



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E  
MUCURI  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS  
GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS**



**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO  
DILUIDO**

**Michelle Garcia Gomes**

**Uberlândia  
Agosto 2019**

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CÍTRICO  
DILUIDO**

**Michelle Garcia Gomes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Doutora em Biocombustíveis.

Orientador: Dr. Daniel Pasquini

Co-orientador: Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta

**Uberlândia  
Agosto 2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G633 2019	<p>Gomes, Michelle Garcia, 1977- Produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido cítrico diluído [recurso eletrônico] / Michelle Garcia Gomes. - 2019.</p> <p>Orientador: Daniel Pasquini. Coorientador: Bruno Eduardo Lobo Baêta. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Biocombustíveis. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2409">http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2409</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Biocombustível. I. Pasquini, Daniel, 1974-, (Orient.). II. Lobo Baêta, Bruno Eduardo, -, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 662.756</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 09, PPBIC				
Data:	23 de agosto de 2018	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:30
Matrícula do Discente:	11523PGB003				
Nome do Discente:	<b>Michelle Garcia Gomes</b>				
Título do Trabalho:	Produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido cítrico diluído.				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Biomassas energéticas: ciência e tecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se na Sala de Reuniões do Instituto de Química, Bloco 1D no Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta: Professores Doutores: Harumi Otaguro, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia; Reinaldo Ruggiero, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia; Leandro Vinícius Alves Gurgel, da(o) Universidade Federal de Ouro Preto; Joyce Rover Rosa, da(o) Instituto Luterano de Ensino Superior, bem como o Daniel Pasquini, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daniel Pasquini, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**[A]provado(a).**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos,

Ata de Defesa - Pós-Graduação 8 (1470559) SEI 23117.072681/2019-14 / pg. 1

conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

 Documento assinado eletronicamente por **Daniel Pasquini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2019, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Harumi Otaguro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2019, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Reinaldo Ruggiero, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/08/2019, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Leandro Vinícius Alves Gurgel, Usuário Externo**, em 23/08/2019, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **JOYCE ROVER ROSA, Usuário Externo**, em 23/08/2019, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1470559** e o código CRC **9F8B9E95**.

Dedico este trabalho aos meus pais (Fernando e Sandra) pelos ensinamentos, carinho e apoio ao longo da minha vida e às minhas irmãs (Emanuelle e Lucille) pelo apoio, compreensão e incentivos. E acima de tudo a Deus, pela oportunidade de obter conhecimentos e saúde para que eu pudesse chegar até este momento.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver, aprender e crescer, aos meus pais, pelo amor, educação, incentivos e exemplos de vida; às minhas irmãs Emanuelle e Lucille, pelo amor, incentivos, companheirismo e paciência e amigos e parentes pelo incentivo constante.

Meu agradecimento ao Prof. e amigo Daniel Pasquini, pela oportunidade de desenvolver este projeto em seu grupo de pesquisa, confiança em mim depositada, orientação, paciência, dedicação, empenho, respeito e principalmente pela amizade ao longo destes anos. Ao meu co-orientador Prof. Bruno pela contribuição durante a execução do trabalho.

Agradeço ao Laboratório multiusuário de microscopia da Faculdade de Engenharia Química (UFU) (Rafael); ao Laboratório de microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Agrárias (LAMIC) (Prof<sup>a</sup>. Milla e Patrícia), ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do Instituto de Física (LNMIS) (Prof. Noelio), ao Laboratório multiusuário da Química (UFU) (Roni), ao Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP) (Elisa, Aline, Adonai, Prof. Leandro) que gentilmente cederam alguns equipamentos e auxiliaram-me para a realização desse trabalho.

Aos amigos da Pós Graduação em Biocombustíveis e em Química, em especial à Ingrid, Renata, Flávia e ao Vitor, pelo convívio, paciência, boa vontade, risadas e desesperos e todo apoio que me foi concedido. A Prof<sup>a</sup>. Harumi pelos conselhos e estímulos ao longo do meu estudo. Aos colegas de laboratório que contribuíram direta e indiretamente com o trabalho.

