. Doutorado. (Doutora em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP., Campinas, SP.
- ANDRADE, W. R.; XAVIER, C. A.; COCA, F. O. C. G.; ARRUDA, L. D. O.; SANTOS, T. M. B. Biogas production from ruminant and monogastric animal manure co-digested with manipueira. **Revista Archivos de Zootecnia**, v.12, p. 375-380, 2016.
- ANJUM, M.; KUMAR, R.; AL-TALHI, H. A.; MOHAMED, S. A.; BARAKAT, M. A. Valorization of biogas production through disintegration of waste activated sludge using visible light ZnO-ZnS/Ag₂O-Ag₂S photocatalyst. **Process Safety and Environmental Protection**, v.119, p. 330-339, 2018.
- APHA, AWW, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th.** Edition. American Public Health Association, Washington, DC., 1995.
- APHA; AWWA; WEF. **American public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. Standard Methods for the examination of water and wastewater.** 21^a. Ed., Washington, D.C, USA, 2005.
- BAJPAI, P. **Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry**, Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, 2017.
- BARROS, T.D. **Biofertilizantes**. AGEITEC: Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. Biofertilizantes, 2019. Disponível em:<
<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1gh4ku02wyiv802hvm3jd85f37c.html>>. Acesso em: 18 de novembro de 2020.

BATISTA, R. D. **Produção e caracterização de invertase e frutossiltransferases de *Aspergillus carbonarius* para produção de alimentos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 91f,2018.

BENLIN, D.; IMING, J. X.; YULONG, E.; PENG, X.; XINFENG, W.; YUANFANG, D.; YIXIAN, W.; ZHIMING, Y. Acid inhibition during anaerobic digestion of biodegradable kitchen waste. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, 023118, 2015.

BOLDRIN, A.; BARAL, K.R.; FITAMO, T.; VAZIFEHKHORAN, A. H.; JENSEN, I.G.; KJAERGAARD, I.; LYNG, K-A.; NGUYEN, Q.V.; NIELSEN, L.S.; TRIOLO, J.M. **Optimised biogas production from the co-digestion of sugar beet with pig slurry: Integrating energy, GHG and economic accounting.** p. 606-617, 2016.

BÜCKA, A; CASCIATORIB, F.P.; THOMÉOB, J.C.; TSOTSASA, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. **Procedia Engineering**, v. 102, p.362 – 371, 2015.

CAMACHO, I. A. O.; CABELLO, C. Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para produção de bio-etanol. **Revista Energia na Agricultura**, v. 27, n. 1, p. 82-88, 2012.

CARVALHO, A. R.; FRAGOSO, R. J.; GOMINHO, J. E.; DUARTE, E. Effect of Minimizing d-Limonene Compound on Anaerobic Codigestion Feeding Mixtures to Improve Methane Yield. **Waste Biomass Valor**, [s.l], p. 1-9, 2017.

CASSINI, S. T.; COELHO, S. T.; PECORA, V. Biogas- Biogas- Biofuels ANP. In: Carlos Augusto G. Perlingeiro. (Org.). **Biofuels in Brazil - Fundamentals, Applications and perspectives.** **Synergia Editora**, v. 1, p. 136-167, 2014.

CAVINATO, C.; FATONE, F.; BOLZONEL L. A. ; PAVAN, P. Thermophilic anaerobic codigestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: comparison of pilot and full scale experiences. **Bioresource Technology**, v.101, p.545–550, 2010.

CHATURVEDI, V.; VERNA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **Biotechnol**, v. 3, p.415–31, 2013.

CHENG, J.; LIN, R.; DING, L.; SONG, W.; LI, Y.; ZHOU, J.; CEN, K. Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: Effect of pretreatment on structural characterization and fermentation performance. **Bioresource Technology**, v.179, p. 407-413, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB,2018. Produção de mandioca – raiz, farinha e fécula. Disponível em: http://www.bnb.gov.br/documents/80223/4049480/44_Mandioca.pdf/08b8f0c3-b88b-4d40-d5ec-4e2620bdcddde. Acesso em: 10 jan.2018.

