



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria

Bruno Eduardo Lobo Baêta

Ouro Preto

2016



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



Bruno Eduardo Lobo Baêta

Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Orientador: Dr. Sérgio Francisco de Aquino

Co-orientador: Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto

2016

B328a Baêta, Bruno Eduardo Lobo.
Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria [manuscrito] / Bruno Eduardo Lobo Baêta. - 2016.
159f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Cana-de-açúcar - Derivados. 2. Resíduos como combustível. 3. Digestão anaeróbia. I. Aquino, Sérgio Francisco de. II. Gurgel, Leandro Vinícius Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 662.636




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB

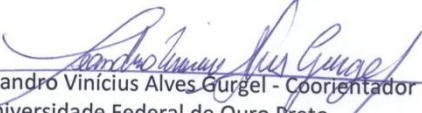


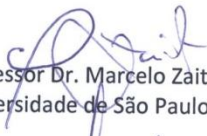
Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por autohidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

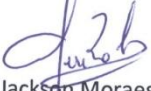
Autor: Bruno Eduardo Lobo Baêta


Tese defendida e aprovada, em 5 de setembro de 2016, pela banca examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto


Prof. Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel - Coorientador
Universidade Federal de Ouro Preto


Professor Dr. Marcelo Zait
Universidade de São Paulo


Dr. George Jackson Moraes Rocha
Laboratório de Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol


Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva
Universidade Federal de Ouro Preto


Professor Dr. Versiane Albis Leão
Universidade Federal de Ouro Preto

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de iniciar agradecendo infinitamente aos meus pais, Jorge e Cida, pelo empenho em proporcionar-me sempre a melhor educação. Por terem me mostrado que a única forma de vencer e conquistar os nossos sonhos e objetivos é através do trabalho e esforço.

A minha irmã Cyntia, por me ensinar o significado da palavra perseverança. Por ser sempre companheira e amiga, e por me amar incondicionalmente. Seu amor e carinho foram forças motrizes para construção deste momento.

A minha alma gêmea, Ananda, amiga, esposa, companheira, simplesmente a melhor pessoa que conheci em toda a minha vida. Não tenho palavras para descrever o quanto sua companhia foi fundamental para meu amadurecimento e conseqüentemente para realização deste sonho.

Ao meu sogro, Pedro, e minha sogra Regina, por me confiarem a joia mais preciosa, e por sempre me dar força para conquistar meus sonhos.

Ao meu irmão da vida, Diegão, por sempre me ajudar em todos os momentos. O convívio com você fez com que a conquista desta jornada fosse mais fácil.

Ao meu amigo e orientador Sérgio, por me passar todos os ensinamentos, você é um exemplo a ser seguido, eternamente serei grato por ter tido a honra de ser orientado por você.

Ao meu amigo e co-orientado Leandro, por sempre me escutar e me ajudar a resolver problemas, pela sua preocupação em aconselhar-me e por compartilhar suas experiências. Sua ajuda foi preciosa para esta conquista.

Aos amigos que tive oportunidade de conhecer durante esta jornada, em especial ao Adilson, Luíde, Bera, Tigrão, André Biroasca, Oscar, Marininha e Amanda.

Ao meu amigo e aluno de iniciação científica José Balena “*street dance*”, por sempre me ajudar nas atividades do laboratório, e claro, por me fazer rir com seus casos.

A todos os professores que passaram por minha vida, tanto aqueles do ensino básico e fundamental, como aqueles que tive a oportunidade de ter contato durante a graduação e pós-graduação. Em especial gostaria de agradecer aos amigos e professores Claudião e César, por terem me introduzido no mundo da pesquisa e ao Robson pela preocupação em aconselhar-me e compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas do Departamento de Química da UFOP

Aos colegas do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental

Ao Professor Fernando Fernandez Polanco e a todas as pessoas da Universidad de Valladolid, por me ajudarem no período em que fiquei longe do Brasil.

A todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Ao CNPq e FAPEMIG por terem financiado a realização deste trabalho

Lista de Abreviaturas

1G- Primeira geração
2G- Segunda geração
AH- Auto hidrólise
Arab- Arabinose
BC- Bagaço de cana-de-açúcar
Cel- Celobiose
COT- Carbono orgânico total
C_p- Capacidade calorífica
CSTR- Reator de Mistura Completa
DA- Digestão anaeróbia
DA-1S- Digestão anaeróbia em único estágio
DA-2S- Digestão anaeróbia em dois estágios
DA-L- Digestão anaeróbia em meio líquido
E(-)- Energia gasta
E(+)- Energia gerada
EA/%- Eficiência acidogênese
FF- furfuraldeído
Glic- Glicose
HAc- Ácido acético
HBut- Ácido butírico
HE- Hidrólise enzimática
HForm- Ácido fórmico
HH- Hidrolisado hemicelulósico
HIso- Ácido isobutírico
HIsobut- Ácido isobutírico
HMF- 5-hidroximetil-2furfuraldeído
HProp- Ácido propiônico
HVal- Ácido valérico
LAI- Lignina ácida insolúvel
LAS- Lignina ácida solúvel
LS- Lignina solúvel
PBH- Potencial bioquímico de hidrogênio
PBM-Potencial bioquímico de metano
PED- Planejamento Doehlert
R_{CH4}- Taxa máxima de produção de metano
R_{H2}- Taxa máxima de produção de hidrogênio
RSL- razão sólido líquido
T- Temperatura
t- tempo
T_{AH}- Temperatura auto hidrólise
VD- Variável dependente
Xil- Xilose
XOS- Xilo-oligômeros solúveis
Y_{HE}- Rendimento hidrólise enzimática
ΔE- Ganho líquido de energia
ΔH^o_{combust} - Entalpia de combustão
λ- Fase lag
ρ_{H2O}- Massa específica da água

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Comparação entre as cadeias de produção na biorrefinaria e refinaria de recursos fósseis.	25
Figura 4.2: Comparação entre biorrefinaria de 1ª e 2ª geração e refinaria de petróleo.	26
Figura 4.3: Diagrama de blocos de uma biorrefinaria lignocelulósica integrada.	29
Figura 4.4: Estrutura esquemática da biomassa lignocelulósica. Os hexágonos na lignina representam as subunidades: álcool p-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S).	32
Figura 4.5: Estrutura molecular da celulose.	33
Figura 4.6: Esquema da estrutura da celulose nas microfibrilas presentes na parede celular.	34
Figura 4.7: Estrutura de xilanas encontradas em plantas anuais.	36
Figura 4.8: Unidades básicas da lignina.	37
Figura 4.9: Estrutura da lignina presente em madeiras moles.	39
Figura 4.10: Esquema representativo para despolimerização das hemiceluloses em processos hidrotérmico	47
Figura 4.11: Resumo da sequência de processos na digestão anaeróbia a partir de resíduos lignocelulósicos:	59
Figura 4.12: Produção de hidrogênio por micro-organismos facultativos (A) e produção de hidrogênio por micro-organismos anaeróbios estritos (B).	69
Figura 6.1: Diagrama de Pareto para o pré-tratamento por AH do BC considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes razão sólido-líquido (RSL), temperatura (T) e tempo (t) nos tores de açúcares C5-C6 (Y1), furanos (Y2), lignina solúvel (Y3) e XOS (Y4) no hidrolisado.	92
Figura 6.2: Concentração de HAc no HH obtido durante o pré-tratamento por AH.	94
Figura 6.3: Imagens de MEV de amostras de BC pré-tratado por AH nas condições do PED 2 (A), 9(B) e 14(C), bem como do BC bruto (D).	98
Figura 6.4: Superfícies de resposta geradas a partir do modelo quadrático apresentando a relação da temperatura e tempo com a solubilização de açúcares C5-C6 (A), furanos (B) e LS (C) e XOS (D).	100
Figura 6.5: Cromatogramas de padrões de FF e HMF (A), amostras das lavagens contendo FF das condições 2(B) e 9(C), amostra de padrão contendo açúcares (D), amostras das lavagens contendo açúcares da condição 2 (E) e 9(F).	102
Figura 6.6: Potencial bioquímico de metano dos HH gerados após o pré-tratamento por AH do BC de acordo com as condições definidas pelo PED.	103
Figura 6.7: Gráficos de superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para conversão de matéria orgânica presentes nos HH em CH ₄ (kg de COT por Nm ⁻³ CH ₄).	104
Figura 6.8: Concentração acumulada de AGV (HAc = ácido acético; HBut = ácido butírico; HIsobut = ácido isobutírico; HIsoval = ácido isovalérico; HProp = ácido propiônico) após a DA dos HH gerados pelas condições de desejabilidade (DC1-DC4).	110
Figura 6.9: Dados preditos pelo modelo de Gompertz (linha preenchida) e dados obtidos experimentalmente (+) durante os testes de PBM.	111

Figura 7.1: Taxa máxima específica de produção de H ₂ , potencial bioquímico de H ₂ PBH, lignina solúvel e furanos	125
Figura 7.2: Relação entre a razão C5-C6/CTT , R _{SH2} e PBH para os HH.	126
Figura 7.3: Produção acumulada de H ₂ na etapa acidogênica para os HH DC1(a), DC2(b), DC3(c) e DC4(d)	128
Figura 7.4: Concentração de substratos e metabólitos na fase líquida no início e final dos ensaios acidogênicos.....	131
Figura 7.5: Produção acumulada de CH ₄ durante o estágio metanogênico do efluente acidogênico gerado a partir da acidogênese do HH gerado pela AH do BC nas condições DC1, DC2, DC 3 e DC4.	132
Figura 7.6: Estimativa energética para o HH gerado pela AH do BC tratado anaerobicamente em sistema de único (DA) e duplo estágio (DA-2S).....	136
Figura 7.7: Fluxograma do processamento do BC em conceito de biorrefinaria destacando o potencial energético envolvido.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Cultivo de diferentes matérias-primas no território Brasileiro.....	23
Tabela 4.2: Resumo das características de algumas biorrefinarias.	27
Tabela 4.3: Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (valores expressos em termos de massa seca - MS).	31
Tabela 4.4: Conteúdo de lignina em diferentes tipos de biomassa.....	37
Tabela 4.5: Composição da lignina em diferentes tipos de biomassa.	38
Tabela 4.6: Composição química (% m/m, base seca) bagaço de cana-de-açúcar oriundos do Brasil reportados na literatura.....	41
Tabela 4.8: Breve revisão da literatura sobre o uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise para biomassa lignocelulósica (continuação).	53
Tabela 4.11: Estudos envolvendo a produção de CH ₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (início).....	63
Tabela 4.11: Estudos envolvendo a produção de CH ₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (continuação).....	64
Tabela 4.11: Estudos envolvendo a produção de CH ₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (continuação).....	65
Tabela 4.11: Estudos envolvendo a produção de CH ₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (final).....	66
Tabela 4.9: Estudos envolvendo o uso de resíduos lignocelulósicos para produção de H ₂ a partir de fermentação (início)	72
Tabela 4.10: Estudos envolvendo o uso de resíduos lignocelulósicos para produção de H ₂ a partir de fermentação (final)	73
Tabela 6.1: Níveis de cada parâmetro considerado durante o planejamento experimental Doehlert e as condições experimentais para otimizar a AH do BC e a composição da química do HH após o pré-tratamento.....	86
Tabela 6.2: Coeficientes de regressão para variáveis dependentes consideradas no planejamento Doehlert.....	86
Tabela 6.3: Condições do pré-tratamento por AH e composição do HH gerado pelas condições de desejabilidade.....	88
Tabela 6.4: Composição dos BCs pré-tratados, perda de massa (%) e rendimento de solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após as condições de AH geradas pelo PED e desejabilidade.....	91
Tabela 6.5: Caracterização da composição do HH no início dos PBM para as condições DC1, DC2, DC3 e DC4.....	107
Tabela 7.1: Características do HH antes do início da etapa acidogênica e valores de desempenho do processo.	124
Tabela 7.2: Comparação dos parâmetros da atividade metanogênica realizada com HH obtido pela AH do BC em em único estágio e em duplo estágio.	133

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo otimizar a partir de um planejamento experimental as variáveis operacionais temperatura (T), tempo (t) e razão sólido-líquido (RSL) para a auto-hidrólise (AH) do bagaço de cana-de-açúcar (BC), visando produzir um hidrolisado hemicelulósico (HH) com características propícias para digestão anaeróbia (DA) e produção bioquímica de metano (PBM). Os resultados indicaram que os HH gerados em condições severas de AH com maior solubilização de hemiceluloses e com maiores teores de açúcares, C5-C6, não foram os mais adequados para produção de metano. Provavelmente isto tenha ocorrido pelo acúmulo de compostos tóxicos e/ou recalcitrantes (furanos e fragmentos de lignina). Condições mais moderadas (170°C , 35 min e $RSL = 0,33 \text{ g BC.mL H}_2\text{O}^{-1}$) geraram um HH com maior PBM ($0,79 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4. \text{ kg COT}^{-1}$), o que foi confirmado pela ferramenta estatística de desejabilidade. O HH obtido a partir da condição DC2 gerada pelo modelo de desejabilidade ($178,2^{\circ}\text{C}$, 43,6 min e $RSL = 0,24 \text{ g BC .ml H}_2\text{O}^{-1}$) apresentou as menores concentrações de compostos tóxicos, o que culminou com menor acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) e maiores PBM ($1,56 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4. \text{ g COT}^{-1}$) durante a DA. O modelo de Gompertz foi usado para ajustar os dados de produção de CH_4 durante a DA. O melhor HH apresentou uma taxa máxima de produção de metano (R_{CH_4}) de $2,6 \text{ mmol CH}_4.\text{d}^{-1}$. Além disso, a digestão anaeróbia foi realizada em dois estágios (acidogênico-metanogênico, DA-2S), em reatores descontínuos, no qual o estágio acidogênico atuou como uma fase prévia de hidrólise e biodetoxificação. Isto permitiu a utilização de condições mais severas de pré-tratamento do BC por AH, $T = 178,6^{\circ}\text{C}$ e $t = 55 \text{ min}$ (DC3) e $T = 182,9^{\circ}\text{C}$ e $t = 40,71 \text{ min}$ (DC4), que, resultaram em maior extração de hemiceluloses do BC (DC3 = 77,40% e DC4 = 73,90%), o que conseqüentemente melhorou o balanço energético líquido do processo proposto gerando uma energia livre de $3,15 \text{ MJ.kg BC}^{-1}$ a partir da combustão do biogás gerado na digestão anaeróbia em dois estágios do hidrolisado hemicelulósico.

Palavras-chave: bagaço de cana de açúcar; pré-tratamento por auto hidrólise; digestão anaeróbia em dois estágios; metano; hidrogênio; hidrolisado de hemicelulose, biorrefinaria

ABSTRACT

This study aimed to optimize through design of experiments, the process variables (temperature – T , time – t and solid-to-liquid ratio – SLR) for sugarcane bagasse (Himmelsbach *et al.*) autohydrolysis (AH) to obtain hemicellulose hydrolyzates (HH) prone to anaerobic digestion (AD) and biochemical methane production (BMP). The results indicated that severe AH conditions, which lead to maximum hemicelluloses dissolution and sugar content in the HH, were not the best for BMP, probably due to the accumulation of toxic/recalcitrant compounds (furans and lignin). Mild AH conditions (170°C, 35min and $SLR=0.33$) led to the highest BMP (0.79 Nm³.kgTOC⁻¹), which was confirmed by the desirability tool. HH produced by AH carried out at the desired condition DC2 (178.6°C, 43.6 min and $SLR=0.24$) showed the lowest accumulation of inhibitory compounds and volatile fatty acids (VFA) and highest BMP (1.56 Nm³.kgTOC⁻¹). The modified Gompertz model best fit the experimental data and led to a maximum methane production rate (R) of 2.6 mmol CH₄.d⁻¹ in the best condition. In additional, the anaerobic digestion was carried out in a two-stage (acidogenic-methanogenic) batch system where the acidogenic phase worked as a hydrolysis and biodetoxification step. This allowed the utilization of more severe AH pretreatment conditions, i.e. $T = 178.6^{\circ}\text{C}$ and $t = 55$ min (DC3) and $T = 182.9^{\circ}\text{C}$ and $t = 40.71$ min (DC4). Such severe conditions resulted in higher extraction of hemicelluloses from SB (DC1 = 68.07%, DC2 = 48.99%, DC3 = 77.40% and DC4 = 73.90%), which consequently improved the net energy balance of the proposed process generating a net energy of 3.15 MJ.kg BC⁻¹ from anaerobic digestion in two-stage of hemicellulose hydrolysate.

Keywords: Sugarcane bagasse; autohydrolysis pretreatment; two-stage anaerobic digestion; methane; hydrogen; hemicellulose hydrolyzate, biorefinary.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	Organização da Tese.....	19
3	Hipóteses e Objetivos	21
3.1	Hipóteses.....	21
3.2	Objetivos.....	22
3.2.1	Objetivo geral	22
3.2.2	Objetivos específicos	22
4	REVISÃO DA LITERATURA	23
4.1	Resíduos Agroflorestais.....	23
4.1.1	Geração e perspectivas do uso de resíduos agroflorestais no Brasil	23
4.2	Biorrefinaria.....	24
4.2.1	Conceitos e tecnologias	24
4.3	Biomassa lignocelulósica	30
4.3.1	Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	31
4.3.2	Bagaço de cana-de-açúcar (BC)	39
4.4	Técnicas de pré-tratamento aplicadas aos resíduos lignocelulósicos visando o uso em bioprocessos.....	41
4.4.1	Auto-hidrólise como técnica de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas. .	45
4.4.2	Detoxificação do hidrolisado hemicelulósico para uso em bioprocessos.....	55
4.5	Produção de biogás a partir de biomassa lignocelulósica	57
4.5.1	Produção de CH ₄ a partir de biomassa lignocelulósica	58
4.5.2	Produção de H ₂ a partir de biomassas lignocelulósicas.....	67
4.5.3	Uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise da biomassa lignocelulósica com vistas à produção de biogás (CH ₄ e H ₂).....	74
5	Material e métodos.....	76
5.1	Preparo do bagaço de cana-de-açúcar.....	76
5.2	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	76
5.2.1	Determinação do teor de umidade	76
5.2.2	Determinação do teor de extrativos	77
5.2.3	Determinação do teor de inorgânicos	77
5.2.4	Determinação do teor de lignina.....	78
5.2.5	Determinação dos teores de celulose e hemiceluloses	79
5.2.6	Balço de massa.....	80
5.3	Ensaio de auto-hidrólise	80
5.4	Químicos	81
5.5	Caracterização do hidrolisado hemicelulósico.....	82
6	OTIMIZAÇÃO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO EM UM CONCEITO DE BIORREFINARIA	83
6.1	Resumo	83
6.2	Introdução	84

6.3	Material e Métodos	85
6.3.1	Planejamento experimental e análise estatística	85
6.3.2	Ensaio de lavagem do BC pré-tratado para remoção de açúcares residuais	88
6.3.3	Biodegradabilidade Anaeróbia	89
6.3.4	Modelagem dos dados experimentais	89
6.4	Resultados e Discussão	90
6.4.1	Caracterização do bagaço de cana	90
6.4.2	Auto-hidrólise do bagaço de cana	91
6.4.3	Efeito da lavagem na remoção de açúcares residuais presentes na fração sólida residual ao pré-tratamento	100
6.5	Testes de biodegradabilidade anaeróbia	102
6.6	Ferramenta de desejabilidade e ensaios de PBM	105
6.7	Conclusões	112
7	<i>AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS (da-2S) DO hh GERADO PELA ah DO bc.</i>	113
7.1	Resumo	113
7.2	Introdução	114
7.3	Material e Métodos	116
7.3.1	Biodegradabilidade acidogênica do hidrolisado de hemiceluloses	116
7.3.2	Avaliação do potencial bioquímico do metano	117
7.3.3	Modelagem dos dados experimentais	118
7.3.4	Ensaio de hidrólise enzimática	119
7.3.5	Estimativa energética	120
7.4	Resultados e Discussão	121
7.4.1	Avaliação da biodegradabilidade acidogênica do hidrolisado hemicelulósico (HH)	121
7.4.2	Avaliação da biodegradabilidade metanogênica do efluente acidogênico	132
7.4.3	Avaliação da eficiência energética da DA-2S para o HH obtido pela AH do BC.	135
7.4.4	Conclusão	138
8	<i>Conclusões Gerais do trabalho</i>	139
9	<i>Perspectivas de Pesquisas futuras</i>	141
10	<i>Referências</i>	142

1 INTRODUÇÃO

Em todo mundo, grande parte da energia utilizada é proveniente de recursos fósseis. Sabe-se que estes recursos são ditos não renováveis e que a quantidade dos mesmos na crosta terrestre é uma incógnita. As reservas mundiais de petróleo necessitam de uma boa gestão para garantirem sua longevidade. Além disso, os riscos geopolíticos provenientes da dependência do petróleo por países politicamente instáveis e os maiores compromissos estabelecidos com o meio ambiente, fizeram com que nos últimos anos uma maior atenção fosse destinada às fontes alternativas de energia. De fato, a utilização de fontes renováveis para produção de energia, seja ela por meio da conversão térmica ou da produção de biocombustíveis (etanol ou biogás) tem sido fortemente incentivada em todo o mundo (Dias *et al.*, 2011).

O combustível de fonte renovável mais comum produzido mundialmente é o etanol, o qual é usualmente obtido do milho, beterraba e cana-de-açúcar (sacarose). Nos últimos anos o etanol vem se tornando um combustível renovável emergente eficiente e economicamente viável. O mesmo pode ainda ser adicionado aos combustíveis fósseis como é o caso da gasolina ou até mesmo utilizado para substituí-la, uma vez que fornece mais potência, embora sua geração de energia por galão (~3,78 L) seja 33 % menor (Rostagno *et al.*, 2015).

Neste contexto, o Brasil vem ocupando um lugar de destaque juntamente com os Estados Unidos da América (EUA) no que diz respeito à produção de bioetanol, sendo o Brasil responsável por grande parte da produção a partir do suco da cana-de-açúcar e o EUA do amido de milho. Essas biomassas são consideradas ideais para produção do etanol, uma vez que os sucos gerados a partir das mesmas apresentam elevados teores de carboidratos que são facilmente convertidos a etanol por meio da fermentação. Segundo Corrêa Da Silva *et al.* (2016) o Brasil atualmente é responsável por 25% da produção mundial de etanol ficando atrás somente dos EUA.

Apesar dos benefícios ambientais provocados pelo uso dos combustíveis renováveis, existe uma grande controvérsia e discussão sobre a utilização dos alimentos como matéria prima para produção desses combustíveis. Ademais, muito se fala sobre a destinação de grandes áreas territoriais para o cultivo de biomassas visando à produção de combustíveis renováveis. Tais preocupações devem-se ao acelerado crescimento populacional e a elevada demanda por alimentos. Posto isto, torna-se extremamente importantes as alternativas que

possa garantir a geração de matérias primas baratas e abundantes, com características ideais para serem utilizadas na produção dos combustíveis renováveis (Gupta e Verma, 2015).

Uma alternativa para esquivar-se do impasse “alimento vs combustível” é a utilização dos resíduos lignocelulósicos como matéria prima. A produção de biocombustíveis líquidos ou gasosos e bioprodutos de valor agregado a partir das biomassas lignocelulósicas residuais têm aspecto ambientalmente favorável (Sanchez e Cardona, 2008). Além do mais, as biomassas lignocelulósicas são muitas vezes ricas em carboidratos presentes na forma de celulose e hemiceluloses. Por biomassa lignocelulósica entende-se toda a matéria de origem vegetal oriunda de floresta nativa ou plantada (ex.: galhos de árvores) e das culturas agrícolas e seus resíduos (ex.: bagaço de cana-de-açúcar (BCA), cascas de arroz, milho ou café) (Diniz, 2008).

Anualmente são acumuladas grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos no planeta em decorrência da produção agrícola ou agroflorestal. Muitas vezes a destinação dada a esses materiais é pouco nobre e representa uma perda do potencial de produção energético, além de gerarem um passivo ambiental. Neste contexto, o Brasil assume uma posição destacada ao considerar o volume da produção agrícola e agroflorestal do país e a consequente geração de resíduos lignocelulósicos. Essas biomassas residuais estão disponíveis em uma forma razoavelmente limpa e em grandes quantidades (Bragatto, 2010).

Segundo dados publicados pela Organização Mundial do Comércio (OMC 2015), o Brasil é o terceiro maior exportador agrícola. A quantidade de resíduos lignocelulósicos oriundos desse setor no país é conseqüentemente elevada. Portanto, faz-se necessário à realização de estudos que visem potencializar a produção sustentável de energia a partir do uso desses resíduos. Desta forma, a produção de etanol oriunda de outros resíduos lignocelulósicos tais como, palha de trigo, casca de arroz e resíduos gerados no processo de beneficiamento de grãos, pode ser uma alternativa interessante para o aumento da produção mundial de etanol (Bensah e Mensah, 2013). Além desses resíduos, o BC gerado durante a produção do etanol de primeira geração (1G) tem sido bastante explorado para produção de etanol celulósico, inclusive em escala industrial.

No entanto, a estrutura química da biomassa lignocelulósica formada majoritariamente por um complexo polimérico natural constituído de celulose, hemiceluloses e lignina, impede a conversão direta desse material a combustível. A utilização dos resíduos lignocelulósicos com elevados rendimentos em processos de fermentação depende da disponibilidade de acesso dos açúcares aos micro-organismos. Para

melhorar a biodigestibilidade da biomassa lignocelulósica, a celulose e as hemiceluloses devem ser convertidas aos seus respectivos monômeros (açúcares) para que então os microorganismos possam utilizá-los para produção de biocombustíveis ou bioprodutos de valor agregado (Kumar *et al.*, 2009).

Diante disso, o uso de técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica passa a ser uma etapa crucial para o sucesso da implantação da produção de biocombustíveis e bioprodutos a partir dos resíduos lignocelulósicos em escala industrial. Alguns autores como Lavarack *et al.* (2002) afirmam que a escolha do pré-tratamento depende do tipo e composição da biomassa e da finalidade de uso da mesma. Bragatto (2010) afirma ainda que, o uso de técnicas de planejamento experimental (fatorial) nas etapas de pré-tratamento de resíduos pode ajudar na escolha do melhor processo para aperfeiçoar a liberação de carboidratos, favorecendo os processos fermentativos de produção de etanol, biogás ou a recuperação de bioprodutos.

Dentre as técnicas de pré-tratamento disponíveis, destacam-se os processos físico-químicos que utilizam ácidos minerais (concentrados ou diluídos) combinados ou não com temperaturas elevadas e os processos hidrotérmicos conhecidos também como auto-hidrólise (AH). Este será objeto de estudo no presente trabalho e consiste, normalmente, no aquecimento (150°C a 220°C) da biomassa em meio aquoso por (5 min a 60 min). Em temperaturas superiores a 160°C parte da biomassa lignocelulósica, primeiramente hemiceluloses e posteriormente pequena parte da celulose e lignina, são solubilizadas (Garrote *et al.*, 1999). Durante a AH, parte das hemiceluloses é hidrolisada formando especificamente ácido acético, e o mesmo é responsável por catalisar a reação de hidrólise das hemiceluloses (Zhu *et al.*, 2005).

A AH como técnica de pré-tratamento vem sendo amplamente estudada quando o objetivo é a produção de etanol a partir de diferentes resíduos lignocelulósicos (Hongdan *et al.*, 2013). Vários estudos demonstram as vantagens do pré-tratamento por AH no aumento da acessibilidade da celulose por parte das enzimas celulolíticas e o consequente aumento da conversão enzimática da celulose a glicose (Laser, Schulman, *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2010; Da Cruz *et al.*, 2012). No entanto, os resultados da literatura mostram que para se atingir maiores conversões enzimáticas da fração sólida residual ao pré-tratamento, rica em celulose, condições de pré-tratamento mais severas são exigidas (Yu *et al.*, 2013). No entanto, tais condições, além de gerarem um hidrolisado rico em açúcares C5 (arabinose e xilose) e C6 (glicose), provocam a formação de compostos oriundos da sua degradação

térmica tais quais, 5-hidroxi metil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF), além de fragmentos de lignina. Ambos os compostos são considerados tóxicos aos micro-organismos fermentativos responsáveis pela conversão de açúcares a biocombustíveis.

Alguns autores como Gurgel *et al.* (2014) destacam como principais vantagens da técnica de pré-tratamento por AH a não necessidade de insumos químicos na etapa de pré-tratamento e a facilidade de implementação em plantas industriais, uma vez que não é necessária a construção de reatores com materiais especiais resistentes à corrosão. Todavia, alguns autores como Hendriks e Zeeman (2009), apontam como desvantagem deste pré-tratamento a elevada demanda de energia. Uma forma de compensar a energia gasta durante esta etapa de pré-tratamento, é avaliar a possibilidade de recuperação de energia a partir do hidrolisado hemicelulósico (HH) rico em açúcares C5 gerado na AH.

Uma alternativa para recuperação de energia a partir do HH seria a produção de biogases, metano e/ou hidrogênio, a partir da sua digestão anaeróbia (DA). A energia gerada pela combustão dos biogases pode ser suficiente para compensar energeticamente a utilização de tal pré-tratamento, viabilizando o balanço de energia sustentável da biorrefinaria integrada. No entanto, a presença de compostos tóxicos no hidrolisado pode dificultar tal aplicação. Posto isto, estudos que visam otimizar as variáveis operacionais do processo de AH para maximizar a solubilização de hemiceluloses garantindo a menor geração de compostos tóxicos se fazem necessários. Além disso, o desenvolvimento de novas alternativas de detoxificação do hidrolisado, são essenciais para maximizar a produção de biogás e garantir a sustentabilidade do processo.

Diante do exposto, o presente trabalho utilizou ferramentas estatísticas de otimização multivariada para avaliar a condição de pré-tratamento por AH visando a produção de HH com características ideais para ser utilizado na DA. Além disso, avaliou-se a viabilidade do uso da DA em dois estágios (acidogênico-metanogênico) como técnica de biodetoxificação do HH, visando maximizar a produção de metano e, de forma paralela, utilizar o hidrogênio gerado na etapa acidogênica como um combustível complementar, permitindo maior recuperação de energia a partir do HH. Ademais, um balanço de energia, bem como uma estimativa da capacidade de produção de etanol a partir da fração sólida residual gerada na AH foi avaliada considerando o contexto da biorrefinaria.

O conhecimento gerado neste estudo permitirá avaliar a viabilidade da aplicação do pré-tratamento por AH como única etapa de pré-tratamento a anteceder a hidrólise

enzimática, de forma a aproveitar a energia contida no HH pela sua DA visando a produção de CH₄ e/ou H₂.

2 ORGANIZAÇÃO DA TESE

O capítulo 1 apresentou a introdução do trabalho e o capítulo 3 será direcionado a apresentação das hipóteses que fundamentarão esta tese de doutorado, bem como, os objetivos a serem alcançados. O capítulo 4 destina-se a apresentar a revisão da literatura, em que serão brevemente abordados os aspectos fundamentais acerca do conceito de biorrefinaria, características das biomassas lignocelulósicas, com destaque para o bagaço de cana-de-açúcar. O objetivo deste tópico é facilitar o entendimento integrado das características necessárias para que a biomassa lignocelulósica seja utilizada como matéria-prima sustentável em uma biorrefinaria. Além disso, um tópico abordando aspectos técnicos sobre a produção de biocombustível (etanol de 1ª e 2ª geração, metano e hidrogênio) a partir de biomassa lignocelulósica será apresentado nessa revisão. Nesta etapa, o principal objetivo é caracterizar os aspectos intervenientes na produção de biocombustível a partir dos resíduos lignocelulósicos. Um tópico será destinado a apresentar as principais técnicas de pré-tratamento utilizadas para as biomassas lignocelulósicas, bem como os principais parâmetros de processo, dando destaque ao pré-tratamento por auto-hidrólise. Além disso, uma breve apresentação do processo de digestão anaeróbia será feita, focando no uso de resíduos lignocelulósicos como substrato. Ao final, uma análise crítica da literatura apontando as justificativas para realização do presente estudo será apresentada.

O capítulo 5 apresentará a metodologia básica para o desenvolvimento do trabalho. Neste serão apresentadas somente as metodologias gerais para o andamento da pesquisa, os procedimentos específicos inerentes a cada etapa e os detalhes associados aos mesmos serão expostos nos respectivos capítulos de resultados.

O capítulo 6 “Otimização da auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de metano a partir do hidrolisado hemicelulósico em um conceito de biorrefinaria”, apresenta contribuições para o entendimento das variáveis importantes a serem otimizadas em um processo de pré-tratamento por auto-hidrólise do BC, quando o objetivo é a produção de metano a partir da digestão anaeróbia do hidrolisado obtido. Além disso, o presente capítulo busca entender quais são as características necessárias do hidrolisado para maximizar a produção de metano, e quais são as influências decorrentes da presença de compostos inibidores ou recalcitrantes (FF, HMF e lignina solúvel) na atividade dos micro-organismos metanogênicos. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na revista *Bioresource Technology* (doi:10.1016/j.biortech.2015.10.003): Baêta, B.E.L., Lima, D.R.S., Adarme, O.F.H., Gurgel, L.V.A., and Aquino, S.F. 2016.

Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production. *Bioresource Technology*, 200, 137-146.

O capítulo 7 “Avaliação da produção de hidrogênio e metano a partir hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por processo de digestão anaeróbia em dois estágios”, apresenta contribuições que mostram a viabilidade da separação espacial da etapa acidogênica da metanogênica em um processo de digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico. Em tal capítulo é possível observar o papel da etapa acidogênica na biodetoxificação do HH e a consequente melhoria dos parâmetros cinéticos da etapa metanogênica, o que culmina com a melhor recuperação de energia a partir da combustão do H₂ e CH₄ gerados pela digestão anaeróbia do HH em dois estágios. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na revista *Bioresource Technology* (doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.113): Baêta, B.E.L., Lima, D.R.S., Filho, J.G.B., Adarme, O.F.H., Gurgel, L.V.A., and Aquino, S.F. 2016. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 218, 436-446.

O capítulo 8 apresenta uma conclusão geral sobre a possibilidade do uso do pré-tratamento por AH do BC, considerando a recuperação de energia a partir dos biogases gerados pela digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico considerando a proposta de implementação da biorrefinaria da cana-de-açúcar.

Por fim, o capítulo 9 destina-se a apresentar as perspectivas de pesquisas futuras e o capítulo 10 apresenta as referências que subsidiaram a elaboração desta tese.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

Esta tese de doutoramento se fundamenta nas seguintes hipóteses:

- 1) A digestão anaeróbia do HH obtido pela AH do BC, pode ser uma alternativa interessante para tratar um dos efluentes líquidos gerados durante a produção do etanol de segunda geração. Além disso, esse processo possibilita o melhor aproveitamento energético desse resíduo líquido, uma vez que o biogás produzido durante a DA pode ser contabilizado no balanço energético do processo;
- 2) A condição para maximizar a produção de metano a partir do HH obtido pelo pré-tratamento por AH do BC não necessariamente será aquela que resultará em maiores teores de açúcares C5-C6 no hidrolisado. Tendo em vista a toxicidade do HH, devido à presença de furanos e fragmentos de lignina, a otimização da produção de metano a partir da DA do HH depende da determinação de uma razão ideal de açúcares e compostos tóxicos (C5-C6)/(furanos +lignina solúvel) presentes no hidrolisado. Para tanto, condições de temperaturas mais brandas e razões sólido-líquido maiores são preferidas quando o objetivo é maximizar a produção de metano na DA em um único estágio a partir do HH;
- 3) Em função da toxicidade do hidrolisado hemicelulósico gerado pela AH do BC, a separação espacial do processo de DA em etapa acidogênica e metanogênica pode melhorar a recuperação de energia a partir do HH, tendo em vista que a etapa acidogênica pode atuar como uma etapa de biodetoxificação, uma vez que os microrganismos acidogênicos são de rápido crescimento e mais resilientes que os metanogênicos. Com isso a viabilidade da utilização do pré-tratamento por AH em condições mais severas pode ser alcançada;
- 4) A inclusão da DA em dois estágios como processo para utilização sustentável do HH na cadeia produtiva do etanol de segunda geração pode ser uma alternativa usada para melhorar o balanço energético implantação da etapa de pré-tratamento por AH do BC.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial de produção de biogás (hidrogênio e metano) a partir da DA do hidrolisado hemicelulósico gerado durante o pré-tratamento por AH do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2.2 Objetivos específicos

- (1) Verificar o efeito dos parâmetros de processo na característica do HH gerado durante o pré-tratamento por AH do BC;
- (2) Avaliar a influência da composição do HH no desempenho da DA em único e duplo estágio e determinar os principais parâmetros cinéticos associados à produção de metano e hidrogênio;
- (3) Avaliar a viabilidade energética do processo proposto por meio de uma estimativa do balanço energético.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Resíduos Agroflorestais

4.1.1 Geração e perspectivas do uso de resíduos agroflorestais no Brasil

Os materiais orgânicos são os principais resíduos sólidos gerados em todo mundo, dentre os quais se destacam aqueles oriundos de residências, indústrias e do setor agroflorestal (Ruggeri e Tommasi, 2012). Sendo o Brasil o terceiro maior exportador agrícola, a quantidade de resíduos oriundos do setor agrícola no país é conseqüentemente elevada. Até o presente momento os resíduos gerados por este setor da economia são considerados um problema ambiental.

No entanto, já se sabe da potencialidade do uso destes resíduos como matéria-prima renovável para processos capazes de realizar as suas conversões em biocombustíveis, energia e produtos químicos de elevado valor agregado. A exploração destes resíduos para a produção de metano, hidrogênio, bioetanol e bioprodutos é promissora, uma vez que esses produtos podem ser gerados a partir da conversão microbiana dos carboidratos contidos na forma de celulose e hemiceluloses. A Tabela 4.1 apresenta o cultivo em território Brasileiro de algumas culturas com potencial de utilização como matéria-prima.

Tabela 4.1: Cultivo de diferentes matérias-primas no território Brasileiro.

Biomassa	Área Plantada (1000 hectares)	Produção de biomassa (1000 t)
Trigo	2166,2	5788,6
Arroz	2427,1	11600,3
Sorgo	785,1	2204,9
Mandioca	1787,5	24524,3
Soja	25042,2	66383
Mamona	129,6	25,8
Milho	7596,3	38861,8
Cana-de-açúcar	8527,8	602178,8
Cevada	88,4	305,1
Café		30000

Fonte: Adaptado (Canilha *et al.*, 2012).

A Tabela 4.1 destaca a produção da cana-de-açúcar no país, mostrando que a mesma é uma das biomassas produzidas em maior quantidade. Atualmente a maior parte da produção

de cana-de-açúcar é destinada para o setor sucroalcooleiro. A importância desta biomassa é evidente e pode ser confirmada pelo último relatório de safra publicado pela Conab (2016), o qual aponta uma previsão de crescimento de até 3,8% na safra 2016/2017. Esse crescimento se deve ao fato do plantio da cana-de-açúcar estar se difundindo para outros estados além de SP, principalmente Goiás e Minas Gerais. A CONAB, no seu relatório de estimativa do acompanhamento da safra brasileira para o biênio 2016/2017 estima que a produção de cana-de-açúcar no Brasil seja de aproximadamente 650 milhões de toneladas. Desta quantidade, aproximadamente 400 milhões de toneladas são destinadas para produção de etanol.

Tipicamente, no processamento da cana-de-açúcar, grandes quantidades de bagaço são produzidas, aproximadamente 240 kg de BC com 50 % de umidade por tonelada de cana-de-açúcar (Dias *et al.*, 2009). Atualmente, grande parte deste bagaço é queimada em caldeiras nas indústrias sucro-alcooleiras para obtenção de vapor utilizado *in loco*. Com isto a possibilidade da utilização do BC para produção de etanol celulósico é comprometida. Diante disto, com intuito de melhor aproveitar o potencial energético dessa biomassa, os centros de pesquisas vêm investindo intensamente na criação de processos que visam produzir biocombustíveis, como álcool de 2ª geração, ou até mesmo gases de maior valor agregado como, CH₄ e H₂. Esses compostos possuem como vantagens poderem ser facilmente estocados, terem um bom valor de mercado, pois muitas vezes são usados com insumos químicos em outros processos como, reforma a vapor, caso do CH₄, e células a combustível para o H₂. É neste objetivo que este trabalho pretende focar a sua atenção.

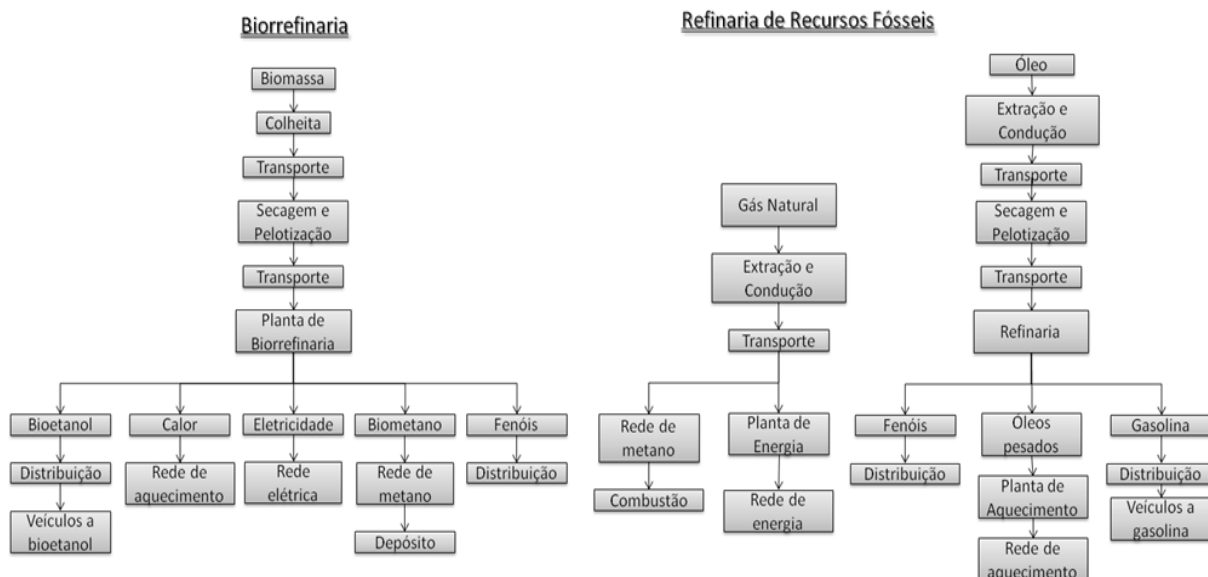
4.2 Biorrefinaria

4.2.1 Conceitos e tecnologias

Segundo alguns autores como Diep *et al.* (2014), biorrefinarias são instalações que de forma sustentável convertem biomassa em energia, produtos químicos e materiais. A principal força motriz para o crescimento das biorrefinarias é a grande atenção dada mundialmente às questões relacionadas ao desenvolvimento sustentável, e a garantia de segurança energética. Além disso, situações relacionadas à mitigação das mudanças climáticas e à demanda crescente de produtos químicos e de materiais, também impulsionam o interesse pelas biorrefinarias. Avaliando de forma genérica é possível dizer que a biorrefinaria é semelhante à refinaria de petróleo, exceto que utiliza biomassa ao invés de petróleo bruto para produzir combustíveis, calor, energia, produtos químicos e materiais. A Figura 4.1 compara de modo

simplificado as cadeias de produção de uma biorrefinaria com uma refinaria que utiliza recursos fósseis.

Figura 4.1: Comparação entre as cadeias de produção na biorrefinaria e refinaria de recursos fósseis. Fonte: adaptado (Cherubini e Jungmeier, 2009).



A classificação de biorrefinaria pode ser feita baseando-se no tipo de matéria-prima (biomassa), tipo de tecnologia e status da tecnologia (1ª ou 2ª geração). Atualmente, biorrefinarias de 1ª geração produzem seus produtos químicos de base a partir dos açúcares disponíveis de componentes de plantas que contêm amido e sacarose. No entanto, a matéria-prima açúcar (sacarose) e/ou amido serve de base para produção de alimentos. Além disso, em geral esses correspondem a somente cerca de 1% da biomassa vegetal disponível (Kamm e Kamm, 2004). Em contraste, a maior parte das biomassas vegetais é constituída de materiais lignocelulósicos que não são facilmente acessíveis pelos bioprocessos de 1ª geração.

Segundo alguns autores como Diep *et. al* (2014), as biorrefinarias de 1ª geração parecem criar algum ceticismo para os pesquisadores, pois, existem preocupações relacionadas aos impactos causados no meio ambiente e no balanço de carbono. De certa forma, isto fixa limites na crescente produção de biocombustíveis de 1ª geração. A principal desvantagem da produção de combustíveis de 1ª geração é o debate sobre o tema alimento *versus* combustível. Há quem diga que o aumento no preço dos alimentos esteja relacionado à produção de biocombustíveis de 1ª geração (Naik *et al.*, 2010), sendo tal debate mais acirrado em países que dispõe de pequena área agricultável.

Devido às desvantagens apresentadas pela biorrefinaria de 1ª geração e as vantagens apresentadas na de 2ª geração (Figura 4.2), a utilização de uma biomassa mais disponível, na qual seja possível a utilização de todas as partes da biomassa (planta, folha, cascas e frutos) parece mais razoável quando se pensa em desenvolvimento sustentável.

Figura 4.2: Comparação entre biorrefinaria de 1ª e 2ª geração e refinaria de petróleo. Fonte: Adaptado (Naik *et al.*, 2010).



Muitas indústrias existentes se enquadram na categoria de biorrefinarias convencionais: indústria do açúcar, indústria do amido, indústria de óleos vegetais, indústria de rações, indústria de alimentos, indústria de papel e celulose e indústria de biocombustíveis convencionais (biodiesel e bioetanol). No entanto, todas as indústrias citadas, normalmente se concentram em produzir um produto principal, e ainda não dedicam esforços para produzir uma ampla gama de produtos que agregam valores de forma integrada.

Tais tipos de biorrefinaria não atendem a definição de um novo conceito de biorrefinaria. De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos EUA, uma biorrefinaria moderna é um complexo fabril que integra processos de conversão de

biomassa e equipamentos para produzir combustíveis, energia e vários insumos químicos. A Tabela 4.2 mostra de forma simplificada algumas características, tipos de matérias-primas, tecnologias predominantes e fases de desenvolvimento, de diferentes tipos de biorrefinarias.

Tabela 4.2: Resumo das características de algumas biorrefinarias.