Gostaria de agradecer o coordenador do Programa da Pós Graduação, assim como aos docentes do IQUFU e do Programa de Pós-Graduação em biocombustíveis, que ao longo do período de graduação e pós-graduação tanto contribuíram para a minha formação e pelo uso da estrutura.

Ao conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ e à FAPEMIG pelo apoio financeiro e CAPES pela bolsa.

As bancas examinadoras pelas sugestões valiosas para o desenvolvimento deste trabalho. E agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e/ou torceram pela concretização da tese.

Aqui fica minha sincera gratidão!

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças.”

Stephen Hawking

“A incerteza é a mola propulsora da criatividade.”

Marcelo Gleiser

“Quiet people have the loudest minds.”

Stephen Hawking

## RESUMO

Resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, podem ser usados como biomassa para geração de energia, na conversão de biocombustíveis líquidos ou gasosos, desde que um pré-tratamento seja aplicado ao material, por ação de meios ácidos, básico ou até mesmo o uso de enzimas específicas, para solubilização dos açúcares e/ou para remoção da lignina. Neste trabalho, dividido em 2 partes, avaliou-se o melhor tratamento de dados para melhor biodegradabilidade anaeróbia e potencial na produção de biogás, a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico diluído. Até o momento, nenhum estudo foi realizado usando este ácido com esta finalidade e este possui várias vantagens de uso, como baixa toxicidade, corrosividade e custo. Na primeira etapa, avaliou-se o pré-tratamento em sistema de refluxo (pressão atmosférica), utilizando-se o planejamento experimental ( $2^2$ ), tendo como variáveis operacionais o tempo (min) e a concentração de ácido cítrico (%). Em uma segunda etapa, realizou-se o pré-tratamento, em sistema pressurizada, otimizado por meio do planejamento experimental Doehlert (Pedersen e Meyer) quadrático, um planejamento experimental ( $2^3$ ). As variáveis avaliadas foram temperatura ( $T$ , °C), tempo ( $t$ , min) e a razão sólido líquido ( $RSL$ ,  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A eficiência dos pré-tratamentos foi avaliada através de caracterização morfológica e química das frações sólidas obtidas e quantificação de açúcares fermentescíveis e inibidores, das frações líquidas. A hidrólise enzimática, foi realizada utilizando-se o complexo enzimático Cellic® CTec 3 e foi determinado quantificação de açúcares redutores totais (ART), além da quantificação de açúcares fermentescíveis (xilose, glicose e/ou arabinose). Nesse contexto, o pré-tratamento físico-químico, do planejamento 1, mostrou que as variáveis em estudo não tiveram relação direta com o teor de lignina, celulose e hemiceluloses. No entanto, a estrutura foi alterada, melhorando a acessibilidade da celulose, o que foi confirmado nas maiores concentrações de açúcares redutores totais em comparação ao bagaço de cana bruto. A amostra 6 (6,0% e 102,43 min) apresentou o menor teor de lignina (22,6%), índice de cristalinidade baixo (54%), desestruturas das fibras (após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática), concentração de açúcares redutores totais alto (28,21%), volume acumulado de biogás no valor de 55,14 NmL. Poder calorífico alcançou-se um valor de 3019 Kcal/kg. No planejamento 2, o pré-tratamento foi mais eficaz ao 1º planejamento, indicando modificações estruturais em quase todas as amostras em relação ao bagaço de cana de açúcar bruto. Os resultados sugerem que as condições de  $RSL$  de  $9,75 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,

temperatura a 120 °C e tempo reacional de 55 min (amostra 2), ocasionaram teor de lignina na faixa de 22 %, teor de celulose acima de 50% e baixo teor de hemiceluloses. Tanto a fração sólida (posteriormente a hidrólise enzimática) como a fração líquida (após o pré-tratamento) demonstraram alta liberação de açúcares e conseqüentemente, valores significativos de volume acumulado de biogás (449,41 e 209,45 NmL, respectivamente). O poder calorífico resultou no valor de 3294 Kcal/kg. Portanto, os resultados demonstraram a viabilidade da ação do ácido cítrico diluído, em novas condições experimentais, para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção promissora de biogás.