COSTA, A. G.; PINHEIRO, F. G. C.; SANTOS, G. C. P. A. B.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, Cunha, n. 194, p. 36-51, 2014.

COSTA, J. A.V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter v.1, p.1–17, 2018.

CREMONEZ, P. A. **Digestão anaeróbia de um polímero á base de fécula de mandioca**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, 2019.

DAHIYA, S.; KUMAR, A. N.; SHANTHI SRAVAN, J.; CHATTERJEE, S.; SARKAR, O.; MOHAN, S. V. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. **Bioresource technology**, v. 248, p. 2-12, 2018.

D'AQUINO, C. A.; MELLO, T. C.; COSTA JÚNIOR, L. Efeito da variação da carga orgânica volumétrica natural na produção de biogás a partir de dejetos suíno em diferentes tempos de retenção hidráulica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24,p.613-617, 2019.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from Waste and Renewable Resources**. An Introduction. Wiley- VCH, 2008.

DINI, C.; DOPORTO, M. C.; VIÑA, S. Z. GARCIA, M. A. Cassava flour and starch as differentiated ingredients for gluten free products. **Nova Science Publishers**, p. 27, 2014.

DOLLHOFER, V.; PODMIRSEG, S. M.; CALLAGHAN, T. M.; GRIFFITH, G. W.; FLIEGEROVÁ, K. Anaerobic Fungi and Their Potential for Biogas Production. **Biogas Science and Technology**, v. 151, p. 41-61, 2015.

DUAN, N.; ZHANG, D.; LIN, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, L.; LIU, H.; LIU, Z. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of pig manure: methane production, mass flow, reactor scale and heating scenarios. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 646-652, 2019.

EKUNDAYO, J.A. **Biotransformation of cassava peel in the Niger Delta area of Nigeria using enhanced natural attenuation**. In J.E. Berry & D.R. Kristiansen (Eds.), *Fungal biotechnology*. London: Academic Press, p. 244-2701, 1980.

FORGACS, G.; MOHAMMAD POURBAFRANI, M.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEHA, M. J.; HOVATHA, I. S. A. Methane production from citrus wastes: process development and cost estimation. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n.250-255, 2012.

FREITAS, F. F.; SOUZA, S. S.; FERREIRA, L. R. A.; OTTO, R. B.; ALESSIO, F. J.; SOUZA, S. N. M.; VENTURINI, O. J.; ANDO JÚNIOR, O. H. The Brazilian market of distributed biogas generation: overview, technological development and case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 101, p. 146-157, 2019.

FRENCH, A.D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v.21, p.885–896, 2014.

GARCIA, G. I.; GÓMEZ, G.R.; PALÁCIOS, P. S.; VENTURA, J.; BOONE, D.; RUIZ, H. A.; AGUILAR, G.C. N. New features and properties of microbial cellulases required for bioconversion of agro-industrial wastes. **Enzymes in food biotechnology**, p.535-550, 2019.

Ge, X.; Matsumoto, T.; Keith, L.; Li, Y. Biogas energy production from tropical biomass wastes by anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 38-44, 2014.

GHOSH, P.; SHAH, G.; CHANDRA, R.; SAHOTA, S.; KUMAR, H.; VIJAY, V. K.; THAKUR, I. S. Assessment of methane emissions and energy recovery potential from the municipal solid waste landfills of Delhi, India. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 611-615, 2018.

GOMES, E.; SILVA, R.; PEREIRA, J.C.; LADINO-ORJUELA, G. Fungal Growth on Solid Substrates: A Physiological Overview. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 3, p. 31–56, 2018.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S. Environmental assessment of green hardboard production coupled with a laccase activated system. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, p. 445–453, 2011.

HEPP, F. **Avaliação da geração de biogás e biometano utilizando cama de bovinos de corte confinados e dejetos suínos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Engenharia Ambiental, do Centro Universitário Univates, em Engenharia Ambiental, 71 f,2016.

IEA, BIOENERGY TASK 37. GREEN GAS - **facilitando uma futura rede de gás verde através da produção de gás renovável**. Agência Internacional de Energia 978-1-910154-38-0, 2018.