Conceito	Tipo de matéria-prima	Tecnologias predominantes	Fase de desenvolvimento
Biorrefinaria Verde “ <i>Green biorefineries</i> ” (GBR)	Biomassa úmida: gramíneas e culturas verdes	Pré-tratamento, prensagem, fracionamento e digestão	Planta Piloto/Pesquisa e desenvolvimento
Biorrefinarias de culturas inteiras “ <i>Whole crop biorefineries</i> ” (WCBR)	Toda cultura: incluindo palha e cereais como: centeio; trigo e milho.	Moagem seca ou úmida, conversão bioquímica.	Planta piloto/Pesquisa e desenvolvimento
Biorrefinarias de matérias-primas lignocelulósicas “ <i>Lignocellulosic feedstock biorefineries</i> ” (LCFBR)	Biomassa rica em lignocelulósica: palha, bagaço de cana-de-açúcar, talo de milho e madeira.	Pré-tratamento químico e/ou térmico, hidrólise enzimática, fermentação e separação.	Planta piloto/Pesquisa e desenvolvimento
Biorrefinarias de duas plataformas “ <i>Two platform concept biorefineries</i> ” (TPCBR)	Todos os tipos de biomassa	Combinação de plataforma para geração de açúcar (conversão bioquímica) e plataforma de gás de síntese (conversão termoquímica)	Planta Piloto/Pesquisa e desenvolvimento
Biorrefinarias termoquímicas “ <i>Thermo chemical biorefineries</i> ” (TCBR)	Todos os tipos de biomassa	Conversão termoquímica: torrefação, pirólise, gaseificação, separação de produtos e sínteses catalíticas.	Planta Piloto/Pesquisa e desenvolvimento
Biorrefinaria Marinha “ <i>Marine biorefineries</i> ” (MBR)	Biomassa aquática: macroalgas e microalgas	Rompimento celular, extração de produtos e separação de produtos.	Pesquisa e Desenvolvimento

Fonte: Adaptado (Diep *et al.*, 2014).

O presente trabalho pretende dedicar maior atenção a biorrefinaria lignocelulósica de segunda geração, considerando como matéria-prima o bagaço de cana-de-açúcar residual ao processo de produção de etanol de 1ª geração a partir do suco da cana-de-açúcar. Além desse resíduo, a biorrefinaria lignocelulósica pode utilizar como matéria-prima os resíduos gerados

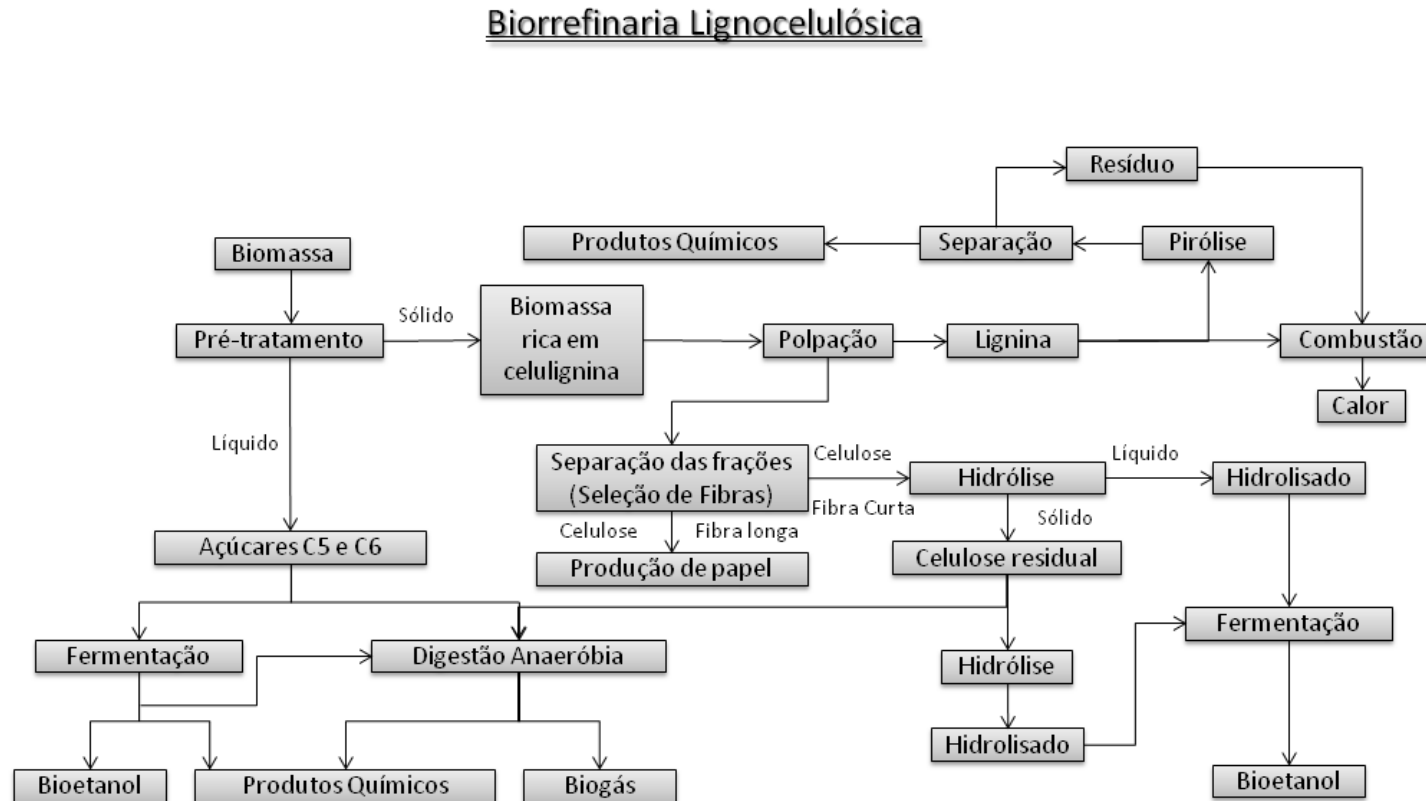
na indústria da madeira, no setor agrícola e municipal. Essas matérias-primas são ótimas em termos de custos e de flexibilidade.

Segundo Kamm et al. (2006), o sistema de biorrefinaria lignocelulósica é provavelmente o mais avançado em termos de desenvolvimento de tecnologias, e possivelmente isto esteja atrelado a necessidade de utilização dessas matérias-primas renováveis.

A biorrefinaria lignocelulósica caminha para a progressão de uma usina de produção de biocombustível líquido de 2ª geração para um sistema mais avançado, que integra a produção de uma ampla gama de coprodutos. Em uma planta de biocombustível lignocelulósico de 2ª geração, grande parte das hexoses é convertida a etanol para maximizar a produção de biocombustível. Em contraste, em uma biorrefinaria lignocelulósica moderna todos os açúcares na forma de pentoses e hexoses são separados e individualmente convertidos em produtos que agregam valor ao processo. Alguns autores como Cherubini e Jungmeier (2009) consideram, por exemplo, a produção de biogás a partir do hidrolisado hemicelulósico (contendo majoritariamente pentoses) gerado após o pré-tratamento, como uma alternativa que deve ser inserida dentro do contexto da biorrefinaria lignocelulósica. Um esquema de uma biorrefinaria lignocelulósica moderna e integrada é mostrado na Figura 4.3.

Para que a biorrefinaria funcione de forma satisfatória é necessário à realização de algumas etapas. Como o intuito deste trabalho é apresentar a possibilidade da produção de bioenergia a partir da digestão anaeróbia do HH gerado a partir do processamento da biomassa, uma atenção maior será dada as principais etapas que constituem a cadeia produtiva em uma biorrefinaria lignocelulósica.

Figura 4.3: Diagrama de blocos de uma biorrefinaria lignocelulósica integrada. Fonte: Adaptado (Cherubini e Jungmeier, 2009), (Kamm e Kamm, 2004; Kumar *et al.*, 2008) e (Carvalho *et al.*, 2008)



Segundo alguns autores como Streffer (2014), em uma biorrefinaria para produção de bioenergia e bioprodutos, os micro-organismos utilizam açúcares oriundos da celulose e hemiceluloses. No entanto, a complexidade desses polímeros na biomassa dificulta seu uso de forma direta. Sendo assim, grandes esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de processos que permitam a recuperação dos açúcares contidos nestes polímeros de forma economicamente viável. Atualmente algumas etapas são aplicadas em uma biorrefinaria para conseguir acessibilidade aos açúcares oriundos da celulose e hemiceluloses, de modo a facilitar o seu uso pelos micro-organismos (Taherzadeh e Karimi, 2008). As etapas a seguir são consideradas básicas em uma biorrefinaria lignocelulósica que visa o aproveitamento dos açúcares e da lignina (Streffer, 2014):

Etapa 1: Extração de produtos primários obtidos da matéria-prima lignocelulósica.

Etapa 2: Fracionamento da biomassa lignocelulósica em seus componentes principais (hemiceluloses, lignina e celulose).

Etapa 3: Hidrólise das hemiceluloses e celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis (xilose, arabinose e glicose).

Etapa 4: Conversão de glicose em biocombustíveis (etanol, butanol e biogás) e bioprodutos (ácido succínico, ácido láctico, ácido levulínico) usando fermentação, digestão anaeróbia ou reações químicas clássicas.

Etapa 5: Conversão da xilose e arabinose em biocombustíveis (etanol e biogás) e bioprodutos (ácido butírico, ácido propiônico e furfural) usando fermentação, digestão anaeróbia ou reações químicas convencionais.

Etapa 6: Conversão da lignina em produtos químicos através de pirólise, ou sua queima juntamente com outros resíduos gerados no processo, visando a obtenção de energia para manter o funcionamento da biorrefinaria e gerar excedentes para possível venda no mercado de energia.

Esta tese propõe a avaliar processos que se enquadram nas etapas 2, 3, 4 e 5.

4.3 Biomassa lignocelulósica

Como já discutido, as biomassas lignocelulósicas apresentam grande potencial para serem utilizadas como matéria-prima em biorrefinarias. As mesmas são consideradas rica fonte de carboidratos, atrativas economicamente e que podem ser obtidas a partir de diferentes

fontes. Para explorar com maior detalhe o uso das biomassas lignocelulósicas como matéria-prima nas biorrefinarias, é importante uma melhor compreensão acerca da estrutura química das mesmas.

4.3.1 Estrutura da biomassa lignocelulósica

A maior parte da biomassa disponível em todo planeta consiste de material lignocelulósico. Os materiais lignocelulósicos são constituídos majoritariamente de celulose, lignina e hemiceluloses, juntamente com uma pequena quantidade de outros materiais como proteínas, extrativos, minerais e metabólitos secundários. Para a escolha do melhor tipo de biomassa lignocelulósica utilizada como matéria-prima nas biorrefinarias, além do conhecimento acerca da composição da biomassa, outros critérios como a taxa de crescimento da cultura e a aptidão para o crescimento em diferentes regiões geográficas faz-se necessário (Rubin, 2008).

O tipo de crescimento da biomassa influencia a composição estrutural da mesma. A quantidade de celulose, lignina e hemiceluloses pode variar em função do tipo de biomassa. Alguns autores como Yi Zheng (2009) afirmam que a biomassa lignocelulósica contém de 50% a 80% em base seca de carboidratos, que são polímeros formados por unidades de açúcares C5 e C6. A composição dos seus constituintes majoritários celulose, hemiceluloses e lignina podem variar de 40 a 50%, 25 a 35% e 10 a 35%, respectivamente (Yang e Wyman, 2008). A Tabela 4.3 mostra a composição de alguns resíduos lignocelulósicos utilizados como matéria-prima em biorrefinarias.

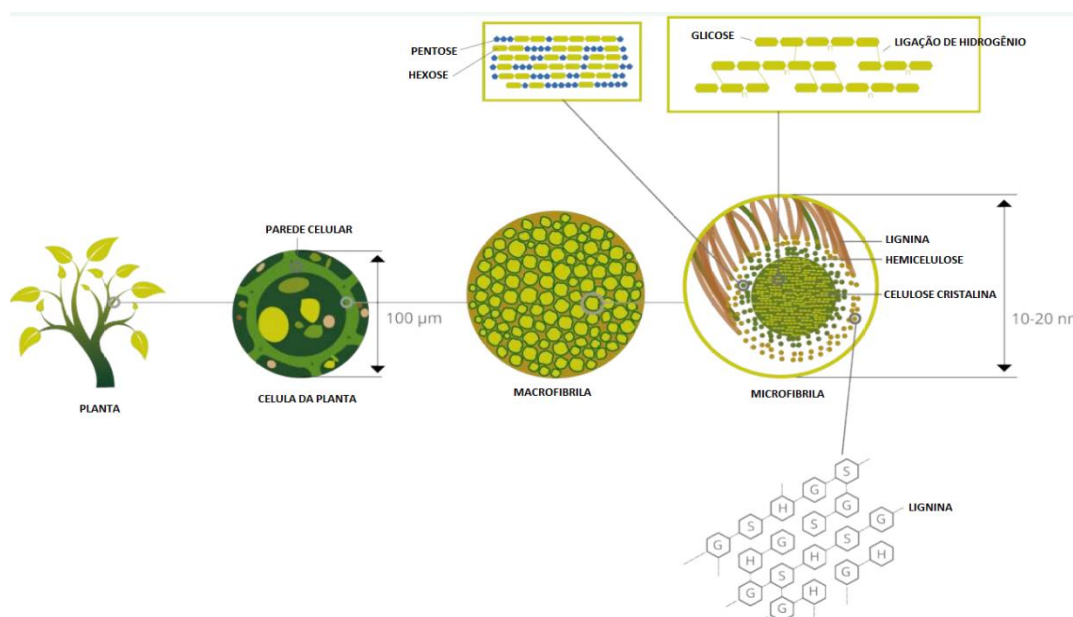
Tabela 4.3: Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (valores expressos em termos de massa seca - MS).

Componentes (%MS)	Material lignocelulósico			
	Bagaço de cana	Resíduo de Milho	Palha de Trigo	Eucalipto
Celulose	39,01	37,69	32,64	48,07
Xilanas	22,05	21,61	19,22	10,42
Arabinanas	2,06	2,42	2,35	0,30
Mananas	0,35	0,38	0,31	1,23
Galactanas	0,46	0,87	0,75	0,74
Lignina	23,09	18,59	16,85	26,91
Ácidos Urônicos	2,16	2,99	2,24	4,07
Cinzas	3,66	10,06	10,22	1,22
Extrativos	3,78	5,61	12,95	4,15

Fonte: (Bragatto, 2010).

A Figura 4.4 apresenta de forma simplificada a estrutura de uma biomassa lignocelulósica, em que é possível visualizar a estrutura de uma célula vegetal, a parede celular, as microfibrilas e macrofibrilas, bem como seus principais componentes: celulose, hemiceluloses (polioses) e lignina.

Figura 4.4: Estrutura esquemática da biomassa lignocelulósica. Os hexágonos na lignina representam as subunidades: álcool *p*-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). Fonte: Adaptado (Streffer, 2014).



Nos vegetais, de forma geral a celulose é o componente mais abundante das paredes celulares seguido pelas hemiceluloses, o segundo constituinte mais abundante da biomassa lignocelulósica e que é responsável por unir as fibras celulósicas em microfibrilas e as interligarem com a lignina, criando uma rede complexa de ligações que provê força estrutural ao vegetal (Wyk, 2001). A lignina pode ser considerada como a “cola” celular, responsável por promover ao tecido das plantas e as fibras individuais força compressiva, e a parede celular resistência contra a deformação. Além disso, é responsável por unir as diferentes células vegetais e fornecer resistência a planta contra insetos e micro-organismos (Rubin, 2008).

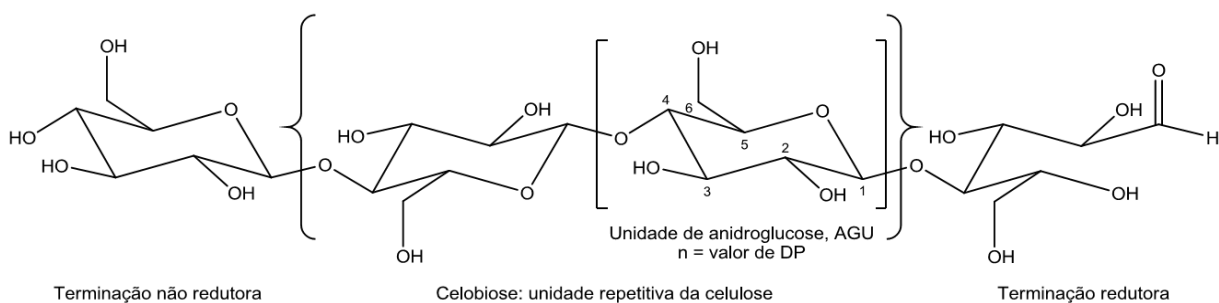
Dada à importância do entendimento aprofundado acerca das unidades principais que fazem parte da composição da biomassa lignocelulósica, especial atenção será dada na compreensão dos constituintes celulose, hemiceluloses e lignina.

4.3.1.1 Celulose

A celulose é a base estrutural das células das plantas e é o polímero orgânico mais abundante no planeta Terra, representando cerca de 1×10^{12} toneladas da produção anual de biomassa, e é considerada uma fonte de matéria-prima quase que inesgotável frente ao aumento da demanda por produtos renováveis e ambientalmente corretos (Klemm *et al.*, 2005).

Pensando na complexidade da estrutura, segundo alguns autores a celulose não pode ser considerada a mais complexa (Klemm *et al.*, 1998). Porém, este polímero apresenta influência bastante notável nas reações envolvendo os resíduos lignocelulósicos. A celulose é um homopolímero linear composto por unidades de β -D-anidroglicopiranosose (AGU) ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Considerando o dímero celobiose como unidade básica de repetição, a celulose pode ser considerada como um polímero de celobiose. Na estrutura da celulose, dois monômeros de glicose adjacentes são ligados pela eliminação de uma molécula de água e esta ligação dá origem a celobiose. Uma cadeia de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose. A Figura 4.5 mostra de modo simplificado a estrutura molecular da celulose, com as unidades básicas de celobiose.

Figura 4.5: Estrutura molecular da celulose. Fonte (Klemm *et al.*, 1998).

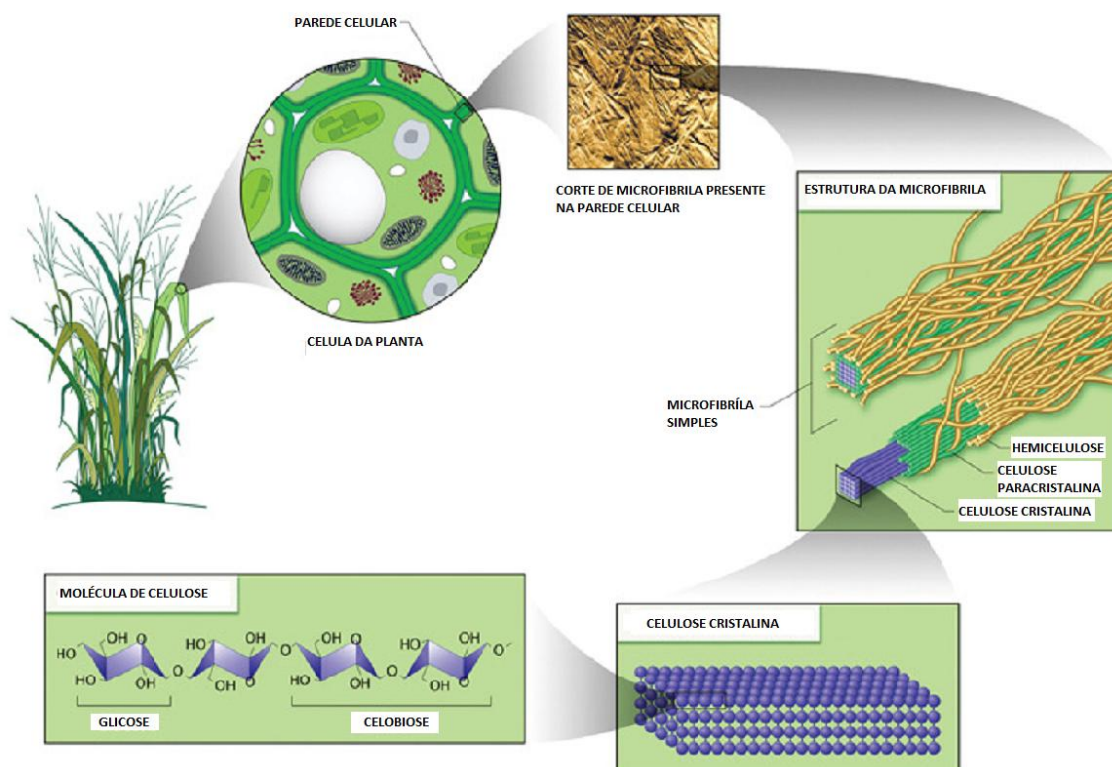


Cada unidade de β -D-anidroglicopiranosose possui grupos hidroxilas posicionados nos carbonos 2 (C-2), 3 (C-3) e 6 (C-6), capazes de realizarem reações específicas para álcoois primários e secundários. Os grupos hidroxilas localizados nas posições vicinais da estrutura representam uma estrutura típica de glicol. Os grupos hidroxilas presentes nos finais das cadeias de celulose exibem comportamentos distintos. O carbono C-1 anomérico tem propriedades redutoras, enquanto o grupo hidroxila em C-4 livre é dito não redutor. As hidroxilas encontram-se envolvidas em interações do tipo intra- e intermoleculares (Klemm *et al.*, 1998).

A unidade de β -D-anidroglicose nas cadeias de celulose assumem uma conformação em cadeira do tipo 4C_1 . Nessa conformação, os grupos de hidroxila livres estão posicionados no plano do anel, ou seja, em posição equatorial, enquanto os átomos de hidrogênio estão posicionados em posição perpendicular, dita axial (Klemm *et al.*, 1998).

Nos vegetais em geral, a celulose é encontrada basicamente nas paredes primárias e secundárias, sendo que a parede primária contém de 10 a 40% e a secundária de 40 a 60% de desse constituinte (Klemm *et al.*, 2005). Na célula vegetal, a celulose é produzida na forma de microfibrilas de celulose semicristalinas agrupadas em cadeias lineares. Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promove o suporte e resistência à parede celular (Emons, 2008). A Figura 4.6 apresenta um esquema ilustrativo que mostra a celulose na forma de microfibrila presente na parede celular.

Figura 4.6: Esquema da estrutura da celulose nas microfibrilas presentes na parede celular. Fonte: (Smith, 2007).



Na estrutura microfibrilar da celulose existem diferentes graus de ordenação, regiões cristalinas muito ordenadas e regiões de menor ordenação. As regiões de elevada

crystalinidade são pouco acessíveis por solventes e reagentes. Em contrapartida, as regiões relativamente desordenadas são mais acessíveis e apresentam maior reatividade química.

A celulose em decorrência da sua estrutura não pode ser facilmente hidrolisada, e para que seja possível a hidrólise, é necessária a ação de meios ácidos, ou até mesmo o uso de enzimas específicas. A celulose, quando sofre hidrólise, produz exclusivamente os monômeros de glicose, que podem ser inseridos na biorrefinaria para produção de etanol por meio da sua fermentação na presença de leveduras, ou produção de outros compostos químicos como: etileno, propeno, buteno, propileno, ácidos acrílicos, poliéster dentre outros (Schuchardt *et al.*, 2001). Sendo assim, a molécula de celulose tem enorme valor comercial para diferentes setores industriais.

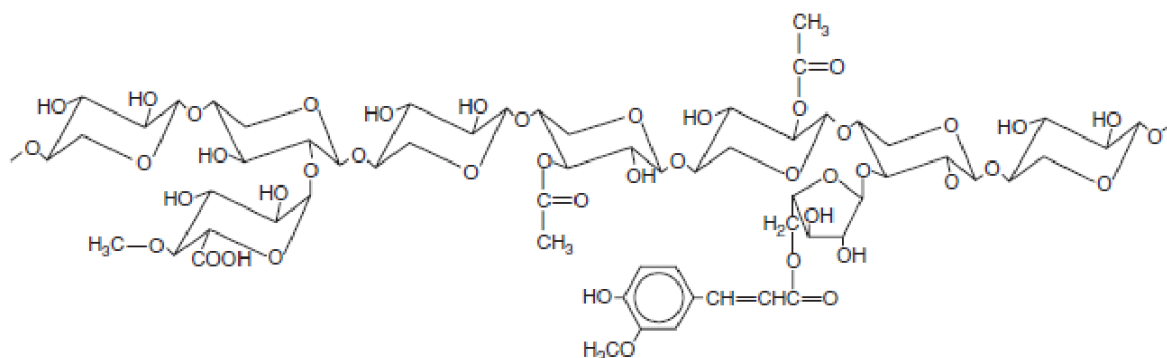
4.3.1.2 Hemiceluloses

Como pode ser visto na Figura 4.6, as hemiceluloses estão associadas às microfibrilas de celulose por ligações de hidrogênio, e são responsáveis por promoverem a união das microfibrilas de celulosas adjacentes. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose, porém com muitas ramificações. As hemiceluloses constituem cerca de 20 a 30% do total de massa seca dos tecidos de xilema e têm uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares, dependendo do tipo de planta. Tais açúcares são classificados como xilanas, unidades de β -1,4- D-xilose ligadas, mananas, unidades de β -1,4-D-manose ligadas; arabinanas, unidades α -1,5-L-arabinose ligadas e galactanas, unidades de β -1,3-D-galactose ligadas (Spiridon e Popa, 2008).

De acordo com alguns autores como Spiridon e Popa (2008), a xilana é um dos maiores constituintes dos materiais lignocelulósicos representando cerca de 30%. A sua estrutura possui um esqueleto linear que consiste de resíduos de β -1,4-D-xilanopiranoose ligados. Tais resíduos podem ser substituídos com ramificações contendo os grupos acetila, arabinosila e glicoronosila, dependendo do tipo de biomassa.

Em culturas anuais como a cana-de-açúcar as principais hemiceluloses são representadas por xilanas, mais heterogêneas do que as encontradas em tecidos de madeira. A Figura 4.7 apresenta a estrutura de xilanas encontradas em culturas anuais.

Figura 4.7: Estrutura de xilanas encontradas em plantas anuais.



Em decorrência das características estruturais, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade a reações do que a celulose. Tal fato deve-se ao maior caráter amorfo daquele quando comparado a este. O caráter amorfo das hemiceluloses garante maior acessibilidade dos reagentes, facilitando principalmente reações de hidrólise, como é o caso das reações que ocorrem durante o pré-tratamento por AH (Ebringerova, 2000).

4.3.1.3 Lignina

Em termos de quantidade a lignina é a segunda macromolécula mais abundante da Terra, ficando atrás somente da celulose. A lignina apresenta um papel primordial na estrutura dos vegetais lignocelulósicos, pois é responsável por garantir suporte mecânico às plantas, característica essa que ajudou na adaptação das plantas superiores. A lignina é um componente característico da lamela média e dos tecidos especializados vasculares, responsáveis pelo transporte de fluido. No entanto, sabe-se que a maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média, que nada mais é do que a intersecção entre duas células. A deposição dos monômeros de lignina na parede celular vai depender da espécie vegetal, tipo de célula, estágio de desenvolvimento do tecido e condições de crescimento (Jiménez e Rodriguez, 2010). O teor de lignina varia normalmente de 15 a 35% e, em alguns casos pode ultrapassar os 40% (Kamm e Kamm, 2004). A Tabela 4.4 apresenta o teor de lignina em algumas biomassas.

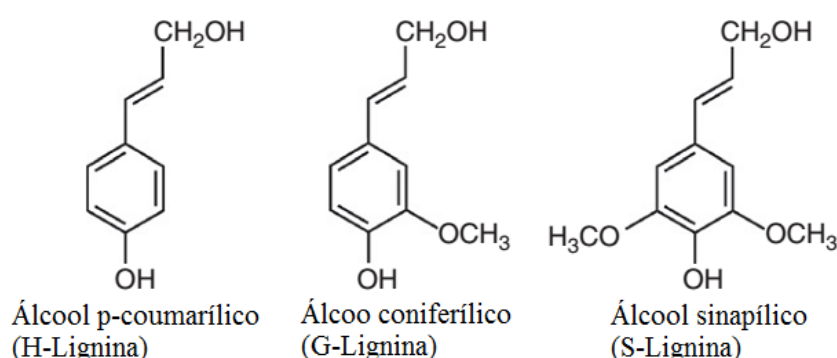
Tabela 4.4: Conteúdo de lignina em diferentes tipos de biomassa.

Biomassa	Conteúdo de Lignina (%)
Bambu	20-24
Bagaço de cana-de-açúcar	18-20
Palha de cereais	6-24
Palha de trigo	16-18
Palha de aveia	17-20
Palha de milho	10-17
Palha de centeio	18-20
Palha de arroz	10-12

Fonte: Adaptado de (Windeisen e Wegener, 2012).

O crescimento da macromolécula de lignina na planta envolve um complicado sistema bioquímico e químico que tem sido extensivamente estudado. Vários autores consideram a lignina como um material polifenólico de estrutura amorfa, que é formado por meio de uma reação de polimerização desidrogenativa dos álcoois, *p*-cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S), dando origem as unidades de fenilpropano (C6C3) (Windeisen e Wegener, 2012). A estrutura básica da lignina é classificada de acordo com dois componentes: uma parte é aromática e a outra é a cadeia C3 (alifática). A Figura 4.8 apresenta as unidades básicas da lignina.

Figura 4.8: Unidades básicas da lignina. Fonte: Adaptado (Windeisen e Wegener, 2012)



A composição das unidades básicas da lignina varia muito dependendo do tipo da espécie vegetal. A Tabela 4.5 apresenta de forma resumida os valores percentuais das unidades básicas da lignina em diferentes tipos de biomassa.

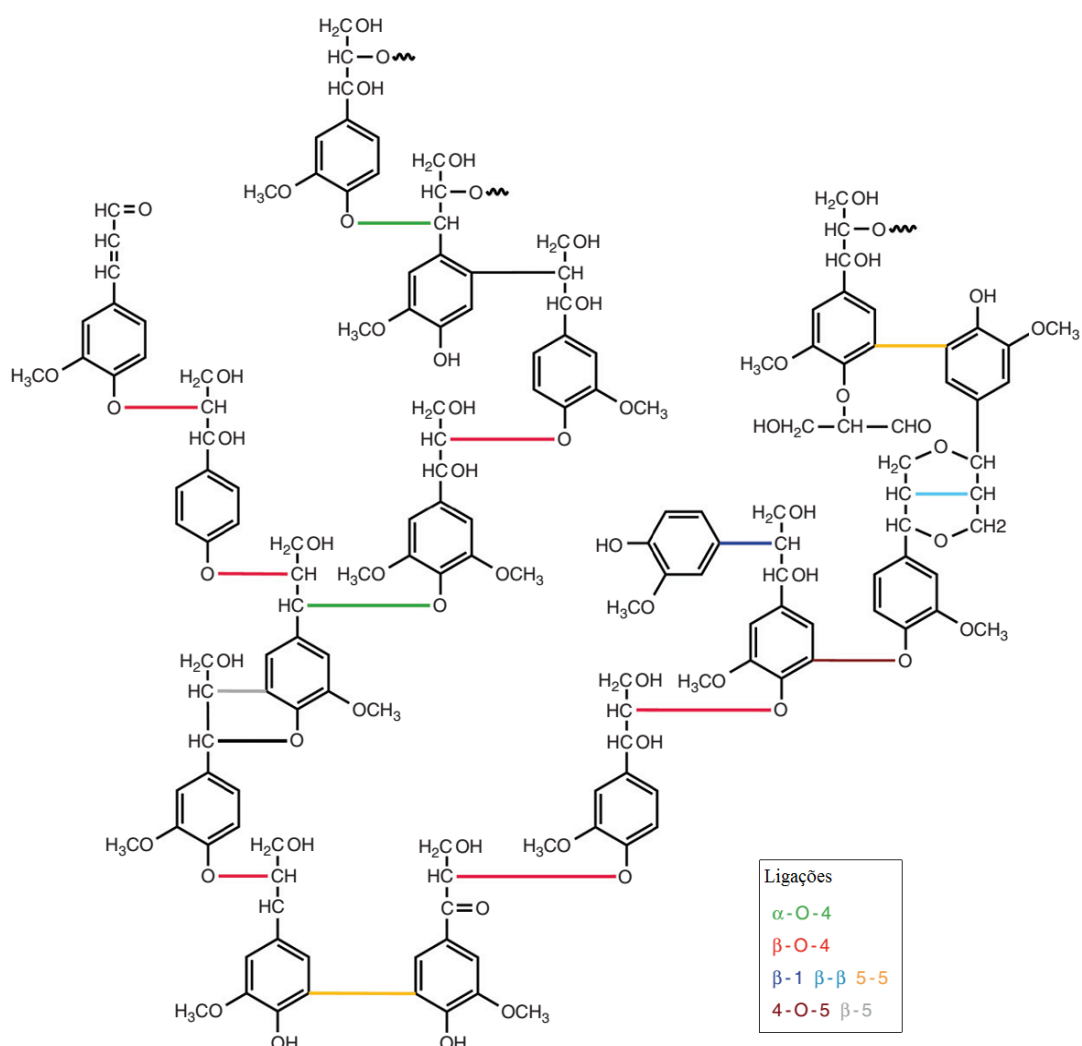
Tabela 4.5: Composição da lignina em diferentes tipos de biomassa.

Biomassa	Lignina-H (%)	Lignina-G (%)	Lignina-S (%)
Madeira Mole	<10	>95	2-3
Abeto	5	94	1
Madeira de Compressão	29	70	1
<i>Plantas Anuais</i>			
Bambu	25	35	40
Gramínea	5-33	33-80	20-54

Fonte: (Windeisen e Wegener, 2012).

As unidades de fenilpropano podem ser ligadas por diferentes tipos de ligações, porém existe uma predominância das ligações do tipo β -O-4 e α -O-4. A lignina possui em sua estrutura grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. No entanto, como resultado da sua estrutura tridimensional ela pode ser considerada predominantemente hidrofóbica na forma nativa. Ela é responsável por garantir hidrofobicidade à parede celular das plantas. A Figura 4.9 apresenta a possível estrutura química da lignina de madeiras moles (*softwood*), bem como as principais ligações entre as unidades fenilpropânicas.

Figura 4.9: Estrutura da lignina presente em madeiras moles. Fonte: (Windeisen e Wegener, 2012).



4.3.2 Bagaço de cana-de-açúcar (BC)

Depois de apresentada de forma genérica, a estrutura e composição química dos materiais lignocelulósicos em tópicos anteriores, este tópico destina-se a apresentar de forma mais aprofundada a composição do BC, biomassa utilizada neste trabalho.

O BC é um resíduo lignocelulósico fibroso gerado durante a operação de esmagamento dos colmos da cana-de-açúcar durante a operação de moagem para extração do caldo da cana. Essa etapa é utilizada no processo de fabricação do açúcar e etanol de 1ª geração.

A composição química do BC o torna interessante como uma matéria-prima industrial de elevada importância econômica. A utilização integral deste componente é extremamente desejável tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Atualmente grande parte do bagaço gerado nas usinas é utilizada para viabilizar e satisfazer as demandas energéticas do processo de produção de açúcar e etanol de 1ª geração.

O uso mais tradicional para viabilização energética é a produção de vapor mediante a combustão do bagaço em caldeiras na própria usina. No entanto, estudos realizados associados à experiência industrial do setor sucroalcooleiro, apontam que é possível suprir as demandas energéticas de uma usina com praticamente metade do bagaço gerado. Sendo assim, a outra metade poderia ser utilizada para outras aplicações como produção de papel e celulose, etanol de 2ª geração e outros biocombustíveis (Orlando *et al.*, 2002).

O BC possui alguns requisitos técnicos e econômicos como, por exemplo, elevada reatividade frente a agentes de polpação e hidrólise, e o fato de ser considerado um resíduo, que o faz atrativo para ser usado como matéria-prima em biorrefinarias. Além disso, as características composicionais do BC são um tanto quanto interessantes, haja vista o elevado teor de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) em sua estrutura.

A constituição do BC é resumida por três frações, cujo percentual depende do processo agroindustrial utilizado pela usina. Basicamente a composição média dos bagaços é: 45% de fibras, 2 a 3% de sólidos solúveis, 2 a 3% de sólidos insolúveis. A fibra é composta em grande parte por fração sólida orgânica, a fração de sólidos solúveis, que podem ser dissolvidos em água é composta principalmente de sacarose. Já a fração de sólidos insolúveis, ou parte que não pode ser solubilizada em água é constituída basicamente de substâncias inorgânicas (minerais, fragmentos de solo e materiais estranhos), e é fortemente influenciada pelas condições de manejo (corte e colheita) e processamento da cana (Canilha *et al.*, 2012).

Parte dos componentes de interesse, hemiceluloses e celulose, pode ser extraídas das fibras presentes no BC, e isto aumenta o interesse pelo uso deste material em processos de bioconversão que visam à produção de etanol de 2ª geração, enzimas específicas, xilitol e produção de biogás (CH₄ e H₂). Mediante a estas vantagens, o bagaço é considerado não somente um subproduto da indústria sucroalcooleira, mas também um coproduto de elevado valor agregado (Pandey *et al.*, 2000).

No entanto, para viabilidade do uso deste resíduo como matéria-prima, algumas questões como: *i*) entendimento da composição química do bagaço e *ii*) conhecimento sobre as técnicas de pré-tratamento, se fazem necessário. Nos últimos anos, diferentes estudos

apresentam as diferenças encontradas na composição do bagaço de cana-de-açúcar oriundos do território brasileiro. A Tabela 4.6 mostra de forma resumida a composição química de diferentes bagaços utilizados em estudos distintos.

Tabela 4.6: Composição química (% m/m, base seca) bagaço de cana-de-açúcar oriundos do Brasil reportados na literatura.

Componente (%)	Referência					
	(Rocha <i>et al.</i> , 2011)	(Canilha <i>et al.</i> , 2011)	(Vallejos <i>et al.</i> , 2012)	(Da Silva <i>et al.</i> , 2010)	(Brienzo <i>et al.</i> , 2009)	(Rabelo <i>et al.</i> , 2011)
Celulose	41,1	45,0	42,6	38,8	42,4	38,4
Hemiceluloses	22,7	25,8	28,3	26,0	25,2	23,2
Lignina	21,4	19,1	21,7	32,4	19,6	25,0
Cinzas	2,4	1,0	1,4	2,8	1,6	1,5
Extrativos	6,8	9,1	2,1	-	-	-

Fonte: Adaptado (Canilha *et al.*, 2012).

Segundo alguns autores como Canilha *et al.* (2012), o fato da composição química variar para o mesmo tipo de material não causa surpresa, uma vez que a grande maioria das biomassas lignocelulósicas apresenta o mesmo problema. A composição química depende de alguns fatores genéticos da planta, do ambiente de crescimento e das condições de processo. O conhecimento da composição química da biomassa é fundamental para auxiliar no momento da escolha da aplicação e na determinação da melhor técnica de pré-tratamento. Um fator limitante para a utilização de qualquer material lignocelulósico como matéria prima em uma biorrefinaria é a escolha das melhores técnicas de pré-tratamento para o fracionamento racional e uso consciente de todos os seus constituintes. Tal tema será abordado no próximo tópico.

4.4 Técnicas de pré-tratamento aplicadas aos resíduos lignocelulósicos visando o uso em bioprocessos

Como visto em tópicos anteriores, as propriedades dos resíduos lignocelulósicos conferem dificuldades para o uso dos mesmos em bioprocessos. Sendo assim, etapas prévias de pré-tratamento precisam ser utilizadas para viabilizarem o uso de matérias-primas lignocelulósicas em processos que envolvem a biodegradação.

Os objetivos do uso das etapas de pré-tratamento são, aumentar a área superficial dos materiais lignocelulósicos, desconstruir a estrutura lignocelulósica de forma a liberar açúcares

oriundos das hemiceluloses, aumentar o acesso dos agentes de hidrólise aos componentes da celulose, e reduzir a cristalinidade da mesma (Mosier *et al.*, 2005). Devido à complexidade da estrutura lignocelulósica estes tratamentos são geralmente severos e podem ser classificados em físicos, químicos, bioquímicos e térmicos.

Alguns especialistas apontam que os processos de pré-tratamento representam um custo significativo no uso dos resíduos lignocelulósicos como matéria-prima para processos de produção de bioetanol, biogás e bioprodutos de valor agregado (Alvira *et al.*, 2010). Mediante isto, a busca por um pré-tratamento que garanta elevado desempenho nos bioprocessos é extremamente importante.

Algumas observações sobre as técnicas de pré-tratamento consideradas mais usadas para biomassas lignocelulósicas estão sumarizadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Informações sumarizadas sobre as técnicas de pré-tratamento mais utilizadas para o uso de biomassa lignocelulósica em bioprocessos (início)

Pré-tratamentos	Observações	Referências
Físicos/Físico-Químicos		
<i>Mecânico</i>	<p>Promove a redução do grau de polimerização da biomassa. Pode ser utilizado antes de processos de hidrólise do material lignocelulósico visando o aumento de rendimento nas etapas de hidrólise.</p> <p>Reduz o tempo de residência em processos de digestão aumentando a taxa de digestão.</p> <p>Minimiza a produção de compostos inibidores.</p> <p>Apresenta uma elevada demanda energética e na grande maioria das vezes precisa estar associado a outros pré-tratamentos para obter elevados rendimentos.</p>	(Ramos, 2003; Alvira <i>et al.</i> , 2010)
<i>Térmico</i>	<p>Em determinadas condições pode promover boa solubilização das hemiceluloses, bem como parte da lignina.</p> <p>Pode ser considerado adequado quando pretende-se utilizar a fração hemicelulósica para geração de produtos de valor agregado.</p> <p>Caso não seja otimizado pode produzir grande quantidade de compostos fenólicos.</p> <p>Condições severas de pré-tratamento podem provocar a condensação e precipitação de lignina solúvel, além de aumentar a produção de alguns produtos de degradação dos açúcares C5 e C6, tais como furfural (FF) e 5-hidroximetil2-furfural (HMF).</p> <p>Temperaturas superiores a 250 °C devem ser evitadas para minimizar a chance de reações de pirólise</p>	(Brownell <i>et al.</i> , 1985; Bobleter, 1994)
<i>Vapor/Explosão a vapor</i>	<p>Podem ser usados para desconstrução da biomassa.</p> <p>Durante os pré-tratamentos a vapor parte das hemiceluloses é hidrolisada formando ácidos como os ácidos acético e fórmico.</p> <p>Os tratamentos envolvendo o vapor incluem o risco de produção de compostos como FF, HMF e compostos fenólicos em elevadas quantidades.</p> <p>Requerem elevadas temperatura e pressão, o que culmina na necessidade da construção de reatores especiais que suportam condições extremas de pressão e temperatura.</p>	(Brownell <i>et al.</i> , 1985; Laser, Shulman, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Auto-hidrólise (“liquid hot water”- LHW)</i>	<p>Apresenta um bom efeito quanto ao aumento da área superficial da fração sólida residual ao pré-tratamento rica em celulose.</p> <p>Facilita o acesso da celulose por parte dos micro-organismos e enzimas.</p> <p>Quando otimizado pode garantir elevados valores de extração de açúcares C5, oriundos das hemiceluloses.</p> <p>Em temperaturas entre 180°C e 200°C podem apresentar efeitos na solubilização de lignina</p> <p>Quando controlado pode gerar um hidrolisado com menores concentrações de produtos inibidores quando comparado as técnicas que utilizam baixos valores de pH, tais como os tratamentos ácidos catalisados.</p> <p>O pH durante o processo é mantido entre 4-7, não sendo necessária a construção de reatores especiais.</p>	(Bobleter, 1994; Mosier <i>et al.</i> , 2005; Boussarsar <i>et al.</i> , 2009; Diaz <i>et al.</i> , 2010; Yu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ácido</i>	<p>A solubilização das hemiceluloses e precipitação de lignina solúvel são mais pronunciadas durante o pré-tratamento utilizando ácidos fortes quando comparado ao pré-tratamento usando ácidos diluídos.</p>	(Cassini <i>et al.</i> , 2006; De Ávila e Guirardello, 2008; Akpinar <i>et</i>

	<p>A maior vantagem é a elevada solubilização de hemiceluloses.</p> <p>Existe grande risco na formação de produtos de degradação voláteis.</p> <p>Em alguns casos a técnica usando ácido forte pode não ser atrativa para os bioprocessos, haja vista a acentuada formação de compostos inibidores e a elevada depreciação dos equipamentos.</p> <p>O pré-tratamento ácido diluído é uma técnica promissora, uma vez que a depreciação dos equipamentos é menor e é possível minimizar as reações secundárias que dão origem aos compostos tóxicos.</p>	<p><i>al.</i>, 2010; Canilha <i>et al.</i>, 2011)</p>
Alcalino	<p>As primeiras reações que ocorrem são as reações de hidrólise, que são capazes de atacar ligações existentes entre a lignina e carboidrato.</p> <p>O rompimento das ligações cruzadas provoca um aumento na porosidade e área superficial.</p> <p>O pré-tratamento pode ser realizado em temperatura ambiente.</p> <p>O pré-tratamento utilizando hidróxido de sódio é comumente utilizado na indústria de papel em etapas de polpação, o que garante uma boa compreensão acerca das variáveis de processo.</p> <p>Como fator adverso pode ser citado o fato do uso de insumo químico e necessidade de reatores feitos com materiais que suportam ataque básico.</p>	<p>(Tahezadeh e Karimi, 2008; Hendriks e Zeeman, 2009; Lei <i>et al.</i>, 2010; Zhang e Yang, 2011)</p>
Oxidativo	<p>Usa agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peracético.</p> <p>Em alguns casos os oxidantes podem provocar a perda de hemiceluloses e celulose.</p> <p>O uso do ácido peracético já demonstrou ser altamente seletivo para extração de lignina e ineficiente para remoção de carboidratos.</p>	<p>(Teixeira <i>et al.</i>, 1999; Kaparaju e Felby, 2010; Lucas <i>et al.</i>, 2012; Ayeni <i>et al.</i>, 2013)</p>
Combinados		
Térmico e ácido	<p>O ácido externo catalisa a solubilização das hemiceluloses, além de diminuir a temperatura ótima de pré-tratamento, levando a uma melhoria da hidrólise enzimática do substrato.</p> <p>As modificações na estrutura da biomassa decorrentes da perda de hemiceluloses e lignina podem provocar uma reorientação cristalina da celulose.</p> <p>O processo pode gerar elevadas quantidades de furanos.</p>	<p>(Ke <i>et al.</i>, 2012)</p>
Térmico e alcalino	<p>A combinação de pré-tratamentos em temperaturas de 100 a 150°C associados à adição de Ca(OH)₂ já mostrou-se eficiente para a remoção de lignina em biomassas com baixos teores de lignina, entretanto, tal combinação mostrou-se não efetiva para biomassas com levados teores de lignina.</p>	<p>(Chang <i>et al.</i>, 2001)</p>
Térmico e oxidativo	<p>O uso de ácido peracético associado ao tratamento a vapor é eficiente para remoção de açúcares na forma de oligômeros.</p> <p>Grande quantidade de compostos fenólicos é formada, no entanto, alguns deles são degradados a ácidos carboxílicos.</p>	<p>(Ando <i>et al.</i>, 1987; Hendriks e Zeeman, 2009; Kaparaju e Felby, 2010)</p>

A Tabela 4.7 apresenta informações acerca das principais tecnologias de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas quando o objetivo é a utilização das mesmas como matéria-prima para os bioprocessos. A partir das informações fornecidas é possível afirmar que a técnica de pré-tratamento por AH possui algumas características que a tornam interessante para o uso nas biorrefinarias conforme apresentado no item 4.4.1. Como o presente trabalho focará atenção em avaliar o uso do HH gerado durante a etapa de pré-tratamento por AH para produção de biogás por DA considerando o conceito da biorrefinaria da cana-de-açúcar, uma atenção maior será destinada ao seu entendimento no próximo tópico.