**PALAVRAS-CHAVES:** biomassa lignocelulósica; hidrólise enzimática; digestão anaeróbia; açúcares fermentescíveis.

## ABSTRACT

Lignocellulosic residues, such as sugarcane bagasse, can be used as biomass for energy generation, in the conversion of liquid or gaseous biofuels, provided that a pretreatment is applied to the material by acidic, basic or even the use of specific enzymes for sugar solubilization and/or lignin removal. In this work, divided into 2 parts, we evaluated the best data treatment for better anaerobic biodegradability and potential in biogas production, from the pretreatment of sugarcane bagasse with dilute citric acid. To date, no studies have been conducted using this acid for this purpose and it has several advantages of use such as low toxicity, corrosivity and cost. In the first stage, the pretreatment in reflux system (atmospheric pressure) was evaluated, using the experimental design ( $2^2$ ), having as operational variables time (min) and citric acid concentration (%). In a second stage, pretreatment was performed in a pressurized system, optimized through the quadratic Doehlert (Pedersen and Meyer) experimental design, an experimental design ( $2^3$ ). The variables evaluated were temperature (T, °C), time (t, min) and liquid solid ratio (RSL, g.mL<sup>-1</sup>). The efficiency of the pretreatments was evaluated by morphological and chemical characterization of the obtained solid fractions and quantification of fermentable sugars and inhibitors of the liquid fractions. Enzymatic hydrolysis was performed using Cellic® CTec 3 enzymatic complex and quantification of total reducing sugars (ART), as well as quantification of fermentable sugars (xylose, glucose and/or arabinose). In this context, the pre-treatment physicochemical design experimental 1 showed that the variables under study had no direct relationship with the content of lignin, cellulose and hemicelluloses. However, the structure was altered, improving pulp accessibility, which was confirmed in the higher concentrations of total reducing sugars compared to raw sugarcane bagasse. Sample 6 (6.0% and 102.43 min) had the lowest lignin content (22.6%), low crystallinity index (54%), fiber breakdowns (after pretreatment and after enzymatic hydrolysis), high total reducing sugar concentration (28.21%), accumulated biogas volume of 55.14 NmL. Caloric power reached a value of 3019 Kcal/kg. In design experimental 2, pretreatment was more effective at design experimental 1, indicating structural changes in almost all samples in relation to raw sugarcane bagasse. The results suggest that RSL conditions of 9.75 g.mL<sup>-1</sup>, temperature at 120 °C and reaction time of 55 min (sample 2) caused lignin content in the range of 22%, cellulose content over 50 % and low hemicellulose content. Both solid fraction (after enzymatic

hydrolysis) and liquid fraction (after pretreatment) showed high sugar release and consequently significant accumulated biogas volume values (449.41 and 209.45 NmL, respectively). The calorific value resulted in the value of 3294 Kcal/kg. Therefore, the results demonstrated the viability of the action of dilute citric acid under new experimental conditions for sugarcane bagasse pretreatment for promising biogas production.