INSAM, H.; FRANKE- WHITTLE, I.; GOBERNA, M. Microbes in Aerobic and Anaerobic Waste Treatment. in: H. Insam, I. Franke- Whittle, M. Goberna (Eds.), **Microbes at Work. From Waste to Resources**. Springer, p. 1- 34, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, 2020.Disponível em: <http://www.profigen.com.br/ler/1/355/306/fusarium>. Acesso em: 10 jan. 2021.

KALLIOINEN, A.; HAKOLA, M.; RIEKKOLA, T. REPO, T.; LESKELA, M.; VON WEYMARN, N.; SIIKA-AHO, M. A novel alkaline oxidation pretreatment for spruce, birch and sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v.140, p.414-420, 2013.

KAPOOR, R., GHOSH, P., KUMAR, M., SENGUPTA, S., GUPTA, A., KUMAR, S. S., PANT, D. Valorization of agricultural waste for biogas based circular economy in India: A Research Outlook. **Bioresource Technology**, v. 304 ;123036, 2020.

KARIMI, K., TAHERZADEH, M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresour. Technol**, v.200, p.1008–1018, 2016.

KARLSSON, T.; KONRAD, O.; LUMI, M.; SCHMEIER, N. P.; MARDER, M.; CASARIL, C. E.; KOCH, F. F.; Pedroso, A. G. Manual básico de biogás. 1ª ed. Lajeado: **UNIVATES**, 2014.

KARTHIKEYAN, P. O.; TRABLY, E.; MEHARIYA, S.; BERNET, N.; WONG, J.W.C.; CARRERE, H. 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 249, p.1025- 1039, 2018.

KUNZ, A.; OLIVEIRA, L.; PICCININ, L.S. **Manual de Análise do Biogás**. Florianópolis: Alfakit, 2007.

KENNY, K. L.; SMITH, W. A.; GRESHAM, G. L.; WESTOVER, T. L. Understanding biomass feedstock variability. **Biofuels**, v. 4, p. 111-127, 2013.

KONDUSAMY, D; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Oxford, v. 2, p.1821–1830, 2014.

KOTHARI, R., PANDEY, A., KUMAR, S., TYAGI, V., TYAGI, S. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 39, pp.174-195, 2014.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, v. 34, p. 491-500, 2014.

LEITÃO, R. C.; CLAUDINO, R. L.; ALEXANDRE, L.C.; CASSALES, A. R.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T. **Produção do biogás a partir do bagaço de caju**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

LEUNG, D. Y. C.; WANG, J. An overview on biogas generation from anaerobic digestion of food waste. **International Journal of Green Energy**, v.13, p.119–131, 2016.

MADADI, M.; ABBAS, A. Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review. **Journal of Plant Pathology e Microbiology**, v.08, p.1-6, 2017.

MALAKAR, B.; DAS, D.; MOHANTY, K. Optimization of glucose yield from potato and sweet lime peel waste through different pre-treatment techniques along with enzyme assisted hydrolysis towards liquid biofuel. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2723–2732, 2020.

MARTÍN, M. A.; SILES, J. A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. Biomethanization of orange peel waste. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 8993–8999, 2010.

MARTINEZ, G. D.; FEIDEN, A. Potencial do resíduo do processamento da mandioca para produção de etanol de segunda geração. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.6, p.141-148, 2017.

MATOS, F. C. **Produção de biogás e biofertilizante a partir de dejetos de bovinos, sob sistema orgânico e convencional de produção**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola e Ambiental). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 52 f, 2016.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals e biorefinery concept. **Progress in energy and combustion science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

Miller, G, L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry.V. 31, P. 426-428. 1959.

MIN, H.; KYU, S.; HYUB, J.; MOON, J. Bioresource Technology Microbial community structure in a thermophilic aerobic digester used as a sludge pretreatment process for the mesophilic anaerobic digestion and the enhancement of methane production. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 80–89, 2013.

MONLAU, F.; BARAKAT, A.; TRABLY, E.; DUMAS, C.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 260–322, 2013.

MORGAN, N. K.; CHOCT, M. Mandioca: Cassava: Nutrient composition and nutritive value in poultry diets. **Animal Nutrition**, v.2, p.253–261, 2016.