4.4.1 Auto-hidrólise como técnica de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.

A auto-hidrólise (AH) ou tratamento hidrotérmico é um processo que permite a solubilização das hemiceluloses. Esse procedimento consiste no uso da água como solvente e nucleófilo nas reações de hidrólise das hemiceluloses em temperaturas elevadas (150-200°C) e altas pressões (10-40 bar). A principal vantagem desta técnica é o fato de que na mesma não é necessário adicionar insumos químicos como ácidos e bases, e isto faz com que a mesma seja atraente ambientalmente e economicamente, uma vez que não é necessário o uso de reatores especiais confeccionados com materiais resistentes a corrosão (Taherzadeh e Karimi, 2008). Além disso, a aplicação de tal técnica em escala industrial parece ser mais fácil uma vez que é possível utilizar parte do vapor gerado no processo de produção de etanol 1G como fonte de calor.

Durante o pré-tratamento as moléculas de água podem penetrar na biomassa, promovendo uma hidratação na celulose, solubilização das hemiceluloses e ligeira remoção de parte da lignina. O tratamento por AH é extremamente efetivo no aumento da acessibilidade e susceptibilidade da área superficial da celulose, o que provoca um aumento da biodegradabilidade para os micro-organismos e uma melhora da ação das enzimas celulolíticas nos processos de hidrólise enzimática.

Além disso, a AH também é capaz de melhorar a extração de açúcares C5, garantindo a possibilidade do uso racional da fração hemicelulósica. Outra vantagem da AH frente aos pré-tratamentos mais usuais como aqueles que fazem uso de baixos valores de pH, como é o caso dos pré-tratamentos com ácidos concentrados e diluídos e dos pré-tratamentos por explosão a vapor auto catalisados, é o fato da AH gerar um HH com menores teores de compostos tóxicos, tais como, FF, HMF e compostos fenólicos (Zheng *et al.*, 2014). Ademais, a adição de uma etapa para redução do tamanho da biomassa não se faz necessária, uma vez

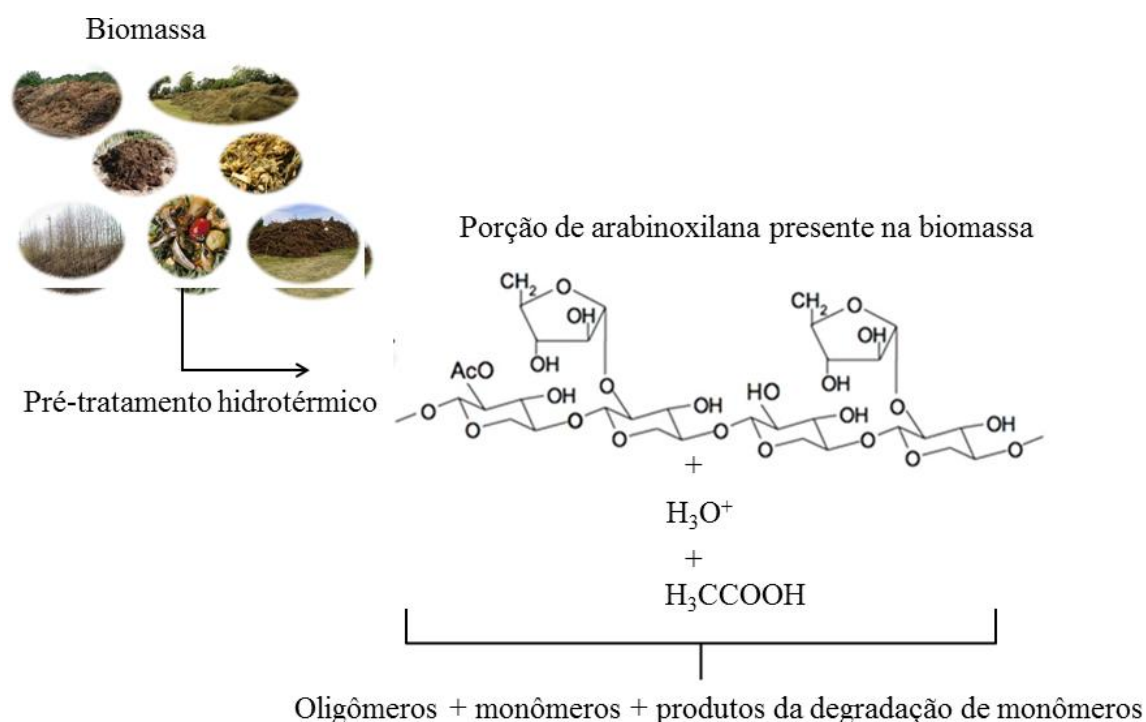
que durante o pré-tratamento grande parte das partículas são desfeitas. Este conjunto de características positivas torna a técnica atraente quanto ao seu uso em larga escala (Zheng *et al.*, 2014).

A eficiência da AH depende do tipo de biomassa, podendo variar em função da composição química e das propriedades estruturais da mesma. As condições de pré-tratamento estão intimamente relacionadas ao tipo de matéria-prima e finalidade de produção, ou seja, depende do produto que se deseja obter (biogás, bioetanol ou outros bioprodutos) após o pré-tratamento. Diante de tal situação passa a ser fundamental o estudo otimizado das variáveis que mais influenciam o processo (Fernandez-Cegri *et al.*, 2012; Monlau *et al.*, 2012).

No pré-tratamento por AH, a hidrólise das hemiceluloses é auto catalisada pela presença de alguns ácidos orgânicos gerados pela clivagem das ligações entre grupos substituintes das hemiceluloses, tais quais, *O*-acetil e ácido urônico. A quebra de tais ligações gera no meio, ácido acético e ácido glicurônico, que ajudam a catalisar a solubilização de oligossacarídeos e açúcares monoméricos.

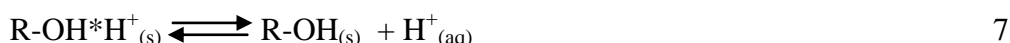
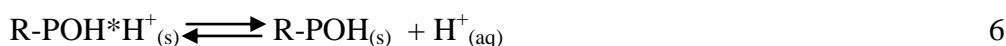
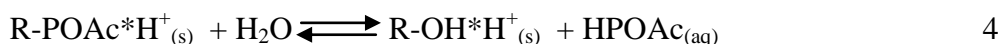
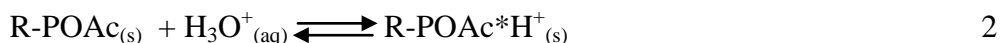
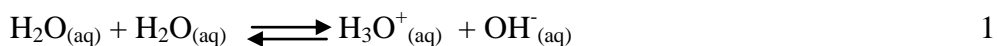
Como os processos de AH ocorrem em condições de acidez mais brandas, a degradação dos açúcares monoméricos em aldeídos inibidores como FF e HMF é minimizada. Além disso, em elevadas temperaturas (150 a 230°C) as frequências das vibrações das moléculas de água aumentam, contribuindo para a reação de auto ionização da molécula. Tal reação gera como um dos produtos o íon hidrônio (H_3O^+) que atua como catalisador (Zheng *et al.*, 2014). Em regiões subcríticas (100-374°C), a constante de ionização da água (K_w) aumenta com a temperatura, além disso, nesta faixa de temperatura a água apresenta uma elevada constante dielétrica que permite uma ligeira solubilização da lignina. A Figura 4.12 apresenta de forma simplificada um esquema da solubilização das hemiceluloses.

Figura 4.10: Esquema representativo para mostrar a despolimerização das hemiceluloses em processos hidrotérmico adaptado de (Ruiz *et al.*, 2013).

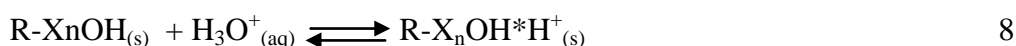


Um grande número de hipóteses vêm sendo sugeridas nos últimos anos para explicar o fenômeno de despolimerização das hemiceluloses em processos hidrotérmicos. Baseado na teoria das reações de superfície de branqueamento aplicadas em madeiras e fibras, proposta por Liu (2004) e Yang e Liu (2005), em um estudo recente Liu (2010) apresentou um modelo para extração de hemiceluloses durante a AH. No caso da hidrólise ácida, o íon H_3O^+ atua como um catalisador para hidrolisar as ligações glicosídicas e induzir sua despolimerização. A quebra das ligações glicosídicas é aumentada quando os oligômeros são distanciados da superfície sólida, sendo que sob elevadas temperaturas, a elevação da constante dielétrica do meio facilita a difusão dos oligômeros para fase líquida. Segundo Liu (2010), o entendimento do mecanismo de hidrólise das hemiceluloses pode ser muito complicado quando os mecanismos de transferência de massa estão ligados aos mecanismos químicos. No entanto, quando vistos de forma separada, pode-se deduzir que o processo de solubilização acontece em função das reações que ocorrem nas seguintes etapas:

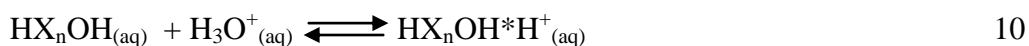
Etapas de formação dos íons H^+ ou H_3O^+ :



Etapas envolvidas durante solubilização das hemiceluloses para o meio reacional



Etapas da reação para reduzir o tamanho da cadeia dos oligômeros em solução



Para definição de tal modelo o autor considera que $X_m + X_s = X_n$, R denota a celulose e/ou lignina ligada a biomassa, e P representa um segmento/subunidade de hemiceluloses ou lignina. Já X_n , representa um grupo médio de n-xilo-oligômero $(-O-C_5H_8O_3^-)_n$, enquanto HX_nOH é um n-xilo-oligômero e HOAc representa a molécula de ácido acético.

Os fenômenos considerados como importantes para o entendimento da despolimerização das hemiceluloses são a transferência de massa e as reações químicas envolvidas durante o processo. O entendimento integrado dos dois fenômenos pode dificultar a compreensão do mesmo. Sendo assim, o autor sugere que quando se avalia os fenômenos de forma separada, pode-se deduzir que: *i*) íons hidrônios formados no meio reacional migram para a superfície da partícula sólida, *ii*) A quimiosorção, decorrente de ligações de hidrogênio, ocorrem na superfície sólida, *iii*) as reações entre os grupos de xilanas e íons H_3O^+ ocorrem na superfície, *iv*) os xilo-oligômeros dissolúveis sofrem uma desorção e *v*) os xilo-oligômeros dissolvidos difundem e são transportados para o seio da solução.

Essas condições de contorno podem auxiliar no entendimento da cinética das reações de despolimerização das hemiceluloses em processos hidrotérmicos como a AH. As Equações

2 e 9 representam a adsorção do íon H_3O^+ sobre a superfície da biomassa. Nas Equações 2, 3 e 10 estão representadas as reações superficiais nas quais um grupo acetila, um grupo acetilado, ou xilo-oligômeros são clivados a partir da biomassa. As reações 10 e 11 mostram o mecanismo de solubilização dos xilo-oligômeros. Após a solubilização, os mesmos são transformados em monômeros que posteriormente em meio ácido formarão compostos como furfural, ácido levulínico e fórmico.

Além do efeito sobre as hemiceluloses, o processo por AH pode provocar alterações na estrutura da lignina presente na biomassa. A lignina como mencionada anteriormente é a macromolécula mais abundante formada por compostos fenólicos, cujo precursores são os três álcoois, *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, sendo que os mesmos estão ligados entre si por ligações éter (C-O-C) e/ou ligações C-C (Ruiz *et al.*, 2013). Nos materiais lignocelulósicos a lignina está sempre associada com as hemiceluloses, não somente como uma mistura física, mas também por meio de ligações covalentes.

Durante o processamento hidrotérmico, as ligações lignina e lignina-hemiceluloses podem sofrer degradação, despolimerização parcial, além de alterações na organização (Fang *et al.*, 2008). Para explicar o mecanismo de ação do pré-tratamento hidrotérmico sobre a lignina, Zhang *et al.* (2008) sugeriu um mecanismo em duas fases: 1) reação muito rápida onde fragmentos de lignina com baixa massa molar e elevada reatividade são solubilizados pelo rompimento das ligações lignina-carboidratos; 2) reação lenta em que os fragmentos solúveis reagem uns com os outros, provocando a recondensação e repolimerização da lignina. Essas reações ocorrem na presença de ácidos orgânicos liberados durante o processamento hidrotérmico da biomassa.

A despolimerização parcial da lignina e o rompimento das ligações lignina-hemiceluloses produz parte dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado gerado no pré-tratamento hidrotérmico. Em alguns estudos com materiais lignocelulósicos, autores como Garrote *et al.* (2004) reportam que as ligações éter da lignina são rompidas durante o processamento hidrotérmico, causando uma diminuição na massa molar e um aumento da concentração de compostos fenólicos. Além dos compostos fenólicos, Garrote *et al.* (2008) tratando casca de cevada a 216°C observou a presença de vários outros compostos químicos possivelmente oriundos da lignina como os ácidos benzoico, gálico, siríngico e cinâmico e os aldeídos 3-4 dihidroxibenzaldeído e seringaldeído. A solubilização da lignina em processos hidrotérmicos e a geração de compostos oriundos da lignina depende das condições operacionais do processo (severidade das condições de reação) e do tipo de material lignocelulósico.

De acordo com alguns autores como Pérez *et al.* (2007), as variáveis consideradas mais importantes durante os processos hidrotérmicos envolvendo biomassas lignocelulósicas incluem, temperatura, tempo de residência, tamanho de partícula, razão sólido-líquido e pH do meio. A relação existente entre a temperatura e tempo de residência influenciam fortemente no processo hidrotérmico. Ballesteros (2002) reportou em seus estudos avaliando a extração de hemiceluloses em resíduos agrícolas herbáceos, que o aumento da temperatura e do tempo de residência resultou em maior conversão de hemiceluloses em açúcares. No entanto, quando condições severas são utilizadas, um maior controle do processo é exigido, uma vez que aumenta a possibilidade da degradação dos açúcares monoméricos. Autores como Karago (2004) mostram que a preservação de produtos como açúcares C5 e C6 é possível em menores temperaturas e maiores tempos de residência.

Além dos fatores mencionados acima, o tamanho de partícula da biomassa durante o processamento hidrotérmico pode limitar a transferência de calor. Quando tamanhos de partículas maiores são utilizados ocorre um superaquecimento no exterior das partículas gerando gradiente de temperatura entre a parte interna e externa, o que resulta em uma diferença na hidrólise (Diaz *et al.*, 2010). Estes problemas podem ser resolvidos integrando as operações unitárias de cominuição como etapa prévia ao processo hidrotérmico. As operações de redução de tamanho não somente alteram o tamanho e a forma das partículas, como também modificam a área superficial, porosidade e propriedades de fluidez (Ruiz *et al.*, 2011).

Apesar de alguns autores defenderem a inclusão de etapas de cominuição antes do tratamento térmico, uma corrente de pesquisadores (Ballesteros, 2000; Mosier *et al.*, 2005) defende que o uso de tal etapa não se faz necessário, uma vez que em muitas biomassas as partículas se quebram naturalmente quando são submetidas a processos de aquecimento em meio aquoso. Além disso, é muito discutido se as melhorias no processo são suficientes para compensarem o gasto energético envolvido durante as operações de cominuição, por tal motivo no presente estudo optou-se por não utilizar uma etapa previa de moagem do BCA.

Segundo alguns autores como Rodriguez *et al.* (2009), a razão sólido-líquido (*RSL*) e a umidade da biomassa são variáveis que devem ser levadas em consideração durante o processo de AH. Tais variáveis podem influenciar na capacidade de penetração de calor e de íons H_3O^+ na biomassa. Um tratamento desigual pode provocar uma maior ação sobre a parte externa da biomassa fazendo com que a parte interna seja menos afetada durante o pré-tratamento. Autores como Rodriguez *et al.* (2009) mostram que é possível obter elevadas concentrações de açúcares C5 (xilose e arabinose) e ácido acético quando o processo de AH

ocorre combinando elevadas temperaturas com baixos tempos de residência e elevadas *RSL*. O fato de se utilizar maiores valores de *RSL* implica na demanda de menor quantidade de água, o que é interessante do ponto de vista de aplicação uma vez que metodologias cada vez mais amigáveis ao meio ambiente são procuradas.

Além das variáveis citadas, a configuração dos reatores utilizados no pré-tratamento por AH pode provocar alterações nas características do hidrolisado e nos rendimentos do processo. Os reatores comumente utilizados no processo por AH são os reatores em batelada. Nestes, a partícula sólida do material lignocelulósico é misturada com água em elevadas temperaturas no reator. Geralmente os processos em batelada apresentam elevados tempos de residência, o que aumenta a probabilidade de geração de compostos indesejáveis formados a partir dos carboidratos ou oligômeros solubilizados durante o processo para fase líquida.

Outras configurações usadas são os reatores semicontínuos. Em tais reatores, a água quente passa sobre um leito fixo de material lignocelulósico, a reação ocorre com baixos tempos de residência para fração líquida quando comparado ao reator em batelada, o que contribui para formação de uma menor quantidade de produtos indesejáveis, uma vez que a fração líquida é rapidamente drenada para fora do reator (Ingrama *et al.*, 2009). Na mesma linha dos reatores semicontínuos, os reatores contínuos também podem ser considerados reatores em que os produtos da fase líquida apresentam baixos tempos de residência. Na maioria das vezes o material lignocelulósico flui em corrente paralela ou em contracorrente com a água. Quando objetiva-se extrair hemiceluloses em elevadas temperaturas e pressões com elevados rendimentos e baixa geração de produtos indesejáveis, tal sistema pode ser preferido (Rogalinski *et al.*, 2008).

Mediante as informações apresentadas sobre a técnica de AH é notória a viabilidade de investigações mais criteriosas sobre o efeito de tal pré-tratamento e a otimização do mesmo para diferentes aplicações. Sendo assim, um número extensivo de estudos vem sendo desenvolvidos com intuito de avaliar o uso de tal técnica de pré-tratamento para diferentes tipos de biomassas com distintas finalidades. A Tabela 4.8 compila algumas informações de estudos realizados utilizando a técnica de AH.

Tabela 4.8: Breve revisão da literatura sobre o uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise para biomassa lignocelulósica (início).

Objetivo principal	Matéria prima	Condições do processo	Referência
Estudo para obtenção de substitutos xilo-oligossacarídeos para alimentos de qualidade	Madeira de eucalipto, sabugo de milho, cascas de cevada e casca de arroz	Temperatura: 150 a 220°C Tempo: 0,4 a 0,75 h	(Parajó <i>et al.</i> , 2004)
Produção de xilo-oligossacarídeos	Lascas de madeira de eucalipto, espigas de milho, palha de trigo e de grãos usados em cervejaria	Temperaturas: 150 a 240°C razão líquido-sólido: 8 ou 10 g/g	(Carvalho <i>et al.</i> , 2009)
Produção de xilo-oligossacarídeos	Sabugo de milho, cascas de amêndoa, caroços de azeitona, casca de arroz, palha de trigo e palha de cevada	Temperatura: 179°C Tempo: 23 min Razão sólido-líquido: 833g/5L de água (cascas de amêndoa, caroços de azeitonas e casca de arroz; 625g/5L de água (sabugo de milho) e, 300g/5L de água (palha de cevada e palha de trigo)	(Nabarlatz <i>et al.</i> , 2007)
Remoção de hemiceluloses e lignina de bagaço de cana-de-açúcar	Bagaço de cana-de-açúcar	Temperatura: 200 a 280°C	(Sasaki <i>et al.</i> , 2003)
Comparação dos pré-tratamentos <i>liquid hot water</i> e vapor	Bagaço de cana-de-açúcar	Temperatura: 170 a 230°C Tempo: 1 a 46 min Concentração de sólidos: 1 a 8% para <i>liquid hot water</i> e, \geq 50% para vapor	(Laser, Schulman, <i>et al.</i> , 2002)
Tratamentos para extração dos principais componentes da <i>Hesperaloe funifera</i>	<i>Hesperaloe funifera</i> , nome comum: Luca Vermelha	Temperatura: 150 a 190°C Tempo: 0 a 20 min Razão sólido-líquido: 6 a 10	(Sanchez <i>et al.</i> , 2011)
Otimização das condições para extração de componentes viáveis a processos em biorrefinarias	Palha de milho	1º estágio: 15% amônia Temperatura: 60°C Tempo: 8 h Razão sólido-líquido: 1:10 2º estágio: percolação usando água quente Temperatura: 190 a 210°C Fluxo de 20 mL/min por 10 min	(Yoo <i>et al.</i> , 2011)
Avaliação sobre a geração de xilo-oligossacarídeos a partir de dois resíduos lignocelulósicos	Ervas mistas (principalmente pertencentes a espécie <i>Lolium</i>), e conchas de sementes de girassol	Temperatura: 180°C Tempo: 20 a 60 min Razão sólido-líquido: 8kg/kg	(Gullon <i>et al.</i> , 2009)

Tabela 4.8: Breve revisão da literatura sobre o uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise para biomassa lignocelulósica (continuação).

Objetivo Principal	Matéria Prima	Condições do Processo	Referência
Avaliar os efeitos da variação das condições de pré-tratamento sobre a concentração de xilose e xilo-oligossacarídeos	Bagaço de cana-de-açúcar	Temperatura: 143,3 a 176,7°C Tempo: 20 a 70 min	(Vallejos <i>et al.</i> , 2012)
Produção de etanol celulósico	Palha de cana-de-açúcar	Temperatura: 170 a 210°C Tempo: 5 a 15 min	(Santos <i>et al.</i> , 2014)
Produção de xilo-oligossacarídeos	Grãos de cervejaria	Temperatura: 150 a 190°C Tempo: 32 a 44 min	(Carvalho, 2004)
Estudo da cinética da extração de hemicelulose durante pré-tratamento	Açúcar de bordo	Temperatura: 145 a 185°C Tempo: 8 h	(Mittal <i>et al.</i> , 2009)
Hidrólise de hemiceluloses para oligômeros e monômeros	<i>Sesbania grandiflora</i>	Temperatura: 145 a 190°C Tempo: até 7,5 h	(Yanez <i>et al.</i> , 2009)
Avaliar as possibilidades de utilização de palha de colza como uma fonte de açúcares fermentáveis por meio de pré-tratamento com água quente	Colza, nome comum: couve-nabiça	Temperatura: 161.7 a 230°C Tempo: 17 a 58,3 min	(Diaz <i>et al.</i> , 2010)
Produção de metano a partir da fração sólida residual gerada após o pré-tratamento	Palha de trigo, sabugo de milho, palha de milho, palha de arroz, talo de girassol e bagaço de cana-de-açúcar	Temperatura: 100 a 230°C Tempo: 5-20 min	(Chandra, Takeuchi, Hasegawa, <i>et al.</i> , 2012; O-Thong <i>et al.</i> , 2012)

Como pode ser observado na literatura, grande parte dos trabalhos realizados envolvendo o uso da técnica por AH como etapa prévia de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos focam as atenções em avaliar o efeito do tratamento sobre algumas propriedades físicas do material como, área superficial, aumento de porosidade e acessibilidade, e essa preocupação baseia-se no fato de que na grande parte os pesquisadores buscam avaliar a eficiência do pré-tratamento sobre a hidrólise enzimática e na consequente produção de etanol celulósico e outros produtos a partir da fração sólida (Peng *et al.*, 2012).

Alguns autores como Carvalho *et al.* (2008) destacam que as hemiceluloses extraídas durante o processo muitas vezes são consideradas um produto secundário devido à ineficiência da fermentação dos açúcares oriundos da mesma a etanol. Esses autores afirmam ainda que no que tange o conceito integrado da biorrefinaria de resíduos lignocelulósicos, o HH deve ser considerado um produto primário, uma vez que possui substâncias capazes de serem convertidas a outros produtos que não sejam o etanol. Diante disto aumentam-se os esforços para a realização de estudos que busquem utilizar o HH de forma mais racional. Além disso, na AH a otimização deve ser otimizada, nesse conceito de biorrefinaria integrada, de tal forma a permitir a máxima produção de outros produtos como, CH₄ e H₂, a partir do HH sem sacrificar a posterior produção de etano celulósico a partir da fase sólida pré-tratada.

Os processos baseados na fermentação são comumente preferidos como alternativa potencial para converter as hemiceluloses em biocombustíveis e produtos químicos tais como álcoois superiores, acetona, hidrogênio e ácido succínico (Girio *et al.*, 2010). Outra hipótese levantada por alguns especialistas é a possível viabilidade de uso dos açúcares C5 para produção de biogás por digestão anaeróbia.

Segundo alguns autores como Mariano *et al.* (2013), o uso do biogás gerado pela digestão anaeróbia pode ser uma alternativa para integração do uso das hemiceluloses na cadeia da biorrefinaria. Avaliando o cenário Brasileiro, essa alternativa mostra-se interessante uma vez que os processos de digestão anaeróbia podem ser favorecidos em países tropicais. Ademais, pensando na biorrefinaria da cana-de-açúcar, o uso da fração hemicelulósica para produção de biogás pode ser uma alternativa interessante para integração dos processos de produção de etanol 1G e 2G, uma vez que a energia gerada pela queima do biogás pode ser suficiente para viabilizar energeticamente a implantação de uma etapa de pré-tratamento.

Como pode ser visto na Tabela 4.8 são poucos os estudos que avaliam a viabilidade do uso da técnica de pré-tratamento por AH para produção de biogás, principalmente quando considera-se o HH gerado a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Isto abre a possibilidade de

novos estudos utilizando essa técnica de pré-tratamento com vistas à produção de H₂ e/ou CH₄ a partir da fração hemicelulósica.

No entanto, uma dificuldade para o uso do HH gerado principalmente por pré-tratamentos térmicos e termoquímicos nos processos biológicos é a formação de compostos tóxicos durante o pré-tratamento. A presença desses compostos é muitas vezes o fator limitante para os processos de bioconversão que usam o hidrolisado. Sendo assim, antes da aplicação é necessário avaliar as condições de pré-tratamento que geram menores teores de compostos inibidores aos micro-organismos e, além disso, são necessários estudos que busquem desenvolver métodos de detoxificação do hidrolisado. O tópico seguinte apresentará brevemente uma revisão do estado da arte sobre a detoxificação de hidrolisados hemicelulósicos.

4.4.2 Detoxificação do hidrolisado hemicelulósico para uso em bioprocessos

Conforme visto em tópicos anteriores os processos de pré-tratamento térmicos e termoquímicos de biomassa, na maioria das vezes em função das condições operacionais geram compostos indesejáveis aos bioprocessos. Alguns autores como Mussatto e Roberto (2004) afirmam que os compostos tóxicos gerados durante os processos térmicos e termoquímicos podem ser divididos em dois grupos: 1) produtos da degradação do açúcar e 2) produtos da degradação da lignina.

Os produtos gerados a partir da degradação dos açúcares em processos térmicos e termoquímicos são basicamente o 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) formado a partir da degradação de açúcares C6 (glicose), majoritariamente oriundos da celulose, e o 2-furfuraldeído (FF), formado a partir de açúcares C5 (xilose e arabinose), obtidos da hidrólise das hemiceluloses. Em processos térmicos auto catalisados efetivos para extração das hemiceluloses como é o caso da AH, é mais comum no hidrolisado a presença de FF quando comparado ao HMF. Isso pode ser explicado pelo fato de que em tais processos a solubilização da celulose e liberação de monômeros de glicose é minimizada.

O efeito da presença desses compostos no processo de fermentação dos açúcares a etanol é bastante estudado. Avaliando a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, Roberto *et al.* (1991) mostrou que em concentrações menores que 500 mg.L⁻¹ o FF não apresentou efeito no crescimento celular, enquanto que em concentrações acima de 2000 mg.L⁻¹ o crescimento celular foi inibido completamente. Nigam (2001) encontrou que uma concentração de 250 mg.L⁻¹ não foi suficiente para reduzir a produção de etanol, no entanto,

concentrações superiores a 1500 mg.L⁻¹ interferiram na respiração e taxa de crescimento dos micro-organismos. Uma diminuição de 94% para 85% foi observada na conversão de etanol.

Em relação ao HMF, Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000) mostraram que seu efeito inibitório é similar ao FF, e que ambos são responsáveis por provocarem uma grande fase *lag* no crescimento dos micro-organismos. Os mesmos autores mostram que a taxa de crescimento foi reduzida em 43%, 70% e 100%, quando o HMF foi encontrado nas concentrações de 500 mg.L⁻¹, 750 mg.L⁻¹ e 1500 mg.L⁻¹, respectivamente. Martinez *et al.* (2001) observou que a produção de etanol por *E. coli* a partir de hidrolisado hemicelulósico gerado a partir do bagaço de cana-de-açúcar foi afetada quando a concentração de furanos totais (HMF + FF) foi superior a 900 mg.L⁻¹. O mecanismo que melhor explica a ação inibitória dos furanos aos micro-organismos é a capacidade dos mesmos em alterarem o processo de replicação celular (Klinke *et al.*, 2004).

Além dos furanos, outra classe de compostos inibitórios que podem ser formados e solubilizados e transportados para o HH durante os processos de pré-tratamento são os produtos da degradação da lignina. Uma variedade de compostos aromáticos, poliaromáticos, fenólicos e aldeídicos são liberados a partir da lignina. Os compostos fenólicos possuem elevada toxicidade aos micro-organismos. Esses compostos são conhecidos por provocarem alterações na divisão celular e perda da integridade das membranas biológicas, afetando a habilidade das mesmas em atuarem como barreiras seletivas e matrizes de enzimas. Como consequência, o crescimento celular e assimilação de compostos por parte das membranas são afetados.

Na literatura vários estudos foram realizados com intuito de avaliar o efeito da toxicidade de tais compostos em processos de fermentação. No entanto, são poucos os estudos que avaliam o efeito da presença dessas substâncias na eficiência da digestão anaeróbia do HH. Barakat *et al.* (2012) realizou um estudo no qual foi avaliado a influência da presença de furanos e fragmentos de lignina na digestão anaeróbia. Os resultados mostraram que a capacidade máxima de produção de metano foi afetada na presença de furanos.

Além disso, os autores perceberam que tais compostos possuem grande influência na adaptação dos micro-organismos, e essa conclusão foi possível uma vez que na presença desses compostos o início da produção de metano ocorreu sempre depois de um período de adaptação. Em relação à toxicidade dos compostos derivados da lignina, os autores perceberam que algumas propriedades como, massa molar, hidrofobicidade e a relação de unidades siringila (S) e guaiacila (G) presentes no fragmento de lignina podem influenciar no potencial de produção de metano.

Grande parte dos estudos que avaliam os mecanismos de toxicidade dos compostos decorrentes dos pré-tratamento de biomassas são realizados em sistemas contendo somente um dos compostos tóxicos. Alguns autores como Mussatto e Roberto (2004) afirmam que no HH a toxicidade dos compostos pode ser maximizada em função dos efeitos sinérgicos, uma vez que no HH uma gama de compostos tóxicos é encontrada em diferentes concentrações.

De acordo com Taherzadeh e Karimi (2008) existem quatro maneiras para minimizar a presença de compostos tóxicos no HH: 1) evitar a sua formação controlando as condições do pré-tratamento; 2) detoxificar o HH antes do uso em bioprocessos; 3) desenvolver espécies de micro-organismos que sejam resistentes aos compostos inibidores e 4) converter os compostos tóxicos em compostos que não interfiram no metabolismo.

Uma alternativa bastante usada é a detoxificação do HH por meio de diferentes tipos de metodologias, incluindo, biológicas, físicas e químicas. A efetividade da escolha da técnica de detoxificação depende do tipo de biomassa usada no pré-tratamento, do tipo de pré-tratamento, do tipo de micro-organismo usado e do produto que pretende ser obtido. Dentre as metodologias de detoxificação do HH pode-se destacar os processos biológicos. Em tais processos uma possibilidade é o uso de enzimas específicas de micro-organismos que atuam diretamente sobre os compostos tóxicos provocando sua alteração química. Tais enzimas muitas vezes são obtidas a partir de fungos. Joenssoná *et al.* (1998) detoxificou um HH obtido a partir de madeira com lacase e peroxidase produzidas pelo fungo *Trametes versicolor*, promovendo um aumento de 70 % na produção de etanol. No que diz respeito a utilização da etapa acidogênica como etapa detoxificante do HH gerado pela AH do BC para posterior alimentação da etapa metanogênica, não foram encontrados nenhum estudo na literatura.

4.5 Produção de biogás a partir de biomassa lignocelulósica

Como dito em tópicos anteriores a busca por uma energia segura e o aumento contínuo da emissão de gases estufas e seu acúmulo na atmosfera tem reforçado o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias energéticas baseadas no conceito de energia renovável. Tal ação visa minimizar a dependência pelos recursos fósseis ditos não renováveis (Chandra, Takeuchi, Hasegawa, *et al.*, 2012).

Algumas alternativas são apontadas como promissoras, sendo a mais estudada pela comunidade científica a produção de bioetanol de 1ª e 2ª geração. No entanto, em função de algumas dificuldades encontradas na implantação do processo, o uso de outros tipos de bioenergia como a produção de biogás vem assumindo um lugar de destaque, principalmente

quando integradas com a cadeia produtiva da biorrefinaria de segunda geração da cana-de-açúcar.

Dentre os processos escolhidos para a produção de biogás destaca-se a digestão anaeróbia. Esse processo é promissor para produção de energia renovável, uma vez que é possível realizar a conversão microbiana da matéria orgânica em biogases com potencial energético, tais como CH_4 e H_2 .

Comumente os substratos mais utilizados para produção de biogás incluem efluentes domésticos e efluentes/resíduos industriais gerados em diferentes processos. Além dos substratos citados anteriormente, o uso de resíduos lignocelulósicos vem demonstrando grande potencial para uso em processos de produção de biogás. A possibilidade de produzir biogás de diferentes substratos é uma das principais vantagens da digestão anaeróbia sobre outros processos como a produção de etanol. O presente tópico destina-se a apresentar as possibilidades de produção de CH_4 e H_2 a partir de biomassa lignocelulósica.

4.5.1 Produção de CH_4 a partir de biomassa lignocelulósica

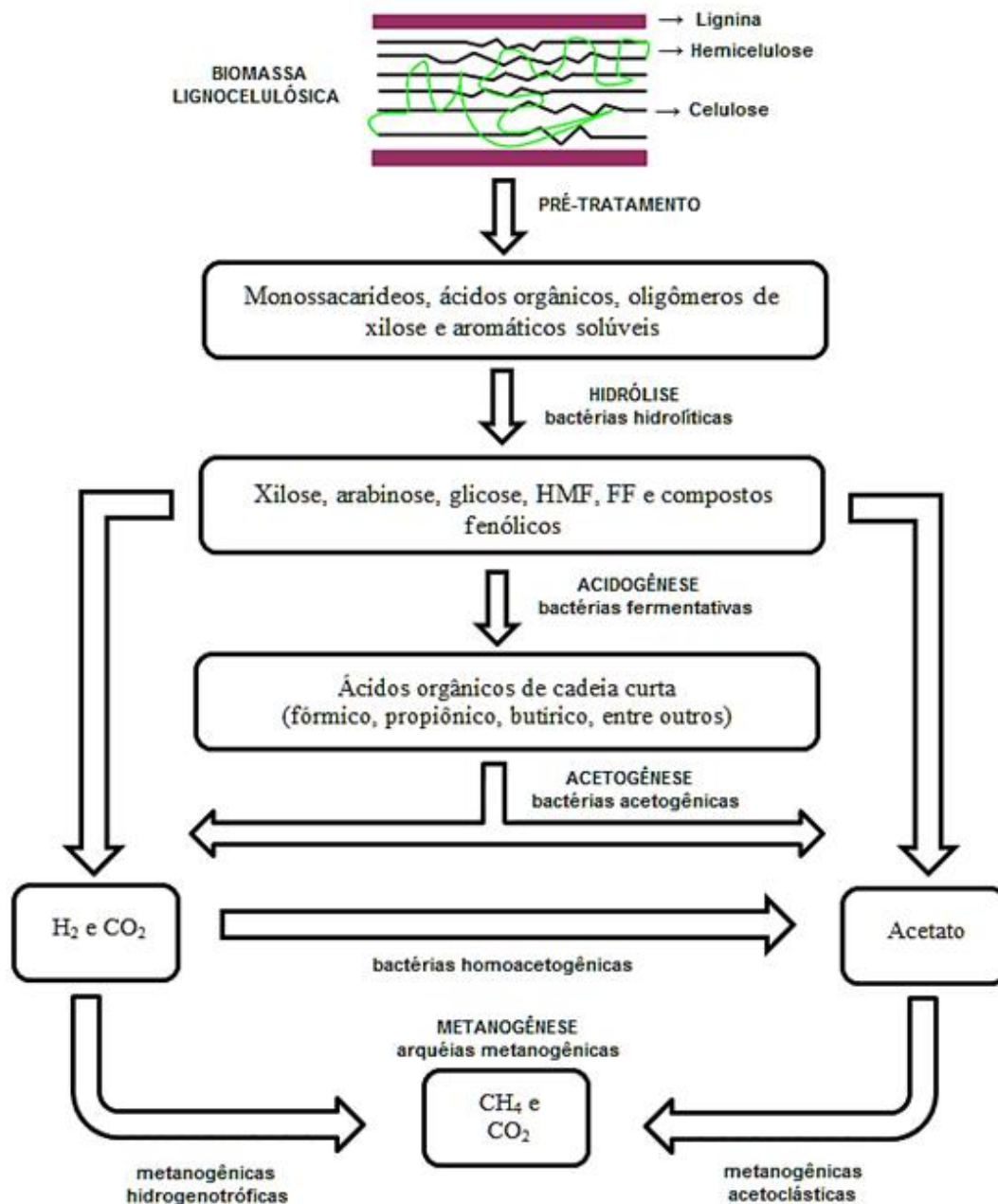
A produção de CH_4 a partir de uma variedade de resíduos por meio da tecnologia de digestão anaeróbia está crescendo em todo mundo e é considerada ideal em decorrência dos seus benefícios econômicos e ambientais. Além disso, outras vantagens oferecidas pelo biogás são: *i*) pode ser produzido a partir de recursos renováveis, *ii*) sua produção independe de fontes externas oriundas do petróleo, *iii*) ajuda na redução da poluição causada por resíduos orgânicos, que são responsáveis por boa parte da poluição de água doce e *v*) ajuda a retardar os problemas de gestão de resíduos (Chandra, Takeuchi, *et al.*, 2012b).

Alguns autores como Zheng *et al.* (2014) afirmam que em termos da relação energia produzida/energia consumida (28 MJ/MJ), a digestão anaeróbia é o método mais eficiente para produção de bioenergia a partir de biomassa, superando os processos termoquímicos. Além disso, após enriquecimento o biogás a base de CH_4 pode substituir o gás natural na alimentação de motores automotivos ou em motores de combustão interna utilizados para geração de energia. Desta forma, o CH_4 poderia inclusive substituir os combustíveis produzidos a partir da refinaria de petróleo.

Como dito anteriormente a forma mais usual de produção de CH_4 é por via bioquímica utilizando micro-organismos anaeróbios. O processo ocorre na ausência de oxigênio e é conhecido como digestão anaeróbia. O processo de digestão anaeróbia pode ser dividido em quatro etapas: *i*) hidrólise, *ii*) acidogênese, *iii*) acetogênese e *iv*) metanogênese. As fases são

realizadas por diferentes tipos de micro-organismos (bactérias e arqueas) que trabalham em condições de relação sintrófica entre si. A Figura 4.11 mostra de forma simplificada todas as quatro fases do processo de digestão anaeróbia, considerando como substrato compostos obtidos a partir de biomassas lignocelulósicas. Todas as quatro etapas do processo de degradação anaeróbia serão brevemente discutidas abaixo.

Figura 4.11: Resumo da sequência de processos na digestão anaeróbia a partir de resíduos lignocelulósicos: Adaptado de (Monlau, Barakat, *et al.*, 2013)



i) Hidrólise

Durante a etapa de hidrólise no processo de digestão anaeróbia, compostos mais complexos (proteínas, lipídeos, polímeros a base de açúcares e carboidratos) são transformados em substâncias quimicamente consideradas mais simples e solúveis em meio aquoso. Esse mecanismo ocorre pela ação de exoenzimas excretadas por micro-organismos anaeróbios facultativos e/ou estritamente anaeróbios. A hidrólise dos carboidratos pode ocorrer em poucas horas ao passo que a hidrólise de compostos mais complexos como proteínas, lipídeos e polímeros (hemiceluloses e celulose) pode levar alguns dias (Taherzadeh e Karimi, 2008). Nesta etapa os micro-organismos anaeróbios facultativos consomem grande parte do oxigênio dissolvido presente na água provocando um abaixamento no potencial redox do meio garantindo assim condições ideais para a ação dos micro-organismos estritamente anaeróbios. A formação dos açúcares a partir dos carboidratos, ácidos graxos a partir dos lipídeos e aminoácidos a partir das proteínas ocorrem na etapa de hidrólise. Sendo assim, essa etapa passa a ser de fundamental importância para o processo de obtenção de biogás a partir de biomassas lignocelulósicas. Com intuito de tornar esse processo mais factível do ponto de vista de aplicação, algumas técnicas de pré-tratamento da biomassa vêm sendo realizadas para facilitar a ação das exoenzimas liberadas durante esta etapa (Hendriks e Zeeman, 2009).

ii) Acidogênese

Esta etapa ocorre de forma concomitante à etapa de hidrólise, uma vez que os micro-organismos acidogênicos convertem as substâncias mais simples produzidas na hidrólise em ácidos de cadeia curta, moléculas C1-C5 (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico), álcoois, hidrogênio e CO₂. A quantidade de íons H⁺ formada intermediariamente durante a acidogênese determina os tipos de produtos formados. Além disso, a pressão parcial de hidrogênio pode influenciar na quantidade de ácidos mais reduzidos como propionato e butirato, cuja degradação é inibida termodinamicamente pela presença de elevadas concentrações de acetato, hidrogênio dissolvido e talvez formiato (Zheng *et al.*, 2014).

iii) Acetogênese

Essa etapa é fundamental para gerar substrato para etapa de metanogênese. Durante a acetogênese os micro-organismos convertem ácidos intermediários (ex.: ácido propiônico, butírico, valérico, dentre outros) e álcool em acetato que é o principal substrato dos micro-organismos metanogênicos acetoclásticos. Estima-se que de 70% a 80% da produção de metano em um reator anaeróbio advenha dessa rota. As bactérias acetogênicas crescem em relação simbiótica com os micro-organismos metanogênicos. Durante esta etapa ocorre a produção de hidrogênio e os valores de pressão de hidrogênio são fundamentais para manter o equilíbrio dinâmico entre as etapas de acetogênese e metanogênese. Caso a pressão de hidrogênio aumente no sistema a formação de acetato pelos micro-organismos acetogênicos é comprometida, afetando severamente os micro-organismos produtores de CH₄. Para que isto não ocorra, existe a dependência de outra classe de micro-organismos metanogênicos, que utiliza CO₂ e H₂ para produção de CH₄, minimizando o aumento excessivo da pressão de hidrogênio. Sendo assim, fica claro que a elevada conversão de CH₄ a partir de qualquer fonte de carbono é altamente dependente do equilíbrio entre as fases de acetogênese e metanogênese (Baêta *et al.*, 2013).

iv) Metanogênese

Nesta etapa a formação de CH₄ ocorre em condições estritamente anaeróbias e pode ser realizada por micro-organismos metanogênicos acetoclásticos ou hidrogenotróficos. A diferença entre as duas espécies é o tipo de substrato utilizado para produção do CH₄. Os micro-organismos acetoclásticos convertem moléculas de acetato em CH₄ e CO₂, ao passo que as hidrogenotróficas convertem CO₂ e H₂ em CH₄. Para elevadas taxas de produção de CH₄ é necessário que as condições de crescimento sejam ideais para os micro-organismos metanogênicos e acetogênicos. A etapa de metanogênese é comumente considerada como etapa limitante para a taxa de produção de CH₄. Esse fato deve-se as baixas taxas de crescimento específico apresentada pelos micro-organismos metanogênicos, e a consequente sensibilidade a mudanças de pH, temperatura e presença de compostos inibidores (Zheng *et al.*, 2014).

Quando se trata da digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica a etapa de hidrólise também pode ser considerada uma etapa limitante para o processo biológico. Isto ocorre em decorrência da ineficiência da ação das exoenzimas excretadas na etapa de hidrólise sobre a complexa estrutura encontrada nos substratos lignocelulósicos. Desta forma, para a viabilidade da produção de CH₄ a partir de materiais lignocelulósicos a avaliação de diferentes técnicas de pré-tratamento da biomassa faz-se necessária, tanto para produção do

biogás utilizando o sólido na digestão anaeróbia em fase sólida (Travaini *et al.*), como através do uso do hidrolisado obtido por diferentes pré-tratamento pelo processo de digestão anaeróbia em fase líquida (DA-L) (Cirne *et al.*, 2007).

A digestão anaeróbia pode ser classificada com base no percentual de sólidos totais (ST). Segundo alguns autores como Zheng *et al.* (2014), quando o processo de digestão anaeróbia acontece com quantidade de sólidos totais (ST) superiores a 15%, ele pode ser considerado como DA-S, ao passo que quantidades de ST inferiores a 15% caracterizam uma DA-L. Ambos os tipos de digestão anaeróbia estão sendo estudados para avaliar a produção de biogás a partir de biomassa lignocelulósica (Zheng *et al.*, 2009).

A comparação entre DA-S e DA-L indica que a DA-L geralmente tem uma maior taxa de reação e menores tempos de retenção quando comparada a DA-S. Mediante tais vantagens, muitos estudos envolvendo o uso de técnicas de pré-tratamento vêm sendo conduzidos para produção de biogás a partir de resíduos lignocelulósicos por meio da DA-L em escala de bancada. A Tabela 4.9 apresenta uma breve revisão da literatura sobre os estudos envolvendo a produção de biogás usando DA-L e DA-S a partir de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas por diferentes técnicas.