**Keywords:** lignocellulosic biomass; enzymatic hydrolysis; anaerobic digestion; fermentable sugars.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura geral.</b> Fluxograma esquemático das etapas dos procedimentos experimentais proposto para a produção de biogás ( $\text{CH}_4(\text{g})$ e $\text{H}_2(\text{g})$ ) e etanol 2G .....	29
<b>Figura 1.</b> Principais componentes químicos da biomassa lignocelulósica .....	36
<b>Figura 2.</b> Fórmula da celulose (A) e grupos terminais da cadeia polimérica de celulose (B) .....	38
<b>Figura 3.</b> Fórmula estereo-química da celulose .....	39
<b>Figura 4.</b> Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose .....	40
<b>Figura 5.</b> Estruturas dos açúcares componentes das polioses .....	42
<b>Figura 6.</b> Esquema da estrutura química da xilana e seu monômero xilose (principal constituinte da hemiceluloses) .....	43
<b>Figura 7.</b> Estruturas dos álcoois cumarílico(I), coniferílico(II) e sinapílico(III) .....	43
<b>Figura 8.</b> Esquema estrutural da lignina de folhosas .....	44
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática de uma macromolécula de lignina de madeiras moles .....	45
<b>Figura 10.</b> Alterações estruturais do complexo celulose-hemiceluloses-lignina determinadas pelo pré-tratamento .....	50
<b>Figura 11.</b> Reações que ocorrem durante o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos .....	51
<b>Figura 12.</b> Apresentação esquemática da hidrólise da celulose a glicose por enzimas celulolíticas .....	61
<b>Figura 13.</b> Visão geral simplificada de fatores que limitam a hidrólise eficiente da celulose (simbolizada pelas linhas retas) .....	62
<b>Figura 14.</b> Ação enzimática das celulasas: <i>i</i> ) endo-1,4- $\beta$ -glicanase – hidrólise das cadeias de celulose em fragmentos menores, <i>ii</i> ) exo-1,4- $\beta$ -glicanase – hidrólise das cadeias (fragmentos menores) de celulose à celobiose e <i>iii</i> ) 1,4- $\beta$ -glicosidase – hidrólise de celobiose a glicose .....	63
<b>Figura 15.</b> Esquema das reações envolvidas no método DNS .....	65
<b>Figura 16.</b> Esquema das possibilidades de produção de hidrogênio a partir da celulose .....	68
<b>Figura 17.</b> As quatro etapas da degradação microbiológica anaeróbica .....	72

<b>Figura 18.</b> Fluxograma esquemático das etapas do procedimento experimental para o 1° planejamento .....	83
<b>Figura 19.</b> Analisador de umidade .....	84
<b>Figura 20.</b> Bagaços de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados .....	102
<b>Figura 21.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com rendimento (%), após o pré-tratamento .....	104
<b>Figura 22.</b> Variações dos valores de rendimento, lignina, celulose e hemiceluloses das amostras pré-tratadas .....	105
<b>Figura 23.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com lignina ...	106
<b>Figura 24.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com celulose .	107
<b>Figura 25.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com hemiceluloses (%) .....	107
<b>Figura 26.</b> Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado com ácido cítrico .....	109
<b>Figura 27.</b> Difrátogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado .....	112
<b>Figura 28.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com índice de cristalinidade (%) .....	113
<b>Figura 29.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com ART (g/L) .....	115
<b>Figura 30.</b> Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado após a hidrólise enzimática .....	117
<b>Figura 31.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min), em relação a concentração de glicose (g/L) .....	119

<b>Figura 32.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com glicose (g/L) .....	120
<b>Figura 33.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min), em relação a concentração de xilose (g/L) .....	121
<b>Figura 34.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com xilose (g/L) .....	121
<b>Figura 35.</b> Composição de açúcares das amostras pré-tratadas .....	122
<b>Figura 36.</b> Produção de biogás da fração líquida após o pré-tratamento da amostra 6, em (a) relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e (b) volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias) .....	123
<b>Figura 37:</b> Sistemas usados no pré-tratamento .....	129
<b>Figura 38.</b> Fluxograma esquemático das etapas do procedimento experimental para o 2° planejamento .....	131
<b>Figura 39.</b> Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados .....	136
<b>Figura 40.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação ao rendimento .....	141
<b>Figura 41.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> com rendimento (%) .....	142
<b>Figura 42.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> com lignina (%) .....	144
<b>Figura 43.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação à celulose .....	146
<b>Figura 44.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> com celulose (%) .....	147
<b>Figura 45.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação à hemiceluloses .....	148