MOSHI, A. P.; CRESPO, C. F.; BADSHAH, M.; HOSEA, K. M. M.; MSHANDETE, A. M.; ELISANTE, E., MATTIASSON, B. Characterisation and evaluation of a novel feedstock, *Manihot glaziovii*, Muell. Arg, for production of bioenergy carriers: Bioethanol and biogas. **Bioresource Technology**, v.172, p. 58-67, 2014.

MOSHI, A. P.; TEMU, S. G.; NGES, I. A; MALMO, G.; HOSEA, K. M. M.; Elisante, E.; Mattiasson, B. Combined production of bioethanol and biogas from peels of wild cassava *Manihot glaziovii*. **Chemical Engineering Journal**, 279, 297–306, 2015.

MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; SHENG, K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 180, p. 661–671, 2016.

OECHSNER H.; JUNGBLUTT T.; KRANERT M.; KUSCH S. Editorial: progress in biogas-state of the art and future perspectives. **Engineering in Life Science**, v. 12, p. 239–40, 2012.

OLIVEIRA, M. V. C. **Caracterização molecular de clones de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**.82 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

PATINVOH, R.J.; OSADOLOR, O.A.; CHANDOLIAS, K.; SÁRVÁRI HORVÁTH, I.; TAHERZADEH, M.J. Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresour. Technol**, v.8, p.13-24, 2017.

PAUDEL, S.R.; BANJARA, S.P.; CHOI, O.K.; PARK, K.Y.; KIM, Y.M.; LEE, J.W.; Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: current state and challenges, **Bioresource Technology**, Essex, v. 245, p. 1194-1205, 2017.

PENG, J.; SONG, Y.; WANG, Y.; YUAN, P.; LIU, R. International Biodeterioration & Biodegradation Spatial succession and metabolic properties of functional microbial communities in an anaerobic baffled reactor. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 80, p. 60–65, 2013.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 21-31, 2016.

PRABHUDESSAI, V.; GANGULY, A.; MUTNURI, S. Biochemical Methane Potential of Agro Wastes. **Journal of Energy**, [s.l.], v. 7, p. 1-8, 2013.

QUADROS, D. G.; OLIVER, A. P. M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P. H. F.; FERREIRA, E, J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, p. 326-332, 2010.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

REIFSCHNERIDER, J. B.; NASS, L.L.; HENZ, G. P. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. 1ª Edição, versão 2, prefixo editorial 3, número ISBN:4-5-6-7-8, 2015.

RIBEIRO, D.S. **Obtenção de enzimas a partir da casca do maracujá amarelo (*passiflora edulis*)**. Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, na conclusão do curso de Química com Atribuições Tecnológicas, 51f, 2017.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 161p., 2010.

RODRIGUES, J. P.; ORRICO, A. C. A.; ORRICO JUNIOR, M. A. P.; SENO, L. O.; ARAÚJO, L. C.; SUNADA, N. S. Adição de óleo e lipase sobre a biodigestão anaeróbia de dejetos suínos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 44, p. 544-547, 2014.

RUIZ, B.; BENITO, A.; RIVERA, J.D.; FLOTATS, X. Assessment of different pre-treatment methods for the removal of limonene in citrus waste and their effect on methane potential and methane production rate. **Waste Management & Research**, [s.l.], v. 34, p. 1249-1257, 2016.

RUIZ, B.; FLOTATS, X. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. **Journal Biochemical Engineering**, [s.l.], v. 109, p. 9-18, 2016.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E. P.; WEILAND, P.; BORJA, R. The effect of biogas sparging on cow manure characteristics and its subsequent anaerobic biodegradation. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 83, p. 10-16, 2013.

SCHIRMER, W. N. **Avaliação da geração de gás sulfídrico no biogás gerado a partir de resíduos sólidos urbanos**. Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal - SP, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2015.

SEAB. Departamento de Economia Rural. **Análise da conjuntura agropecuária – Mandioca – Safra 2017-2018**.

SHRESTHA, S.; FONOLL, X.; KHANAL, S.K.; RASKIN, L. Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: Current status and future perspectives. **Bioresour. Technol**, v. 245, p.1245– 1257, 2017.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002 p.235, 2002.