Tabela 4.9: Estudos envolvendo a produção de CH₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (início)

Tipo de Tratamento	Matéria Prima	Condições do Pré-tratamento	Resultados	Referências
Físicos				
Mecânico	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, palha de arroz, aveia, trevo, bagaço, fibra de coco, cânhamo, cascas de banana, folhas de couve-flor, biofibras digeridas Resíduos florestais: folhas de <i>Mirabilis</i> Gramíneas: grama de despejo e feno de capim Fração orgânica de resíduos sólidos urbanos 	Tamanho da partícula: 0,003 a 30 mm	Melhoria no rendimento de metano superior a 30%. Ocasionalmente, a redução no tamanho diminuiu a produção de biogás.	(Delgenés <i>et al.</i> , 2002; Kaparaju <i>et al.</i> , 2002; Bruni <i>et al.</i> , 2010; Kreuger <i>et al.</i> , 2011)
Explosão a vapor	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, talos de milho, palha de minho, resíduos de citrinos, polpa de batata, bagaço da palha, biofibras digeridas Madeira dura: Cedro Japonês, salgueiro, bétula Gramíneas: junco, <i>Miscanthus</i>, algas Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo, e resíduos de papel Madeira macia: bamboo 	<i>T</i> : 160 a 260°C, <i>P</i> : 0,7 a 4,8 MPa, <i>t</i> : de alguns segundos a poucos minutos	Efeitos positivos com aumento de pelo menos 40% no rendimento de metano. Ocasionalmente, efeito zero ou negativo também foi observado.	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2004; Bruni <i>et al.</i> , 2010; Teghammar <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 4.9: Estudos envolvendo a produção de CH₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (continuação)

Tipo de Tratamento	Matéria Prima	Condições do Pré-Tratamento	Resultados	Referências
<i>Auto-hidrólise</i>	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, palha de arroz, frutos vazios de dendê, talos de girassol, bagaço de cana Gramíneas: <i>Miscanthus</i> e grama híbrida Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo, e resíduos de papel 	<p><i>T</i>: 100 a 230°C, <i>P</i>: 0,1 a 2,8 MPa, <i>t</i>: de poucos minutos a algumas horas</p>	7 a 220% de aumento no rendimento de metano	(Chandra, Takeuchi, <i>et al.</i> , 2012a; Chandra, Takeuchi, Hasegawa, <i>et al.</i> , 2012; O-Thong <i>et al.</i> , 2012)
<i>Extrusão</i>	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de cevada, milho, fração sólida de estrume Gramíneas: <i>Lolium multiflorum</i>, feno peletizado Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo 	<p><i>T</i>: 60 a 90°C <i>P</i>: 0,45 a 3,5 MPa <i>t</i>: 4 a 12 min</p>	8 a 70% de aumento no rendimento de metano	(Brückner <i>et al.</i> , 2007; Hjorth <i>et al.</i> , 2011)
<i>Radiação</i>	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, palha de cevada, trigo de primavera, palha de aveia, talos de arroz Gramíneas: switchgrass e grama híbrida Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo 	<p><i>T</i>: 115 a 300°C <i>t</i>: poucos minutos a algumas horas</p>	4 a 28% de aumento no rendimento de metano. A combinação com ácidos ou álcalis pode proporcionar considerável aumento no rendimento de biogás.	(Jackowiak, Bassard, <i>et al.</i> , 2011; Jackowiak, Frigon, <i>et al.</i> , 2011; Cesaro <i>et al.</i> , 2012; Shahriari <i>et al.</i> , 2012; Sapci, 2013)

Tabela 4.9: Estudos envolvendo a produção de CH₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (continuação)

Tipo de Tratamento	Matéria Prima	Condições do Pré-tratamento	Resultados	Referências
Químicos				
Alcalino	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, palha de arroz, palha de milho, folhas de beterraba, milho, feno ensilado, bagaço de cana-de-açúcar, colza, talos de girassol, bagaço de uva Resíduos florestais: folhas caídas Madeira dura: bétula Madeira macia: abeto e pinheiro Gramíneas Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo, polpa de papel, lodo 	Produtos químicos: NaOH, Ca(OH) ₂ , CaO, KOH, NH ₃ e H ₂ O Carga dos produtos químicos: 1 a 10% (g/g matéria seca) T: 15 a 170°C t: 1h a 10 dias	Efeito positivo na maioria dos casos, com aumento de 3,2% a 130% no rendimento de metano. Efeito negativo também ocorreu em poucos casos. No geral, este processo é mais efetivo em biomassas que contém mais lignina.	(Azzam e Nasr, 1993; Himmelsbach <i>et al.</i> , 2010; Mirahmadi <i>et al.</i> , 2010; Wang e Wang, 2010; Zhu e Pan, 2010; Liew <i>et al.</i> , 2011; Chandra, Takeuchi, Hasegawa, <i>et al.</i> , 2012)
Ácido	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: torta de óleo de girassol, resíduos de estufa, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos do processo de extração de plantas, talos de girassol, fibras de coco, colza, palhas, samambaia Gramíneas: feno Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo 	Produtos químicos: H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ , H ₃ PO ₄ , ácido acético e ácido málico Carga dos produtos químicos: 1 a 4% (g/g de matéria seca) podendo ser um pouco maior para ácidos orgânicos (ex.: 35 a 80% para ácido acético) T: ambiente a 170°C t: de poucos minutos a 30 dias.	Efeito positivo na maioria dos casos com aumento de 20 a 200% no rendimento de metano. Efeitos negativos ocorreram em poucos casos (por ex.: 2% H ₂ SO ₄ com colza)	(Xiao e Clarkson, 1997; Antonopoulou <i>et al.</i> , 2010; Badshah <i>et al.</i> , 2012; Monlau <i>et al.</i> , 2012; Monlau, Latrille, <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 4.9: Estudos envolvendo a produção de CH₄ a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas (final)

Tipo de Tratamento	Matéria Prima	Condições do Pré-tratamento	Resultados	Referências
<i>Explosão a vapor catalisada</i>	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: biofibras digeridas, cânhamo, palha de trigo Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo 	Produtos químicos: H ₂ SO ₄ , SO ₂ , H ₃ PO ₄ , NaOH com ou sem H ₂ O ₂ Carga dos produtos químicos: 0,5 a 4% (g/g de matéria seca) T: 155 a 220°C t: 5 min a 1 h	18 a 107% de aumento no rendimento de metano	(Bruni <i>et al.</i> , 2010; Teghammar <i>et al.</i> , 2010; Kreuger <i>et al.</i> , 2011; Nkemka e Murto, 2013)
<i>Oxidação úmida</i>	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de trigo, bioresíduos digeridos, palha de milho, palha de centeio de inverno, bagaço de palha de oleaginosa, palha de fava Madeira dura: salgueiro Gramíneas: <i>Miscanthus</i> Resíduos sólidos urbanos: resíduos de jornal e de jardim 	T: 180 a 220°C P O ₂ : 0 a 1.2 MPa H ₂ O ₂ pode ser adicionado t: poucos minutos	34 a 136% de aumento no rendimento de metano	(Fox e Noike, 2004; Petersson <i>et al.</i> , 2007; Uellendahl <i>et al.</i> , 2008; Wang, 2010)
Pré-tratamento oxidativo com peróxidos	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: palha de arroz, talos de girassol, sorgo Resíduos sólidos urbanos: fração orgânica do resíduo e resíduos de papel Gramíneas: <i>Miscanthus</i> 	Produtos químicos incluem H ₂ O ₂ com doses de 1 a 4% (g/g de matéria seca) e NaOH (1 a 2%) que tem sido utilizado em conjunto com o H ₂ O ₂ para aumentar o rendimento do metano. T: 25 a 220°C t: de poucos minutos até 7 dias.	33 a 120% de aumento no rendimento de metano. Efeitos negativos também foram observados.	(Teghammar <i>et al.</i> , 2010; Michalska <i>et al.</i> , 2012; Monlau <i>et al.</i> , 2012; Song <i>et al.</i> , 2012)
Líquidos iônicos	<ul style="list-style-type: none"> Resíduos agrícolas: linter de algodão desengordurado e branqueado, resíduos de palha de estrume, palha de trigo, palha de arroz, palha de tritcale (híbrido de centeio e trigo) Gramíneas: jacinto de água 	Líquidos iônicos: <i>N</i> -metilmorfolina- <i>N</i> -óxido monohidratado (NMMO) e cloreto de 1- <i>n</i> -butil-3 metilimidazol (BMIMCl) Carga do produto químico: 70 a 85% T: 90 a 130°C t: 1 a 15 h	16 a 1200% de aumento no rendimento de metano	(Jeihanipour <i>et al.</i> , 2010; Akhand, 2012; Teghammar <i>et al.</i> , 2012; Gao <i>et al.</i> , 2013; Purwandari <i>et al.</i> , 2013)

A Tabela 4.9 mostra que existem muitos estudos envolvendo a produção de CH₄ a partir de biomassas lignocelulósicas. No entanto, são poucos os estudos que avaliam a produção de CH₄ a partir de diferentes técnicas de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, grande parte dos estudos utiliza a fração sólida gerada após o pré-tratamento como matéria-prima, o que inviabiliza a integração da etapa de produção de biogás em uma biorrefinaria de etanol celulósico, haja visto que na grande maioria das vezes a fração sólida é submetida a etapa de hidrólise enzimática buscando a produção do etanol celulósico. O uso do hidrolisado obtido após etapa de pré-tratamento para produção de mais uma fonte energia (biogás) como abordado neste estudo, poderia contribuir para o balanço energético positivo nas biorrefinarias de 2^a geração.

4.5.2 Produção de H₂ a partir de biomassas lignocelulósicas

Como visto em tópicos anteriores a biomassa pode ser convertida em energia a partir de: *i*) processos térmicos, tais como combustão (calor e eletricidade), gaseificação (gás de síntese), pirólise ou liquefação (bio-óleos), *ii*) processos físico-químicos (ex.: biodiesel); *iii*) processos bioquímicos para produção de, CH₄, etanol, butanol ou hidrogênio.

O hidrogênio pode ser considerado um bom combustível para produção de energia no futuro. Tal fato deve-se ao seu elevado valor energético, 143 KJ.g⁻¹, sendo em termos mássicos a mais elevada de todos os combustíveis, cerca de 2,75 vezes superior quando comparado a combustíveis de hidrocarbonetos pesados (Kapdan e Kargi, 2006). Além disso, o hidrogênio pode ser utilizado em células a combustível visando a geração de eletricidade, pode ser utilizado como insumo químico em diferentes setores industriais (ex.: síntese de amônia, hidrogenação de óleos vegetais e reações de hidrocrackeamento na indústria do petróleo, dentre outras).

No presente momento, grande parte do hidrogênio produzido mundialmente é obtida de combustíveis fósseis através da reforma a vapor do gás natural, pirólise de carvão ou eletrólise (Marone *et al.*, 2014). No entanto, o uso de tecnologias consideradas ambientalmente mais corretas vem sendo amplamente estudadas para a produção de hidrogênio. Dentre tais tecnológicas destacam-se a produção de hidrogênio por via biológica. Alguns pesquisadores como Kaparaju, Serrano, Thomsen, *et al.* (2009) afirmam que a produção do biohidrogênio é mais favorável do ponto de vista energético, uma vez que as pressões e temperaturas envolvidas nos processos são mais próximas das encontradas em condições ambientes. Isto garante ao processo um balanço global energético favorável. Além

disso, a produção biológica de hidrogênio abre espaço para utilização de recursos energéticos renováveis, os resíduos, os quais são inesgotáveis.

Dentre os bioprocessos utilizados para produção de biohidrogênio podem-se destacar:

- 1- Biofotólise da água por algas;
- 2- Fermentação (*dark-fermentation*) durante a fase acidogênica da digestão anaeróbia da matéria orgânica;
- 3- Processos de duas etapas, fermentação (*dark*) e foto-fermentação (*photo-fermentation*).

Os processos apresentados acima possuem como característica comum o fato de a produção de hidrogênio ocorrer por fermentação ou fotossíntese. Os processos dependentes da energia luminosa, incluem a biofotólise direta e indireta e a foto-fermentação. Os micro-organismos responsáveis por esses processos são as algas, cianobactérias e bactérias fotossintéticas, respectivamente. Já o processo de produção de hidrogênio por fermentação escura, é realizado por micro-organismos anaeróbios estritos, facultativos ou aeróbios, como *Clostridium*, *Escherichia* e *Bacillus*, respectivamente (Panagiotopoulos *et al.*, 2009).

A produção do hidrogênio a partir da água usando algas consiste em uma separação da molécula de água em íons H^+ e O_2 por meio do processo de fotossíntese. Os íons H^+ passam por um processo de conversão mediante a ação da enzima hidrogenase, dando origem a moléculas de $H_{2(g)}$. A produção de hidrogênio a partir de algas segundo alguns autores (Kapdan e Kargi, 2006) é considerada economicamente viável e sustentável, uma vez que a produção passa pelo uso da água como fonte renovável e do $CO_{2(g)}$, um gás com considerável efeito estufa.

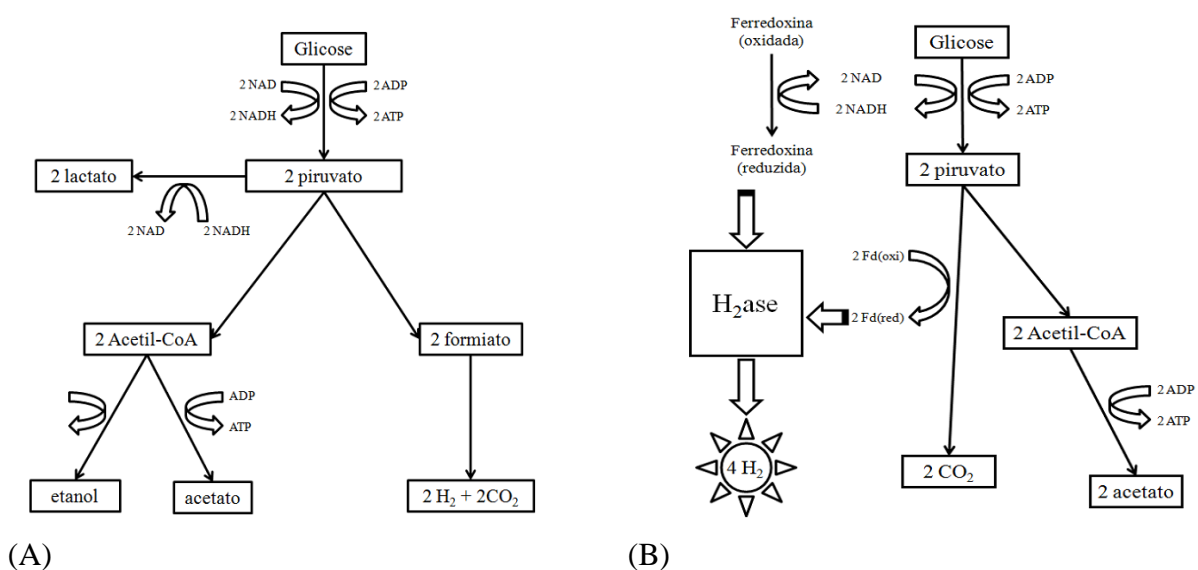
No entanto, esse processo apresenta algumas limitações como a inibição da enzima hidrogenase na presença de oxigênio, a dependência de fótons (radiação solar ou artificial) e o fato de não utilizar resíduos como substrato. Avaliando este último aspecto citado, os processos de fermentação (*dark fermentation*) e foto-fermentação levam certa vantagem, pois a produção de hidrogênio nesses casos passa pela utilização de resíduos como substrato. Tal fato abre a possibilidade de uso dos resíduos lignocelulósicos como substrato para produção de hidrogênio (Nissilä *et al.*, 2014), embora permaneça a dependência de uma fonte de radiação luminosa.

Como o foco do presente trabalho é a produção de hidrogênio pela fermentação durante a fase acidogênica da digestão anaeróbia da matéria orgânica, uma maior atenção será dada ao entendimento do processo de fermentação escura (*dark fermentation*). Esse processo possui

algumas vantagens: *i*) a não dependência de luz, o que garante a possibilidade de produção durante 24 h, com menor gasto energético *ii*) versatilidade quanto ao tipo de substrato utilizado (proteínas, carboidratos, ácidos, hemiceluloses, açúcares e oligômeros), *iii*) elevadas taxas de produção de hidrogênio, *iv*) robustez tendo em vista que a produção pode ser realizada em ambientes não assépticos e *v*) simplicidade, tendo em vista que os reatores são de simples configuração como os reatores de tanque agitado (CSTR) (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005).

A produção de hidrogênio pela fermentação durante a fase acidogênica do processo anaeróbio pode acontecer por meio do metabolismo de micro-organismos anaeróbios ou facultativos. Os mesmos utilizam carboidrato, proteínas, dentre outras moléculas orgânicas como substrato. No entanto, sabe-se que a etapa comum a todos é a formação de piruvato, seguida da etapa de formação de acetil-CoA. A formação da acetil-CoA pode ser realizada pela ação catalítica da enzima piruvato formiato liase (PFL), no caso de micro-organismos facultativos ou pela ação catalítica da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), no caso de micro-organismos estritamente anaeróbios. Em ambos os casos, o piruvato é usado na ausência de oxigênio para formação de acetil-CoA, possibilitando a formação de ATPs pela ação das enzimas PFL ou PFOR (Hallenbeck e Ghosh, 2009). A Figura 4.12 apresenta de forma esquemática a produção de hidrogênio a partir de glicose por ambos os tipos de micro-organismos.

Figura 4.12: Produção de hidrogênio por micro-organismos facultativos (A) e produção de hidrogênio por micro-organismos anaeróbios estritos (B). Fonte adaptado de (Hallenbeck e Ghosh, 2009).



A elevada taxa de produção de hidrogênio por meio da fermentação exige um conhecimento aprofundado de algumas condições tais como: *i*) tipo de cultura; *ii*) temperatura, *iii*) tipo e concentração de substrato, *iv*) pH e *v*) tempo de contato (Nissilä *et al.*, 2014). Esses parâmetros além de influenciarem na taxa de crescimento dos micro-organismos, também direcionam o tipo de metabolismo que eles irão realizar. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos que avaliam a produção de hidrogênio em diferentes condições com distintos substratos e meios de cultura passa a ser de fundamental importância.

Vários estudos avaliaram o inóculo usado na produção de hidrogênio e alguns autores como Baghchehsaraee *et al.* (2008) e Chang *et al.* (2010) mostraram a possibilidade do uso de culturas mistas para produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos. No entanto, o uso de cultura pura também é possível, e em muitas das vezes leva a maiores taxas de produção de hidrogênio para uma mesma condição quando comparado ao uso de culturas mistas.

Alguns autores como Pan *et al.* (2008) e Chong *et al.* (2009) demonstraram em seus estudos vantagens relacionadas ao uso de culturas puras. Dentre os pontos positivos destaca-se a facilidade de manipulação do meio de cultura por meio de controle de condições de cultivo, possibilitando a redução de produtos indesejáveis como ácido propiônico e etanol, garantindo assim maiores rendimentos de produção de hidrogênio. Porém, as culturas são muito sensíveis a qualquer tipo de contaminação, e seu uso demanda na maioria das vezes etapas de assepsia, o que significa um aumento no custo do processo. Além disso, os micro-organismos podem ser classificados como mesofílicos (20-45°C), termofílicos (40-65°C) ou hipertermofílicos (65-80°C). A escolha do tipo de inóculo, bem como de um micro-organismo específico dependerá das características que cada um possui (Ntaikou *et al.*, 2010).

Conforme apresentado anteriormente, a fermentação visando a produção de hidrogênio permite a utilização de diferentes compostos como substrato. Porém, sabe-se que a produção de hidrogênio a partir de substratos ricos em carboidratos é maior quando comparada a substratos ricos em gorduras e proteínas (Nissilä *et al.*, 2014). Tal fato abre a possibilidade do uso de resíduos lignocelulósicos como substratos para produção de hidrogênio, uma vez que esses resíduos apresentam em suas estruturas elevados teores de açúcares e carboidratos nas formas de hemiceluloses e celulose. No entanto, os elevados teores de lignina encontrados nos resíduos lignocelulósicos, bem como a elevada cristalinidade da celulose inviabilizam o uso de tais substratos de forma direta para produção de hidrogênio.

Alguns autores como Kaparaju, Serrano, Thomsen, *et al.* (2009) e Ntaikou *et al.* (2010) apontaram a necessidade do uso de técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para maximizar a produção de hidrogênio. No entanto, grande parte dos estudos envolvendo técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos contemplam a produção de bioetanol (Kumar *et al.*, 2009).

Dados da literatura apontam que os requisitos para um pré-tratamento com vistas à produção de bioetanol são diferentes daqueles necessários para produção de biohidrogênio. Isto pode ser atribuído às diferenças inerentes a cada processo de produção. O bioetanol, por exemplo, é produzido usando culturas puras, desta forma o hidrolisado deve conter maiores teores de açúcares C5-C6 na forma disponível e menores teores de substâncias complexas.

Por outro lado, o hidrogênio em grande escala é produzido por meio de culturas mistas. Desta forma, os substratos mais complexos como os oligômeros gerados durante o pré-tratamento podem ser convertidos através da ação microbiana a monômeros, e isto, implica que a hidrólise durante o pré-tratamento não necessita ser completa para que o hidrolisado seja usado na produção do $H_{2(g)}$ (Colleran *et al.*, 1998). Isto implica em dizer que a produção de H_2 pode ser feita utilizando hidrolisados com maiores teores de oligômeros gerados a partir da hidrólise parcial da hemicelulose. Devido às diferenças existentes entre a produção de bioetanol e hidrogênio as condições dos pré-tratamentos requeridos também serão diferentes, podendo a produção de H_2 ocorrer em condições de pré-tratamento mais brandas, em que a formação de oligômeros é maior, ou seja, não se faz necessário fornecer energia no sistema suficiente para converter tais oligômeros em açúcares facilmente disponíveis como observado para produção de etanol.

Tal fato abre espaço para estudos envolvendo a avaliação de diferentes tipos de pré-tratamento para distintas biomassas visando à maximização da produção de H_2 . Dentre os estudos realizados destacam-se aqueles envolvendo os pré-tratamentos físicos (moagem e fragmentação), químicos (ácidos, alcalinos e líquidos iônicos) e físico-químicos (auto-hidrólise e explosão a vapor). A Tabela 4.10 apresenta de forma compilada os estudos apresentados na literatura utilizando diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, condições de processos, tipos de inóculos e tipos de pré-tratamento, visando a produção de $H_{2(g)}$ a partir da fermentação (*dark fermentation*).

Tabela 4.10: Estudos envolvendo o uso de resíduos lignocelulósicos para produção de H₂ a partir de fermentação (início)

Método de Pré-tratamento	Condições do Pré-tratamento	Substrato	Cultura	Temperatura (°C)	pH	Rendimento de H ₂ em termos de hexoses	Referências
Auto-hidrólise	180°C	Palha de trigo	Cultura enriquecida	70	nr	1,59 mol.mol ⁻¹	(Kongjan e Angelidaki, 2010)
	Nr	Palha de trigo	Cultura enriquecida	70	nr	2,56 mol.mol ⁻¹	(Kongjan <i>et al.</i> , 2010)
	170°C	Alga marinha (<i>Laminaria japonica</i>)	Lodo digerido anaerobiamente	35	nr	110 L.kg ⁻¹	(Jung <i>et al.</i> , 2011)
Explosão a vapor	H ₂ O, 220°C, 1,2% (L.L ⁻¹) de H ₂ SO ₄ , 190°C	Palha de milho	Lodo digerido	35	5,5	2,84 mol.mol ⁻¹	(Datar, Huang, Maness, Mohagheghi, Czernik, Chornet, <i>et al.</i> , 2007)
	1% (kg.L ⁻¹) de H ₂ SO ₄ , 121°C	Talos de milho	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	37	nr	82 L.kg ⁻¹	(Rena <i>et al.</i> , 2008)
	1,5 Mpa	Talos de milho	<i>Clostridium nutyricum</i>	35	nr	68 L.kg ⁻¹	(Li e Chen, 2007)
Líquido Iônico	10%(kg.kg ⁻¹) [C ₄ mim]Cl	Celulose	<i>Thermotoga neopalitana</i>	80	7,5	1,22 mol.mol ⁻¹	(Quemeneur <i>et al.</i> , 2012)
Ácido Diluído	0,2% (L.L ⁻¹) HCl	Resíduos de borra de cerveja	Composto de esterco de vaca	36	6,5	69 L.kg ^{-1 d}	(Fan <i>et al.</i> , 2006)
	4% (kg.L ⁻¹) HCl	Borra de cerveja	Farelo de cereais	35	7,0	53 L.kg ^{-1 e}	(Cui <i>et al.</i> , 2009)
	0,5% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	Polpa de mandioca	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>	36	5,5	2,76 mol.mol ⁻¹	(Phowan <i>et al.</i> , 2010)
	1% (kg.kg ⁻¹) HCl	Sabugo de milho	Esterco de vaca	36	8,0	110 L.kg ⁻¹	(Pan <i>et al.</i> , 2008)
	0,2% (L.L ⁻¹) HCl	Resíduos de talos de milho	Composto de esterco de vaca	36	7,0	150 L.kg ⁻¹	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)

Tabela 4.10: Estudos envolvendo o uso de resíduos lignocelulósicos para produção de H₂ a partir de fermentação (final)

Método de Pré-tratamento	Condições do Pré-tratamento	Substrato	Cultura	Temperatura (°C)	pH	Rendimento de H ₂ em termos de hexoses	Referências
Ácido Diluído	1,7% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	Palha de milho	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	60	7,0	2,24 mol.mol ⁻¹	(Cao <i>et al.</i> , 2012)
	1,08% (kg.kg ⁻¹) H ₂ SO ₄	Palha de milho	<i>Clostridium thermocellum</i>	55	6,8	1,67 mol.mol ⁻¹	(Lalaurette <i>et al.</i> , 2009)
	4% (kg.L ⁻¹) HCl	Gramínea	Farelo de cereal	35	7,0	72 L.kg ⁻¹ e	(Cui e Shen, 2012)
	H ₂ SO ₄ (pH 2,5)	Trigo moído	Lodo anaeróbio	55	5,9	2,4 mol.mol ⁻¹	(Cakir <i>et al.</i> , 2010)
	2% (L.L ⁻¹) HCl	Palha de aveia	Lodo anaeróbio	30	5,5	2,90 mol.mol ⁻¹	(Arriaga <i>et al.</i> , 2011)
	4% (kg.L ⁻¹) HCl	Palha de soja	Farelo de cereais	35	7,0	60 L.kg ⁻¹ c	(Han <i>et al.</i> , 2012)
Micro-ondas e ácido	0,5% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	bagaço de cana-de-açúcar	<i>Clostridium butyricum</i>	37	5,5	1,73 mol.mol ⁻¹	(Pattra, Sakchai <i>et al.</i> , 2008)
	1% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	bagaço de cana-de-açúcar	Esterco de elefante	37	6,5	0,84 mol.mol ⁻¹	(Fangkum e Reungsang, 2011)
Ácido concentrado	1,6% (kg.L ⁻¹) H ₂ SO ₄ + 450W	Óleo de tronco de palma	Lodo anaeróbio	55	6,0	0,71 mol.mol ⁻¹	(Khamtib <i>et al.</i> , 2011)
	10% (kg.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	Celulose	<i>Thermotoga neopolitana</i>	80	7,5	0,95 mol.mol ⁻¹	(Nguyen <i>et al.</i> , 2008)
	55% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄	Celulose de algodão	Cultura mista	37	8,2	0,99 mol.mol ⁻¹	(Chu <i>et al.</i> , 2011)
Alcalino	55% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄ , 40°C	Palha de arroz	Lodo	37	7,0	0,44 mol.mol ⁻¹	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
	1% (kg.kg ⁻¹) Ca(OH) ₂	Resíduos de talos de milho	Resíduo de madeira apodrecida	60	7,0	155 L.kg ⁻¹ g	(Cao <i>et al.</i> , 2012)
	NaOH (pH 12,5)	Resíduos de frutas e vegetais	Lodo de esgoto	35	5,6	0,73 mol.mol ⁻¹	(Ruggeri e Tommasi, 2012)
	2% (kg.kg ⁻¹) NaOH	Sabugo de milho	Esterco de laticíneo	36	7,0	14,2 L.kg ⁻¹ d	(Pan <i>et al.</i> , 2010)
Ácido e Alcalino	0,1% (L.L ⁻¹) H ₂ SO ₄ + 0,1% (L.L ⁻¹) NaOH ^a	Óleo de tronco de palma	Lodo anaeróbio	60	6,2	2,24 mol.mol ⁻¹	(Hniman <i>et al.</i> , 2011)
Ácido e Bacteriano	H ₃ PO ₄ + <i>Isolado celulolítico</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>C. butyricum</i>	35	7,5	1,08 mol.mol ⁻¹	(Lo <i>et al.</i> , 2011)

Os resultados dos estudos apresentados na literatura mostram que a produção de hidrogênio pelo processo de fermentação utilizando como substrato os hidrolisados obtidos a partir do pré-tratamento de resíduos é um método promissor para produção de energia renovável. No entanto, foi possível perceber que a grande maioria dos estudos desenvolvidos direcionam suas atenções para avaliação da produção de hidrogênio em um único estágio, não foram encontrados que avaliavam a etapa acidogênica com a etapa metanogênica. Os estudos envolvendo a produção de hidrogênio em escala contínua são mais restritos. Tal fato abre a possibilidade para realização de estudos nesta área, principalmente em sistemas de duas fases, que empregam um reator metanogênico recebendo o efluente do reator acidogênico.

A revisão da literatura também mostra que apesar da existência de estudos envolvendo diferentes tipos de pré-tratamento (auto-hidrólise, explosão a vapor, líquidos iônicos e micro-ondas), grande parte dos estudos ainda contempla o uso de pré-tratamentos clássicos como os ácidos e alcalinos. Além disso, não foram encontrados estudos que avaliassem as características da etapa acidogênica utilizando como substrato o HH obtido pela AH do BC.

4.5.3 Uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise da biomassa lignocelulósica com vistas à produção de biogás (CH₄ e H₂)

Grande parte dos estudos envolvendo o uso da técnica de pré-tratamento por auto-hidrólise da biomassa lignocelulósica visando à produção de biogás (CH₄ e H₂) otimizaram as condições do pré-tratamento com intuito de garantir a produção de hidrolisados com elevados teores de açúcares C5-C6. No entanto, para que tais condições sejam atingidas são necessárias condições extremas de temperatura e tempo de contato, o que inviabiliza o uso do processo em escala industrial. Além disso, nessas condições a produção de compostos tóxicos como os furanos pode ser maximizada, comprometendo a atuação posterior dos micro-organismos produtores de metano e hidrogênio. Outro aspecto da revisão de literatura que merece ser destacado refere-se às poucas referências que discutem a influência de diferentes condições de pré-tratamento por auto-hidrólise na produção de biogás a partir do HH. É necessário dar enfoque à composição ideal do hidrolisado em termos de concentração de açúcares, concentração de oligômeros, lignina solúvel e furanos, para atingir elevados rendimentos de produção de biogás.

Contribuição do Trabalho

O presente trabalho busca avaliar qual condição de pré-tratamento por auto-hidrólise é considerada ideal para produção de CH_4 e H_2 . A avaliação das relações existentes entre as condições do pré-tratamento e a composição ideal para o hidrolisado obtido após o pré-tratamento também será objeto de estudo. A separação espacial da etapa acidogênica da etapa metanogênica juntamente com os efeitos da inclusão dessa etapa na elevação da performance da metanogênese será avaliada. Espera-se que este trabalho forneça informações relevantes sobre as condições de processo mais adequadas à produção de biogás utilizando o HH gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do BC como substrato.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os itens que compõem este capítulo pretendem apresentar as características gerais das principais metodologias e aparatos experimentais utilizados para realização da pesquisa. Os procedimentos usados para caracterização da biomassa, bem como as principais técnicas analíticas e os procedimentos experimentais serão apresentados. Os detalhes associados a cada etapa das investigações serão expostos nos respectivos capítulos.

5.1 Preparo do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana utilizado foi fornecido por Jatiboca Usina de Açúcar e Etanol (Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil), sendo o mesmo pertencente à safra de 2012/2013. O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um processo de lavagem com água destilada a 70°C por um período de 1 h sob agitação mecânica constante. Esse procedimento visou à remoção dos açúcares residuais do processo de moagem da cana-de-açúcar feito pela usina. Após esse procedimento o bagaço de cana-de-açúcar foi armazenado em ambiente com temperatura inferior a 0°C para melhor conservação.

5.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

5.2.1 Determinação do teor de umidade

A determinação dos teores de umidade das amostras foi realizada em balança OHAUS modelo MB25. Cerca de 1 g de amostra foi pesada na balança termogravimétrica. O equipamento aqueceu a amostra até 105°C por um período de tempo até que a variação do teor de umidade fosse mínima, menor que 5%. O teor de umidade foi calculado por meio da equação (5.1)

$$U, \% = \left(\frac{m_{total} - m_{seca}}{m_{total}} \right) \times 100 \quad (5.1)$$

em que U é a umidade da amostra (%), m_{seca} é a massa seca (g) obtida após o teste e m_{total} é a massa total (g) utilizada no teste.

5.2.2 Determinação do teor de extrativos

Para quantificação dos extrativos presentes na biomassa utilizou-se 10,000 g de BC em base seca. A massa de BC foi adicionada em um cartucho especial para extração do tipo Soxhlet, previamente pesado e tarado. Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 125 mL de ciclohexano e 125 mL de etanol (99%). O sistema de extração foi montado e a biomassa foi submetida a uma extração por 48 h. Após a etapa de extração o cartucho juntamente com a biomassa foram lavados com abundância de água (100 mL). Após a lavagem o cartucho foi levado a uma estufa para secagem ajustada em 60°C por 72 h. Após a etapa de secagem o sistema cartucho mais biomassa livre de extrativos foi pesado. Para realização dos cálculos de perda de massa uma amostra de biomassa foi retirada e submetida a análise de umidade. O teor de extrativos foi então determinado por gravimetria.

5.2.3 Determinação do teor de inorgânicos

O teor de inorgânicos (cinzas) da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T211 om-02. Os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 525°C por 4 h e depois resfriados à temperatura ambiente em dessecador e tarados. Cerca de 1,000 g de amostra (40-60 mesh) livre de umidade foi pesada em um cadinho previamente tarado. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Os cadinhos foram aquecidos a 100°C e nessa temperatura permaneceram por 1 h. Após esse tempo a temperatura foi aumentada gradualmente de 50 em 50°C a cada 40 min (rampa de 1,25°C/min.) a fim de carbonizar a amostra suavemente para que não houvesse projeções. Os cadinhos foram mantidos a 525°C por 4 h e resfriados a temperatura ambiente em dessecador. O teor de inorgânicos foi determinado gravimetricamente e calculado segundo a equação (5.2).

$$\text{Inorgânicos, \%} = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (5.2)$$

em que m_f é a massa final (g) após a calcinação e m_i é massa inicial (g) de amostra livre de umidade.

5.2.4 Determinação do teor de lignina

5.2.4.1 Teor de lignina insolúvel pelo método Klason

O teor de lignina insolúvel da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T222 om-02, modificada de acordo com o descrito a seguir. Pesou-se cerca de 0,7133 g (base seca) de bagaço de cana-de-açúcar livre de extrativos previamente moído (40-60 mesh) e transferiu-se para um tubo autoclavável de 500 mL contendo 10,7 mL de solução de ácido sulfúrico 72% ($d = 1,6338 \text{ g/mL}$).

A mistura bagaço/ácido permaneceu em agitação sobre uma chapa magnética por um período de 2 h. Após o término da chamada fase de condensação iniciou-se a etapa de hidrólise. Durante esta etapa o ácido foi diluído a uma concentração de 3% (m/v) adicionando-se aos tubos autoclaváveis 400 mL de água destilada. Posteriormente os tubos foram levados a uma autoclave previamente aquecida a uma temperatura de 121°C , por onde permaneceram por 1 h. Passado a etapa de hidrólise iniciou-se a etapa de filtração. Nesta etapa a solução foi filtrada a quente em funil de placa sinterizada do tipo ASTM 10-15M previamente seco em estufa a 105°C por 1 h e tarado.

O cadinho juntamente com o material insolúvel presente no mesmo foi levado para uma estufa de secagem com recirculação de ar a 80°C por 24 h. Após este tempo, os cadinhos foram levados a um dessecador, onde permaneceram até peso constante. Após esta etapa o cadinho pesado foi levado a mulfla a 525°C por um período de 2 h. Posteriormente os cadinhos foram retirados e levados ao dessacador até peso constante. Isso foi feito para desconsiderar a fração inorgânica insolúvel. Nesta etapa, considerou-se que toda a matéria orgânica perdida no processo de carbonização era lignina insolúvel. O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente e calculado segundo a equação 5.3.

$$\text{Lignina, \%} = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (5.3)$$

em que m_f é a massa de lignina (g) residual e m_i é a massa inicial(g) de amostra livre de umidade.

5.2.4.2 Teor de lignina solúvel

Para determinação do teor de lignina solúvel utilizou-se como amostra o filtrado obtido durante a determinação da lignina insolúvel pelo método Klason. A quantificação da lignina solúvel foi feita por meio de medida de absorbância em 215 nm e 280 nm, seguindo

metodologia adaptada por (Marabezi, 2009). As concentrações de lignina solúvel foram calculadas utilizando a equação 5.4.

$$C(g/L) = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (5.4)$$

A equação 5.4 é resultante da solução simultânea de duas equações:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$$

Sendo:

A_{280} = valores de absorvância da solução a 280 nm.

A_{215} = valores de absorvância da solução a 215 nm.

C_D = concentração de carboidratos (g/L).

C_L = concentração de lignina solúvel (g/L).

Os valores 0,68 e 0,15 são respectivamente as absorvidades molares dos produtos de degradação dos carboidratos (FF e HMF) em 280 nm e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são as absorvidades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente.

5.2.5 Determinação dos teores de celulose e hemiceluloses

Os teores de celulose e hemiceluloses foram determinados pela análise cromatográfica dos componentes da solução resultante do método de determinação do teor de lignina Klason (ver item 5.2.3). Essa determinação foi realizada por meio da detecção dos seguintes compostos no hidrolisado: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroxi metil-2-furfuraldeído (HMF).

As análises dos açúcares foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) modelo SHIMADZU equipado com detector de índice de refração (RID-6A SHIMADZU) e coluna Aminex HPX 87H (300 × 7,8 mm BIO-RAD). A mistura eluente foi composta de ácido sulfúrico 0,005 mol/L e o fluxo no qual o eluente foi bombeado para o sistema foi de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 45°C em um forno modelo CTO-10A SHIMADZU.

As condições cromatográficas para determinação dos ácidos orgânicos, FF e HMF foram iguais às usadas para a determinação dos açúcares. A única mudança foi em relação ao tipo de detector usado para quantificação dos compostos. Os ácidos e aldeídos foram detectados com auxílio de um detector UV-Vis (SPD-10AV SHIMADZU) operado em canal

duplo, sendo o comprimento de onda de 210 nm usado para determinação dos ácidos e o de 274 nm para análise do FF e HMF.

Após a quantificação dos compostos por cromatografia as massas de celobiose e glicose foram convertidas em quantidade de glicanas; as massas de xilose e arabinose em xilanas e arabinanas respectivamente, e a massa de ácido acético convertida em grupos acetila. Além disso, os teores de HMF foram convertidos em glicanas e os de FF em xilanas multiplicando-se a quantidade de HMF e FF pelos fatores de hidrólise 1,286 e 1,375, respectivamente. A conversão dos componentes do hidrolisado em celulose e hemiceluloses foi feita de acordo com as equações 5.5 e 5.6.

$$Celulose, \% = \left\{ \frac{[(0,95C_{celobiose}) + (0,9C_{glicose}) + (3,52C_{ácido\ fórmico}) + (1,29C_{HMF})V_{H_2O+H_2SO_4}]}{m_i} \right\} \times 100 \quad (5.5)$$

$$Polioses, \% = \left\{ \frac{[0,88C_{xilose} + 0,88C_{arabinose} + 1,375C_{furfural}]V_{H_2O+H_2SO_4}}{m_i} \right\} \times 100 \quad (5.6)$$

5.2.6 Balanço de massa

O balanço de massa para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar foi calculado utilizando a equação 5.7.

$$Balanço\ de\ massa, \% = C + P + L_{(insolúvel)} + I \quad (5.7)$$

onde C é o teor de celulose (%), P o teor de polioses (hemiceluloses) (%), L o teor de lignina (solúvel + insolúvel) (%) e I o teor de inorgânicos (%).

5.3 Ensaios de auto-hidrólise

Os ensaios de auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados em dois tipos de reatores tubulares de aço inox 316 L do tipo autoclave com anel de vedação de politetrafluoretileno (PTFE), um de 208 mL de volume útil usado para os ensaios gerados pelo planejamento experimental Doehlert (Pedersen e Meyer) e outro de 475 mL de volume útil usado nos ensaios gerados pela ferramenta de desejabilidade. Para o aquecimento dos reatores durante a etapa de hidrólise utilizou-se um banho termostatizado de 25 L contendo glicerina como fluido de aquecimento. As temperaturas ideais foram programadas e monitoradas com auxílio de um termopar. O conteúdo de água do bagaço de cana foi

contabilizado somente nos balanços de massa. Nos 19 ensaios realizados pelo planejamento experimental Doehlert (Pedersen e Meyer) a massa de BC utilizada foi 10,00 g (base seca). Já para os ensaios gerados pela ferramenta de desejabilidade, a massa de BC utilizada foi de 30,0000 g. Após o pré-tratamento, o reator foi imediatamente resfriado num banho de gelo e aberto, e o BC pré-tratado foi prensado a 9 toneladas em uma prensa hidráulica da marca SOLAB[®]. O volume da fração líquida liberada após prensagem foi medido e posteriormente parte do hidrolisado hemicelulósico (HH) foi filtrado em filtros de nitrocelulose com tamanhos de poros de 0,45 µm. Os filtrados foram submetidos a cromatografia para quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos, FF e HMF conforme a metodologia descrita na seção 5.2.5. Além da caracterização cromatográfica, parte do HH filtrado foi submetido a uma análise de carbono orgânico total solúvel (COT) e lignina solúvel. Uma quantidade de HH sem filtrar foi reservada para os ensaios de DA.

O BC pré-tratado (fração sólida) foi seco (sem lavagem após prensagem) numa estufa de circulação forçada de ar a 85°C durante 24 h, transferida para um dessecador para resfriar e depois pesada. A perda de massa (PM) foi determinada gravimetricamente e a remoção de hemiceluloses (RH) foi estimada usando a Eq. 6.8.

$$RH \% = \left\{ \frac{HC_{SB} - [HC_{AH-BC} (Y_{AH-BC}/100)]}{HC_{BC}} \right\} \times 100 \quad (4.8)$$

em que RH é remoção de hemiceluloses (%), HC_{AH-BC} e HC_{BC} são os conteúdos de hemiceluloses no BC após e antes da AH, respectivamente, e Y_{AH-BC} (%) é o rendimento da AH ($Y = 100 - PM$).

5.4 Químicos

Os reagentes usados durante a execução do trabalho foram ciclohexano, etanol (99,5%) e ácido Sulfúrico (95-98%), todos adquiridos da empresa Synth (Brasil). Padrões cromatográficos como celobiose (cel), D-glicose (Glic), D-xilose (Xil), L-arabinose (Arab), ácido acético (HAc), fórmico (HFor), propiônico (HProp), isobutírico (HIso), butírico (HBut), valérico (HVal), isovalérico (HIso), 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Brasil).

5.5 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

A concentração de carbono orgânico total (COT) nos hidrolisados provenientes da AH foi determinada utilizando um equipamento analisador de COT solúvel modelo TOC-L CPH/PCN da marca SHIMADZU.

Os xilo-oligômeros (XOS) presentes nos hidrolisados foram determinados tal como descrito na metodologia NREL LAP-015. Os XOS foram hidrolisados por meio de um tratamento ácido de uma amostra de hidrolisado nas seguintes condições: razão hidrolisado/água de 1:10 (v/v), 4% em peso H_2SO_4 a $121^\circ C$ durante 1 h. Os produtos gerados após o tratamento ácido tais como açúcares, ácidos, FF e HMF foram quantificados de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 5.2.5. O teor de XOS foi estimado a partir da diferença observada na concentração de açúcares monoméricos e produtos de degradação dos açúcares encontrados nos hidrolisados, antes e depois do tratamento ácido. Os teores de açúcares, furanos e ácidos foram determinados de acordo com metodologia descrita no item 5.2.5.

5.6 Quantificação do biogás

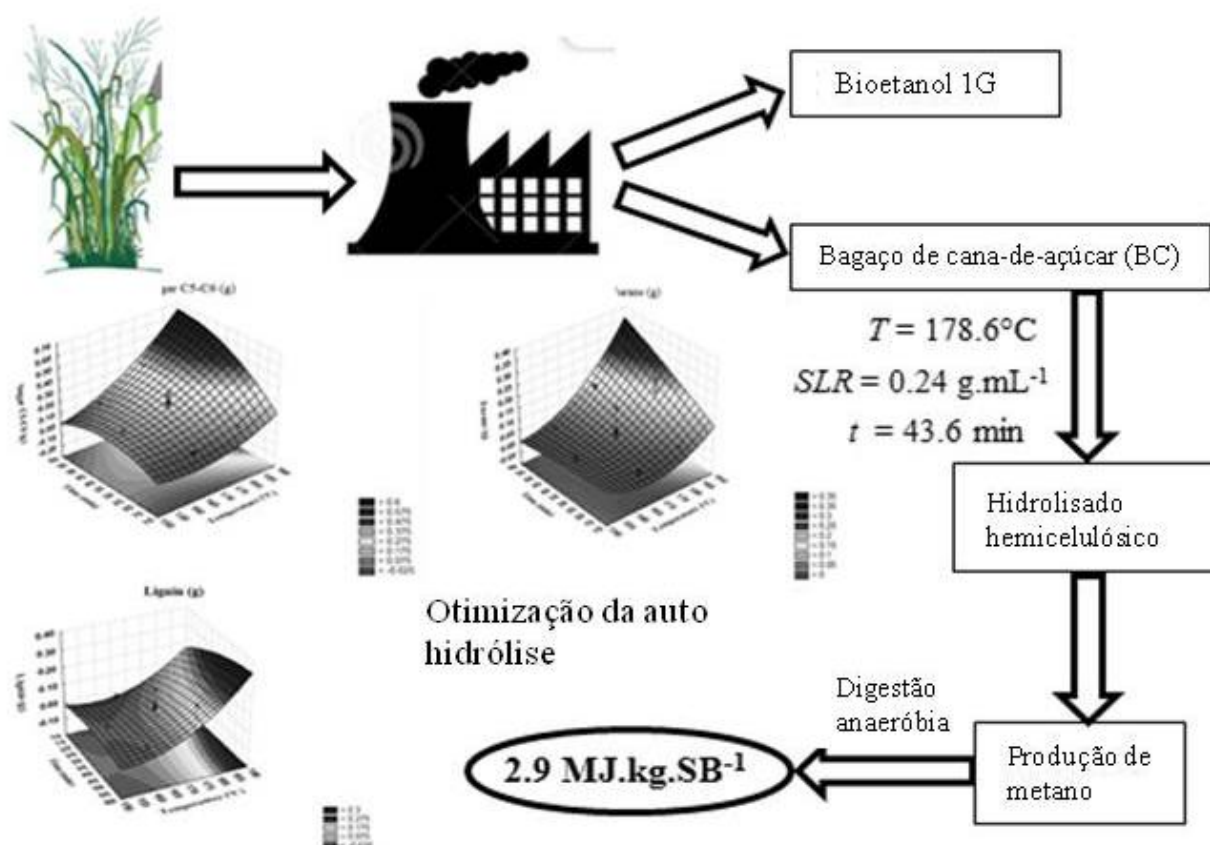
A produção de biogás foi monitorada até a estabilização e a composição do gás foi medida por um cromatógrafo gasoso (CG) SHIMADZU, modelo 2014, equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de peneira molecular (5A) da Marc Restek preenchida com fase estacionária Msieve 5Å. Todos os valores de potencial bioquímico de metano (PBM) e hidrogênio (PBH) ($Nm^3.kg\ COT^{-1}$) estão apresentados sob condições normais de temperatura e pressão (CNTP: 273K; 101315 Pa).

6 OTIMIZAÇÃO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO EM UM CONCEITO DE BIORREFINARIA

Destaques do trabalho

- A AH do BC foi otimizada pelo planejamento experimental para se obter o hidrolisado hemicelulósico com maior capacidade de produção de CH₄;
- Condições intermediárias de AH (178,6°C; 43,6 min e *RSL* = 0,24) mostraram-se mais eficientes para gerar hidrolisados hemicelulósicos para produção anaeróbia de CH₄;
- A melhor produção de metano foi de 1,56 Nm³ CH₄. kg COT⁻¹, a qual pôde potencialmente gerar 2,9 MJ .kg BC⁻¹.