<b>Figura 46.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com hemiceluloses (%) .....	150
<b>Figura 47.</b> Composição de açúcares das amostras pré-tratadas (fração líquida) .....	154
<b>Figura 48.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar (fração líquida) considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação à glicose .....	156
<b>Figura 49.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com glicose (%) .....	157
<b>Figura 50.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com xilose (%) .....	159
<b>Figura 51.</b> Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado com ácido cítrico .....	164
<b>Figura 52.</b> Difratogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado .....	166
<b>Figura 53.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação ao índice de cristalinidade .....	168
<b>Figura 54.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com índice de cristalinidade (%) .....	169
<b>Figura 55.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com ART (g/L) .....	173
<b>Figura 56.</b> Composição de açúcares das amostras pré-tratadas .....	175
<b>Figura 57.</b> Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes ( <i>RSL</i> , <i>T</i> e <i>t</i> ) em relação à glicose .....	176
<b>Figura 58.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com glicose (g/L) .....	177
<b>Figura 59.</b> Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com xilose (g/L) .....	179
<b>Figura 60.</b> Produção de biogás da fração líquida após o pré-tratamento da amostra 2, em relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias) .....	184

**Figura 61.** Produção de biogás da fração sólida após o pré-tratamento da amostra 2, em relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias) ..... 186

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estudos provenientes da literatura envolvendo a composição química do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil .....	36
<b>Tabela 2.</b> Poder calorífico superior (PCS) para o bagaço de cana-de-açúcar mensurado por Silva e Morais (2008) .....	49
<b>Tabela 3.</b> Capacidade calorífica de alguns combustíveis .....	68
<b>Tabela 4.</b> Planejamento Fatorial de pré-tratamento .....	81
<b>Tabela 5.</b> Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado com ácido cítrico .....	103
<b>Tabela 6.</b> Índice de Cristalinidade (IC) .....	111
<b>Tabela 7.</b> Concentração de açúcares redutores totais (ART) e perda de massa (PM) .....	114
<b>Tabela 8.</b> Concentração de glicose (g/L) e xilose (g/L) e conversão enzimática da celulose (CC) .....	118
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose (g/L) .....	119
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância (ANOVA) para a concentração de xilose (g/L) .....	120
<b>Tabela 11.</b> Determinação do poder calorífico após a HE .....	125
<b>Tabela 12.</b> 2º Planejamento Fatorial de pré-tratamento .....	128
<b>Tabela 13.</b> Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	138
<b>Tabela 14.</b> Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido cítrico .....	139
<b>Tabela 15.</b> Análise de variância (ANOVA) para rendimento .....	140
<b>Tabela 16.</b> Análise de variância (ANOVA) para celulose .....	145
<b>Tabela 17.</b> Análise de variância (ANOVA) para hemiceluloses .....	148
<b>Tabela 18.</b> Composição do líquido após o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido cítrico diluído .....	152
<b>Tabela 19.</b> Análise de variância (ANOVA) para glicose .....	156
<b>Tabela 20.</b> A conversão enzimática da celulose (CC) após o pre-tratamento .....	160
<b>Tabela 21.</b> Índice de Cristalinidade (IC) .....	167
<b>Tabela 22.</b> Análise de variância (ANOVA) para índice de cristalinidade .....	168
<b>Tabela 23.</b> Concentração de açúcares redutores totais (ART) e perda de massa (PM) .....	171

<b>Tabela 24.</b> Concentração de glicose (g/L), xilose (g/L) e arabinose (g/L) e conversão enzimática da celulose (CC) .....	174
<b>Tabela 25.</b> Análise de variância (ANOVA) para glicose .....	176
<b>Tabela 26.</b> Tabela de comparação de trabalhos utilizando hidrólise enzimática após o pré-tratamento .....	181
<b>Tabela 27.</b> Determinação do poder calorífico após a HE .....	187