SIVAMANI, S.; BASKAR, R. Optimization of bioethanol production from cassava peel using statistical experimental design. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.34, p.567–574, 2014.

SOUZA, A.S.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; MOTA, A.D.S.; PALMA, M.N.N.; FRANCO, M.O.; DUTRA, E.S.; SANTOS, C.C.R.; AGUIAR, A.C.R.; OLIVEIRA, C.R.; ROCHA, W.J.B. Valor nutricional de frações da parte aérea de quatro variedades de mandioca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.441-455, 2011.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International journal of Science and Nature**, v.3, p.480-486, 2012.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pre-treatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAPPIBAN, P.; SMITH, D.; TRIWITAYAKORN, K.; BAO, J. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 167-180, 2019.

TSCHOEKE, I.C.P.; SILVA, L.F.; SANTOS, A.F.M.S.; SOUZA, T.P.C. Análise da carga orgânica da manipueira em casas de farinha. **Revista Brasileira de agrotecnologia**, v. 7, p. 228 – 232, 2017.

VALENTI, F.; ZHONG, Y.; SUN, M.; PORTO, S. M. C.; TOSCANO, A.; DALE, B.E.; SIBILLA, F.; LIAO, W. Anaerobic co-digestion of multiple agricultural residues to enhance biogas production in southern Italy. **Waste Management**, [s. l.], v. 78, p. 151- 157, 2018.

Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for extraction fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

VASCO-CORREA, J.; KHANAL, S.; MANANDHAR, A.; SHAH, A. Anaerobic digestion for bioenergy production: global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. **Bioresource Technology**, v.247, p.1015–1026, 2018.

VILHALVA, D. A. A.; JÚNIOR SOARES, M. S.; MOURA, C. A.M.; CALIARI, M.; SOUZA, T. A. C.; SILVA, F. A. Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 514-521, 2011.

- WADHWA, M., BAKSHI, M.P.S. **Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products.** In: Makkar, H.P.S. (Ed.), Food and Agriculture Organization, Rome, 2013.
- WAGNER, A. O.; LACKNER, N.; MUTSCHLECHNER, M.; PREM, E. M.; MARKT, R.; ILLMER, P. Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production. **Energies**, v. 11, p. 1-14, 2018.
- WANAPAT, M.; KANG, S. Cassava chip (*Manihot esculenta* Crantz) as an energy source for ruminant feeding. **Animal Nutrition**, v.1, p.266–270, 2015.
- WANG, P.; WANG, H.; QIU, Y.; REN, L.; JIANG, B. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—a review. **Bioresource Technology**, v. 248, p.29–36, 2018.
- WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.85p.849–60, 2010.
- YAHMED, B. N.; CARRERE, H.; MARZOUKI, M. N.; SMAALI, I. Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. **Algal Research**, v.27, p.206–214, 2017.
- ZHANG, D.; DUAN, N.; TIAN, H.; LIN, C.; ZHANG, Y.; LIU, Z. Comparing two enhancing methods for improving kitchen waste anaerobic digestion: Bentonite addition and autoclaved de-oiling pretreatment. **Process safety and environmental protection**, v. 115, p.116-124, 2018.
- ZHANG, Q., HE, J., TIAN, M., MAO, Z., TANG, L., ZHANG, J., ZHANG, H. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. *Bioresource Technology*, 100(9): 8899-8906, 2011.
- ZAHAN, Z.; OTHMAN, M. Z.; MUSTER, T. H. Anaerobic digestion/co-digestion kinetic potentials of different agro-industrial wastes: a comparative batch study for C/N optimisation. **Waste Management**, [s. l.], v. 71, p. 663-674, 2018.
- ZHANG, A.; SHEN, J.; NI, Y. Anaerobic Digestion for Use in the Pulp and Paper Industry and Other Sectors: An Introductory Mini-Review. **Bioresource Resources**, v.10, p.8750-8769, 2015.

ZHANG, W.; LANG, Q.; WU, S.; LI, W.; BAH, H.; DONG, R. Anaerobic digestion characteristics of pig manures depending on various growth stages and initial substrate concentrations in a scaled pig farm in Southern China. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 63-69, 2014.

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, 2014.