Figura Resumo



6.1 Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo, otimizar a partir de um planejamento experimental as variáveis operacionais temperatura (T), tempo (t) e razão sólido-líquido (RSL) para a auto-hidrólise (AH) do bagaço de cana-de-açúcar (BC), visando produzir um

hidrolisado hemicelulósico (HH) com características propícias para digestão anaeróbia (DA) e produção bioquímica de metano (PBM). Os resultados indicaram que os HH gerados em condições severas de AH com maior solubilização de hemiceluloses e com maiores teores de açúcares, C5-C6, não foram os mais adequados para produção de metano. Provavelmente isto tenha ocorrido pelo acúmulo de compostos tóxicos e/ou recalcitrantes (furanos e fragmentos de lignina). Condições mais moderadas (170°C, 35 min e $RSL = 0,33 \text{ g BC.mL H}_2\text{O}^{-1}$) geraram um HH com maior PBM ($0,79 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4. \text{ kg COT}^{-1}$), o que foi confirmado pela ferramenta estatística de desejabilidade. O HH obtido a partir da condição DC2 do modelo de desejabilidade (178,2°C, 43,6 min e $RSL = 0,24 \text{ g BC .ml H}_2\text{O}^{-1}$) apresentou as menores concentrações de compostos tóxicos, o que culminou com menor acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) e maiores PBM ($1,56 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4. \text{ g COT}^{-1}$) durante a DA. O modelo de Gompertz foi usado para ajustar os dados de produção de CH₄ durante a DA. O melhor HH apresentou uma taxa máxima de produção de metano (R_{CH_4}) de $2,6 \text{ mmol CH}_4.\text{d}^{-1}$.

6.2 Introdução

Conforme dito anteriormente grande parte da energia mundial advém dos combustíveis fósseis. Os compromissos relacionados ao meio ambiente vêm forçando a atenção de pesquisadores no que tange ao desenvolvimento de fontes de energias alternativas renováveis. Na verdade, o uso de recursos renováveis para produção de energia tem sido fortemente encorajado em todo o mundo (Cherubini & Jungmeier, 2009).

A AH do BC, objeto de estudo deste trabalho, gera um HH rico em açúcares C5, principalmente xilose e arabinose, que não podem ser facilmente convertidos em etanol por meio de processos bioquímicos utilizando leveduras convencionais (Kaparaju, Serrano, Thomsen, *et al.*, 2009). A utilização do HH para a produção de bioetanol 2G normalmente requer o desenvolvimento de micro-organismos geneticamente modificados que possam assimilar pentoses (Rabelo *et al.*, 2011). Sendo assim, uma alternativa para melhor aproveitar o HH é a produção de biometano por meio da digestão anaeróbia (DA). Tal alternativa pode ser parte de uma solução energética viável e sustentável para a integração da produção do bioetanol de 1G e 2G nas indústrias de açúcar e álcool.

A maioria dos estudos apresentados na revisão da literatura foca seus esforços em avaliar a capacidade de produção de CH₄ a partir de toda a biomassa pré-tratada, não fazendo distinção entre o uso da fração sólida e do HH. O uso de todo material pré-tratado para a

produção de CH₄ dificulta a utilização racional e eficiente de todas as frações presentes na biomassa.

Diante disto, este estudo teve como objetivo avaliar qual a condição de pré-tratamento por AH do BC é capaz de gerar um HH passível de ser utilizado como substrato para produção de CH₄ por meio da DA clássica. Somado a isso, o presente estudo mostra o efeito que a otimização das condições para a AH do BC possui quando deseja-se utilizar, além do HH para produzir CH₄ por DA, a fração sólida rica em celulose para processos futuros.

Outro ponto abordado foi a necessidade da inclusão de outras variáveis respostas além da quantidade de açúcar presente no HH na otimização do processo. Por meio do uso de um planejamento experimental Doehlert (PED), que incluiu as variáveis respostas furanos e lignina solúvel (LS) presentes no HH foi possível encontrar a faixa ótima de trabalho para AH objetivando usar o HH como substrato na DA.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Planejamento experimental e análise estatística

As condições da auto hidrólise para o BC foram otimizadas por meio do PED não ortogonal. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura (T , °C), tempo (t , min) e a razão sólido líquido (RSL , g.mL⁻¹). As variáveis dependentes monitoradas no HH durante o estudo foram massa de açúcares C5-C6 ($Y1$ – glicose + xilose + arabinose), furanos ($Y2$ - FF + HMF), lignina solúvel ($Y3$ - LS) e xilo-oligômeros presentes no HH ($Y4$ - XOS). Os níveis de cada variável independente usada no PED e as condições experimentais empregadas em cada ensaio de AH podem ser vistas na Tabela 6.1.

A análise estatística foi realizada com um nível de significância de 95% e uma superfície de resposta foi construída para as quatro variáveis dependentes (VD) utilizando a Eq. 6.1. Os valores de todos os coeficientes descritos na Eq. 6.1 para cada VD estão apresentados na Tabela 6.2, assim como os ajustes dos modelos quadráticos.

$$VD = b_0 + b_1(RSL) + b_2(T) + b_3(t) + b_{11}(RSL^2) + b_{22}(T^2) + b_{33}(t^2) + b_{12}(RSL \times T) + b_{13}(RSL \times t) + b_{23}(T \times t) \quad (6.1)$$

Tabela 6.1: Níveis de cada parâmetro considerado durante o planejamento experimental Doehlert e as condições experimentais para otimizar a AH do BC e a composição da química do HH após o pré-tratamento.

Variável	Níveis de razão sólido-líquido (<i>RSL</i>)					
<i>RSL</i> (g.mL ⁻¹)	-1	-0,5	0	0,5	1	
	0,111	0,167	0,222	0,278	0,333	
	Níveis de temperatura (<i>T</i>)					
<i>T</i> (°C)	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577
	155	160,0	165,0	170,0	175,0	180,0
			Níveis de tempo (<i>t</i>)			
<i>t</i> (min)			-0,817	0	0,817	
			15	35	55	
Experimentos	<i>RSL</i> (g.mL ⁻¹)	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)			
1	0,333	170,0	35			
2	0,278	185,0	35			
3	0,278	175,0	55			
4	0,111	170,0	35			
5	0,167	155,0	35			
6	0,167	165,0	15			
7	0,278	155,0	35			
8	0,278	165,0	15			
9	0,167	185,0	35			
10	0,222	180,0	15			
11	0,222	175,0	55			
12	0,222	160,0	55			
13	0,222	170,0	35			
14	0,222	170,0	35			
15	0,222	170,0	35			
16	0,222	170,0	35			
17	0,222	170,0	35			
18	0,222	170,0	35			
19	0,222	170,0	35			

Tabela 6.2: Coeficientes de regressão para variáveis dependentes consideradas no planejamento Doehlert

Coeficientes	C5-C6	Furanos	Lignina solúvel	XOS
<i>b</i> ₀	0,223514	0,052686	5,354427	-12,9373
<i>b</i> ₁	-0,048500	-0,037637	1,968063	-33,4485
<i>b</i> ₁₁	0,017418	0,031882	6,489400	38,0582
<i>b</i> ₂	0,309625	0,156938	-0,068675	0,1255
<i>b</i> ₂₂	0,112304	0,091196	0,000236	-0,0002
<i>b</i> ₃	0,190647	0,080940	-0,015451	0,1647
<i>b</i> ₃₃	-0,148284	-0,007526	-0,000052	-0,0002
<i>b</i> ₁₂	-0,051650	-0,018350	-0,034931	0,0718
<i>b</i> ₁₃	0,011687	0,000924	0,024640	0,1676
<i>b</i> ₂₃	0,139880	0,087546	0,000089	-0,0011
<i>R</i> ²	0,976	0,954	0,968	0,860

Após a análise e entendimento dos resultados obtidos pelo PED, a ferramenta estatística de desejabilidade foi utilizada. Tal ferramenta estatística tem o objetivo de prever os valores das variáveis independentes de um sistema em função do nível de desejabilidade de cada variável dependente. Para tanto faz-se necessário atribuir valores de pontuação para cada variável. Esta pontuação varia de 0 a 1, sendo 0 muito indesejável e 1 muito desejável.

Neste estudo a ferramenta de desejabilidade foi usada com o objetivo de avaliar o efeito dos teores de açúcares C5-C6, furanos e lignina solúvel presentes no HH na DA. As pontuações de desejabilidade utilizadas para cada uma das variáveis dependentes podem ser vistas na Tabela 6.3. Nesta tabela é possível observar que foi mantida a pontuação de muito desejável (1) para a produção de açúcares C5-C6 em todas as situações estudadas, pois a máxima produção destes compostos consiste na condição ideal para os micro-organismos. Além disso, também é possível perceber que as pontuações usadas para os furanos e LS alternaram-se em (0) e (1). A condição DC1 considerou valores muito desejáveis (1) para as três variáveis dependentes, e isto foi pensado com intuito de avaliar a ação sinérgica desses compostos. Por outro lado, na condição DC2 pensou-se em obter uma condição livre dos compostos prejudiciais ao sistema, valores muito indesejáveis (0) para furanos e LS foram adotados. Para as condições DC3 e DC4 pensou-se em uma alternância entre o valor muito desejável (1) e muito indesejável (0) para furanos e LS, possibilitando a investigação da influência de cada uma dessas variáveis sobre o sistema.

A partir das pontuações atribuídas a cada uma das três variáveis dependentes em cada uma das quatro condições, a ferramenta de desejabilidade gerou os valores de saída para as *VD RSL*, *T* e *t* que retratam as condições de desejabilidade pré-estabelecidas para respeitar os níveis almejados de açúcares C5-C6, furanos e LS. Em seguida, foram realizados os pré-tratamentos de acordo com as diretrizes dadas pela ferramenta de desejabilidade e, ao final foram medidos os valores de açúcares C5-C6, furanos e LS encontrados. Tanto a concepção experimental quanto a ferramenta de desejabilidade foram executados utilizando o programa Statistica® (versão 10.0).

Tabela 6.3: Condições do pré-tratamento por AH e composição do HH gerado pelas condições de desejabilidade

Condição	Condições desejadas ^a (valores de entrada)			Condições decodificadas gerada pela ferramenta de desejabilidade (valores de saída)		
	C5-C6	Furanos	LS	RSL(g,mL ⁻¹)	T (°C)	t (min)
DC1	1	1	1	0,14286	185,0 (± 1,0)	55,00
DC2	1	0	0	0,23809	178,6 (± 1,0)	44,00
DC3	1	1	0	0,19047	178,6 (± 1,0)	55,00
DC4	1	0	1	0,25397	182,9 (± 1,0)	41,00

^aDados de entrada codificados: 0 – presença em menor quantidade 1– presença em maior quantidade

6.3.2 Ensaio de lavagem do BC pré-tratado para remoção de açúcares residuais

Conforme dito anteriormente, na etapa de pré-tratamento por AH os grupos acetila das ramificações das cadeias de xilanas são hidrolisados. Isto provoca a liberação de ácido acético no meio que catalisa as reações de hidrólise das hemiceluloses gerando oligômeros e açúcares. No entanto, sabe-se que durante esse processo uma parte dos açúcares monoméricos C5 formados não são solubilizados para o HH. Tal fato acarreta em uma diminuição do teor de tais compostos no HH.

Considerando que estes compostos são substratos passíveis de serem utilizados numa DA, uma avaliação sobre a necessidade da inclusão de uma etapa de lavagem após o pré-tratamento foi necessária. Isto ocorreu comparando-se os cromatogramas de amostras geradas após sucessivas lavagens com H₂O. As lavagens foram realizadas para duas condições de AH. As condições escolhidas para a realização de tal estudo foram as condições 2 e 9 do PED.

A escolha de tais condições foi baseada no fato de que as mesmas foram as que apresentaram maiores solubilizações de hemiceluloses (ver Tabela 6.4) e conseqüentemente maiores liberações de açúcares C5 durante o processo de hidrólise das hemiceluloses. Além disso, a comparação entre as mesmas permite avaliar a influência da quantidade de água na solubilização de tais compostos, uma vez que a única diferença entre elas é a quantidade de água usada durante o pré-tratamento.

Ambas as condições foram realizadas a 185°C e 35 min, no entanto, para a condição 9 a quantidade de água usada durante a AH foi de 5,98 mL por grama de BC, enquanto que para condição 2 utilizou-se 3,59 mL por grama de BC. O volume de H₂O usado na lavagem foi de 60 mL e o mesmo foi fracionado em 4 lavagens de 15 mL. Após cada lavagem de 15

mL, as amostras da fração líquida foram coletadas e submetidas a cromatografia para quantificação dos açúcares e furanos, conforme descrito na seção 5.3.2.

6.3.3 Biodegradabilidade Anaeróbia

Os testes de digestão anaeróbia em batelada foram realizados em triplicatas para avaliar o potencial bioquímico de metano (PBM) dos HH obtidos a partir da AH do BC. Um teste controle, sem substrato, também foi incluído nos ensaios para verificar a atividade metanogênica do inóculo. Todos os experimentos foram realizados em condições mesofílicas em reatores de vidro de 275 mL que foram colocados num agitador orbital termostatizado ($35,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) a 200 rpm. O volume de trabalho foi de 150 mL, sendo 125 mL dedicados ao *head space*. O inóculo anaeróbico usado para os testes de PBM foi obtido a partir de um reator UASB alimentado com esgoto sanitário operado em escala de demonstração no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG-COPASA. O inóculo foi previamente incubado por quatro dias a 35°C para eliminar a produção de metano a partir da biodegradação de qualquer material orgânico residual.

Uma amostra de HH de 15,0 mL foi adicionada aos frascos de vidro para manter uma razão alimentação/micro-organismo de $0,4 \text{ g COT.gSSV}^{-1}$. Esta relação foi obtida a partir de um estudo em que variou-se esta variável em 3 níveis (0,2; 0,4 e $0,8 \text{ g COT.gSSV}^{-1}$). Cada frasco continha volumes variados de inóculo dependendo da concentração de COT no HH. Em cada experimento, adicionou-se uma solução contendo bicarbonato de sódio (tampão) e micro- e macronutrientes. A concentração destes compostos variou e foi determinada para cada experimento com intuito de manter uma proporção mínima de COT:N:P de 350:5:1 de acordo com Baêta *et al.* (2013).

6.3.4 Modelagem dos dados experimentais

O modelo de Gompertz modificado foi utilizado para modelar os dados experimentais obtidos nos testes de PBM. A máxima produção acumulada de metano (PAM) foi obtida pela regressão sigmoideal não linear do modelo de Gompertz modificado de acordo com a Eq. 6.2

$$PAM = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{Re}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (6.2)$$

em que P é a produção potencial de metano (mmol CH_4), R é a máxima taxa de produção de metano ($\text{mmol CH}_4 \text{ h}^{-1}$), λ é o tempo da fase “lag” (d) e e é $\exp(1)$ (Lay, 2000).

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Caracterização do bagaço de cana

A composição química do BC usado neste estudo foi de 44,16% de celulose, 23,61% de hemiceluloses, 25,79% de lignina, 2,22% de extrativos e 1,45% de cinzas (inorgânicos). Essa composição está de acordo com aquela encontrada por outros autores (Vallejos *et al.*, 2012). A Tabela 5.4 mostra os balanços de massa para os BC pré-tratados pela AH nas 19 condições geradas pelo PED e das 4 condições geradas pela ferramenta de desejabilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 6.4 mostram que os balanços de massa dos BC pré-tratados foram coerentes, sendo possível determinar as composições dos BC com boa exatidão. Os balanços de massa para todas as condições fecharam em valores entre 90-110%, valores considerados bons, haja vista a complexidade do material, e as diferentes metodologias utilizadas para determinação da composição química.

Tabela 6.4: Composição dos BCs pré-tratados, perda de massa (%) e rendimento de solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após as condições de AH geradas pelo PED e desejeabilidade.

Experimentos PED	Composição fração sólida				Rendimentos da AH				Características HH			
	Celu (%)	Hemi (%)	Lig (%)	BM ^a (%)	PM ^b (%)	RC ^c (%)	RH ^d (%)	RL ^e (%)	C5-C6 (g)	Furanos (g)	LS ^f (g)	XOS ^g (g)
1	54,66	16,59	24,47	95,72	16,45	5,60	57,01	4,15	0,195	0,060	0,09	1,02
2	58,32	13,67	26,80	98,79	27,10	12,12	69,09	8,41	0,387	0,170	0,18	1,23
3	59,36	12,85	25,56	96,77	23,91	6,64	68,67	8,82	0,328	0,144	0,19	1,33
4	59,49	21,47	24,80	105,76	20,35	2,06	46,96	7,39	0,322	0,173	0,16	0,86
5	51,59	29,93	22,80	104,32	6,96	0,79	13,63	0,55	0,138	0,041	0,01	0,03
6	49,96	31,79	22,20	103,95	4,50	1,38	5,83	0,60	0,042	0,020	0,01	0,02
7	51,86	31,64	22,90	106,40	7,47	0,81	9,19	0,66	0,113	0,025	0,01	0,01
8	50,12	31,26	22,60	103,98	5,76	2,37	8,62	0,15	0,056	0,023	0,00	0,03
9	61,20	7,82	26,10	95,12	29,51	10,84	82,90	13,75	0,516	0,222	0,29	1,01
10	51,98	20,44	23,10	95,52	10,05	3,35	42,97	2,58	0,119	0,045	0,06	0,87
11	59,98	16,18	28,30	104,46	26,19	8,49	62,95	2,07	0,325	0,152	0,04	0,48
12	55,90	16,98	24,70	97,58	14,38	1,07	54,90	0,85	0,136	0,035	0,02	0,34
13	54,00	22,69	24,85	101,54	16,73	7,06	41,38	2,99	0,235	0,069	0,06	0,41
14	54,50	20,67	25,42	100,59	17,91	7,53	47,37	2,18	0,240	0,071	0,05	0,49
15	54,12	18,87	25,23	98,22	17,50	7,71	51,71	2,42	0,285	0,080	0,05	0,63
16	54,20	17,54	24,95	96,69	16,52	6,48	54,58	2,35	0,181	0,051	0,05	0,58
17	57,21	13,20	25,46	95,87	18,45	3,57	66,61	2,66	0,175	0,027	0,06	0,54
18	56,51	14,81	25,58	96,90	18,83	5,19	62,71	2,66	0,227	0,034	0,06	0,44
19	55,20	15,98	25,05	96,23	16,94	5,23	58,83	2,45	0,223	0,037	0,05	0,43

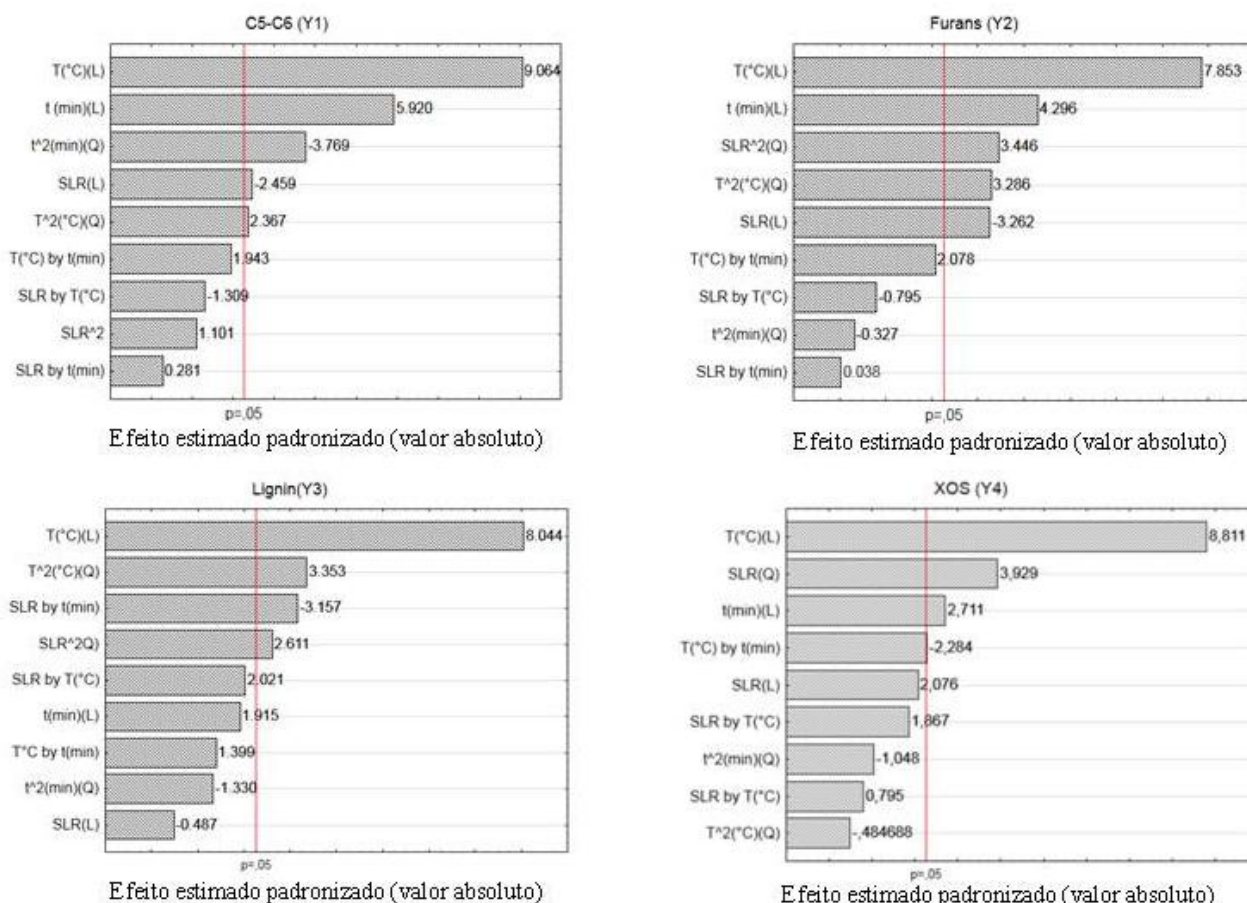
Experimentos Desejeabilidade	Composição fração sólida				Rendimentos da AH				Características HH		
	Celu (%)	Hemi (%)	Lig (%)	BM ^a (%)	PM ^b (%)	RC ^c (%)	RH ^d (%)	RL ^e (%)	C5-C6 (g)	Furanos (g)	LS (g)
DC1	59,28	11,16	26,52	96,97	28,22	3,64	66,07	26,17	1,07	0,33	2,02
DC2	58,97	17,26	34,61	110,84	30,23	6,83	48,99	6,34	0,57	0,08	0,49
DC3	56,06	7,58	29,65	93,29	29,60	10,63	77,40	19,06	0,94	0,27	1,44
DC4	59,25	8,74	29,77	97,79	29,50	5,41	73,90	18,62	0,87	0,24	1,47

^ateores de celulose (%) + hemiceluloses (%) + lignina (%); ^bperda de massa após a AH; ^cremoção celulose (%); ^dremoção hemiceluloses (%); ^eremoção lignina (%), ^flignina solúvel, ^gxilo-oligômero solúvel

6.4.2 Auto-hidrólise do bagaço de cana

A otimização do pré-tratamento por AH do BC foi feita utilizando as seguintes variáveis respostas: quantidade de açúcares C5-C6 (Y1), furanos (Y2), lignina solúvel (LS) (Y3) e xilos-oligômero solúveis (XOS) (Y4) nos HH. Essas variáveis foram escolhidas por existir uma relação direta entre elas e o processo de DA do hidrolisado. Como a otimização buscou um aumento na produção de metano, foi importante definir as condições da AH que permitiram uma efetiva liberação de açúcares C5-C6 concomitantemente com uma geração pequena de compostos tóxicos/recalcitrantes como os furanos e LS. Os efeitos significativos estatisticamente das variáveis independentes (*T*, *t* e *RSL*) durante a AH do BC nas variáveis dependentes Y1, Y2, Y3 e Y4 podem ser observados na Figura 6.1.

Figura 6.1: Diagrama de Pareto para o pré-tratamento por AH do BC considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes razão sólido-líquido (RSL), temperatura (T) e tempo (t) nos tores de açúcares C5-C6 (Y1), furanos (Y2), lignina solúvel (Y3) e XOS (Y4) no hidrolisado.



O diagrama de Pareto (Figura 6.1) mostra que a variável temperatura (T), assim como o seu efeito ao quadrado (T^2), e a variável tempo (t) tem um efeito positivo significativo sobre a variável dependente teor de açúcares C5-C6. É possível perceber que o valor padronizado do efeito da temperatura foi o mais pronunciado (9,064) quando comparado com os efeitos obtidos por outras variáveis independentes ($t = 5,920$; $T^2 = 2.367$).

Os maiores teores de açúcares C5-C6 encontrados em elevadas temperaturas são resultado da elevada solubilização da hemiceluloses e celulose, por exemplo, durante o PED e os ensaios gerados pela ferramenta de desejabilidade, os maiores valores de remoção de hemiceluloses (PED = 82,90% e desejabilidade = 77,40%) foram encontrados em condições de AH com maiores temperaturas (PED = ensaio 9 e desejabilidade = DC3).

Uma possível explicação para isto é a influência da temperatura e do tempo sobre o pH do meio, mais especificamente sobre a concentração de ácido acético (HAc). De acordo

com Costa, A. G. *et al.* (2014), o HAc produzido pela clivagem dos grupos acetila presentes nas hemiceluloses pode agir como um catalisador para as reações de hidrólise das hemiceluloses, contribuindo dessa forma para o aumento da liberação de açúcares.

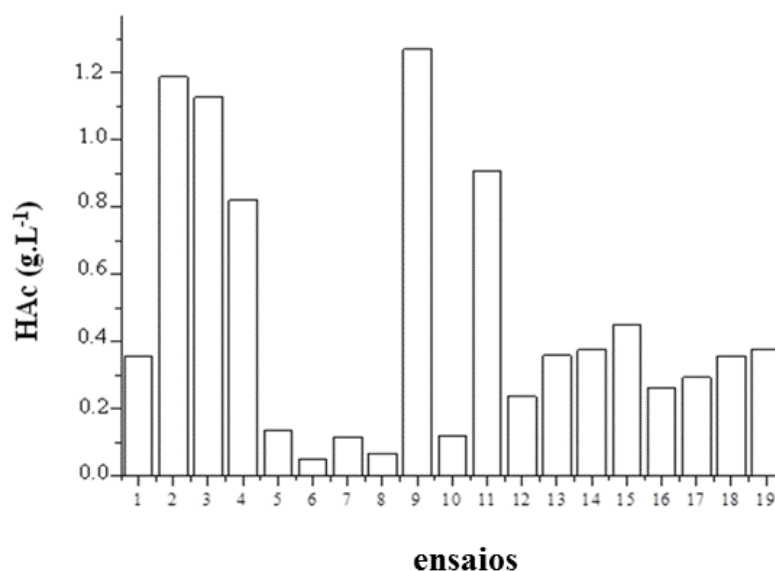
Outra evidência de que em elevadas temperaturas a solubilização das hemiceluloses é favorecida é o efeito significativo positivo desta variável ($T = 8,81$) na solubilização dos xilooligômeros (ver Figura 6.1). Isto mostra que o aumento da temperatura é responsável por facilitar as reações de hidrólise das hemiceluloses, aumentando a geração de oligômeros solúveis no HH. O aumento da temperatura conforme já discutido tem um papel importante na liberação de grupos acetila e conseqüentemente nas reações de hidrólise das hemiceluloses. Além da variável temperatura, o efeito da variável tempo sobre a solubilização de XOS também mostrou-se positivo (2,71), indicando que o aumento do tempo favoreceu as reações de hidrólise das xilanas presentes na fibra aumentando a chance de solubilização dos xilooligômeros formados para o HH. No entanto, a interação das variáveis $T \times t$ apresentou efeito negativo (-2,28) na presença de oligômeros solúveis, ou seja, maiores temperaturas e maiores tempos diminuem a quantidade de XOS no HH. Uma possível explicação é o fato de que em condições com elevadas temperaturas e tempos, maior severidade, parte dos XOS presentes na solução ficam mais disponíveis para sofrerem reações de hidrólise em um hidrolisado com características ácidas, aumentando então a probabilidade de formação de açúcares C5 e conseqüentemente elevando as chances de formação de FF a partir das reações de desidratação desses açúcares.

Na Figura 6.2, que mostra a concentração de HAc obtido nos HH gerados pelas condições de pré-tratamento por AH do PED, é possível perceber que as concentrações mais acentuadas de HAc foram observadas para maiores temperaturas e tempos (ensaio 9, $T = 185^{\circ}\text{C}$ e $t = 35$ min; ensaio 2, $T = 185^{\circ}\text{C}$; $t = 35$ min). Além disso, o aumento do tempo de contato juntamente com a temperatura contribui para o aumento da solubilização da celulose e conseqüentemente para maiores liberações de açúcares C6 (glicose) no HH, conforme pode ser visto na Tabela 6.4.

Apesar dos baixos valores de remoção de celulose observados durante o pré-tratamento por AH, os dados reportados na Tabela 6.4 mostram que maiores tempos e temperaturas implicam em maiores solubilizações da celulose. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores como Vallejos *et al.* (2012). A relação direta entre T , t , HAc e açúcares C5-C6 durante a AH do BC observadas neste estudo estão de acordo com as sugeridas por outros autores. Boussarsar *et al.* (2009) mostraram que a

acumulação máxima de açúcar pode ocorrer em temperaturas e tempos de contato superiores a 190°C e 60 min.

Figura 6.2: Concentração de HAc no HH obtido durante o pré-tratamento por AH.



Somado aos efeitos de T e t , é possível perceber na Figura 6.1 que a RSL teve um efeito negativo sobre a concentração de açúcares C5-C6. Isto implica em dizer que condições com maiores quantidades de água podem resultar em maiores teores de açúcares no HH. Tal ponto pode ser facilmente explicado avaliando a diferença na remoção de hemiceluloses entre as condições 2 e 9 geradas pelo PED. As duas condições foram realizadas com a mesma temperatura (185°C) e tempo (35 min), sendo a RSL (ensaio 2 = 0,278 g BC.mL H₂O⁻¹ e ensaio 9 = 0,167 g BC.mL H₂O⁻¹) a única diferença entre as mesmas.

A condição do ensaio 9 com maior remoção de hemiceluloses (82,9 %) foi a que utilizou maior quantidade de H₂O, 5,99 mL para cada g de BC. No ensaio 2 no qual usou-se 3,59 mL de H₂O por g de BC, o valor de remoção de hemiceluloses foi de aproximadamente 69,09 %, isto evidencia que maiores quantidades de água no processo de AH estão atrelados a maiores rendimentos de solubilização de hemiceluloses.

A maior eficiência de hidrólise das hemiceluloses em meios com maiores quantidades de H₂O pode ser explicada pelo fato da H₂O atuar como um nucleófilo durante o processo de AH. Além disso, as reações que ocorrem durante o processo são reações de hidrólise, portanto, maiores quantidades de água fazem-se necessárias para que as reações possam

ocorrer de forma eficiente, promovendo uma maior solubilização de oligômeros, monossacáridos (xilose e arabinose) e geração de HAc.

Ao avaliar o efeito das variáveis independentes sobre os níveis de furanos (Figura 6.1), é possível perceber que os maiores efeitos estão relacionados com as variáveis T (9,9616) e t (6,1942). Estes resultados são semelhantes aos observados para os açúcares C5-C6. Da mesma forma que um aumento na temperatura e tempo contribuem positivamente para as reações de hidrólise dos carboidratos. Alguns autores como Liu (2010) apontam que em meio ácido e com maiores temperaturas e tempo, as reações de decomposição dos carboidratos a FF e HMF são pronunciadas. Sendo assim, elevadas temperaturas e tempos podem acarretar no aumento de compostos indesejáveis no HH. No entanto, caso o HH seja utilizado como substrato em bioprocessos faz-se necessário avaliar o nível de tolerância dos micro-organismos a essas substâncias.

O efeito da variação da RSL nos teores de furanos foi significativo e teve um valor negativo. Isto implica em dizer que o aumento do valor desta variável, ou seja, menores valores de água provoca a diminuição da quantidade de furanos no HH. Em outras palavras o uso de maiores quantidades de água durante o pré-tratamento por AH provoca a diminuição dos furanos. Como o efeito desta variável é negativo e o aumento da quantidade de água diminui o valor da mesma, é possível dizer que maiores teores de água elevam a quantidade dos produtos de degradação dos açúcares no hidrolisado.

O efeito da RSL no teor de furanos em condições de maior temperatura e tempo pode ser observado comparando-se os teores de furanos em massa encontrados nos hidrolisado produzidos pelos ensaios 2 e 9 gerados pelo PED. A Tabela 6.4 mostra que a condição 9, que utilizou a maior quantidade de água gerou um HH com 0,222 g de furanos, enquanto que a condição 2 que utilizou menor quantidade de água gerou um HH com 0,170 g de furanos.

Como os valores de RSL menores provocam uma maior geração de açúcar e furanos concomitantemente, a otimização dessa variável durante o pré-tratamento por AH deve sempre procurar o compromisso entre a economia de água, aumento da geração de açúcares C5-C6 e menor produção de furanos. A análise do efeito dessa variável é muito importante devido aos propósitos que devem ser alcançados pelo processo de AH em uma biorrefinaria lignocelulósica, que é o menor consumo de água e a menor geração de resíduos. Além disso, os poucos estudos que procuraram avaliar o efeito da RSL no pré-tratamento por AH de

biomassas lignocelulósicas para aplicação em biorrefinarias sustentáveis não apresentaram conclusões claras sobre o efeito dessa variável (Jacobsen e Wyman, 2002).

Quanto ao comportamento do sistema em relação ao teor de lignina solúvel (LS) presente no HH fica claro que apesar dos baixos valores de solubilização deste polímero quando comparado a remoção de hemiceluloses (ver Tabela 6.4), a variável T e o seu termo quadrático (T^2) apresentaram um efeito positivo sobre a remoção da lignina. Em temperaturas superiores e em meio ácido as ligações químicas da lignina tais como α -O-4 e β -O-4 podem ser rompidas, permitindo as reações de condensação e a modificação da lignina na parede celular da planta. Apesar da baixa solvência do meio para estes compostos alguns fragmentos de lignina que não se submeteram as reações de condensação podem ser solubilizados no HH.

Além do efeito da temperatura na solubilização da lignina, o efeito combinado da variável RSL e tempo também mostrou-se significativo. O diagrama de Pareto (Figura 6.1) mostra que a combinação da $RSL \times t$ apresenta efeito significativo negativo (-3,157) na solubilização da lignina. Isto implica em dizer que processos realizados com baixas quantidades de água e elevados tempos dificultam a solubilização de fragmentos de lignina para o HH.

Tal fato é facilmente explicado se considerarmos que em elevadas temperaturas a liberação de HAc para o meio aumenta. Em condições com menores quantidades de H₂O a concentração de íons H₃O⁺ é maior, e isto provoca a diminuição do pH, o que conseqüentemente resulta em uma maior efetividade das reações de fragmentação da lignina. No entanto, para que os fragmentos de lignina formados se solubilizem, é necessário que os mesmos apresentem baixa massa molar e que ainda possuam grupamentos fenólicos para interagirem com as moléculas de H₂O do meio. Caso isto não ocorra, o aumento da variável tempo provocará a repolimerização da lignina na superfície da fibra, culminando então com menores quantidades de fragmentos de lignina solúvel no HH.

Com o intuito de avaliar o grau de modificação química da lignina após o pré-tratamento térmico da biomassa, alguns autores como Ko *et al.* (2015) utilizam a razão entre a lignina ácido insolúvel (LAI) e lignina ácido solúvel (LAS) (LAI/LAS). Esta razão pode ser uma boa variável para indicar o grau de modificação sofrida pela lignina dentro de um mesmo tipo de pré-tratamento realizado em condições diferentes de temperatura, tempo e RSL . Tal razão leva em consideração a quantificação de lignina como tipicamente analisado pelo método Klason, onde uma hidrólise em 72% de H₂SO₄ e o aquecimento em 4% de H₂SO₄

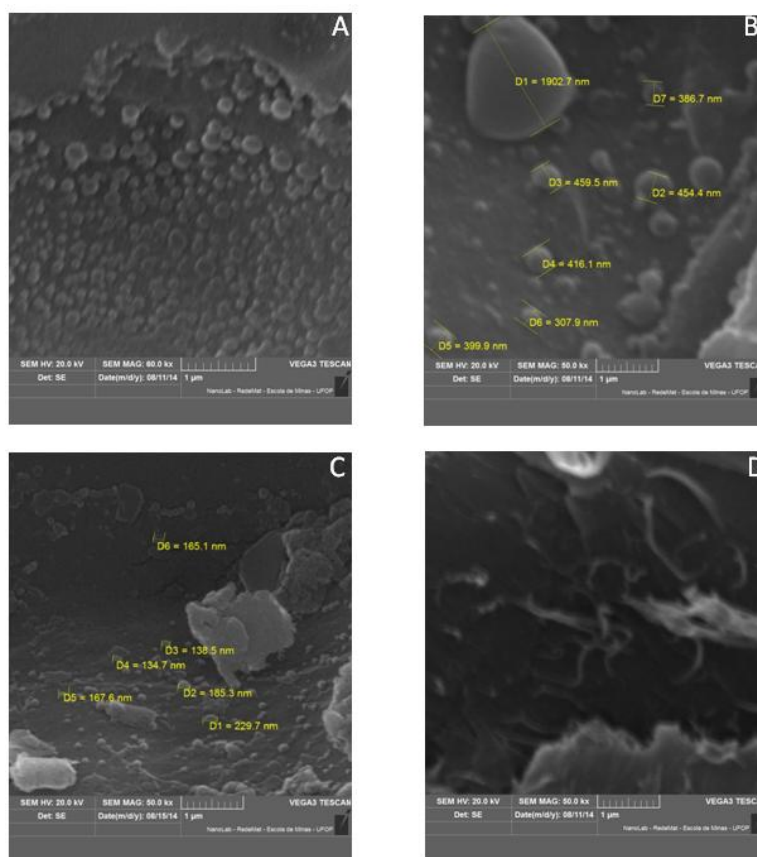
separa a lignina pela dissolução dos carboidratos. Durante este processo, parte da lignina é solubilizada e pode ser identificada como LAS, enquanto isto a LAI é separada como material insolúvel. Os maiores valores desta razão indicam que a fração sólida residual possui uma maior quantidade de lignina modificada na superfície que não foi solubilizada.

Ao avaliar os valores desta variável para as condições 2 (185°C, 35 min e $RSL = 3,60$ mL de H₂O.g BC⁻¹) e 9 (185°C, 35 min e $RSL = 5,99$.mL de H₂O.g BC⁻¹), em que a única diferença é a quantidade de água durante a AH, foi possível perceber que para condição 2, com menor quantidade de água, a razão LAI/LAS foi de 9,8, enquanto que para condição 9 o valor desta variável foi de 5,3. A interpretação destes resultados mostra que quando menores quantidades de água são usadas em elevadas temperaturas, uma maior parte da lignina permanece na forma insolúvel, indicando que o pré-tratamento gerou uma maior quantidade de fragmentos de lignina hidrofóbicos. A presença desses fragmentos hidrofóbicos de lignina na superfície da fibra, associada à baixa solubilidade dos mesmos no hidrolisado podem provocar a formação de gotas esféricas de lignina (*lignin droplets*) na superfície da fase sólida conforme discutido a seguir.

A partir da Figura 6.3 (A-D), que mostra a morfologia da fração sólida residual dos pré-tratamentos de AH realizados nas condições 2, 9 e 14 do PED e do BC sem pré-tratamento obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível confirmar visualmente a hipótese levantada de que na condição 2, por empregar menores quantidades de H₂O, leva à maior formação das gotas de lignina quando comparada à condição 9. Além disso, as comparações entre os gráficos da Figuras 6.3, mostram que quando temperaturas mais baixas são aplicadas como no caso da condição 14 (170°C, 35 min), a formação de gotas de lignina é praticamente nula. Tais resultados estão de acordo com os apresentados pelo diagrama de Pareto, em que observa-se que as variáveis com mais influência na solubilização da lignina durante a AH são temperatura e RSL .

A existência de tais fragmentos de lignina repolimerizada na fração sólida resultante do pré-tratamento pode dificultar a ação de enzimas em processos futuros de hidrólise enzimática ou ainda inviabilizar o uso direto desta fração em processos de digestão anaeróbia em estado sólido. Por outro lado, a presença de elevadas concentrações de fragmentos de LS no hidrolisado é capaz de gerar uma maior toxicidade aos micro-organismos metanogênicos presentes no processo de DA. Alvarez (1991) relatou que os fragmentos de lignina de baixa massa molar são responsáveis por afetarem o crescimento de micro-organismos metanogênicos acetoclásticos.

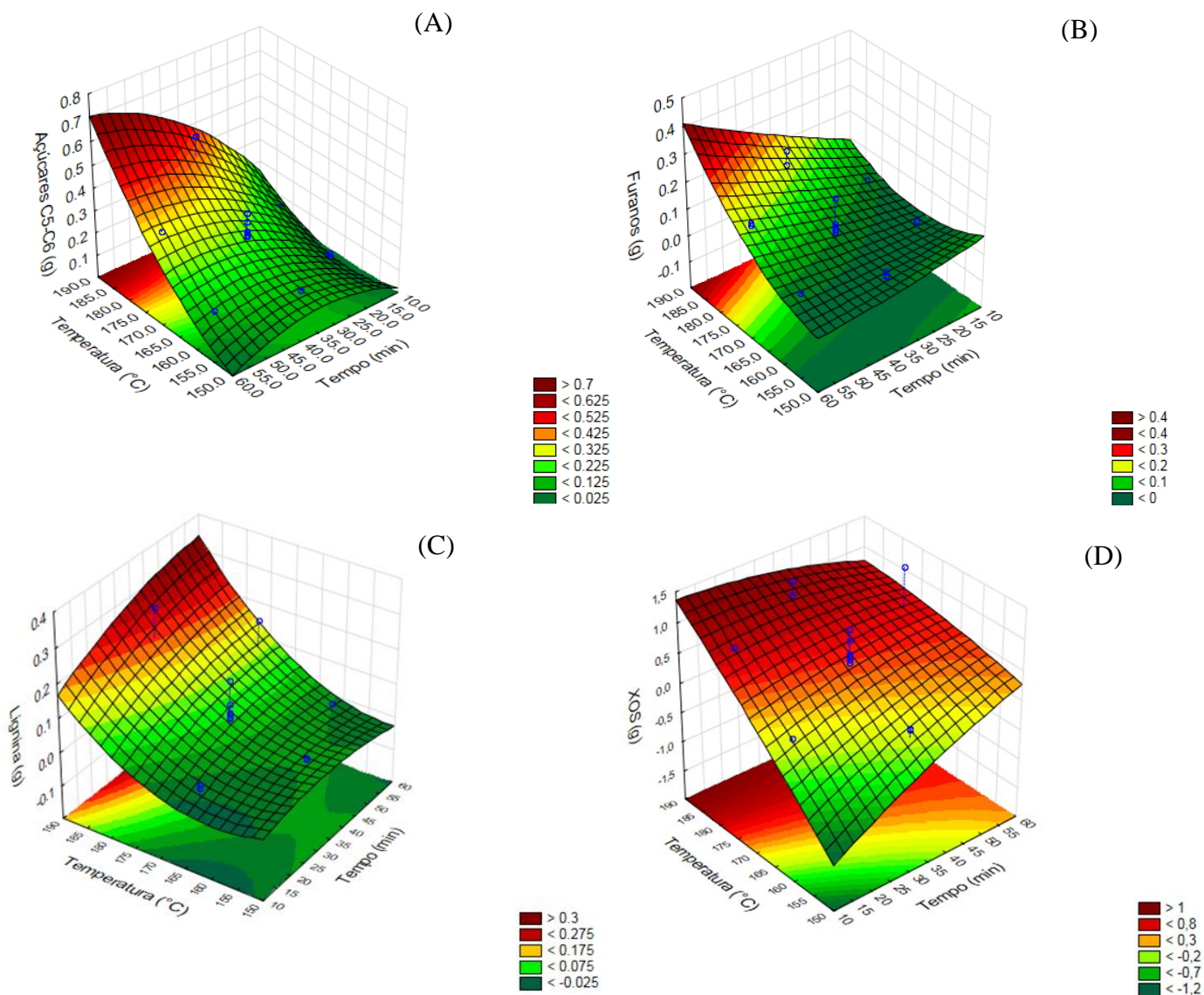
Figura 6.3: Imagens de MEV de amostras de BC pré-tratado por AH nas condições do PED 2 (A), 9(B) e 14(C), bem como do BC bruto (D).



A Figura 6.4 (A-D) mostra as superfícies de respostas geradas pelos modelos quadráticos resultantes do planejamento Doehlert ao fixar a variável *RSL* no ponto central (0,222). Analisando os gráficos de superfície de resposta, é possível perceber que as condições de AH do BC que conduziram a maiores liberações de açúcares C5-C6 foram também as que geraram hidrolisados com maiores acúmulos de furanos, fragmentos de LS e XOS. A Figura 6.4D mostra que as maiores concentrações de XOS no HH são obtidas quando utiliza-se elevadas temperaturas e baixos tempos de contato, sendo que a toxicidade e/ou recalcitrância desses compostos para os micro-organismos anaeróbios não é relatada na literatura. No entanto, em decorrência desses elementos serem fragmentos de xilanas com maiores massa molares liberados durante as reações de hidrólise das hemiceluloses, sua biodegradabilidade pode ser mais lenta, uma vez que para digestão anaeróbia desses compostos faz-se necessário uma etapa de conversão dos mesmos a açúcares monoméricos. A inclusão desta etapa hidrolítica pode resultar em maiores fases de adaptação (fase lag) durante a DA.

Como a presença de furanos, fragmentos de LS e XOS pode determinar o bom desempenho da DA, fica evidente que a otimização da AH visando o uso do HH para produção de CH₄ não pode ser realizada considerando-se apenas os níveis de açúcares C5-C6, ou a quantidade de açúcares redutores totais presentes no hidrolisado conforme sugerido por outros autores como Costa, A. G. *et al.* (2014). Pensando no contexto da biorrefinaria sustentável da cana-de-açúcar, onde o ideal é a utilização fracionada de cada parte da biomassa, como por exemplo, a geração de uma fração sólida residual ao pré-tratamento rica em celulose e a geração de um HH com características adequadas para ser utilizado em outros bioprocessos como a DA, torna-se interessante uma avaliação mais criteriosa do efeito de cada um dos compostos presentes no HH na produção de CH₄. O acompanhamento deste efeito foi avaliado por meio dos resultados de testes de PBM para cada HH conforme será discutido na seção 6.6.

Figura 6.4: Superfícies de resposta geradas a partir do modelo quadrático apresentando a relação da temperatura e tempo com a solubilização de açúcares C5-C6 (A), furanos (B) e LS (C) e XOS (D).