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>1G</b> – primeira geração	<b>GLP</b> - gás liquefeito de petróleo
<b>2G</b> – segunda geração	<b>GNV</b> – gás natural veicular
<b>AGV</b> - ácidos graxos voláteis	<b>HE</b> – hidrólise enzimática
<b>AME</b> - atividade metanogênicas específica	<b>HMF</b> - 5-hidroximetil-2-furfuraldeido
<b>ART</b> - aares redutores totais	<b>HPLC</b> – high performance liquid chromatography
<b>BB</b> – bagaço de cana-de-aar bruto	<b>IC</b> – ndice de cristalinidade
<b>CC</b> - conversão enzimática da celulose	<b>IUPAC</b> - União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>CLAE</b> – cromatografia líquida de alta eficiência	<b>Kg/ha</b> – quilo por hectare
<b>C/N</b> - relação carbono/nitrogênio	<b>MEV</b> – microscopia eletrônica de varredura
<b>CNTP</b> - condições normais de temperatura e pressão	<b>MJ/kg</b> - megajoules por quilograma
<b>DA</b> - digestão anaeróbia	<b>NmL</b> – normal por mililitro
<b>DA-S</b> - digestão anaeróbia em meio sólido	<b>PCI</b> – poder calorífico inferior
<b>DA-L</b> - digestão anaeróbia em meio líquido	<b>PCS</b> – poder calorífico superior
<b>DNS</b> - ácido 3,5-dinitrosalicílico	<b>PM</b> – perda de massa
<b>DQO</b> – demanda química de oxigênio	<b>RSL</b> – razão sólido-líquido
<b>DRX</b> - difração de raios-X	<b>S/I</b> - razão substrato-inóculo
<b>eq</b> – equação	<b>SSV</b> – sólidos suspensos voláteis
<b>ETE</b> - Estação de Tratamento de Esgoto	<b>ST</b> - sólidos totais
<b>FF</b> - 2-furfuraldeido	<b>SV</b> - sólidos voláteis
<b>FPU</b> - filter paper unit	<b>T</b> – temperatura (C)
<b>GEE</b> – gases do efeito estufa	<b>t</b> – tempo (min)
	<b>Ton/ha</b> – tonelada por hectare
	<b>UV-VIS</b> – UV visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1 Organização da tese</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	31
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	31
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	32
<b>3.1 Biomassa lignocelulósica</b> .....	32
<b>3.2 Bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	34
<b>3.3 Estrutura da biomassa lignocelulósica</b> .....	37
<b>3.3.1 Celulose</b> .....	37
<b>3.3.2 Hemiceluloses (Polioses)</b> .....	41
<b>3.3.3 Lignina</b> .....	43
<b>3.3.4 Extrativos e outros</b> .....	46
<b>3.3.5 Poder Calorífico</b> .....	47
<b>3.4 Pré-tratamentos dos resíduos lignocelulósicos</b> .....	49
<b>3.5 Ácido Cítrico</b> .....	56
<b>3.6 Hidrólise enzimática</b> .....	58
<b>3.7 Biogás produzido a partir da biomassa lignocelulósica</b> .....	65
<b>3.7.1 Etapas da digestão anaeróbia (DA)</b> .....	71
<b>3.7.2 Parâmetros importantes para DA e composição do biogás</b> .....	76
<b>4 MATERIAIS E METODOS DO PLANEJAMENTO 1</b> .....	81
<b>4.1 Preparação do bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	81
<b>4.2 1º Planejamento experimental</b> .....	81
<b>4.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	82
<b>4.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento</b> .....	83
<b>4.4.1 Teor de Umidade</b> .....	83
<b>4.4.2 Teor de extrativos</b> .....	84
<b>4.4.3 Teor de cinzas</b> .....	86
<b>4.4.4 Teor de lignina</b> .....	87
<b>4.4.5 Teor de holocelulose</b> .....	89
<b>4.4.6 Teores de celulose e hemiceluloses</b> .....	90