6.4.3 Efeito da lavagem na remoção de açúcares residuais presentes na fração sólida residual ao pré-tratamento

A Figura 6.5 mostra os cromatogramas de soluções padrões de possíveis compostos presentes na fração sólida residual remanescente a AH, FF e HMF (UV-Vis 274 nm) produtos das reações de desidratação de açúcares (Figura 6.5A) e açúcares (Figura 6.5D). Além disso, é possível observar os cromatogramas das amostras de cada solução obtida após as 4 lavagens (L1-L4) realizadas para as condições 2 (Figura 6.5B-E) e 9 (Figura 6.5C-E).

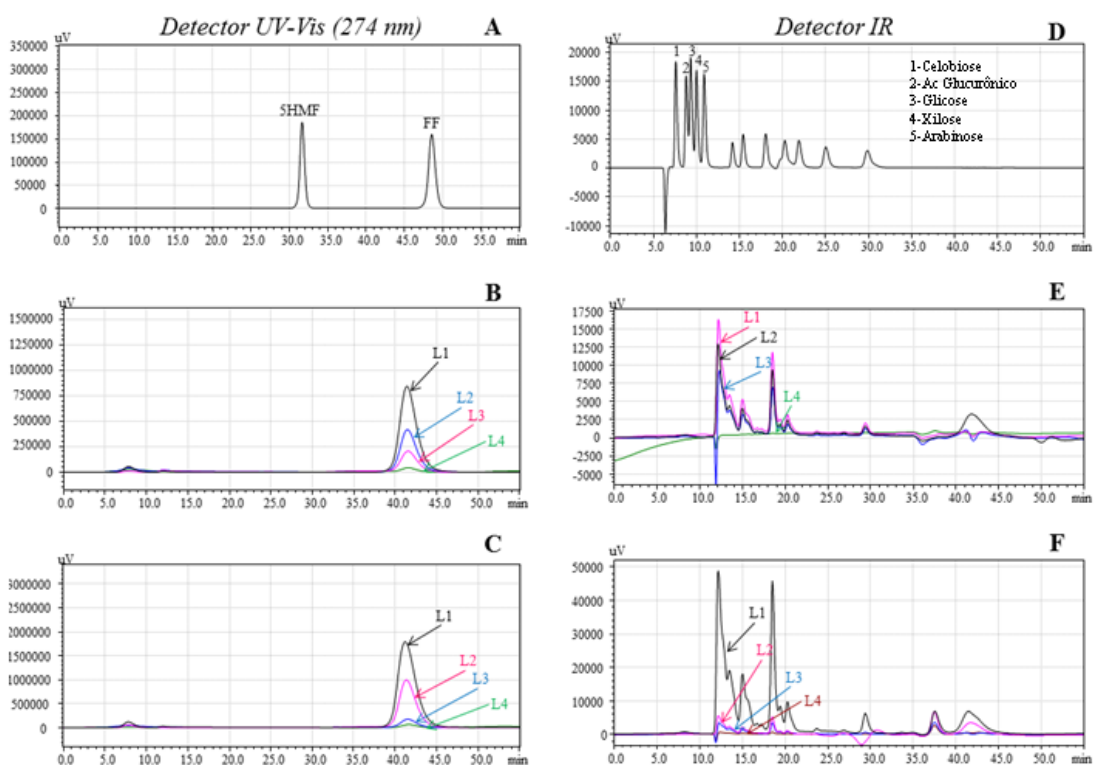
A comparação dos cromatogramas presentes na Figura 6.5B e 6.5C com o cromatograma apresentado na Figura 6.4A, mostra que há liberação de FF, composto formado da desidratação de açúcares C5 presentes nas cadeias de hemicelulose, durante o processo de lavagem da fração sólida. É possível perceber que para as condições 2 (Figura 6.4B) e 9 (Figura 6.4C), o teor de FF foi diminuindo da 1ª para 4ª lavagem.

A avaliação entre as Figuras 6.4B (condição 2) e 6.4C (condição 9) mostra que a intensidade do pico de FF na condição 2 é menor que a intensidade na condição 9. Isto sugere que a fração sólida residual ao pré-tratamento gerada pela condição 9 apresenta maior quantidade de FF na superfície da fibra passível de sofrer solubilização. Uma explicação para isto é o fato de que nesta condição, com maior quantidade de água, as reações de hidrólise das hemiceluloses são mais efetivas (82,90 % de solubilização de hemiceluloses), resultando em uma maior formação de açúcares e conseqüentemente de FF.

A comparação entre o cromatograma presente na Figura 6.4D e os cromatogramas das lavagens apresentados nas Figuras 6.4E e 6.4F mostra que em nenhuma condição estudada foi observada a liberação de açúcares C5 como xilose e/ou arabinose para água de lavagem, sugerindo que nenhum açúcar tenha ficado adsorvido na fração sólida remanescente a AH. Tais resultados mostram que a opção de lavagem da fração sólida para liberação de mais açúcares para o hidrolisado não é viável, uma vez que não foram encontrados açúcares passíveis de sofrerem solubilização, e que ainda ocorre a liberação de FF, composto considerado tóxico aos micro-organismos anaeróbios.

Diante disto, fica evidente que para a circunstância de uso da etapa de pré-tratamento por AH do BC não faz-se necessário a inclusão de etapas de lavagem para maior solubilização de açúcares C5 para o HH. Estes resultados são interessantes, pois mostram que as condições testadas na prensagem após o pré-tratamento são capazes de retirar todo açúcar da superfície da fibra.

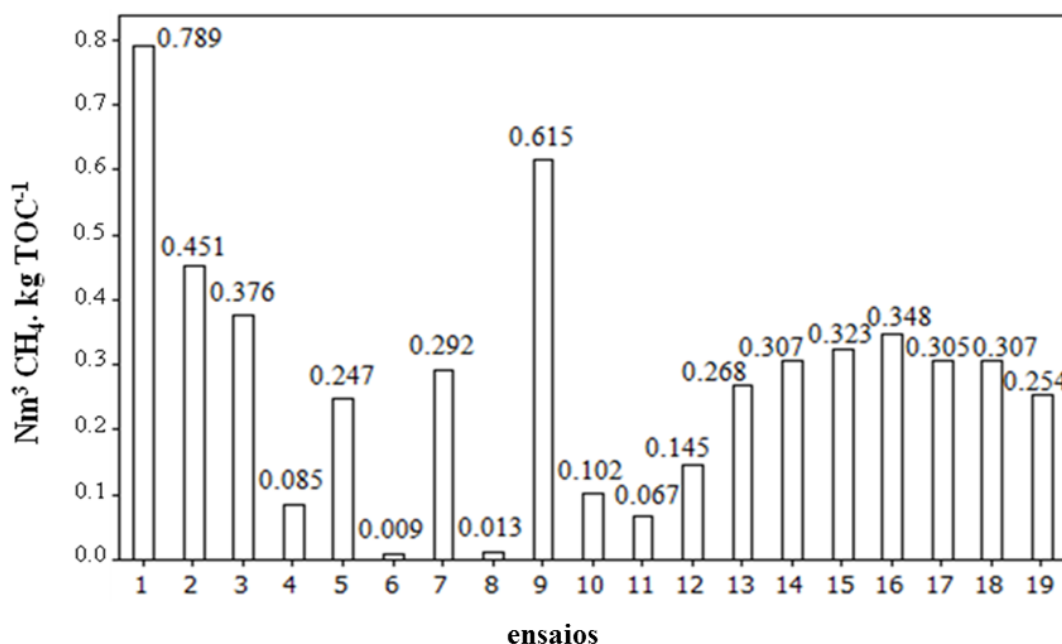
Figura 6.5: Cromatogramas de padrões de FF e HMF (A), amostras das lavagens contendo FF das condições 2(B) e 9(C), amostra de padrão contendo açúcares (D), amostras das lavagens contendo açúcares da condição 2 (E) e 9(F).



6.5 Testes de biodegradabilidade anaeróbia

Os testes de PBM foram realizados com todos os 19 hidrolisados obtidos a partir do PED na tentativa de avaliar quais as condições de AH do BC seriam melhores para a produção de CH₄ por DA. A Figura 6.6 mostra que o teste de PBM realizado com o hidrolisado obtido no ensaio de número 9 ($RSL = 0,167$; $T = 185^{\circ}\text{C}$; $t = 35$ min), em que se esperava obter o maior potencial de produção de CH₄, considerando o seu maior nível de açúcares C5-C6 (0,516 g, ver Tabela 6.4), foi na verdade a segunda maior produção de CH₄, com um valor de PBM de $0,615 \text{ Nm}^3.\text{kg COT}^{-1}$. A maior produção de metano ($0,789 \text{ Nm}^3.\text{kgCOT}^{-1}$) foi observada para o HH proveniente do ensaio 1 ($RSL = 0,333$; $T = 170^{\circ}\text{C}$; $t = 35$ min), o qual continha 2,6 vezes menos açúcares C5-C6 (0,195 g) e uma menor solubilização de hemiceluloses (de apenas 57%, ver Tabela 6.4).

Figura 6.6: Potencial bioquímico de metano dos HH gerados após o pré-tratamento por AH do BC de acordo com as condições definidas pelo PED.



Estes resultados são importantes para evidenciar que a condição de pré-tratamento que provocou a maior solubilização de hemiceluloses e conseqüentemente levou aos maiores teores de açúcares no hidrolisado, não são necessariamente as melhores para a produção de metano, ao contrário do que é normalmente propalado por alguns pesquisadores (Costa, A. G. *et al.*, 2014).

Os resultados do PBM aqui apresentados comprovam a hipótese de que o uso de apenas a variável açúcares C5-C6 (ou açúcares redutores) como variável resposta para otimizar a condição de AH capaz de gerar um HH com maior biodegradabilidade anaeróbia é falha. Além do teor de açúcares deve-se também observar a quantidade de compostos recalcitrantes e tóxicos, tais como LS, furanos e XOS. A Tabela 6.4 mostra que os teores de furanos e LS no hidrolisado gerado pelo ensaio 1 foram respectivamente de 3,7 e 3,2 vezes menores que os observados no ensaio 9, tal fato mostra que baixos teores de furanos e LS no HH são cruciais para o melhor desempenho durante a DA.

Alguns estudos mostram que as arqueias metanogênicas podem ser severamente inibidas em ambientes com elevadas quantidades de furanos, prejudicando a etapa de metanogênese (Boopathy, 2009). Portanto, pode-se inferir que as condições de AH com menor severidade, ainda que impliquem em menores teores de açúcares C5-C6 nos hidrolisados, devem ser as preferidas quando o objetivo é a produção de CH₄ a partir do HH.

Em busca de encontrar uma relação entre a produção de CH₄ e as variáveis dependentes T e t durante a AH, uma análise polinomial não linear de segunda ordem foi realizada utilizando como variável resposta a razão de substrato em termos de carbono orgânico total alimentado pelo volume de metano gerado (kg COT.Nm³CH₄⁻¹). Esta relação é capaz de mostrar qual condição experimental de T e t deve ser aplicada quando o objetivo é gerar um HH com uma quantidade de matéria orgânica solúvel mais susceptível a ser convertida em CH₄ durante os processos de DA.

A equação 6.3 descreve o comportamento da variável resposta (kg COT.Nm³CH₄⁻¹) em relação a temperatura e tempo de contato do pré-tratamento por AH. De acordo com os gráficos de superfície de resposta e as linhas de contorno apresentadas na Figura 6.7 (A-B), o modelo polinomial gerado apresentou um valor de correlação (R^2) de 0,84. Isto implica em dizer que o modelo foi capaz de prever satisfatoriamente 84% da correlação existente entre a variável resposta e as variáveis T e t . Considerando a complexidade do sistema estudado, e comparando este resultado de R^2 com os encontrados por outros autores, é possível dizer que o ajuste foi muito bom. Por exemplo, Ferreira *et al.* (2013) tentou encontrar uma relação entre a produção de CH₄ e os valores de T e t utilizados no pré-tratamento por AH da palha de trigo e encontraram um coeficiente de correlação (R^2) de apenas 0,57.

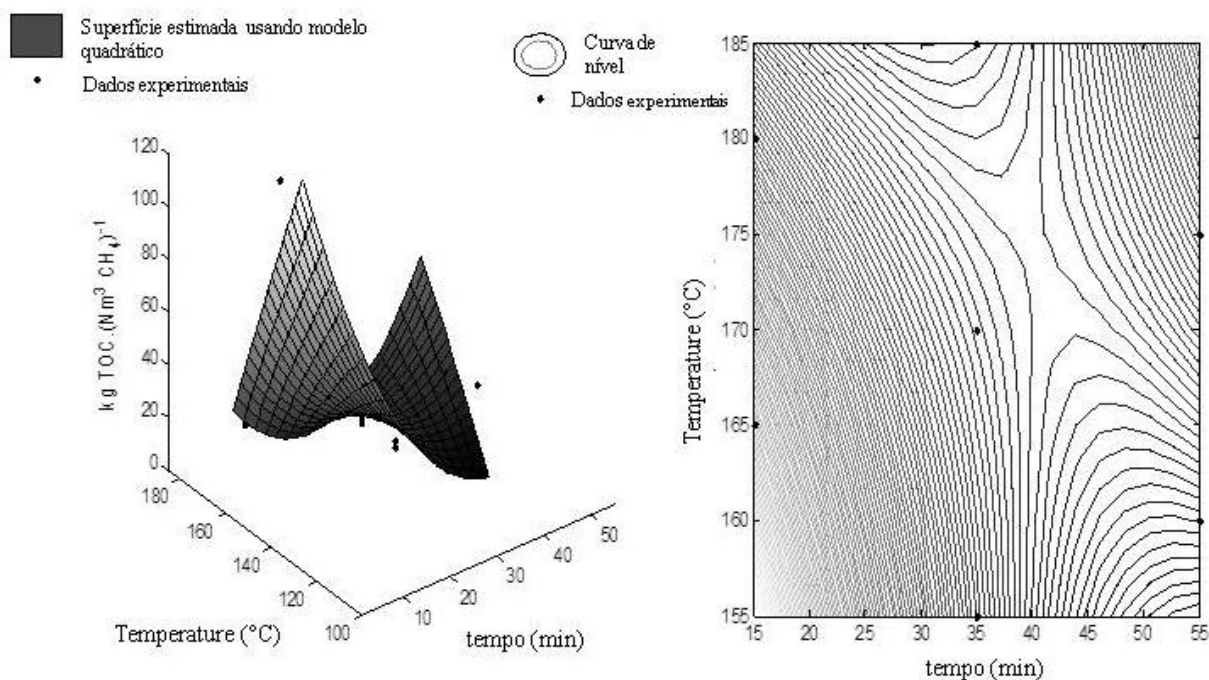
$$\text{kg TOC.}(\text{Nm}^3 \text{CH}_4)^{-1} = 916,5695 - 31,6044t - 3,2075T + 0,0840t^2 - 0,0074T^2 + 0,1427tT \quad (6.3)$$

Avaliando os gráficos (A) e (B) da Figura 6.7 é possível observar que os valores mais baixos da variável resposta kg COT (Nm³CH₄⁻¹), ou seja, aqueles que indicam a presença de um HH com uma quantidade de matéria orgânica solúvel mais susceptível a ser convertida em CH₄ durante os processos de DA foi observado para temperaturas próximas de 175°C e tempos de contato na faixa de 40 a 45 min. Estes valores de T e t estão próximos daqueles usados no ensaio 1 gerado pelo planejamento Doehlert (Tabela 6.1), que apesar de terem tido resultados apenas moderados na conversão de hemiceluloses e teor de açúcares C5-C6 no hidrolisado, foram os que apresentaram maiores valores PBM.

Figura 6.7: Gráficos de superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para conversão de matéria orgânica presentes nos HH em CH₄ (kg de COT por Nm³CH₄).

(a)

(b)



Isso corrobora a hipótese de que as condições de AH que promovem elevada solubilização de hemiceluloses e, conseqüentemente, maior liberação de açúcar, como inferido pelo planejamento Doehlert, não são necessariamente as melhores condições para a produção de CH₄. Os resultados apresentados na Figura 6.7(a-b) sugerem que os valores intermediários de T (165 a 175°C) e t (35 a 45 min) podem ser utilizados para obter um HH com maior capacidade de produção de CH₄.

6.6 Ferramenta de desejabilidade e ensaios de PBM

Como os dados apresentados antes mostraram que o teor de açúcares C5-C6 contido nos HH não foi uma boa variável para estimar seu potencial bioquímico de metano, a ferramenta de desejabilidade foi usada para determinar quais os níveis de compostos tóxicos são necessários para maximizar a produção de CH₄. As condições de desejabilidade foram definidas considerando os níveis desejáveis de açúcares C5-C6, furanos e LS, conforme já apresentado no tópico 6.3.1.

A ferramenta estatística de desejabilidade foi capaz de gerar as condições desejáveis para AH (Tabela 6.3), bem como a composição química esperada para o hidrolisado (Tabela 6.4). Os testes de PBM com os hidrolisados obtidos nas condições DC1 a DC4 permitiram

realizar a avaliação da influência de furanos e LS, bem como a sua combinação na produção de CH₄.

A Tabela 6.3 mostra que a condição DC1 foi gerada com intuito de obter um HH com a máxima quantidade de açúcares, furanos e LS. Este cenário foi criado para verificar a influência negativa dos compostos recalcitrantes/tóxicos FF, HMF e LS, gerados em condições severas de AH na produção de CH₄. Como pode ser visto na Tabela 6.4, o HH proveniente da condição DC1 foi o que apresentou os níveis mais elevados de açúcares (1,07 g), furanos (0,33 g) e LS (2,02 g), quando comparado com as outras condições desejadas.

Por outro lado, a condição DC2 foi concebida com intuito de produzir um HH com a maior quantidade de açúcares e a menor quantidade de compostos tóxicos/recalcitrantes, criando assim a condição mais favorável para a produção de CH₄. Através dos valores apresentados na Tabela 6.4 é possível perceber que o hidrolisado gerado sob tais condições de AH apresentou níveis moderados de açúcares (0,57 g) e a menor quantidade de furanos (0,08 g) e LS (0,49 g).

Por sua vez, as condições de AH, DC3 e DC4, foram definidas para verificar o efeito individual de furanos e LS na produção de CH₄ durante a digestão anaeróbica de HH rico em açúcares. Novamente, a saída da ferramenta de desejabilidade foi consistente com os valores codificados introduzidos e o hidrolisado produzido sob as condições DC3 e DC4 foram os que apresentaram os maiores níveis de furanos e LS.

A Tabela 6.5 mostra as concentrações iniciais de açúcares C5-C6 (glicose, xilose, arabinose), FF e HMF e LS medidas antes do início de cada teste de PBM para os HH gerados pelas quatro condições de desejabilidade. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6.5, a concentração de açúcares C5-C6, furanos e LS no início dos testes de PBM estão em boa concordância com os valores previstos pela ferramenta de desejabilidade.

Tabela 6.5: Caracterização da composição do HH no início dos PBM para as condições DC1, DC2, DC3 e DC4.

Experimento	COT (mg.L ⁻¹)	RH (%) ^c	Glu (mg.L ⁻¹)	Xil (mg.L ⁻¹)	Ara (mg.L ⁻¹)	HFor (mg.L ⁻¹)	HAc (mg.L ⁻¹)	HMF (mg.L ⁻¹)	FF (mg.L ⁻¹)	LS (mg.L ⁻¹)
DC1	2911,67	66,07	8,55	454,19	191,36	248.34	301.21	45.08	158.17	1239.26
DC2	1797,50	48,99	6,81	312,60	309,43	222.57	270.42	23.15	68.12	545.46
DC3	2322,00	77,40	5,74	628,50	239.10	187.12	324.62	44.71	136.42	976.92
DC4	2945,00	73,90	8,34	542,39	115.43	250.77	419.74	68.08	201.61	1380.00

Glu – glicose; Xil – xilose; Ara – arabinose; HFor – ácido fórmico; HAc – ácido acético; HMF – 5-hidroximetil-2-furfuraldeído; FF – 2-furfuraldeído and LS – lignina solúvel

Os valores de PBM obtidos a partir da digestão anaeróbica dos quatro hidrolisados gerados (DC1; DC2; DC3 e DC4) mostram que a produção de CH₄ foi maior para o hidrolisado gerado pela condição DC2 ($1,56 \pm 0,11 \text{ Nm}^{-3} \cdot \text{kg COT}^{-1}$), 178,6°C e 43,6 min, quando comparado com a produção obtida a partir dos hidrolisados gerados pelas condições DC1 ($0,74 \pm 0,08 \text{ Nm}^{-3} \cdot \text{kg COT}^{-1}$), DC3 ($0,48 \pm 0,04 \text{ Nm}^{-3} \cdot \text{kg COT}^{-1}$) e DC4 ($0,35 \pm 0,07 \text{ Nm}^{-3} \cdot \text{kg COT}^{-1}$). Estes resultados confirmam a hipótese de que as concentrações mais baixas de furanos e LS contribuem para aumentar a atividade metanogênica do HH gerado pela AH. Estes resultados também confirmam e validam o modelo proposto pela equação (6.3), que prevê que a maior produção de metano a partir do hidrolisado do BC é atingida quando a AH é realizada nos intervalos de temperatura e tempo de 170°C-180°C e 40-45 min, respectivamente (Figura 6.7 A-B).

De acordo com alguns autores como Santucci *et al.* (2015), o pré-tratamento por AH do BC realizado em temperaturas próximas de 170°C é promissor para gerar hidrolisados que contêm quantidades elevadas de XOS e açúcares monoméricos, bem como baixa concentração de subprodutos de degradação dos açúcares, como por exemplo, os furanos. Além disso, o valor de *RSL* empregado neste estudo (0,24) é maior quando comparado a outros estudos da literatura (EX. *RSL* = 0,10 utilizado por Batalha et al., 2015), isto é altamente desejável uma vez que implica na utilização de menor quantidade de água. Tal fato gera vantagens tanto ambientais quanto econômicas. Somado a isso, o menor teor de água durante a AH implica em dizer que os reatores podem ser alimentados com maior quantidade de sólidos, maximizando assim a capacidade de processamento do BC por corrida.

Além de levar a uma maior produção de metano, o hidrolisado gerado pela condição DC2 exibiu a maior eficiência de remoção de COT (93,13%) quando comparado com os HH gerados pelas condições DC1 (76,24%), DC3 (67,14%) e DC4 (52,55%). Isto indica que o hidrolisado proveniente da condição DC2 foi o que apresentou a maior biodegradabilidade. Uma possível explicação para este comportamento pode estar relacionada a menor concentração de lignina solúvel ($545,46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e à maior concentração de arabinose observada para este HH. Alguns autores como Desai e Rao (2010) afirmam que algumas bactérias anaeróbias e facultativas preferem utilizar arabinose como substrato ao invés de xilose. Isto pode explicar a maior produção de metano a partir do HH gerado pela condição DC2, uma vez que o mesmo foi o que apresentou os maiores valores ($309,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de arabinose (Tabela 6.5).

Uma hipótese para explicar os níveis mais elevados de arabinose no hidrolisado gerado pela condição DC2 é a severidade mais baixa ($T = 178,6^{\circ}\text{C}$ e $t = 43,6$ min) empregada nesse pré-tratamento. Sabe-se que as condições extremas de temperatura e tempo, como as impostas nos ensaios DC1 e DC4, são capazes de solubilizar uma grande quantidade de açúcares C5 (xilose e arabinose) constituintes das hemiceluloses. No entanto, sob condições mais severas, tanto a arabinose quanto a xilose são degradadas em furfural (FF), um composto sabidamente tóxico para os micro-organismos metanogênicos (Bolado-Rodriguez *et al.*, 2016).

Os teores de açúcares C5 nos diferentes hidrolisados apresentados na Tabela 6.5 mostram que as condições mais severas de AH (DC1 e DC4) levaram a produção de um HH com menores teores de arabinose e mais FF. Os níveis mais elevados de FF nestas condições refletem a maior taxa de conversão de arabinose a FF. Isto ocorre, pois a reação de desidratação de arabinose a FF possui uma energia de ativação menor quando comparada com a energia necessária para desidratação da xilose (Jacobsen & Wyman, 2002, Lavarack et al, 2002 e Zhao et al., 2012).

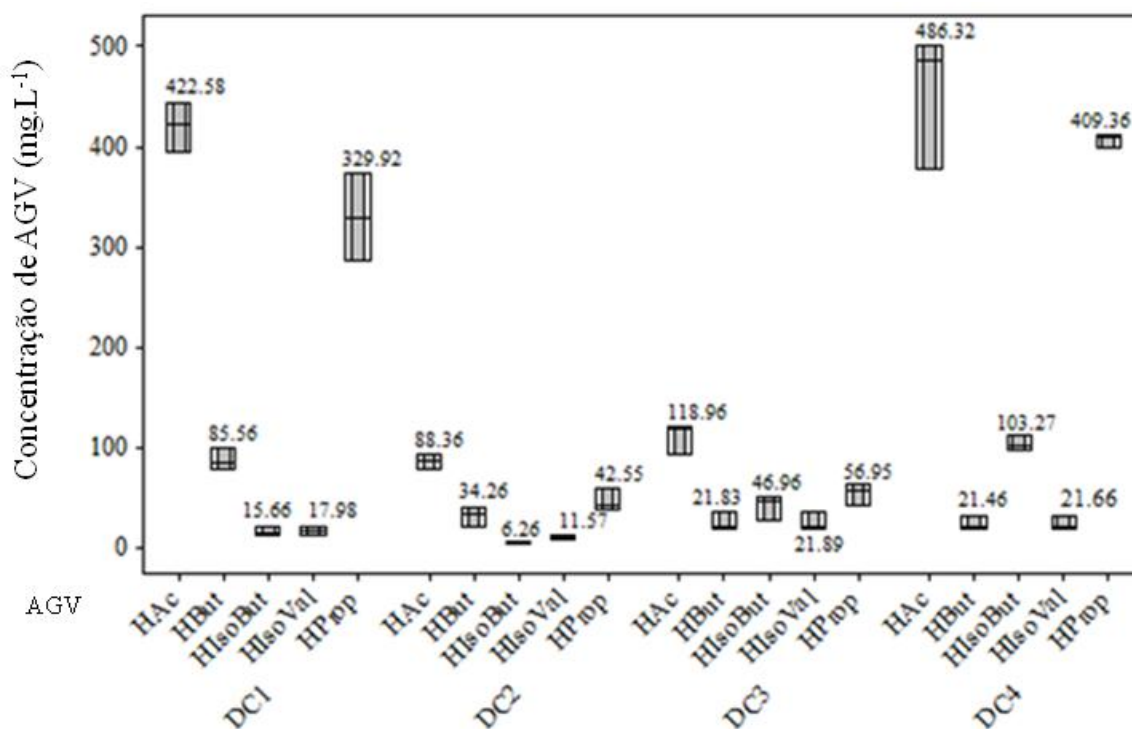
A fácil conversão de arabinose em FF também pode ser explicada pela posição do açúcar na cadeia de hemiceluloses. A arabinose é um substituinte na cadeia de hemiceluloses, e, portanto, é mais facilmente hidrolisada em comparação com a xilose, o principal constituinte da cadeia de hemiceluloses. A solubilização mais fácil da arabinose durante a AH faz com que a molécula de arabinose permaneçam por tempos mais longos na solução sob a ação da temperatura e do pH, o que favorece sua degradação em FF, resultando na geração de um hidrolisado com maior toxicidade.

Vale ressaltar que, além do FF gerado a partir da degradação de arabinose, existe também a contribuição de FF proveniente da degradação da xilose. Portanto, quanto mais severas as condições de AH, mais prejudicada será a digestão anaeróbia do HH devido à maior liberação do FF e à diminuição do teor de arabinose, um açúcar considerado de mais fácil degradação pelos micro-organismos anaeróbios.

A menor toxicidade observada no hidrolisado DC2 em comparação as outras condições (DC1, DC3 e DC4), pode ser confirmada quando se avalia o acúmulo de ácidos graxos voláteis-AGV no final do teste de PBM. Sabe-se que o acúmulo de AGV em sistemas anaeróbios pode ocorrer devido a um desequilíbrio no crescimento microbiano causado por condições de estresse, como deficiência nutricional e toxicidade. Tais condições podem levar

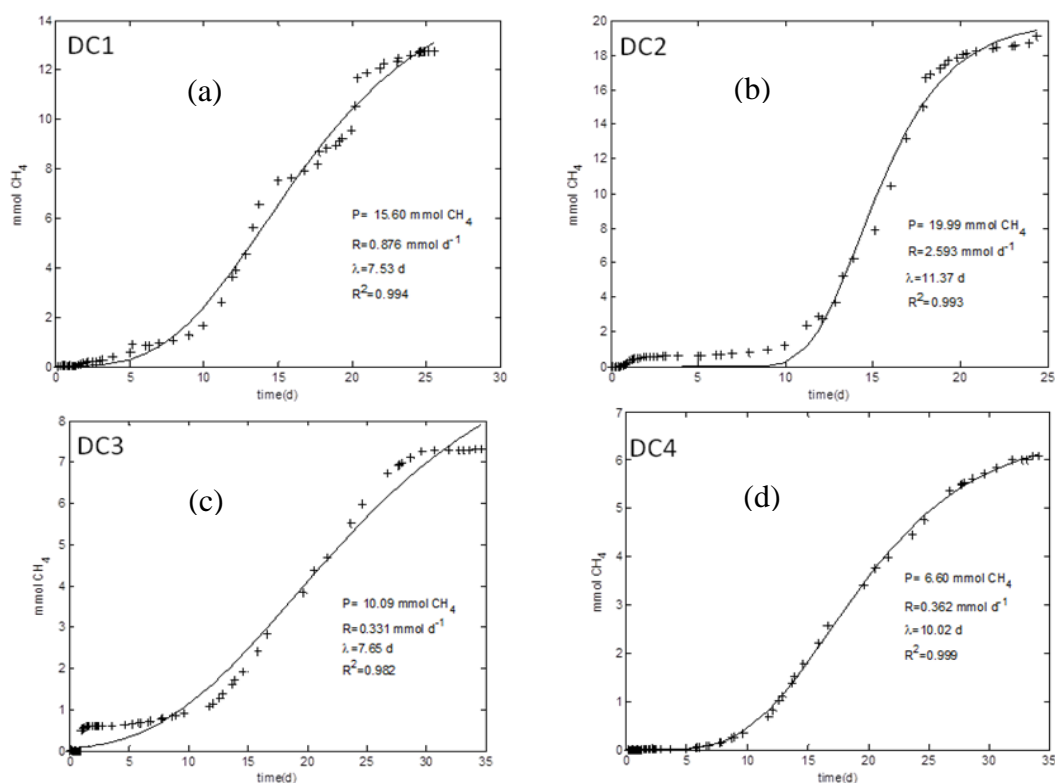
a restrições termodinâmicas e cinéticas no sistema, comprometendo a conversão de matéria orgânica em CH₄. A Figura 6.8 mostra que as concentrações de todos os AGVs identificados e quantificados no fim do teste de PBM foram menores para o hidrolisado DC2 quando comparado com os outros. Isto mostra claramente que as condições mais severas (*T* e *t*) que normalmente levam a uma maior solubilização das hemiceluloses durante a AH, não são necessariamente as mais adequadas quando o objetivo é submeter o hidrolisado para produção de metano por digestão anaeróbia.

Figura 6.8: Concentração acumulada de AGV (HAc = ácido acético; HBut = ácido butírico; HIsoBut = ácido isobutírico; HIsoval = ácido isovalérico; HProp = ácido propiônico) após a DA dos HH gerados pelas condições de desejabilidade (DC1-DC4).



Outra evidência de que o HH gerado pela condição DC2 foi o que apresentou a melhor biodegradabilidade, é o valor da taxa máxima de produção de metano (*R*) estimada pelo modelo de Gompertz modificado, conforme pode ser visto na Figura 6.9(A-D). É possível notar que o modelo foi capaz de reproduzir a produção de metano com bons ajustes. Os valores de coeficiente de determinação (*R*²) foram sempre maiores que 0,98.

Figura 6.9: Dados preditos pelo modelo de Gompertz (linha preenchida) e dados obtidos experimentalmente (+) durante os testes de PBM



O valor de R (taxa de produção de metano) para o hidrolisado gerado pela condição DC2 (2,59 mmol CH₄.d⁻¹) foi maior do que os valores encontrados para as condições DC1 (0,88 mmol CH₄.d⁻¹), DC3 (0,33 mmol CH₄.d⁻¹) e DC4 (0,36 mmol CH₄.d⁻¹). Esta é mais uma indicação de que o HH gerado pela condição DC2 (que tem menores teores de furanos e LS) foi o que acarretou em menor desequilíbrio cinético durante a DA. No entanto,

Considerando que o CH₄ tem um poder calorífico inferior de 34450 kJ.Nm⁻³ (Boussarsar et al., 2009), que o PBM do hidrolisado gerado pela condição DC2 foi de 1,56 Nm³.kg COT⁻¹ e que a quantidade de COT solubilizado durante a AH do BC para esta condição foi de 0,0539 kg COT.kg BCA⁻¹ (em base seca), calcula-se que a DA do HH gerado pela AH em condições moderadas ($T \sim 179^{\circ}\text{C}$; $t \sim 44$ min e $RSL \sim 0,2$) é capaz de produzir 2,896 MJ.kg BC⁻¹. Este valor é superior ao estimado (1,87 MJ.kgBC⁻¹) por outros pesquisadores que utilizaram hidrolisados gerados pelo pré-tratamento do BC com uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio (Rabelo *et al.*, 2011).

Costa Pinheiro et al. (2014) estimaram uma produção de energia de 7,1 MJ.kg BC⁻¹ através da produção de CH₄ a partir de uma mistura de sólido (bagaço residual pré-tratado) e fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) obtida após o pré-tratamento alcalino do BC. Embora este valor seja 2,5 vezes maior do que o estimado neste estudo, deve-se salientar que a quantidade de energia estimada neste estudo para as condições DC2 refere-se apenas a DA da fração solúvel (HH). A fração sólida residual obtida após o pré-tratamento por AH pode ainda ser destinada a um processo de deslignificação para a remoção de lignina, e a fração resultante rica em celulose pode ser submetida a uma etapa de hidrólise enzimática visando à produção de bioetanol 2G.

O uso do HH para a produção de CH₄ e conseqüentemente geração de energia pode abrir um caminho para uma integração sustentável na produção do bioetanol 1G e 2G. Sabe-se que a presença de fragmentos de hemiceluloses gerados após a hidrólise enzimática no hidrolisado utilizado para produção de etanol 2G pode piorar os rendimentos de conversão de glicose (Batalha et al., 2015). Os micro-organismos responsáveis pela fermentação de açúcares em etanol não são capazes de utilizar açúcares C5, tais como xilose e arabinose, que são os principais componentes das hemiceluloses (Kaparaju et al., 2009). Considerando tal situação torna-se importante a tentativa de maximizar a solubilização das hemiceluloses buscando sua utilização no processo de DA. A DA do HH cria uma possibilidade de geração de mais um vetor energético (CH₄) utilizando uma parte da biomassa que até então poderia ser considerado um efluente líquido gerado pelo pré-tratamento. A aplicação de tal tecnologia na cadeia produtiva da biorrefinaria da cana-de-açúcar pode contribuir positivamente para sustentabilidade do processo.

6.7 Conclusões

A AH do BC mostrou que condições severas (185°C, 55 min) e baixa RSL (0,14) levaram a produção de HH com baixo PBM (0,74 Nm³.kg COT⁻¹), e que condições mais brandas (178°C; 44 min) e RSL (0,23) geraram um HH com um maior PBM (1,56 Nm³.kgCOT⁻¹). A taxa de produção de CH₄ estimada pelo modelo de Gompertz foi de 2,6 mmol.d⁻¹ para a melhor condição de desejabilidade. O CH₄ quando considerado para combustão mostrou ser capaz de gerar em torno de 2,9 MJ.kg BC⁻¹. A digestão anaeróbia do HH contribuiu para fechar o balanço energético em uma biorrefinaria de cana, poupando assim o BC para usos mais nobres como a produção de bioetanol 2G e/ou a recuperação de compostos de alto valor agregado.

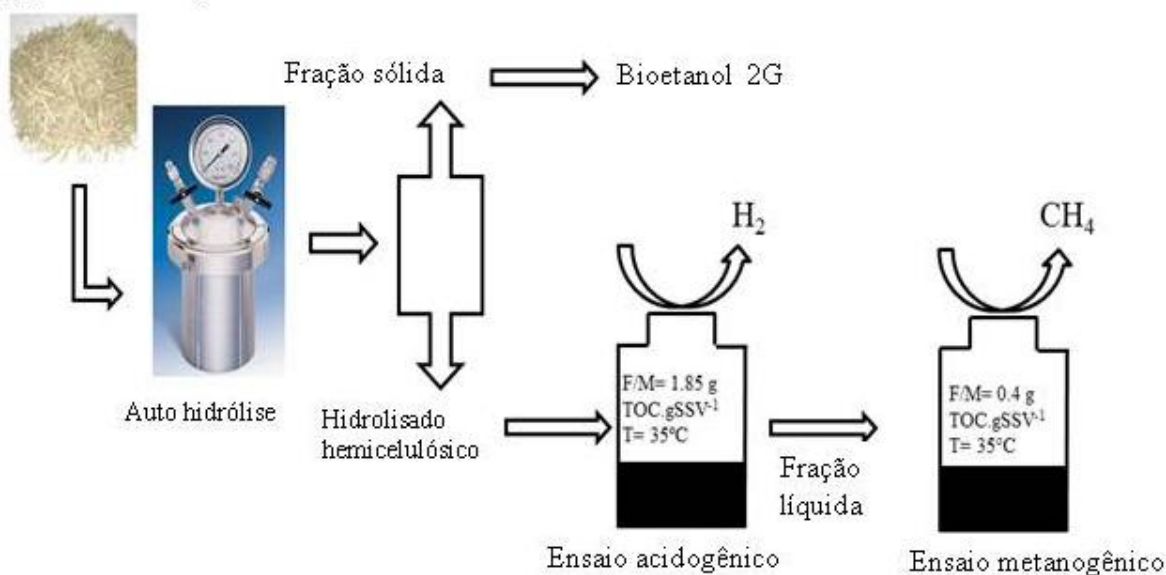
7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS (DA-2S) DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO GERADO PELA AUTO HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Destaques do trabalho

- Digestão anaeróbia em dois estágios foi usada para produzir H₂ e CH₄ a partir do hidrolisado hemicelulósico;
- A fase acidogênica mostrou-se eficiente na detoxificação do hidrolisado hemicelulósico, aumentando a produção CH₄ em 4 vezes;
- O uso da etapa acidogênica permitiu o uso de condições mais severas de pré-tratamento por AH do BC;
- A energia livre que pode ser obtida pela combustão dos biogases H₂ e CH₄ produzidos durante a digestão anaeróbia em dois estágios do hidrolisado hemicelulósico foi de 3,15 MJ.kg BC⁻¹ (base seca)

Figura Resumo

Bagaço de cana-de-açúcar



7.1 Resumo

Este estudo teve como objetivo otimizar a recuperação de energia líquida a partir da produção de H₂ e CH₄ por meio da digestão anaeróbia dos hidrolisados hemicelulósicos (HH) obtidos em condições desejáveis (DC) do pré-tratamento por auto hidrólise (AH) do bagaço de cana-de-açúcar (BC). A digestão anaeróbia foi realizada em dois estágios (acidogênico-

metanogênico, DA-2S), descontínuos, no qual o estágio acidogênico atuou como uma fase de hidrólise e biodetoxificação. Isto permitiu a utilização de condições mais severas de pré-tratamento do BC por AH, $T = 178,6^{\circ}\text{C}$ e $t = 55$ min (DC3) e $T = 182,9^{\circ}\text{C}$ e $t = 40,71$ min (DC4), que, resultaram em maior extração de hemiceluloses do BC (DC3 = 77,40% e DC4 = 73,90%), o que conseqüentemente melhorou o equilíbrio energético líquido do processo proposto. A energia estimada a partir da combustão de ambos os gases (H₂ e CH₄) gerados na DA-2S do HH gerado pela condição DC4 foi capaz de produzir uma energia líquida de 3,15 MJ.kg BC⁻¹_{base seca}.

7.2 Introdução

A AH é um pré-tratamento físico-químico em que a biomassa lignocelulósica é pré-tratada com água no estado líquido quente e sob elevada pressão. Durante o processo, conforme abordado anteriormente as cadeias de hemiceluloses são hidrolisadas e solubilizadas. Uma fração sólida parcialmente deslignificada e rica em celulose é gerada e pode ser utilizada como um substrato para a produção de bioetanol (2G) por meio da integração de processos de conversão enzimática seguida de fermentação com leveduras (Buruiana *et al.*, 2014).

Além da fração sólida, o hidrolisado hemicelulósico (HH) também é gerado. Alguns autores como Saha (2003) mostram que esse hidrolisado contém oligômeros que podem ser usados como matéria prima na produção de hidrogel ou serem submetidos a processos de fermentação para produção de etanol hemicelulósico.

Em vista a complexidade do HH gerado, a separação de oligômeros para o uso na produção de hidrogel exige técnicas caras de extração, o que pode inviabilizar essa aplicação. Em relação à produção de etanol a partir de açúcares C5, uma corrente de estudiosos aponta que a aplicação de tal finalidade está atrelada a capacidade de desenvolvimento de micro-organismos geneticamente modificados capazes de converterem açúcares C5 em etanol em escala real (Carvalho *et al.*, 2008).

Além dos problemas levantados, o uso do HH em bioprocessos pode ser prejudicado já que é conhecido que além dos açúcares C5 existem também compostos gerados pelas reações de modificação da lignina e os formados a partir da desidratação dos açúcares (FF e HMF), que são considerados tóxicos para uma grande quantidade de micro-organismos (Martinez *et al.*, 2001; Arrizon *et al.*, 2012; Mateo *et al.*, 2013).

Uma possibilidade que vem ganhando força nos últimos anos para o melhor aproveitamento energético da fração hemicelulósica é o uso do HH como substrato em processos de DA para produção de CH₄ conforme apresentado no capítulo anterior. No entanto, os estudos disponíveis na literatura relatam pequenas taxas de produção de CH₄, principalmente devido à presença de compostos tóxicos no hidrolisado (Costa, A. G. *et al.*, 2014; Bolado-Rodriguez *et al.*, 2016).

Diante disso, uma alternativa que pode ser utilizada para aumentar a produção de biometano é fazer a biodetoxificação do HH por meio da separação espacial das fases acidogênica e metanogênica (DA-2S). Pelo fato dos micro-organismos acidogênicos possuírem taxas de crescimento mais elevadas quando comparadas com os micro-organismos metanogênicos, a inclusão da fase acidogênica antes da fase metanogênica pode promover a conversão dos açúcares C5 e de outros compostos solúveis, por exemplo, FF, HMF, LS e fragmentos de xilo-oligômeros em ácidos orgânicos e/ou em outros compostos que são mais facilmente biodegradáveis. Os compostos formados na etapa acidogênica podem ser convertidos mais facilmente em CH₄ e CO₂ na fase metanogênica.

Até o momento os estudos que foram publicados abordam aspectos diferentes como, os tipos de substratos que podem ser utilizados, as melhores configurações dos reatores e os efeitos das variáveis de operação sobre a produção de H₂ na etapa acidogênica e CH₄ na metanogênica. No entanto, tais estudos utilizam outros tipos de substratos como, por exemplo, águas residuais, resíduos alimentares e agrícolas (Arreola-Vargas *et al.*, 2016; Lindner *et al.*, 2016). No melhor do nosso conhecimento, não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem a influência da separação espacial acidogênica/metanogênica na produção de H₂ e aumento da produção de CH₄ usando como substrato o HH obtido pela AH do BC.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da produção de H₂ e de CH₄ em sistema de digestão anaeróbia descontínuo de dois estágios (DA-2S) alimentado com HH obtidos a partir das quatro condições de pré-tratamentos geradas pela ferramenta de desejabilidade (ver Tabela 6.3) apresentada no capítulo 6. Além disso, investigou-se a influência da composição do HH sobre as taxas de produção de H₂ e de CH₄ e a capacidade da fase acidogênica em funcionar como uma etapa de biodetoxificação do HH. Considerando o conceito de biorrefinaria também foi avaliada a capacidade de geração de energia a partir da queima do H₂ e CH₄ produzido durante a DA-2S e a possibilidade de utilização da fração sólida remanescente a AH em uma posterior etapa de hidrólise enzimática (HE).

7.3 Material e Métodos

As metodologias gerais utilizadas estão apresentadas no capítulo 5. Este tópico tem como objetivo apresentar as metodologias específicas desta etapa do trabalho.

7.3.1 Biodegradabilidade acidogênica do hidrolisado de hemiceluloses

Os ensaios de DA-2S em batelada foram realizados em triplicata para obter o potencial bioquímico de produção de hidrogênio (PBH) e para avaliar a capacidade dos micro-organismos em atuarem como agentes biodetoxicantes do HH. Um teste controle sem a adição de substrato também foi incluído para avaliar a atividade do inoculo. Todos os experimentos foram realizados em condições mesofílicas em frascos reatores de vidro com 275 mL de volume total, que foram incubados a 35°C em agitadores orbitais termostatizados da marca Solab[®].

O volume de HH usado em cada frasco reator foi fixado em 15 mL e o volume total do reator foi de 150 mL, restando 125 mL de *head space*. A quantidade de inóculo usada em cada teste dependeu da concentração de carbono orgânico total solúvel (COT) de cada HH a fim de manter uma relação alimento/micro-organismo (A/M) de 1,85 g COT.g SSV⁻¹ como sugerido por outros autores (Kongjan e Angelidaki, 2010). O pH inicial em cada frasco reator foi mantido em 5,5 adicionando gotas de solução de NaOH (1,5 mol.L⁻¹) quando necessário. Além disso, uma solução de macro- e micronutrientes foi adicionada conforme composição sugerida por Fangkum e Reungsang (2011).

Parte do inóculo usado para os testes acidogênicos foram coletados de um reator anaeróbio tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) alimentado com esgoto sanitário, instalado no centro de pesquisa e treinamento em saneamento (CePTS) UFMG/Copasa) localizado na ETE Arrudas no município de Belo Horizonte e a outra parte foi de fezes bovina, que presumidamente possui como consórcio microbiano micro-organismos anaeróbios adaptados a frações hidrolisadas de resíduos lignocelulósicos. Os inóculos foram misturados respeitando-se uma relação de 1:1 (m/m) de inóculo de UASB e fezes bovinas. Após a mistura, a mesma foi submetida a um pré-tratamento térmico a 90°C, por 10 min em banho maria termostatizado da marca SOLAB[®].

O pré-tratamento foi realizado para eliminar micro-organismos consumidores de hidrogênio e dar uma vantagem adicional ao micro-organismos produtores de hidrogênio como, *Clostridium sp*, que tem a capacidade de esporular e, por isso, resistem ao tratamento térmico. Após o pré-tratamento térmico o inóculo foi mantido sob pH de ~ 5,5 e alimentado

semanalmente com uma quantidade de xilose suficiente para manter uma concentração de 1,0 g.L⁻¹. Antes do início dos testes de PBH o inóculo foi incubado por sete dias nas mesmas condições do teste. Isto foi realizado para evitar a produção de H₂ a partir da matéria orgânica residual presente no inóculo. Amostras dos reatores de bancada foram coletadas no início e final do teste para determinar o teor de COT, açúcares, furanos, LS, XOS e ácidos orgânicos.

Após a etapa acidogênica a eficiência de conversão ácida (*EA*) para cada condição foi estimada pela equação 7.1 como segue,

$$EA\% = \left(\frac{COT_{AGV}}{COT_{substrato}} \right) \times 100 \quad (7.1)$$

em que *EA* é a porcentagem de carbono orgânico total alimentado que foi convertido em AGV, COT_{AGV} é a quantidade de carbono orgânico total presente na forma de AGV após a fase acidogênica e $COT_{substrato}$ é a quantidade de COT alimentado no início do ensaio acidogênico. A fim de estimar este parâmetro considerou-se a quantidade teórica de carbono orgânico total presente em cada mol de AGV medido nas amostras (por exemplo, 24 g de carbono por mol de ácido acético).

7.3.2 Avaliação do potencial bioquímico do metano

Após os testes anaeróbios acidogênicos, cada frasco de vidro foi aberto e a fração líquida restante foi separada do inóculo acidogênico (fase sólida) por meio de centrifugação a 3600 rpm durante 15 min. Uma parte da fração líquida (efluente) foi armazenado para posterior caracterização da quantidade de açúcares C5-C6, AGV, FF, HMF e COT, enquanto que 15 mL foram utilizados para os testes metanogênicos.

Os testes anaeróbios metanogênicos em batelada foram realizados em triplicata para avaliar PBM da fração líquida resultante dos testes acidogênicos. Um teste controle, sem a adição de substrato também foi executado para avaliar a atividade metanogênica do inóculo. Todos os experimentos foram realizados em condições mesofílicas a 35°C em reatores de vidro de 275 mL, que foram colocados num agitador orbital termostático sob as mesmas condições anteriormente descritas para os testes acidogênicos. O volume de líquido de cada frasco de vidro foi de 150 mL, garantindo um *head space* de 125 mL.

O inóculo anaeróbio usado para os testes de PBM também foi tirado do CePTS UFMG/Copasa. O inóculo também foi pré-incubado durante quatro dias a 35°C, a fim de eliminar a produção de CH₄ a partir da biodegradação de qualquer matéria orgânica residual.

A quantidade de inóculo utilizado dependeu da concentração de carbono orgânico total (COT) remanescente na fração líquida (efluente) de cada teste acidogênico. Isto teve como objetivo manter uma razão A/M de 0,4 g COT.gSSV⁻¹. Uma quantidade de solução tampão de NaHCO₃ aquoso foi adicionada para atingir uma concentração de 5,0 g.L⁻¹ em cada reator de vidro. Além disso, uma quantidade de nutrientes foi adicionada para se obter uma solução com os seguintes componentes e as suas respectivas concentrações em g.L⁻¹ entre parênteses: NH₄Cl (0,28), K₂HPO₄ (0,25), MgSO₄.7H₂O (0,10), CaCl₂.2H₂O (0,01) e CaCO₃ (0,60). Adicionalmente, 150 µL de uma solução contendo os seguintes elementos traço com as suas respectivas concentrações (mg.L⁻¹) em parênteses foram adicionados a cada frasco de vidro: FeCl₂.4H₂O (2,0), H₃BO₃ (50), de ZnCl₂ (50), CuCl₂.2H₂O (38), MnCl₂.4H₂O (500), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (50), AlCl₃.6H₂O (90) e CoCl₂.6H₂O (2,000) (Costa et al., 2014). No final dos testes metanogênicos as amostras foram coletadas para determinação da concentração de AGV e COT. Todos os valores de PBH e PBM (Nm³.kgCOT⁻¹) foram expressos em condições de temperatura e pressão padrão (STP: 273 K e 101315 Pa). Os testes de PBH e PBM foram terminados quando a produção diária de hidrogênio e metano foi inferior a 1% do total acumulado.

7.3.3 Modelagem dos dados experimentais

Os dados de produção acumulada de hidrogênio e de metano dos experimentos acidogênicos e metanogênicos foram ajustados a um modelo de Gompertz modificado equação (7.2) ou a um modelo cinético de primeira ordem pela equação (7.3). A validade dos modelos foi verificada pelos coeficientes de determinação (R^2) e a similaridade entre os valores experimentais e aqueles valores previstos pelos modelos. Após a análise, o melhor modelo utilizado para modelar os dados experimentais acidogênicos foi o modelo de Gompertz modificado. A produção máxima de hidrogênio acumulado (P) foi então calculada pela análise da regressão sigmoidal não-linear dos dados experimentais usando a Eq. (7.2) como segue:

$$P / mmol = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Re}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7.2)$$

em que P é o potencial de produção de hidrogênio (mmol de H₂), R é a taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol H₂ h₋₁), λ é o tempo da fase *lag* (em dias) e e é exp(1).

Diferentemente do que foi observado no capítulo 6, o modelo cinético que melhor se ajustou aos dados de produção de CH₄ não foi o de Gompertz, mas sim o de primeira ordem Eq. (7.3), que tem sido aplicado com sucesso em outros estudos de biodegradabilidade anaeróbia de biomassa lignocelulósica (Ferreira *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014).

$$B / \text{mmol} = B_0 \left[1 - \exp(-k_h t) \right] \quad (7.3)$$

em que B é a produção de CH₄ (mmol), B_0 é comumente utilizado para estimar o grau da extensão da reação, variável que está relacionada com a biodegradabilidade do substrato e k_h (d⁻¹) é a constante de velocidade cinética do processo metanogênico, que pode ser utilizada posteriormente em modelos cinéticos genéricos tais como o ADM1 para prever o desempenho da digestão anaeróbica.

A taxa de produção máxima específica de H₂ (R_{SH_2}) (Nm³.gCOT⁻¹_{adicionado}.d⁻¹) ou CH₄ (R_{SCH_4}) foi obtida dividindo o R gerado pelo modelo de Gompertz no caso do hidrogênio (Eq. 7.2) e o produto de $B_0 \times k_h$ no caso do CH₄ (Eq. 7.3) pelo COT alimentado no início do teste. Em ambos os casos foi necessário fazer a conversão de unidade de mmol para Nm³, considerando as condições padrão (273,15 K e 101315 Pa).

7.3.4 Ensaio de hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática com a fração sólida gerada no pré-tratamento do BC por AH (referente à condição DC4) foram realizados no Laboratório Nacional de Tecnologia do Bioetanol (CTBE). Durante os ensaios utilizou-se dois coquetéis de enzimas: *celluloclast* (celulase de *Trichoderma reesei*, ATCC 26921) e a β-glicosidade (celobiase de *Aspergillus niger*). A atividade das enzimas na solução estoque foram previamente determinadas atingindo os valores de 85,53 FPU.mL⁻¹ e 544,37 UI.mL⁻¹ para enzimas *celluloclast* e β-glicosidade, respectivamente.

Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyers de 50 mL mantidos sobre agitação em uma incubadora orbital de 150 rpm da marca *New Brunswick Scientific*[®], mantida a 50°C por 72 horas. A razão líquido-sólido aplicada nos ensaios foi de 10:1 (ml.g⁻¹), sendo a massa da fração sólida (residual da AH realizada na condição DC4) foi de 1,0 g. Durante os ensaios a concentração inicial das enzimas *celluloclast* e β-glicosidade foi fixada em 10 FPU.mL⁻¹ e

20 UI.mL⁻¹, respectivamente. As amostras da fração sólida foram adicionadas juntamente com o coquetel enzimático e uma solução tampão citrato (0,05 mol.L⁻¹). Durante os ensaios uma quantidade de Azida de sódio (0,02% m/v) também foi adicionada para evitar o crescimento microbiano.

Após as 72h, a hidrólise enzimática foi interrompida por meio da inibição térmica das enzimas, o que foi feito imergindo os erlenmeyers em banho de gelo durante 30 min. Passada a etapa de inativação as amostras do hidrolisado foram centrifugadas por 15 min a 9000 rpm, possibilitando a separação das frações sólida e líquida. Uma amostra da fração líquida foi coletada para determinação da concentração de açúcares fermentescíveis liberados durante a HE, conforme descrito na seção (5.2.5).

7.3.5 Estimativa energética

A estimativa energética para cada condição foi calculada considerando a quantidade de energia gerada ($E+$) a partir da combustão de hidrogênio (ΔH° de combustão = 10,8 MJ.Nm³ H₂) e metano (ΔH° de combustão = 34,5 MJ.Nm³ CH₄) produzido durante os ensaios de PBM e PBH, considerando 90% de eficiência na combustão. O gasto energético durante o pré-tratamento por AH ($E-$) foi considerado para calcular o ganho líquido de energia (ΔE) do processo.

A fim de calcular o gasto de energia, a razão sólido-líquido (RSL) utilizada em cada uma das condições, bem como a temperatura do pré-tratamento (T_{AH}) e temperatura de entrada do material, ou seja, BC ($T_{BCentrada} = 25^\circ\text{C}$) e água ($T_{H_2Oentrada} = 100^\circ\text{C}$), foram consideradas. A consideração de que a água de alimentação entra a 100°C é plausível, pois poder-se-ia usar a água residual das turbinas de condensação do sistema de cogeração de energia das usinas de açúcar e álcool. Os valores de capacidade calorífica (C_p) utilizados para BC (em base seca de peso) e água foram $1,76 \times 10^{-3}$ MJ. (kg °C)⁻¹ e $4,19 \times 10^{-3}$ MJ. (kg°C)⁻¹, respectivamente (Kling *et al.*, 1987). O ΔE foi estimado utilizando a equação 7.5,

$$\Delta E = E(+) - E(-)$$

$$\Delta E = \{[(PBH \times \Delta H^\circ_{\text{comb,H}_2}) + (PBM \times \Delta H^\circ_{\text{comb,CH}_4})] \times \frac{COT_{\text{Solúvel}}}{BC_{\text{Base seca}}} \times 0.9\} - \quad (7.5)$$

$$\{[C_{p,SB} \times m_{SB} \times (T_{AH,T} - T_{SB,25^\circ\text{C}})] + [C_{p,H_2O} \times \frac{1}{RSL} \times \rho_{H_2O} \times (T_{AH,T} - T_{H_2O,100^\circ\text{C}})]\}$$

em que o PBH é o potencial bioquímico de hidrogênio, PBM é o potencial bioquímico de

metano, $COT_{\text{solúvel}}/BC_{\text{base seca}}$ é a quantidade de carbono orgânico total solúvel por kg de BC, em base seca, liberado para o HH após os ensaios de AH e ρ_{H_2O} é a massa específica da água (1,0 g / cm³).

7.4 Resultados e Discussão

7.4.1 Avaliação da biodegradabilidade acidogênica do hidrolisado hemicelulósico (HH)

A Tabela 7.1 mostra a concentração dos principais compostos contidos no HH no início dos ensaios acidogênicos. Para avaliar a eficiência da etapa acidogênica, a eficiência de remoção de COT, PBH e EA (%) foram avaliadas para cada condição de desejabilidade estudada. Na etapa acidogênica nenhuma produção de CH₄ foi detectada, indicando que o tratamento térmico do inóculo foi efetivo na inibição de bactérias metanogênicas.

O pré-tratamento do BC na condição DC2 (178,6°C, 43.6 min e 0.238 g BC_{base seca}·mL H₂O⁻¹) foi o que gerou um HH com maior capacidade de produção de H₂ (0,293 Nm³·kg COT⁻¹) como pode ser visto na Tabela 7.1. Estes valores de produção são promissores quando comparados com os valores obtidos por outros autores. Lazaro *et al.* (2014), por exemplo, encontrou um valor de PBH de 0,133 Nm³ H₂·kg DQO⁻¹ utilizando vinhaça gerada durante a produção de etanol 1G como substrato. Jung *et al.* (2011) por sua vez encontrou valores de PBH de 0,060 Nm³ H₂·kg DQO⁻¹ a partir de biomassa algal pré-tratada em 170°C por 20 min. Nualsri *et al.* (2016) quando estudou a capacidade de produção de H₂ a partir do suco da cana-de-açúcar obteve um valor de 0,373 Nm³ H₂·kg DQO⁻¹.

Com objetivo de comparar os resultados de PBH obtidos no presente estudo com aqueles reportados por outros autores que também avaliaram o HH de diferentes culturas como substrato, foi necessário converter os valores obtidos em Nm³·kg COT⁻¹ para NL H₂·g C5-C6⁻¹, uma vez que muitos autores tem reportado seus resultados nessa unidade. O PBH de 0.83 NL H₂·g C5-C6⁻¹ encontrado neste estudo para o HH da condição DC2 é maior que os 0.33 NL H₂·g C5-C6⁻¹ HH obtidos por Pattra, Sakchai *et al.* (2008), que utilizaram HH obtido a partir do pré-tratamento ácido do BC realizado com H₂SO₄ 0,5 % (v/v), 121°C, RSL = 0,06 e 60 min.

Os maiores valores encontrados para HH gerado pela condição DC2 mostram que a AH foi capaz de gerar um HH mais susceptível à geração de H₂ quando comparado ao pré-tratamento ácido feito por Pattra, Sakchai *et al.* (2008). Possivelmente isto tenha ocorrido,

pela maior severidade do tratamento ácido, que pode levar à formação de maior quantidade de compostos tóxicos no HH. Além dos melhores resultados quando comparados ao HH gerado pelo pré-tratamento ácido do BC, o PBH para o HH DC2 foi maior que os 0,30 NL H₂.g C₅-C₆⁻¹ observados quando avaliou-se o HH gerado a partir do pré-tratamento térmico por explosão a vapor da palha de milho realizada a 220°C por 3 min (Datar, Huang, Maness, Mohagheghi, Czernik e Chornet, 2007).

A comparação dos resultados de produção de PBH, obtidos para o HH gerado na condição DC2, com alguns resultados reportados na literatura mostra que existe potencial para produção de H₂ a partir deste substrato. Uma hipótese para explicar a boa performance observada para este HH pode estar associada às pequenas quantidades de furanos e fragmentos de lignina solúvel nele contidas, quando comparado aos HH das condições DC1, DC3 e DC4. A Tabela 7.1 mostra que para os HH DC1, DC3 e DC4 as concentrações de LS foram sempre maiores que 0,9 g.L⁻¹, enquanto que os teores de furanos foram sempre superiores a 0,15 g.L⁻¹.

As concentrações de furanos e lignina no HH estão de acordo com aqueles encontrados por Siqueira e Reginatto (2015). Esses autores mostraram que as concentrações de furanos entre 0,2 e 0,5 g.L⁻¹ diminuíram de 20 a 35% a produção de H₂ quando comparado a uma solução sintética contendo apenas glicose. O estudo desenvolvido por esses autores também aponta que a presença de alguns compostos derivados da lignina como siringaldeído, vanilina e ácido 4-hidroxibenzóico, em concentrações de 0,250 g.L⁻¹ a 2,0 g.L⁻¹, apresentaram efeitos deletérios aos micro-organismos e diminuíram a produção de H₂ em até 70%.

A Figura 7.1 mostra como as maiores concentrações de LS e furanos podem prejudicar o desempenho da taxa máxima específica de produção de H₂ (R_{SH_2}). Quando os valores de R_{SH_2} para o HH DC2 (0,118 Nm³ H₂.kg COT⁻¹_{adicionado}.d⁻¹) são comparados com os obtidos para os HH DC1 (0,040 Nm³ H₂.kg COT⁻¹_{adicionado}.d⁻¹), DC3 (0,052 Nm³ H₂.kg COT⁻¹_{adicionado}.d⁻¹) e DC4 (0,043 Nm³ H₂.kg COT⁻¹_{adicionado}.d⁻¹) é possível notar que o HH produzido pelas condições DC1 e DC4 foram os que apresentaram maiores valores de furanos, 0,202 g.L⁻¹ e 0,270 g.L⁻¹, respectivamente. Além disso, as condições DC1 e DC4 também foram as que apresentaram HH com maiores teores de LS, 1,24 g.L⁻¹ e 1,27 g.L⁻¹, respectivamente. Esses resultados confirmam que maiores quantidades desses compostos comprometem a cinética da produção de H₂ por micro-organismos acidogênicos, No entanto, mesmo sendo comprometidos esses micro-organismos possuem uma maior tolerância quando comparados aos metanogênicos, o que fortalece o uso da etapa acidogênica antes da metanogênica. Isto é

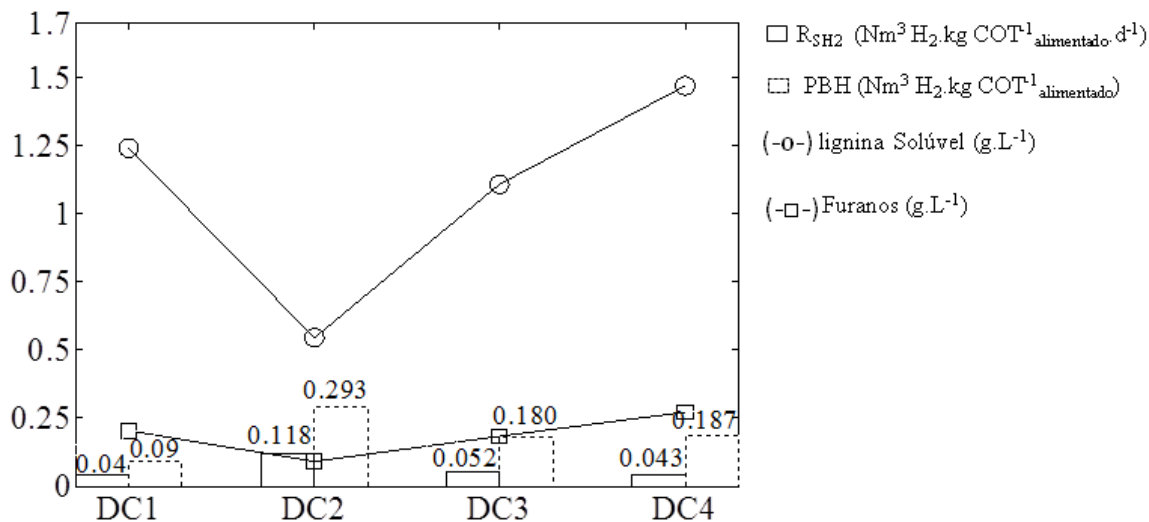
facilmente confirmado se compararmos os valores das fases de adaptação (λ) para o consórcio acidogênico alimentado com todos os HH (DC1= 0,604, DC2= 0,574, DC3= 0,994 e DC4= 1,025 dias), com os valores para o consórcio microbiano atuantes no sistema anaeróbio de um único estágio (ver Fig 6.9), quando alimentados com os mesmos HH (DC1= 7,53, DC2= 11,37, DC3= 7,65 e DC4= 10,02 dias).

Tabela 7.1: Características do HH antes do início da etapa acidogênica e valores de desempenho do processo.

Condição	COT (g.L ⁻¹)	C5-C6 (g.L ⁻¹)	Furanos (g.L ⁻¹)	HAc ^a (g.L ⁻¹)	LS ^b (g.L ⁻¹)	XOS ^c (g.L ⁻¹)	Remoção de TOC (%) ^d	PBH	EA (%)
								(Nm ³ H ₂ .kg TOC ⁻¹)	
DC1	2,9 (± 0,086)	0,656 (± 0,017)	0,202 (± 0,0045)	0,301 (± 0,012)	1,24 (± 0,156)	1,95	22,85 (± 1,38)	0,090 (± 0,028)	55,40
DC2	1,8 (± 0,042)	0,633 (± 0,022)	0,089 (± 0,0066)	0,270 (± 0,08)	0,544 (± 0,058)	2,12	19,51 (± 2,41)	0,293 (± 0,022)	91,85
DC3	2,3 (± 0,022)	0,723 (± 0,026)	0,181 (± 0,0089)	0,324 (± 0,019)	1,11 (± 0,131)	3,10	31,00 (± 3,56)	0,180 (± 0,018)	88,69
DC4	2,9 (± 0,038)	0,867 (± 0,056)	0,270 (± 0,0072)	0,419 (± 0,015)	1,47 (± 0,137)	4,00	37,66 (± 3,92)	0,187 (± 0,028)	82,98

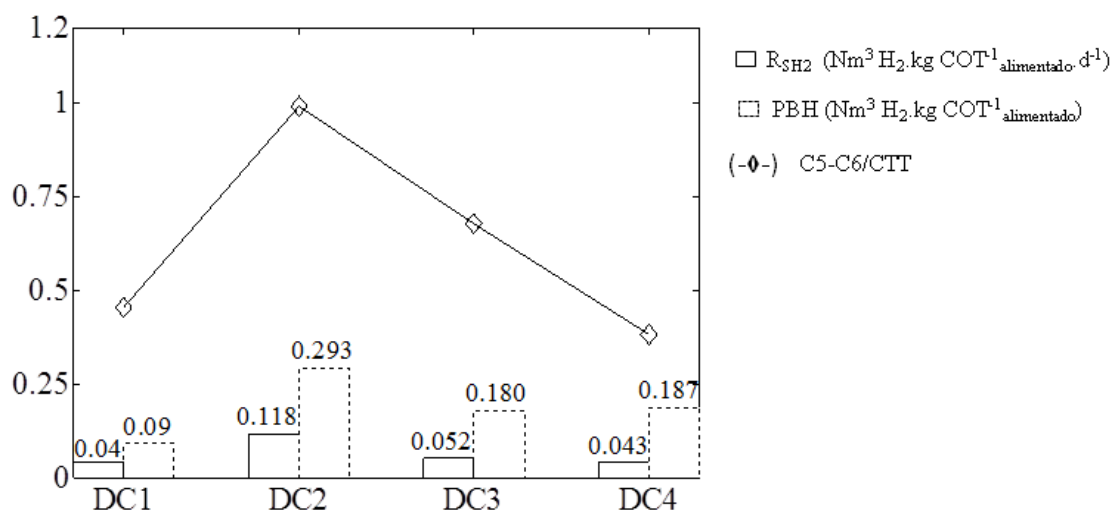
acético, ^b lignina solúvel, ^c xilo-oligômeros (XOS).

Figura 7.1: Taxa máxima específica de produção de H₂ (□), potencial bioquímico de H₂ PBH (□□), lignina solúvel (-o-) e furanos (-□-).



A Figura 7.2 mostra a relação existente entre a R_{SH_2} e a razão de açúcares C5-C6 e compostos tóxicos totais (C5-C6/CTT) presentes em cada HH gerado por cada condição. Os compostos tóxicos totais (CTT) foram considerados como a soma de furanos e lignina. Valores maiores de C5-C6/CTT indicam que o HH possui uma menor carga de compostos tóxicos em relação aos compostos facilmente biodegradáveis. Como os efeitos da toxicidade de compostos originados a partir de biomassa lignocelulósica afetam mais a cinética dos bioprocessos (Mussatto e Roberto, 2004), esta variável pode ser usada para verificar o nível de toxicidade do sistema.

Figura 7.2: Relação entre a razão C5-C6/CTT (-◇-), R_{SH₂} (□) e PBH (▤) para os HH.



Na Figura 7.2 é possível perceber que o comportamento da R_{SH₂} segue a mesma tendência da razão C5-C6/CTT. Um aumento de 0,538 na razão C5-C6/CTT observada entre o HH DC1 e o HH DC2 provocou um aumento de 0,078 Nm³ H₂.kg COT⁻¹ alimentado.d⁻¹ na R_{SH₂}. Por outro lado, é possível perceber que uma diminuição de 0,314 na razão C5-C6/CTT do HH DC2 para o HH DC3 levou a uma redução de 0,066 Nm³ H₂.kg COT⁻¹ alimentado.d⁻¹, enquanto que uma redução de 0,295 na razão C5-C6/CTT do HH DC3 para o DC4 provocou uma redução de 0,009 Nm³ H₂.kg COT⁻¹ alimentado.d⁻¹. Tais resultados sugerem que o entendimento da variável C5-C6/CTT pode ser um bom parâmetro para avaliar a relação entre o nível de toxicidade do sistema e as alterações nas taxas máximas de produção de H₂ para o HH gerado a partir da AH do BC.

A Figura 7.3(a-d) mostra o perfil cinético para produção de H₂ para todos os HH obtidos a partir das condições testadas. Além disso, é possível verificar os parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz modificados (Eq. 7.2) para os dados experimentais. Por meio dos valores de coeficiente de correlação $R^2 > 0,96$, observados para todos os experimentos, é possível dizer que o modelo foi capaz de explicar 96% dos dados experimentais. O valor da taxa máxima de produção de H₂ (R) observado para o HH DC2 (1,417 mmol H₂.d⁻¹) foi pelo menos 50% maior que os observados para os HH (DC1 = 0.774 mmol H₂.d⁻¹, DC3 = 0.815 mmol H₂.d⁻¹ e DC4 = 0.840 mmol H₂.d⁻¹).

O melhor desempenho observada no estágio acidogênico para o HH DC2 pode estar relacionada à quantidade de carbono orgânico solúvel que foi convertido a AGV. Para este HH a EA (%), conforme pode ser visto na Tabela 7.1, foi estimada em 91,85%. Este valor é

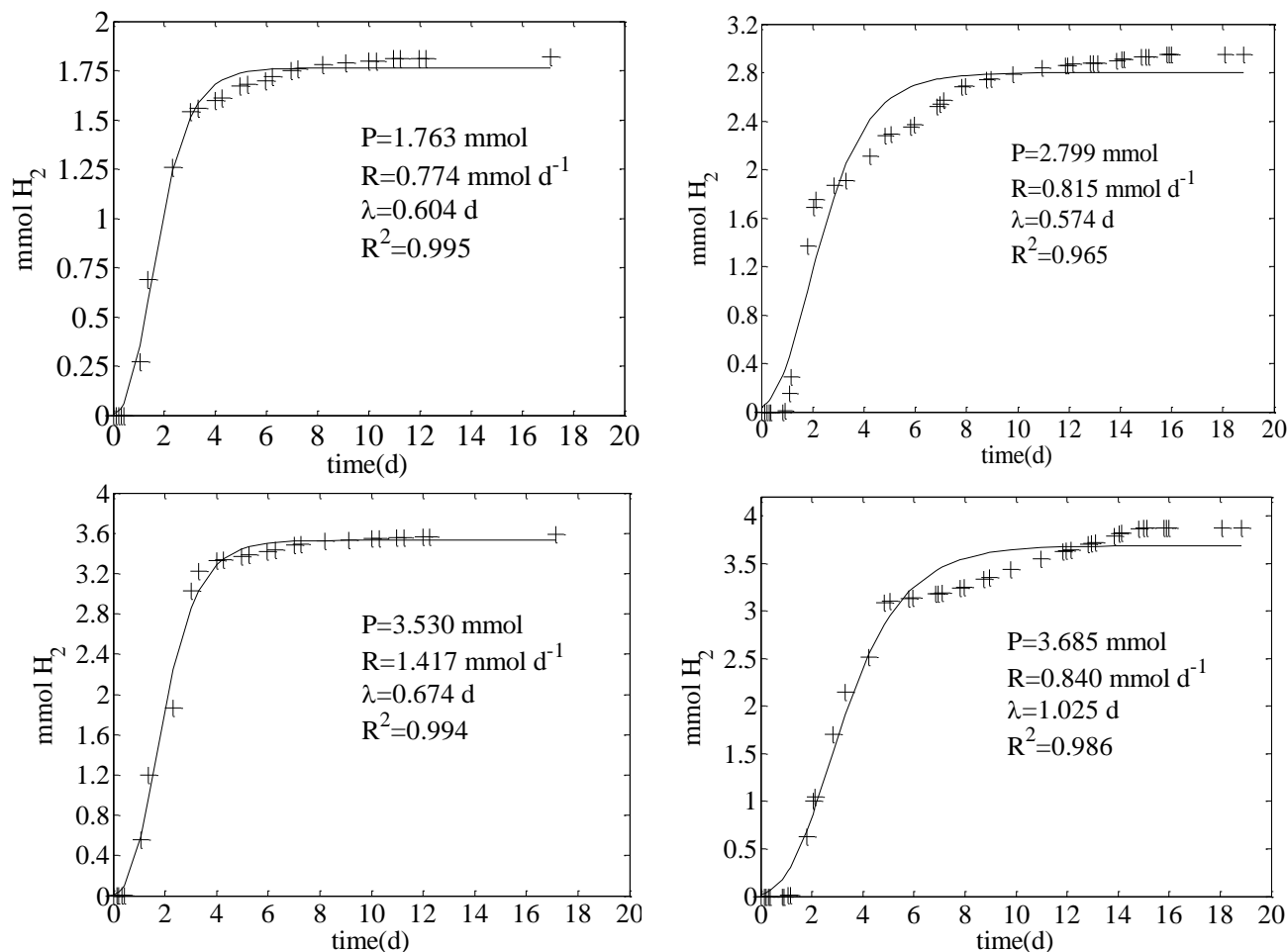
maior do que aqueles obtidos para HH DC1 (55,40%), DC3 (88,69%) e DC4 (82,98), sugerindo que a composição do HH DC2 seja a mais apropriada para o processo de acidificação. Adicionalmente, uma explicação para o pior desempenho do HH DC1 talvez esteja relacionada com a baixa conversão de COT a ácido como observado para este HH. A maior acidificação do HH parece favorecer a etapa posterior de metanogênese, como será discutido posteriormente.

Tendo em vista que os furanos e ligninas são compostos considerados tóxicos e que os XOS são macromoléculas que necessitam passar por uma etapa de hidrólise para serem utilizados durante a DA, os mesmos foram considerados importantes para fase de adaptação dos micro-organismos. Com intuito de avaliar o efeito isolado de cada uma dessas variáveis sobre a fase *lag* (λ), a partir da Tabela 7.1 e da Figura 7.3 compararam-se os valores obtidos para as diferentes condições.

Em DC1 e DC2 os valores de concentração dos XOS (DC1 = 1,95 e DC2 = 2,12 g.L⁻¹) para os dois ensaios são muito próximos, enquanto que os valores de LS (DC1=1,24 e DC2 = 0,54 g.L⁻¹) e furanos (DC1 = 0,202 e DC2 = 0,089 g.L⁻¹) sofreram uma variação de ~ 2 vezes para ambas as variáveis. Ao avaliar os valores de λ (DC1 = 0,604 e DC2 = 0,674 dias), é possível perceber que não houve grande diferença entre eles. Isto permite concluir que apesar da toxicidade relatada para os furanos e lignina solúvel, o efeito desses compostos sobre a fase *lag* da etapa acidogênica não se mostrou relevante.

Por outro lado, na comparação entre as condições DC1 e DC4, em que as concentrações de LS e furanos não foram muito diferentes, observou-se uma variação na fase *lag* de ~ 2 vezes (DC1 = 0,604 e DC4 = 1,025 dias). Essa diferença pode ser explicada pelo efeito da variável XOS sobre λ , visto que a concentração desse composto no HH DC4 foi maior (DC1 = 1,95 e DC4 = 4,0 g.L⁻¹). Com isto fica evidente que o efeito da variável XOS sobre a fase *lag* durante a etapa acidogênica é mais pronunciado do que observado para os furanos e lignina solúvel.

Figura 7.3: Produção acumulada de H₂ na etapa acidogênica para os HH DC1(a), DC2(b), DC3(c) e DC4(d)



Durante a etapa acidogênica da DA os ácidos são normalmente os principais produtos acumulados. A Figura 7.4 mostra a concentração dos diferentes AGVs acumulados durante a digestão anaeróbia dos HH. Além dos ácidos é possível observar a concentração inicial e final dos principais compostos presentes no HH. A Figura 7.4 mostra que durante a etapa acidogênica os compostos facilmente degradáveis como os açúcares C5-C6 (glicose, xilose e arabinose) foram totalmente consumidos pelos micro-organismos e possivelmente convertidos em AGVs. Além das conversões dos açúcares, a Figura 7.4 mostra que para todos HH foram observadas reduções nas concentrações de FF e HMF. A eficiência de remoção para os furanos (FF + HMF) em todos os ensaios foi superior a 80%.

Kongjan *et al.* (2010) em estudo realizado para avaliar a capacidade de produção de H₂ a partir do HH obtido da palha de trigo usando micro-organismos da espécie *Thermodes ulfovibrio sp*, também reportou a degradação de compostos tóxicos como FF e HMF. Esses resultados, associados aos encontrados neste estudo, demonstram a capacidade dos micro-

organismos produtores de H₂ em removerem parte dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado. Essa remoção pode ocorrer por assimilação por parte dos micro-organismos ou pela adsorção desses compostos no inóculo. Esta hipótese é plausível, pois, a hidrofobicidade desses compostos associada à hidrofobicidade da parede celular dos micro-organismos pode favorecer o mecanismos de adsorção.

As reduções na concentração dos compostos tóxicos observadas durante os ensaios acidogênicos certificam a capacidade da fase acidogênica em atuar como uma etapa detoxificante do HH antes do seu uso para produção de CH₄ em uma etapa metanogênica. Essa ação pode melhorar a produção de CH₄, pois os micro-organismos metanogênicos acetoclásticos que apresentam menores taxas de crescimento e são menos tolerantes aos compostos tóxicos entrariam em contato com um HH mais biodegradável.

Os principais metabólitos gerados pela digestão acidogênica do HH obtido pela AH do BC foram os ácidos acéticos e butírico. A Figura 7.4 mostra que para os HH obtidos pelas condições de pré-tratamento mais severas como DC1 (185°C e 55 min), DC3 (178,6°C e 55 min) e DC4 (182,9°C e 41 min) houve predominância do acúmulo de ácido butírico ao invés de acético.

Alguns autores, tais quais Buitrón *et al.* (2014), Lazaro *et al.* (2014) e Pattra, Sakchai *et al.* (2008) usaram as razões de HAc/AGV_{total} e HBut/AGV_{total} para estimar a rota metabólica predominante dos micro-organismos durante a etapa acidogênica. Na Figura 7.4 é possível verificar que no final da etapa acidogênica quando se utilizou o HH produzido pela condição DC2, o valor da relação HAc/AGV_{total} foi de 0,47 mg HAc.mg AGV_{total}⁻¹, enquanto que o valor da relação HBut/AGV_{total} atingiu o valor de 0,23 mg HBut.mg AGV_{total}⁻¹. Esses valores permitem concluir que o HH gerado pela DC2 favoreceram a rota acética.

O maior valor de PBH (0.293 Nm³.kg COT⁻¹) observado para este HH pode estar relacionado com a predominância da rota acética no sistema. Considerando o metabolismo para açúcar C6 (glicose), sabe-se que 1 mol de glicose quando convertido a acetato pode gerar 4 mols de H₂, enquanto que a rota butírica é capaz de gerar apenas 2 mol de H₂ (Fangkum e Reungsang, 2011). Diante disso, é possível afirmar que o HH que possui características que favorecem a rota acética, como o gerado pela condição DC2 deve ser preferido quando o objetivo é a produção de H₂.

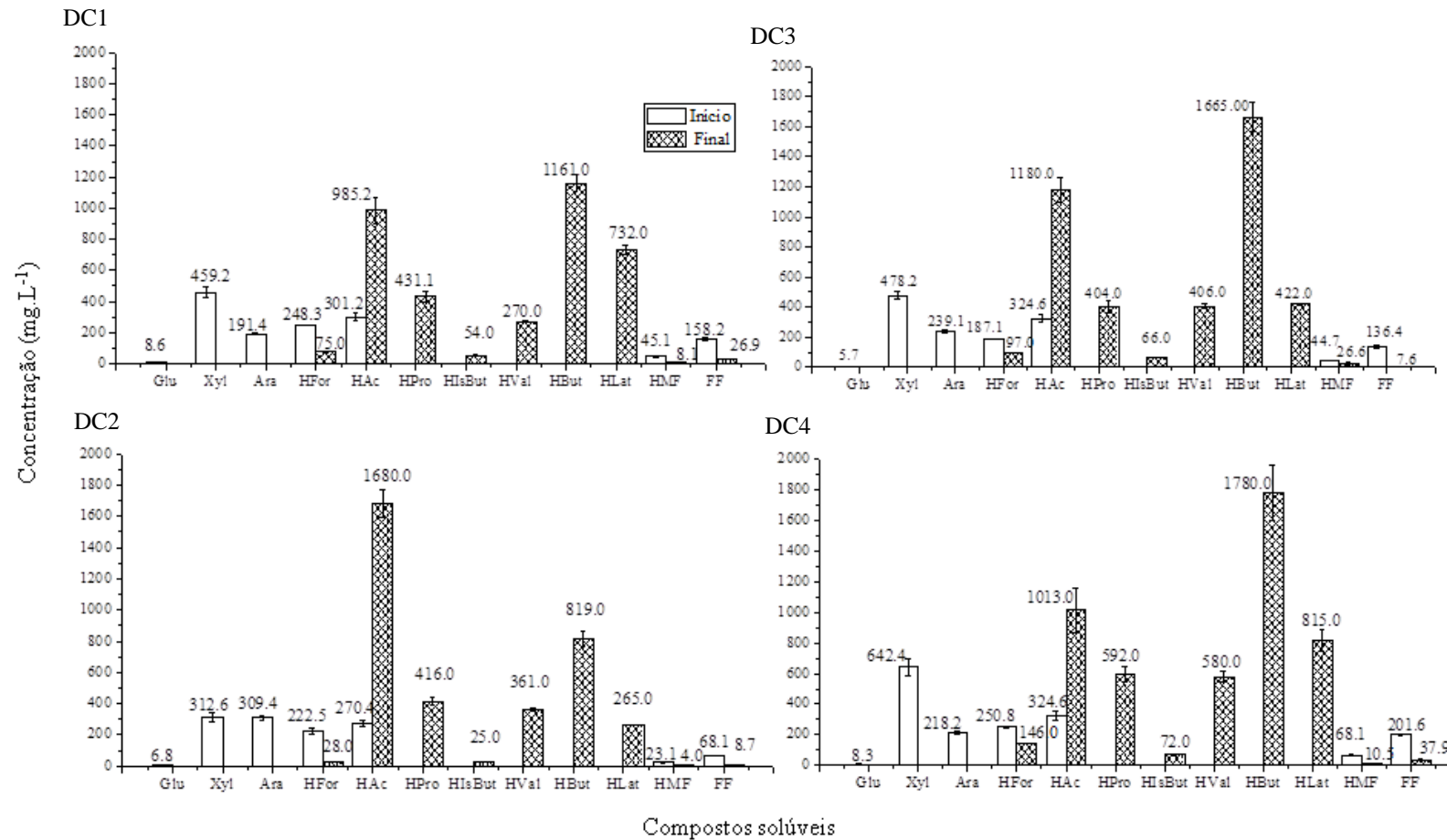
Para aqueles HH com maiores quantidades de compostos tóxicos (DC1, DC3 e DC4), a digestão acidogênica seguiu preferencialmente a rota butírica. Para o HH DC1 o valor de HAc/AGV_{total} foi de 0,29, enquanto que HBut/AGV_{total} foi 0,39. Esse comportamento foi

repetido para as condições DC3 (HAc/AGV_{total} = 0,28 e HBut/AGV_{total} = 0,39) e DC4 (HAc/AGV_{total} = 0,20 e HBut/AGV_{total} = 0,36). Isto mostra um indício de que sistemas com elevados teores de compostos tóxicos podem induzir a rota butírica. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores como Fangkum e Reungsang (2011), que também notaram a predominância de uma fermentação butírica para um HH produzido pelo pré-tratamento ácido (5% H₂SO₄ (v/v), 60 min e 121°C) do BC. Tal pré-tratamento é conhecido por gerar grandes quantidades de compostos tóxicos.

Outro metabólito produzido pela degradação acidogênica do HH gerado pela AH do BC foi o ácido láctico. No final da etapa acidogênica, a concentração de ácido láctico no efluente foi de 732 (DC1), 265 (DC2), 422 (DC3) e 815 mg.L⁻¹ (DC4). A maior quantidade de ácido láctico observada para os HH DC1, DC3 e DC4, pode ser um dos fatores que explicam o maior valor de PBH observado para condição DC2. De acordo com Nualsri *et al.* (2016) não existe consumo ou geração de H₂ associado à formação de ácido láctico a partir de açúcares. Sendo assim, condições que geram maiores quantidades de ácido láctico podem exibir menores produções de H₂.

As eficiências de remoção de COT durante a etapa acidogênica para todos os HH estudados foram menores que 40%, conforme pode ser visto na Tabela 7.1. Isto indica que a etapa acidogênica não contribuiu para remoção de carbono solúvel do hidrolisado. De fato, os dados apresentados anteriormente mostram que grande parte da matéria orgânica presente no HH tenha sido provavelmente convertida a AGV. Devido à grande quantidade de matéria orgânica residual no efluente acidogênico é requerida uma etapa adicional ao processo para remover o carbono presente na fração líquida, e tal etapa pode ser a metanogênese. A inclusão desta etapa ao processo pode aumentar a recuperação de energia a partir do HH gerado pela AH do BC.

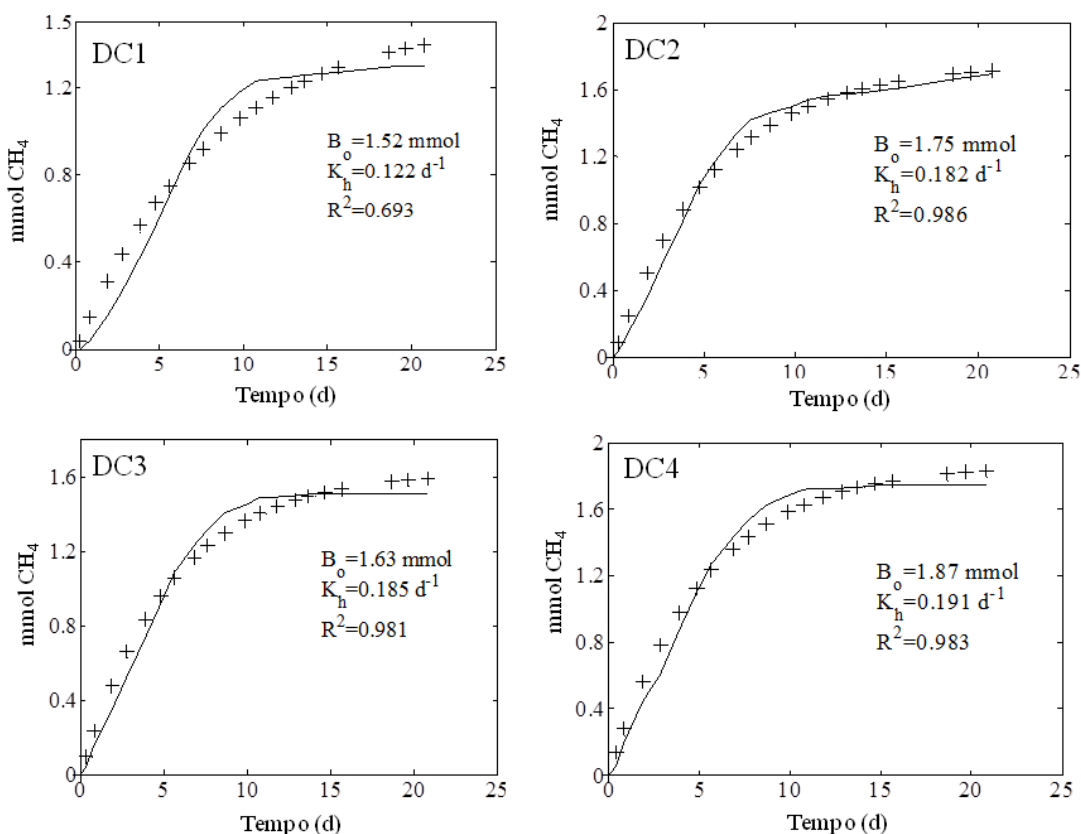
Figura 7.4: Concentração de substratos e metabólitos na fase líquida no início e final dos ensaios acidogênicos.



7.4.2 Avaliação da biodegradabilidade metanogênica do efluente acidogênico

O estágio metanogênico em um sistema anaeróbio de dois estágios (DA-2S) inicia-se após a fase acidogênica. Para simular isto em escala de bancada, o efluente acidogênico foi recuperado e submetido a uma etapa metanogênica como descrito na seção 7.3.2. Os dados da modelagem realizada pelo modelo de cinética de primeira ordem (Eq. 7.3) para os dados experimentais obtidos pelos ensaios de PBM para todos os HH estudados (DC1, DC2, DC3 e DC4) são apresentados na Figura 7.5.

Figura 7.5: Produção acumulada de CH₄ durante o estágio metanogênico do efluente acidogênico gerado a partir da acidogênese do HH gerado pela AH do BC nas condições DC1, DC2, DC 3 e DC4.



A Figura 7.5 mostra que a produção de CH₄ iniciou-se nas primeiras horas, demonstrando que os micro-organismos metanogênicos encontraram um substrato mais biodegradável, não demandando nenhum período de adaptação ou fase *lag*. Esses resultados diferem daqueles apresentados no capítulo 6, em que se observou um período de adaptação para todos os HH usados nos ensaios de PBM (ver Figura 6.9). As fases *lag* reportadas para a

DA em único estágio para o HH gerado pela AH do BC variaram de 7,5 a 11,4 dias, indicando que os micro-organismos demandaram tempo bem superior ao seu tempo de geração para se adaptarem ao meio. Conforme discutido anteriormente, isto aconteceu em decorrência da presença de compostos tóxicos no HH.

A Tabela 7.2 compara os valores de PBM bem como os parâmetros cinéticos obtidos para produção de CH₄ por DA em um único estágio (DA-1S), conforme já discutido no capítulo 6, com os valores obtidos quando o HH foi submetido a uma digestão anaeróbia em dois estágios, acidogênese e metanogênese (DA-2S).

Tabela 7.2: Comparação dos parâmetros da atividade metanogênica realizada com HH obtido pela AH do BC em em único estágio e em duplo estágio.

Condições da AH (Fonte de HH)	DA-1S			DA-2S		
	PBM ^a	λ ^b	R _{SCH₄} ^c	PBM	λ	R _{SCH₄}
DC1	0.74	7.53	0.007	1.00	None	0.019
DC2	1.56	11.37	0.032	1.81	None	0.049
DC3	0.48	7.65	0.003	1.52	None	0.042
DC4	0.35	10.02	0.003	1.52	None	0.043

^aPBM - Nm³ CH₄.(kg TOC)⁻¹; ^b λ - fase lag (d⁻¹); ^cR_{SCH₄} - Nm³ CH₄.(kg TOC.d)⁻¹.

Uma possível explicação para as diferenças observadas na fase de adaptação parece estar relacionada ao fato de que na etapa acidogênica parte dos xilo-oligômeros e compostos considerados tóxicos foram assimilados e convertidos em compostos mais facilmente biodegradáveis, portanto, a fase acidogênica teve o papel de atuar como uma etapa de biodetoxificação do HH.

O aumento na produção de CH₄ durante a DA-2S pode ser observado comparando os valores de PBM. Para todos os HH estudados a adição de uma etapa acidogênica antes da etapa metanogênica melhorou a atividade dos micro-organismos e culminou com aumentos nos valores de PBM de até 4 vezes. Os maiores ganhos foram observados para as condições até então consideradas como geradoras de um HH de difícil assimilação, como é o caso dos HH obtidos pelas condições DC1, DC3 e DC4. O aumento no PBM para o HH DC1 tratado previamente submetido à etapa acidogênica foi de 35,1 %. Enquanto isto, os valores para as condições DC3 e DC4 foram, 216 e 334 %, respectivamente. O aumento observado para o HH DC2 não foi tão significativo, apenas 16 %. Isto mostra que tal HH já continha em sua composição uma matéria orgânica solúvel mais disponível para produção de CH₄ em um único estágio.