4.4.7 <i>Rendimento, deslignificação , balanço de massa e perda de massa</i> .....	92
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	93
4.6 Difração de Raios-X (DRX) .....	93
4.7 Ensaio de hidrólise enzimática.....	94
4.8 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO .....	96
4.9 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) .....	97
4.10 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos .....	97
4.11 Monitoramento do biogás .....	99
4.12 Determinação de Poder calorífico .....	100
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES DO PLANEJAMENTO 1</b> .....	100
5.1 Pré-tratamento e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar .....	100
5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	108
5.3 Difração de Raios-X (DRX) .....	111
5.4 Hidrolise enzimática .....	114
5.5 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO .....	122
5.6 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) .....	123
5.7 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos (DA).....	123
5.8 Monitoramento do biogás .....	123
5.9 Determinação de Poder calorífico .....	124
5.10 Conclusões do Planejamento 1.....	126
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS DO PLANEJAMENTO 2</b> .....	127
6.1 Preparo do bagaço de cana-de-açúcar .....	127
6.2 2º Planejamento experimental.....	127
6.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	129
6.4 Caracterizações do bagaço de cana-de-açúcar antes e após pré-tratamento	132
6.4.1 <i>Teor de Umidade</i> .....	132
6.4.2 <i>Teor de extrativos</i> .....	132
6.4.3 <i>Teor de Cinzas</i> .....	132
6.4.4 <i>Teor de lignina</i> .....	132
6.4.5 <i>Teor de holocelulose</i> .....	132
6.4.6 <i>Teores de celulose e hemiceluloses</i> .....	133
6.4.7 <i>Rendimento e deslignificação e balanço de massa e perda de massa</i> .....	133
6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	133

<b>6.6 Difração de Raios-X (DRX)</b> .....	133
<b>6.7 Ensaio de hidrólise enzimática</b> .....	133
<b>6.8 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO</b> .....	134
<b>6.9 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)</b> .....	134
<b>6.10 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos</b> .....	134
<b>6.11 Monitoramento do biogás</b> .....	135
<b>6.12 Determinação do poder calorífico</b> .....	135
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	135
<b>7.1 Pré-tratamento e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	135
<b>7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	163
<b>7.3 Difração de Raios-X (DRX)</b> .....	165
<b>7.4 Hidrólise enzimática</b> .....	170
<b>7.5 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO</b> .....	182
<b>7.6 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)</b> .....	182
<b>7.7 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos (DA)</b> .....	182
<b>7.8 Monitoramento do biogás</b> .....	183
<b>7.9 Determinação de Poder calorífico</b> .....	187
<b>7.10 Conclusões do Planejamento 2</b> .....	188
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	189
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	193

## 1 INTRODUÇÃO

Os investimentos em biocombustíveis têm aumentado em resposta a políticas globais visando à obtenção da redução da emissão do GEE (gases de efeito estufa), diversificação de fontes de energia e diminuição da dependência de combustíveis fósseis. A energia renovável serve como uma alternativa viável às fontes de energia tradicionais, fornecendo formas energéticas limpas e sustentáveis. O desenvolvimento de biorrefinarias relacionadas à produção de biocombustíveis utilizando matérias-primas lignocelulósicas, ainda está em fase comercial inicial e muitos desafios técnicos e econômicos devem ser superados antes de uma indústria da energia renovável pode se tornar uma empresa bem-sucedida e comercialmente viável (PAPA *et al.*, 2015; MEIGHAN *et al.*, 2017, ZABED *et al.*, 2016; BUDDADEE *et al.*, 2008).

A biomassa lignocelulósica, principal matéria-prima potencial para a biorrefinaria, devido ao seu teor de açúcar, alta disponibilidade e baixo custo (TRAVAINI *et al.*, 2016), representa uma fonte natural, barata e abundante. Constituída, majoritariamente, por três frações que se encontram intimamente associadas, dando origem a uma estrutura de caráter recalcitrante ao vegetal, sendo estas frações compostas por polímeros de açúcares (celulose (30 - 50%) e hemiceluloses (25-35%), lignina (10-35%) e outros componentes, como extrativos e proteínas, óleos e cinzas (TRAVAINI *et al.*, 2016; ISIKGOR; BECER, 2015; GÁMEZ *et al.*, 2006). Esses materiais podem ser utilizados como substratos para processos fermentativos, visto que 70% da matéria seca é constituída de carboidratos (TAMANINI; HAULY, 2004).

O principal desafio para a refinaria à base de biomassa é o design eficiente, econômico e sustentável do pré-tratamento, a fim de fragmentar e abrir a complexa estrutura lignocelulósica e, assim, facilitar o acesso das enzimas durante a hidrólise, para melhorar a taxa e o rendimento da liberação de açúcares. Esta etapa representa até 20% dos custos de produção totais (TRAVAINI *et al.*, 2016; AMIN *et al.*, 2017).