Além do PBM, a inclusão da etapa acidogênica também alterou os parâmetros cinéticos do processo, tal qual a taxa de produção máxima específica de CH₄ (R_{SCH_4}). Para todos os HH estudados a R_{SCH_4} foi aumentada quando comparada ao sistema em um único estágio. Os valores de R_{SCH_4} para os HH DC1 e DC2 foram 2,7 e 1,3 vezes maiores que aqueles observados para o sistema em um único estágio, respectivamente. Enquanto isto para os HH DC3 e DC4 os valores de R_{SCH_4} no sistema DA-2S foram 14 vezes maiores que os observados para a digestão em uma única fase.

As maiores mudanças observadas na R_{SCH_4} para o HH DC3 e DC4 podem estar relacionadas aos maiores valores de XOS presentes nestes HH, conforme pode ser visto na Tabela 7.1. Como essas moléculas são mais complexas e exigem a inclusão de uma etapa de hidrólise antes de serem convertidas pelos micro-organismos metanogênicos, a sua presença no sistema anaeróbio em um único estágio, ao que tudo indica, alterou a cinética do processo. Isto pode ser confirmado ao se avaliar que durante a DA em um único estágio a fase *lag* para o HH DC4 foi de ~10 dias. Já com a inclusão da etapa acidogênica uma hipótese é que parte desses XOS foram hidrolisados a açúcares e posteriormente convertidos a ácidos, o que facilitou a biodegradação na posterior etapa de metanogênese.

Os resultados reportados no presente estudo mostraram que independentemente das características do HH, a adição da etapa acidogênica antes da etapa metanogênica contribuiu para melhorar digestibilidade do HH, levando a um melhor desempenho durante a produção de CH₄. A melhora nos parâmetros cinéticos associada às maiores produções de CH₄ promovidas pela separação espacial da etapa acidogênica permitiu uma melhor recuperação energética a partir do HH.

Comparando os resultados de PBM para os HH efluentes da etapa acidogênica, DC1 ($1,0 \pm 0,02 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4.\text{kg COT}^{-1}$), DC2 ($1,81 \pm 0,015 \text{ CH}_4.\text{kg COT}^{-1}$), DC3 ($1,52 \pm 0,035 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4.\text{kg COT}^{-1}$) e DC4 ($1,52 \pm 0,052 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4.\text{kg COT}^{-1}$) com os resultados obtidos por outros autores que avaliaram a biodegradabilidade do HH em um único estágio, fica evidente que a DA-2S para o HH é uma alternativa tecnológica interessante para aumentar a produção de biogases e conseqüentemente a recuperação de energia a partir do HH. Como exemplos, Kaparaju, Serrano e Angelidaki (2009) que reportou um PBM de $\sim 0,34 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4.\text{kg DQO}^{-1}$ para um HH obtido pela AH (180°C for 15 min e 190°C por 3min) da palha de trigo e Costa, A. G. *et al.* (2014) um PBM de $\sim 0.20 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4.\text{kg DQO}^{-1}$ a partir de HH gerado pela AH do BC (200°C e 10 min), valores de 3 a 9 vezes menores àqueles obtidos neste estudo.

Além disso, a DA-2S resultou em boa eficiência de remoção de carbono orgânico total solúvel em todos os casos estudados (DC1 = 82,71%, DC2 = 86,98%, DC3 = 89,32% e DC4 = 89,42%), garantindo a geração de um efluente com menor quantidade de matéria orgânica. A elevada remoção de COT observada também sugere que os micro-organismos que atuaram nas fases acidogênica e metanogênica foram capazes de converter os xilo-oligômeros em açúcares e ácidos, assegurando um melhor uso da matéria orgânica solúvel contida no HH.

7.4.3 Avaliação da eficiência energética da DA-2S para o HH obtido pela AH do BC.

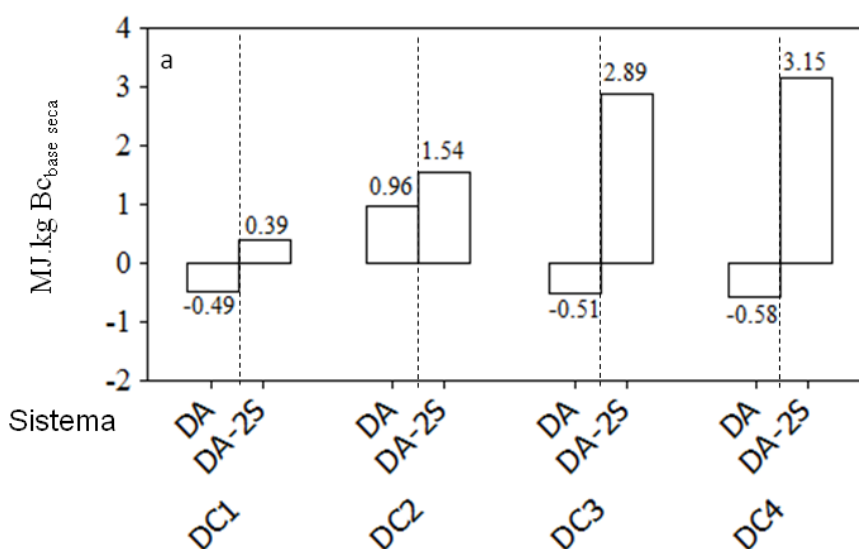
A Figura 7.6 mostra uma estimativa do balanço energético para o processo estudado considerando os HH gerados pelas 4 condições de desejabilidade. Na Figura 7.6 é possível perceber que a DA do HH em um único estágio tem balanço positivo somente para o HH gerado pela condição DC2 (0,96 MJ.kg BC⁻¹_{base seca}). Estes resultados mostram que se somente um único estágio for usado durante a DA do HH gerado pela AH do BC, o aproveitamento da fração hemicelulósica para produção de CH₄ só será viável energeticamente para condições mais brandas (DC2 = 178,6°C por 43,6 min), que são capazes de gerar um HH com menores teores de compostos tóxicos e de mais fácil degradação.

Ao contrário disso, quando o sistema em duplo estágio (DA-2S) foi utilizado a Figura 7.6 mostrou que para todos os HH o balanço energético mostrou-se positivo, sendo as melhores recuperações de energia sendo observadas para as condições de pré-tratamento por AH mais severas tais como as condições DC3 (178,6°C por 55 min) e DC4 (182,9°C por 40,71 min). Estes resultados são muito interessantes, pois abrem caminho para a possibilidade do uso de maiores temperaturas e tempos durante a AH sem a preocupação da perda de recuperação de energia por parte do HH. Soma-se a isso o fato de que, sob condições mais severas, uma fração maior das hemiceluloses e lignina é solubilizada. Tal fato é importante quando se avalia o uso da fração sólida remanescente para a produção de etanol 2G após sua hidrólise enzimática.

O HH que exibiu o melhor balanço de energia para o sistema de DA-2S foi aquele produzido pela condição DC4, com aproximadamente 3,2 MJ por kg de BC em base seca processado durante a AH. Este valor é menor que os 7,98 MJ.kg BC⁻¹_{base seca} observado por Kumari e Das (2015) que avaliaram a recuperação de energia a partir do pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise enzimática. No entanto, apesar do bom resultado encontrado é válido salientar que nesse estudo os autores não consideraram a energia despendida durante o

pré-tratamento. Além disso, a produção de biogás ocorreu considerando toda a mistura gerada após o pré-tratamento, não fazendo distinção da fase sólida enriquecida em celulose e do HH. O uso da fração sólida enriquecida de celulose para produção de biogás concorre diretamente como uso da mesma para a produção do etanol 2G, um dos principais produtos da biorrefinaria da cana-de-açúcar.

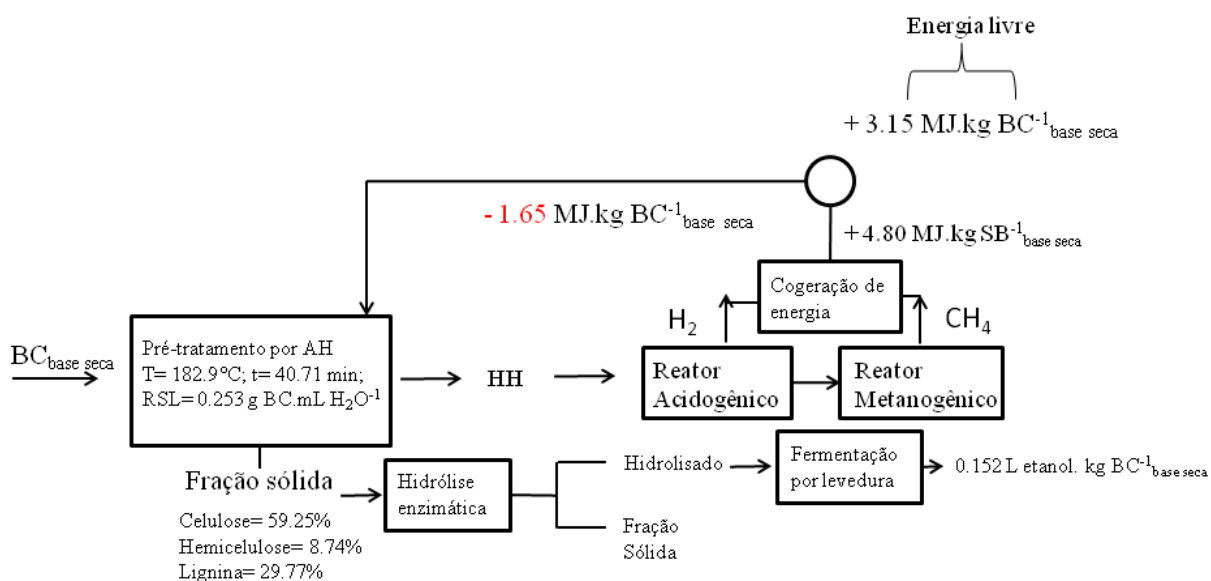
Figura 7.6: Estimativa energética para o HH gerado pela AH do BC tratado anaerobicamente em sistema de único (DA) e duplo estágio (DA-2S)



A explicação para a maior recuperação de energia observada para o HH DC4 em comparação com os outros HH é o ganho de energia a partir da combustão do CH₄. Para este HH, a inclusão da etapa acidogênica provocou um aumento na produção de CH₄ de 1,17 Nm³ CH₄.kg COT⁻¹ em relação à quantidade de CH₄ recuperada em um único estágio, considerando uma eficiência de 90% (ver seção 7.3.5). Neste cenário o ganho de energia promovido pela inclusão da etapa acidogênica foi de 36,3 MJ.kg COT⁻¹, que é maior do que aqueles observados para os HH obtidos nas condições DC1 (8,0 MJ.kg COT⁻¹), DC2 (7,8 MJ.kg COT⁻¹) e DC3 (32,3 MJ.kg COT⁻¹). Adicionalmente, outro ponto que pode ser enfatizado é que a menor quantidade de H₂O ~ 3,95 mL por kg de BC usada na condição DC4, quando comparada com as quantidades usadas nas outras condições (DC1~6,99 mL, DC2 ~ 4,20 mL e DC3 ~ 5,26 mL) contribuiu para uma menor quantidade de energia gasta durante o pré-tratamento, uma vez que grande parte da energia requerida é usada para aquecer a água.

A Figura 7.7 mostra um fluxograma do processo sugerido para maximizar a geração de energia considerando a integração do processo de produção do etanol 1G e 2G, considerando o pré-tratamento por AH como etapa responsável por diminuir a recalcitrância do BC excedente do processo 1G. Além disso, é considerada durante o processo a geração de etanol 2G a partir da fração sólida enriquecida em celulose juntamente com a energia recuperada pela DA-2S do HH gerado pela AH.

Figura 7.7: Fluxograma do processamento do BC em conceito de biorrefinaria destacando o potencial energético envolvido



Para estimar a quantidade de etanol 2G produzido a partir da fração sólida gerada pela condição DC4 foi considerada uma taxa de geração da fração sólida de 0,705 kg FS.kg BC⁻¹_{base seca}, assumindo uma perda de massa de 29,5% após a AH, conforme pode ser visto na Tabela 6.4. Além disso, assumiu-se um rendimento (Y_{HE}) de hidrólise enzimática (HE) de 62,18 % e uma geração de 0,42 g etanol.g glicose⁻¹ durante a fermentação (Rabelo *et al.*, 2011). O Y_{HE} da HE foi medido experimentalmente a partir da fração sólida gerada após a AH na condição DC4, conforme descrito na seção 7.3.4.

O baixo valor de rendimento da HE para fração sólida gerada pela AH na condição DC4 (182,9°C por 40,71 min) pode estar relacionado com a precipitação de fragmentos de lignina de elevada massa molar sobre a fibra. Relatos da literatura apontam que os valores temperaturas mais elevados geralmente empregados em pré-tratamentos hidrotérmicos (170 a 180°C) do BC estão próximos da temperatura de transição vítrea (Saenger) da lignina e da

lignina quimicamente modificada (Ko *et al.*, 2015). Nessas regiões de temperatura, a lignina e seus possíveis fragmentos sofrem alterações na viscosidade, o que permite sua migração da lamela média e da parede celular para fora da célula, mais especificamente sobre a superfície das fibras. Uma alternativa para melhorar a produção de etanol celulósico a partir da fração sólida residual ao pré-tratamento na condição empregada é a utilização de um pré-tratamento específico para remoção total dos fragmentos de lignina presentes na superfície da fibra.

A Figura 7.6 mostra que a quantidade de energia livre recuperada a partir do HH DC4 é suficiente para destilar aproximadamente 0,53 L de etanol anidro por kg de BC, considerando que a energia gasta nesta operação é de 5.9 MJ.L⁻¹ etanol anidro (Pfeffer *et al.*, 2007). Como durante o processo a produção de etanol a partir da fração sólida residual foi de 0,152 L de etanol por kg de BC, é possível dizer que a energia liberada pela digestão anaeróbia em dois estágios do HH pode ser utilizada para suprir toda demanda energética envolvida na etapa de destilação do etanol 2G. Outra alternativa para a DA-2S é considerar somente a energia gerada pela combustão do metano e estimar os lucros decorrentes da venda do H₂ produzido na etapa acidogênica para uso como matéria prima na indústria química. Tal ação pode ser mais viável e não influenciaria a produção de energia a partir do biogás, uma vez que para todas as condições estudadas a quantidade de energia decorrente da combustão do H₂ foi sempre inferior a 5% da energia total gerada durante a combustão do CH₄ e H₂.

7.4.4 Conclusão

Este capítulo demonstra o potencial de produção de H₂ e CH₄ usando a digestão anaeróbia em dois estágios (DA-2S) para melhorar a recuperação energética a partir do HH gerado pela AH do BC. Observou-se que durante o processo a etapa acidogênica atuou como etapa biodetoxicante, aumentando a produção de CH₄ na fase metanogênica. A utilização da DA-2S permitiu a aplicação de condições de pré- tratamento por AH mais severas (182,9°C, 40.7 min e $RSL = 0.253 \text{ gBC}_{\text{base seca}} \cdot \text{mL}^{-1}$), garantindo uma boa recuperação energética a partir do HH (3.15 MJ.kgBC⁻¹_{base seca}), contribuindo sustentavelmente para integração do processo produtivo de etanol 1G e 2G.

8 CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO

Este tópico apresenta as conclusões gerais que puderam ser extraídas a partir dos resultados apresentados nos capítulos 6 e 7.

O pré-tratamento por auto-hidrólise (AH) do bagaço de cana foi estudado neste trabalho e os resultados mostraram que a quantidade de água usada no processo pode ser diminuída sem que a obtenção de um hidrolisado rico em açúcares seja prejudicada. Desta forma, a viabilidade econômica do processo foi melhorada tanto do ponto de vista energético quanto do ponto de vista operacional, visto que maiores quantidades de bagaço de cana poderiam ser carregadas no reator em cada batelada, aumentando a capacidade de processamento do pré-tratamento hidrotérmico. Aliado a isto foi possível observar que quando a AH é utilizada e busca-se o uso do HH não se faz necessária a inclusão de uma etapa de lavagem ao processo, uma vez que esta resultou na liberação de furfuraldeído, que pode dificultar a biodegradabilidade do hidrolisado.

Além disso, o planejamento experimental para o pré-tratamento por auto-hidrólise foi validado, o que possibilitou a obtenção de hidrolisados desejáveis do ponto de vista operacional e científico, facilitando a interpretação dos fenômenos que influenciam o desempenho do processo e apontando as condições de pré-tratamento que podem ser efetivamente aplicadas a processos industriais em uma biorrefinaria.

Os resultados apresentados comprovaram a hipótese 2 desta tese, de que o uso somente da variável açúcares C5-C6 (ou açúcares redutores) como variável resposta para otimizar as condições de AH não é a melhor alternativa quando se pretende usar o HH gerado para produção de biogás. Além do teor de açúcar foi possível concluir que as quantidades de compostos recalcitrantes e de mais difícil degradação como, fragmentos de lignina solúvel, furanos e xilo-oligômeros (XOS) também precisam ser consideradas.

A presença dos XOS mostrou ter grande efeito sobre a fase de adaptação dos micro-organismos durante a digestão anaeróbia. No entanto pode-se perceber que esses compostos foram consumidos, o que é altamente relevante, pois mostra que os micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia, diferentemente dos envolvidos na fermentação alcoólica são capazes de assimilar açúcares C5 com elevada eficiência.

A digestão anaeróbia dos hidrolisados hemicelulósicos foi avaliada em um único estágio e em dois estágios, sendo que a separação espacial da acidogênese e da metanogênese demonstrou que grande parte da toxicidade provida por compostos como furanos e lignina

pôde ser eliminada durante a etapa de acidogênese, favorecendo a etapa de metanogênica. Este resultado corrobora com a hipótese 3 apresentada no início desta tese.

Desta forma, foi mostrado neste trabalho que a energia produzida por meio da queima de CH_4 e H_2 obtidos na digestão anaeróbia poderia aumentar a viabilidade econômica do processo de produção de etanol 1G integrado ao processo de produção de etanol 2G. Além disso, a digestão anaeróbia, conforme estabelecido na hipótese 1 deste trabalho, mostrou ser uma alternativa viável para proporcionar a melhor utilização do efluente líquido (hidrolisado hemicelulósico) gerado durante a produção do etanol 2G.

Os balanços energéticos desenvolvidos no capítulo 7, que levaram em conta não só a energia dos gases metano e hidrogênio a partir do HH, mas também o potencial de produção de etanol 2G a partir da fração sólida remanescente mostraram que maiores quantidades de energia podem ser obtidas caso a digestão anaeróbia em dois estágios seja usada em detrimento ao processo clássico de estágio único.

Desta forma, um conceito de biorrefinaria de segunda geração considerando apenas uma etapa de pré-tratamento por auto-hidrólise seguida da hidrólise enzimática da fração sólida residual, juntamente com o aproveitamento integral da fração hemicelulósica para produção de biogás foi sugerida neste trabalho, comprovando assim as hipóteses 3 e 4.

9 PERSPECTIVAS DE PESQUISAS FUTURAS

Durante a integração das plantas de etanol 1G e 2G, é possível usar também a vinhaça gerada na produção de etanol para a codigestão do HH. Isso é interessante do ponto de vista de aplicação uma vez que o uso da vinhaça para produção de biogás é muitas vezes comprometido pelos altos níveis de sulfeto de hidrogênio (H_2S), normalmente formado nos digestores anaeróbios usados para o tratamento da vinhaça. A digestão anaeróbica concomitante de HH e vinhaça pode permitir a diluição de sulfato, visto que este ânion não está normalmente presente nos HH, diminuindo então a quantidade de H_2S no biogás e melhorando a sua qualidade. A codigestão da vinhaça e do HH também poderia beneficiar a atividade metanogênica nos digestores, se considerarmos a diluição de compostos tóxicos, tais como FF, e de HMF e fragmentos de lignina solúvel, que estão normalmente presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e ausentes na vinhaça.

Outros pontos que poderão ser avaliados futuramente diz respeito ao *scale up* do processo de digestão anaeróbia do HH. A avaliação da melhor configuração de reatores associada ao estudo da influência de algumas variáveis de processo como, carga orgânica aplicada, tempo de detenção hidráulica, e estudos de modelagem cinética em reatores operados de forma contínua faz-se necessário.

Estudos de caracterização detalhada do efluente gerado após a etapa acidogênica utilizando técnicas analíticas avançadas como CG-MS-MS e HPL-MS, devem ser realizados com intuito de avaliar a possibilidade de produção de alguns ácidos orgânicos (Ex., ácidos 3-(hidroxifenil) pentanoico e 4-(4-hidroxifenil) butanoico), considerados de alto valor agregado e produzidos a partir da digestão anaeróbia de fragmentos de lignina.

Como os resultados obtidos neste estudo apresentaram uma conversão reduzida durante a hidrólise enzimática para a fração sólida residual a AH, uma possibilidade seria avaliar o uso de técnicas de deslignificação que priorizam as reações radicalares como, processos oxidativos avançados, com objetivo de maximizar a deslignificação e promover uma melhoria no rendimento da HE. Aliado a isto seria necessário o estudo da viabilidade de produção de biogás a partir da digestão anaeróbia do resíduo gerado após a inclusão de tal etapa.

10 REFERÊNCIAS

- AKHAND, M. M. **Optimization of NMMO pre-treatment of straw for enhanced biogas production**. 2012. (Master Thesis). University of Borås
- AKPINAR, O. et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119-125, 2010. ISSN 00236438.
- ALVAREZ, R. S. A. L., G. The methanogenic toxicity of wastewater Lignins and lignin related compounds. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 50, p. 443-445, 1991.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-61, Jul 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042329> >.
- ANDO, S. et al. Increased Digestibility of Cedar by pretreatment with peracetic acid and steam explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 802-804, 1987.
- ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Exploitation of rapeseed and sunflower residues for methane generation through anaerobic digestion: the effect of pretreatment. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 5, 2010.
- ARREOLA-VARGAS, J. et al. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 2, p. 897-904, 2016. ISSN 03603199.
- ARRIAGA, S. et al. Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, p. 7, 2011.
- ARRIZON, J. et al. Bioethanol and Xylitol Production from Different Lignocellulosic Hydrolysates by Sequential Fermentation. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 3, p. 437-454, 2012. ISSN 01458876.
- AYENI, A. O. et al. Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology. **Fuel**, v. 106, p. 187-194, 2013. ISSN 00162361.
- AZZAM, A. M.; NASR, M. I. Physicothermochemical pretreatments of food processing waste for enhancing anaerobic digestion and biogas generation. **Journal of Environmental Science Health**, v. 28, p. 20, 1993.
- BADSHAH, M. et al. Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 262-9, Jun 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22446055> >.
- BAËTA, B. E. L. et al. Degradation of a model azo dye in submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) operated with powdered activated carbon (PAC). **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 462-470, 2013. ISSN 03014797.
- BAGHCHEHSARAEE, B. et al. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4064-4073, 2008.
- BALLESTEROS, I., OLIVA J.M. , NEGRO, M.J. , MANZANARES, P. , BALLESTEROS, M. *. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 187-192, 2002.
- BALLESTEROS, I., OLIVA, J. M. , NAVARRO, A. A, GONZALES, A. , CARRASCO, J. AND BALLESTEROS, M. Effect of Chip Size on Steam Explosion Pretreatment of Softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 97-110, 2000.

- BARAKAT, A. et al. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 90-9, Jan 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100239> >.
- BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovations. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, p. 1-21, 2013. ISSN 1687-806X 1687-8078.
- BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 797-841, 1994.
- BOLADO-RODRIGUEZ, S. et al. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 182-90, Feb 2016. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26642223> >.
- BOOPATHY, R. Anaerobic biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by a methanogenic archaeobacterium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 1070-1072, 2009. ISSN 09648305.
- BOUSSARSAR, H.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6537-42, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664914> >.
- BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 154 (Doutorado). Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009. ISSN 1369703X.
- BROWNELL, H. H.; YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Steam-Explosion Pretreatment of Wood- Effect of chip size, acid, moisture content and press drop. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 792-801, 1985.
- BRÜCKNER, C.; WEISS, D.; MILDNER, U. **Mundgerechtere bakterienkost**. Bauern Ztg, p.48-49. 2007
- BRUNI, E.; JENSEN, A. P.; ANGELIDAKI, I. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8713-7, Nov 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638274> >.
- BUITRÓN, G. et al. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19249-19255, 2014. ISSN 03603199.
- BURUIANA, C.-T. et al. Bioethanol Production from Hydrothermally Pretreated and Delignified Corn Stover by Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 2, p. 1158-1165, 2014. ISSN 0887-0624 1520-5029.
- CAKIR, A.; OZMIHCI, S.; KARGI, F. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 4, 2010.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal Biomedical and Biotechnology**, v. 2012, p. 989572, 2012. ISSN 1110-7251 (Electronic) 1110-7243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251086> >.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467-75, Sep 2011. ISSN 1476-5535 (Electronic) 1367-5435 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210180> >.

CAO, G.-L. et al. Enhanced cellulosic hydrogen production from lime-treated cornstalk wastes using thermophilic anaerobic microflor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 6, 2012.

CARVALHEIRO, F. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 93-100, 2004. ISSN 09608524.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CARVALHEIRO, F. et al. **Hydrothermal processing of hardwoods and agro-industrial residues: evaluation of xylo-oligosaccharides production.** Nordic Wood Biorefinery Conference (NWBC). Helsink 2009.

CASSINI, S. T. et al. Alkaline and acid hydrolytic processes in aerobic and anaerobic sludges: effect on total EPS and fractions. **Water Science & Technology**, v. 53, n. 8, p. 51, 2006. ISSN 02731223.

CESARO, A. et al. Enhanced biogas production from anaerobic codigestion of solid waste by sonolysis. **Ultrason Sonochemical**, v. 19, n. 3, p. 596-600, May 2012. ISSN 1873-2828 (Electronic) 1350-4177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962478> >.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. **Applied Energy**, v. 94, p. 129-140, 2012a. ISSN 03062619.

_____. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462-1476, 2012b. ISSN 13640321.

CHANDRA, R. et al. Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. **Energy**, v. 43, n. 1, p. 273-282, 2012. ISSN 03605442.

CHANG, J. J. et al. Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 13399-13406, 2010.

CHANG, V. S. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. **Biotechnology Letter**, v. 23, p. 1327-1333, 2001.

CHERUBINI, F.; JUNGMEIER, G. LCA of a biorefinery concept producing bioethanol, bioenergy, and chemicals from switchgrass. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 15, n. 1, p. 53-66, 2009. ISSN 0948-3349 1614-7502.

CHONG, M. L. et al. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 764-771, 2009.

CHU, C.-Y. et al. Kinetics of cotton cellulose hydrolysis using concentrated acid and fermentative hydrogen production from hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 36, p. 7, 2011.

CIRNE, D. G. et al. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 516-527, 2007. ISSN 1364-5072 1365-2672.

- COLLERAN, E. et al. Full-scale and laboratory-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. **Biodegradation**, v. 9, n. 3-4, p. 233-245, 1998.
- CORRÊA DA SILVA, R.; DE MARCHI NETO, I.; SILVA SEIFERT, S. Electricity supply security and the future role of renewable energy sources in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 328-341, 2016. ISSN 13640321.
- COSTA, A. G. et al. The use of thermochemical pretreatment to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 363-372, 2014.
- COSTA, A. G. et al. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 363-372, 2014. ISSN 13858947.
- CUI, M.; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 4, 2012.
- CUI, M. et al. Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7971-7978, 2009.
- DA CRUZ, S. H. et al. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 439-47, Mar 2012. ISSN 1476-5535 (Electronic) 1367-5435 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080307> >.
- DA SILVA, A. S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402-7409, Oct 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576565> >.
- DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 932-939, 2007. ISSN 03603199.
- DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 932-939, 2007.
- DE ÁVILA, R. F.; GUIRARDELLO, R. Evaluation of a Sugarcane Bagasse Acid Hydrolysis Technology. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 6, p. 883-892, 2008. ISSN 09307516 15214125.
- DELGENÉS, J. P.; PENAUD, V.; MOLETTA, R. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. In: MATA-ALVAREZ, J. (Ed.). **Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes**. London: IWA, 2002. cap. 8, p.221-228.
- DESAI, T. A.; RAO, C. V. Regulation of arabinose and xylose metabolism in Escherichia coli. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1524-32, Mar 2010. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023096> >.
- DIAS, M. O. et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964-71, Oct 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795041> >.
- DIAS, M. O. S. et al. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p. 1206-1216, 2009. ISSN 02638762.
- DIAZ, M. J. et al. Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2428-35, Apr 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939678> >.

DIEP, N. Q. et al. Biorefinary: Concepts, current status and development trends. **International Journal of Biomass & Renewables**, p. 1-8, 2014.

DINIZ, D. D. S. **Produção de álcool etílico utilizando como matérias primas resíduos florestais e agrícolas**. 2008. 231 (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

EBRINGEROVA, A. H., T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, p. 542-556, 2000.

EMONS, A. M. C., SCHEL, J. H.N AND MULDER, B.M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 22-26, 2008.

FAN, Y. T. et al. Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, p. 493-496, 2006.

FANG, Z. et al. Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3424-30, Jun 2008. ISSN 0960-8524 (Print) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881227> >.

FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 9, 2011.

FERNANDEZ-CEGRI, V. et al. Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 424-9, Nov 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940352> >.

FERREIRA, L. C. et al. Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 251-7, Sep 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800630> >.

FERREIRA, L. C. et al. Biomethane potential of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 254-259, 2014. ISSN 13858947.

FOX, M.; NOIKE, T. Wet oxidation pretreatment for the increase in anaerobic biodegradability of newspaper waste. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 273-281, 2004. ISSN 09608524.

GAO, J. et al. Effect of ionic liquid pretreatment on the composition, structure and biogas production of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Bioresource Technology**, v. 132, p. 361-4, Mar 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186677> >.

GARROTE, G. et al. Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: Product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 4, p. 544-552, 2008. ISSN 02608774.

GARROTE, G. et al. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 191-200, 2004. ISSN 09242244.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 57, p. 191-202, 1999.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-800, Jul 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171088> >.

- GULLON, P. et al. Aqueous pretreatment of agricultural wastes: characterization of soluble reaction products. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5840-5, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570673> >.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015. ISSN 13640321.
- GURGEL, L. V. A.; PIMENTA, M. T. B.; CURVELO, A. A. D. S. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO₂). **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 141-149, 2014. ISSN 09266690.
- HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 287-97, May 2009. ISSN 0167-7799 (Print) 0167-7799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329204> >.
- HAN, H. et al. Optimization of biohydrogen production from soybean straw using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 8, 2012.
- HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-8, Jan 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599291> >.
- HIMMELSBACH, J. N. et al. Effect of ammonia soaking pretreatment and enzyme addition on biochemical methane potential of switchgrass. **Transactions of the ASABE**, v. 53, n. 6, p. 7, 2010.
- HJORTH, M. et al. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 4989-94, Apr 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339066> >.
- HNIMAN, A.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8, 2011.
- HONGDAN, Z.; SHAOHUA, X.; SHUBIN, W. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 391-6, Sep 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819975> >.
- INGRAMA, T. et al. Semi-continuous liquid hotwater pretreatment of rye straw. **The Journal of supercritical fluids**, v. 48, p. 238-246, 2009.
- JACKOWIAK, D. et al. Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6750-6, Jun 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524906> >.
- JACKOWIAK, D. et al. Enhancing solubilisation and methane production kinetic of switchgrass by microwave pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3535-40, Feb 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21147525> >.
- JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 6, p. 1454-1461, 2002. ISSN 08885885 (ISSN). Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037139205&partnerID=40&md5=d03003a508064284ce7b3fe06fbdee8e> >.
- JEIHANIPOUR, A.; KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. Enhancement of ethanol and biogas production from high-crystalline cellulose by different modes of NMO pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 469-76, Feb 15 2010. ISSN 1097-0290 (Electronic) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806660> >.

- JIMÉNEZ, L.; RODRIGUEZ, A. Valorization of Agricultural Residues by Fractionation of their Components. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, p. 125-134, 2010.
- JOENSSONÁ, L. J. et al. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 691-697, 1998.
- JUNG, K. W.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2745-50, Feb 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123054> >.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137-45, Apr 2004. ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749903> >.
- KAPARAJU, P.; FELBY, C. Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre-treatment processes of wheat straw and corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3175-81, May 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056415> >.
- KAPARAJU, P. et al. Co-digestion of energy crops and industrial confectionery by-products with cow manure: batch-scale and farm-scale evaluation. **Water Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 6, 2002. ISSN 02731223.
- KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; ANGELIDAKI, I. Effect of reactor configuration on biogas production from wheat straw hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6317-23, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19647428> >.
- KAPARAJU, P. et al. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2562-8, May 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135361> >.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569-582, 2006.
- KARAGO, S. B., T.; MUTO, A.; SAKATA, Y. AND AZHAR UDDIN, MD. Low-Temperature Hydrothermal Treatment of Biomass: Effect of Reaction Parameters on Products and Boiling Point Distributions **Energy & Fuels**, v. 18, p. 234-241, 2004.
- KE, J. et al. Advanced biorefinery in lower termite-effect of combined pretreatment during the chewing process. **Biotechnology and Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 11, 2012. ISSN 1754-6834 (Electronic) 1754-6834 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390274> >.
- KHAMTIB, S.; PLANGKLANG, P.; REUNGSANG, A. Optimization of fermentative hydrogen production from hydrolysate of microwave assisted sulfuric acid pretreated oil palm trunk by hot spring enrichment culture. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 12, 2011.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 44, n. 22, p. 3358-93, May 30 2005. ISSN 1433-7851 (Print) 1433-7851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861454> >.
- KLEMM, D. et al. General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose. **Wiley-VHC**, p. 263, 1998.
- KLING, S. H. et al. Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse by Steam Explosion Pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 1035-1039, 1987.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10-26, Nov 2004. ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300416> >.

- KO, J. K. et al. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 252-262, 2015.
- KOBAYASHI, F. et al. Methane production from steam-exploded bamboo. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 426-428, 2004. ISSN 13891723.
- KONGJAN, P.; ANGELIDAKI, I. Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: effect of reactor configuration. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7789-96, Oct 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554199> >.
- KONGJAN, P. et al. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 899-908, Apr 1 2010. ISSN 1097-0290 (Electronic) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998285> >.
- KREUGER, E. et al. Bioconversion of industrial hemp to ethanol and methane: the benefits of steam pretreatment and co-production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3457-65, Feb 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111616> >.
- KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009. ISSN 0888-5885 1520-5045.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-91, May 2008. ISSN 1367-5435 (Print) 1367-5435 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338189> >.
- KUMARI, S.; DAS, D. Improvement of gaseous energy recovery from sugarcane bagasse by dark fermentation followed by biomethanation process. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 354-63, Oct 2015. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210150> >.
- LALAURETTE, E.; THAMMANNAGOWDA, S.; MOHAGHEGHI, A. Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 34, p. 9, 2009.
- LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 10 2002.
- LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.
- LAVARACK, B. P.; GRI, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose , arabinose , glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 13, 2002.
- LAY, J.-J. Biohydrogen Generation by Mesophilic Anaerobic Fermentation of Microcrystalline Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, p. 280-287, 2000.
- LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407-6418, 2014. ISSN 03603199.
- LEI, Y. et al. Effect of hot-water extraction on alkaline pulping of bagasse. **Biotechnology Advanced**, v. 28, n. 5, p. 609-12, Sep-Oct 2010. ISSN 1873-1899 (Electronic) 0734-9750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493244> >.

- LI, D.; CHEN, H. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 1742-1748, 2007.
- LIEW, L. N.; SHI, J.; LI, Y. Enhancing the solid-state anaerobic digestion of fallen leaves through simultaneous alkaline treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8828-34, Oct 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803572> >.
- LINDNER, J. et al. Is the continuous two-stage anaerobic digestion process well suited for all substrates? **Bioresource Technology**, v. 200, p. 470-6, Jan 2016. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519699> >.
- LIU, C.-M. et al. Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pretreatment in both batch and continuous systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6, 2013.
- LIU, S. A simplistic mechanistic model and effect of consistency on alkaline peroxide brightening of mechanical pulps. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 20, p. 4377-4383, 2004. ISSN 00092509.
- LIU, S. Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis. **Biotechnology Advanced**, v. 28, n. 5, p. 563-82, Sep-Oct 2010. ISSN 1873-1899 (Electronic) 0734-9750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493246> >.
- LO, Y.-C. et al. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8, 2011.
- LUCAS, M. et al. Evidence for room temperature delignification of wood using hydrogen peroxide and manganese acetate as a catalyst. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 174-80, Sep 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728198> >.
- MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação de teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 135 (PhD). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MARIANO, A. P. et al. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 390-9, Aug 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748087> >.
- MARONE, A. et al. Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. **Renewable Energy**, v. 68, p. 6-13, 2014. ISSN 09601481.
- MARTINEZ, A. et al. Detoxification of Dilute Acid Hydrolysates of Lignocellulose with Lime. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 287-293, 2001.
- MATEO, S. et al. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013. ISSN 09266690.
- MICHALSKA, K. et al. Influence of pretreatment with Fenton's reagent on biogas production and methane yield from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 72-8, Sep 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728185> >.
- MIRAHMADI, K. et al. Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. **Bioresource**, v. 5, n. 2, p. 10, 2010.
- MITTAL, A. et al. Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple wood meal: Reaction kinetics. **Holzforschung**, v. 63, n. 3, 2009. ISSN 1437-434X 0018-3830.

- MONLAU, F. et al. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 241-7, Sep 2012. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820113> >.
- MONLAU, F. et al. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 260-322, 2013. ISSN 1064-3389 1547-6537.
- MONLAU, F. et al. Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment. **Applied Energy**, v. 102, p. 1105-1113, 2013. ISSN 03062619.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**, v. 96, n. 6, p. 673-86, Apr 2005. ISSN 0960-8524 (Print) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588770> >.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1-10, May 2004. ISSN 0960-8524 (Print) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987714> >.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20-28, 2007. ISSN 01448617.
- NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010. ISSN 13640321.
- NGUYEN, T.-A. D. et al. Hydrogen production by the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana*, using cellulose pretreated by ionic liquid. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 8, 2008.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.
- NISSILÄ, M. E.; LAY, C.-H.; PUHAKKA, J. A. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 145-159, 2014. ISSN 09619534.
- NKEMKA, V. N.; MURTO, M. Biogas production from wheat straw in batch and UASB reactors: the roles of pretreatment and seaweed hydrolysate as a co-substrate. **Bioresour Technol**, v. 128, p. 164-72, Jan 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196235> >.
- NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 21-29, 2010.
- NUALSRI, C.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Biochemical hydrogen and methane potential of sugarcane syrup using a two-stage anaerobic fermentation process. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 88-99, 2016. ISSN 09266690.
- O-THONG, S.; BOE, K.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic anaerobic co-digestion of oil palm empty fruit bunches with palm oil mill effluent for efficient biogas production. **Applied Energy**, v. 93, p. 648-654, 2012. ISSN 03062619.
- ORLANDO, U. S. et al. A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. **Bioresource technology**, v. 83, p. 195-198, 2002.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour Technol**, v. 74, p. 25-33, 2000.

- PAN, C. et al. Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 6, 2010.
- PAN, C. M. et al. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 5383-5391, 2008.
- PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 24, p. 6331-8, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656677> >.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PARAJÓ, J. C. et al. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 115-120, 2004. ISSN 09242244.
- PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy** v. 33, p. 9, 2008.
- PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5256-5265, 2008. ISSN 03603199.
- PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. **N Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 739-50, Dec 31 2010. ISSN 1876-4347 (Electronic) 1871-6784 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460178> >.
- PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 4, p. 879-903, Jul-Aug 2012. ISSN 1873-1899 (Electronic) 0734-9750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306329> >.
- PÉREZ, J. A. et al. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 10, p. 929-938, 2007. ISSN 02682575 10974660.
- PETERSSON, A. et al. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 11-12, p. 812-819, 2007. ISSN 09619534.
- PFEFFER, M. et al. Analysis and decrease of the energy demand of bioethanol-production by process integration. **Applied Thermal Engineering**, v. 27, n. 16, p. 2657-2664, 2007. ISSN 13594311.
- PHOWAN, P.; REUGSANG, A.; DANVIRUTAI, P. Bio-hydrogen production from cassava pulp hydrolysate using co-culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. **Biotechnol**, v. 9, n. 3, p. 6, 2010.
- PURWANDARI, F. A. et al. Pretreatment of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for biogas production: structural changes and digestion improvement. **Bioresour Technol**, v. 128, p. 461-6, Jan 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201529> >.
- QUEMENEUR, M. et al. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 2012.
- RABELO, S. C. et al. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 17, p. 7887-95, Sep 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689929> >.
- RAMOS, L. P. THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

- RENA, N. et al. Bioaugmented hydrogen production from carboxymethyl cellulose and partially delignified corn stalks using isolated cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5250-5255, 2008.
- ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21, 1991 1991.
- ROCHA, G. M. J. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011. ISSN 09619534.
- RODRIGUEZ, A. et al. Influence of variables in the hydrothermal treatment of rice straw on the composition of the resulting fractions. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 20, p. 4863-6, Oct 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467587> >.
- ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 1, p. 54-63, 2008. ISSN 08968446.
- ROSTAGNO, M. A. et al. Subcritical and supercritical technology for the production of second generation bioethanol. **Crit Rev Biotechnol**, v. 35, n. 3, p. 302-12, 2015. ISSN 1549-7801 (Electronic) 0738-8551 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24494703> >.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-5, Aug 14 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704079> >.
- RUGGERI, B.; TOMMASI, T. Efficiency and efficacy of pre-treatment and bioreaction for bio-H₂ energy production from organic waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11, 2012.
- RUIZ, H. A. et al. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35-51, 2013. ISSN 13640321.
- RUIZ, H. A. et al. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw-effect of particle size and process conditions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 88-94, 2011. ISSN 02682575.
- SAENGER, M., HARTGE, E-U., WERTHER, J., OGADA, T., SIAGI, Z. Combustion of coffee husks. **Renew Energ**, v. 23, p. 103-21, 2001.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, n. 5, p. 279-91, May 2003. ISSN 1367-5435 (Print) 1367-5435 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698321> >.
- SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 13, p. 5270-95, Sep 2008. ISSN 0960-8524 (Print) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158236> >.
- SANCHEZ, R. et al. Exploitation of hemicellulose, cellulose and lignin from *Hesperaloe funifera*. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 2, p. 1308-15, Jan 2011. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846856> >.
- SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 7, 2014.
- SANTUCCI, B. S. et al. Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **BioEnergy Research**, 2015. ISSN 1939-1234 1939-1242.
- SAPCI, Z. The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws. **Bioresour Technol**, v. 128, p. 487-94, Jan 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic)

0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201904> >.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresour Technol**, v. 86, p. 4, 2003.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: Como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SHAHRIARI, H. et al. Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. **Waste Manag**, v. 32, n. 1, p. 41-52, Jan 2012. ISSN 1879-2456 (Electronic)
0956-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945550> >.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109-116, 2015. ISSN 09601481.

SMITH, W. **Literature review: state of the art in biorefinary development**. National Non Food Crops Centre. 2007

SONG, Z. et al. Comparison of two chemical pretreatments of rice straw for biogas production by anaerobic digestion. **Bioresources**, v. 7, p. 14, 2012.

SPIRIDON, L.; POPA, V. I. Hemicelluloses: Major Sources, Properties and Applications. In: ELSEVIER (Ed.). **Monomers, polymers and composites from renewable resource**. Amsterdam, 2008. cap. 13, p.289-304.

STREFFER, F. Lignocellulose to Biogas and other Products. **JSM Biotechnology and Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1023-1029, 2014.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal Molecular Science**, v. 9, n. 9, p. 1621-51, Sep 2008. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325822> >.

TEGHAMMAR, A. et al. Enhanced biogas production from rice straw, triticale straw and softwood spruce by NMMO pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 116-120, 2012. ISSN 09619534.

TEGHAMMAR, A. et al. Pretreatment of paper tube residuals for improved biogas production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1206-12, Feb 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic)
0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800220> >.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Alkaline and Peracetic Acid Pretreatments of biomass for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 77-79, 1999.

TRAVAINI, R. et al. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresour Technol**, v. 133, p. 332-9, Apr 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic)
0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434810> >.

UELLENDAHL, H. et al. Energy balance and cost-benefit analysis of biogas production from perennial energy crops pretreated by wet oxidation. **Water Science & Technology**, v. 58, n. 9, p. 7, 2008.

VALDEZ-VAZQUEZA, I. et al. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organicwaste: Mesophilicversus thermophilicregime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1383-1391, 2005.

VALLEJOS, M. E. et al. Low liquid–solid ratio (LSR) hot water pretreatment of sugarcane bagasse. **Green Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 1982, 2012. ISSN 1463-9262
1463-9270.

WANG, G. T. **Biogas production from energy crops and agriculture residues**. 2010. (PhD Dissertation). Technical University of Denmark

WANG, H. J.; WANG, H. Alkaline hydrothermal pretreatment for the increase in biodegradability of leaves waste. In: HAO, J. M.; LI, J. H., *et al*, Selected proceedings of the fifth international conference on waste management and technology (ICWMT 5), 2010, Irvin, California. Sci Res Publ, Inc-Srp. p.166-169.

WINDEISEN, E.; WEGENER, G. **Lignin as Building Unit for Polymers**. Polymer Science: A Comprehensive Reference. ELSEVIER: 255-265 p. 2012.

WYK, J. P. H. V. Biotechnology and the utilization of biowaste as ar resource for bioproduct development. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 172-177, 2001.

XIAO, W.; CLARKSON, W. W. Acid solubilization of lignin and bioconversion of treated newsprint to methane. **Biodegradation**, v. 8, p. 6, 1997.

YANEZ, R.; GARROTE, G.; DIAZ, M. J. Valorisation of a leguminous species, *Sesbania grandiflora*, by means of hydrothermal fractionation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6514-23, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660941> >.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008. ISSN 1932104X 19321031.

YANG, L.; LIU, S. Kinetic Model for Kraft Pulping Process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 7078-7085, 2005.

YI ZHENG, Z. P. A. R. Z. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal Agricultural & Biology Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

YOO, C. G.; LEE, C. W.; KIM, T. H. Two-stage fractionation of corn stover using aqueous ammonia and hot water. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 729-40, Jul 2011. ISSN 1559-0291 (Electronic) 0273-2289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21274655> >.

YU, Q. et al. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592-8, Feb 2013. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306094> >.

YU, Q. et al. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4895-9, Jul 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004094> >.

ZHANG, B.; HUANG, H. J.; RAMASWAMY, S. Reaction kinetics of the hydrothermal treatment of lignin. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 147, n. 1-3, p. 119-31, Mar 2008. ISSN 1559-0291 (Electronic) 0273-2289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401758> >.

ZHANG, M.-L. et al. Enhanced biohydrogen production from cornstalkwastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 4, 2007.

ZHANG, S. F.; YANG, H. Effect of Hot-Water Pre-Extraction on Alkaline Pulping Properties of Wheat Straw. **Advanced Materials Research**, v. 236-238, p. 1174-1177, 2011. ISSN 1662-8985.

ZHENG, M. et al. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5140-5, Nov 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540752> >.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014. ISSN 03601285.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4992-5002, Jul 2010. ISSN 1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969450> >.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y.; ELANDER, R. Optimization of Dilute-Acid Pretreatment of Corn Stover Using a High-Solids Percolation Reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, n. 05, p. 1045-1054, 2005.