Anualmente, grandes quantidades de materiais de biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas e florestais, gramíneas, resíduos de papel, culturas energéticas lenhosas e herbáceas e resíduos sólidos municipais, dentre outras são acumuladas no planeta e estão disponíveis em uma forma razoavelmente limpa e em larga escala (BRIENZO *et al.*, 2017; PAPA *et al.*, 2015). Porém, muitas vezes, a disposição final desses materiais é inadequada, gerando impactos ambientais, e, portanto, não

aproveitando o seu conteúdo energético ou químico (BRAGATTO, 2010; SANTOS, 2017; BAËTA *et al.*, 2016; ; SILVA; MORAIS, 2008).

Dessa forma, a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, tais como a produção de biogás, contribui para o suprimento de energia e ajuda a mitigar o problema de poluição que pode ser causado pela disposição inadequada dos mesmos (PANDEY *et al.*, 2000c). Dessa maneira, a produção de biogás também pode se tornar adequada para a geração de energia em pequena escala no local onde os resíduos forem gerados e estiverem disponíveis, evitando maiores gastos de energia e custo de transporte (LIMA, 2018). A utilização desse gás em larga escala permitiria que a humanidade reduzisse drasticamente o consumo de petróleo, sendo que esta redução somada à não emissão direta na atmosfera do biogás se tornariam ferramentas contra o combate à emissão de gases de efeito estufa e conseqüentemente mitigadoras do aquecimento global (OLIVEIRA, 2009).

A produção de biocombustíveis no Brasil tem elevada importância devido à necessidade energética para os próximos anos, nos quais a demanda total de energia do país estimava-se que, a partir de 2013, iria crescer 4,3% ao ano e chegaria a 351,35 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (tep) em 2023. A indústria e o setor de transportes continuarão a serem os principais responsáveis por esse consumo, com 67% do total (ROSSI, 2015).

Segundo Chemmés *et al.* (2013), a cana-de-açúcar é uma das principais culturas e fonte de matéria-prima para a produção de bioetanol no Brasil, em decorrência do seu baixo custo, frente as outras matérias-primas, além de elevada disponibilidade. Vale destacar que a principal característica do mercado do etanol é a concentração das atividades no Brasil e nos Estados Unidos. Juntos esses países foram responsáveis por 80% da produção e por 72% do consumo total de etanol combustível no mundo em 2014, no entanto, Estados Unidos produziu e consumiu mais etanol que o Brasil (BRANDÃO, 2015).

Entretanto, a elevada produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar acarreta na geração de um grande volume de bagaço. Esse resíduo possui baixa densidade e, portanto, grandes volumes de baixo valor agregado são estocados. Muitas vezes o destino final desse resíduo lignocelulósico representa perdas do seu potencial energético, uma vez que o mesmo é, comumente, queimado em caldeiras para geração

de vapor e eletricidade dentro das usinas sucroalcooleiras (HOFSETZ *et al.*, 2012; BUDDADEE *et al.*, 2008).

O bagaço de cana possui alguns requisitos técnicos, energéticos 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 são interessantes, considerando-se o elevado teor de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) em sua estrutura (BAÊTA, 2016).

Assim sendo, o bagaço de cana-de-açúcar pode potencializar para o rendimento de produção de biocombustíveis como biogás (metano (CH<sub>4</sub>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>)), além de gerar assim como obter alguns bioprodutos, valorizando o resíduo lignocelulósico, favorecendo o crescimento e desenvolvimento de pesquisas na área e contribuindo no aspecto ambiental e econômico.

No entanto, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para produção de biocombustíveis esbarra na elevada resistência à degradação química e biológica que é explicada, principalmente, pela complexidade das interações entre os constituintes dos resíduos lignocelulósicos (celulose, hemiceluloses e lignina) (SANTOS, 2017; HENDRIKS *et al.*, 2009).

Neste contexto, o desenvolvimento de processos que busquem a produção de biocombustíveis deve passar pela otimização integrada das etapas de caracterização química e de pré-tratamento dos resíduos agrícolas lignocelulósicos (GOUVEIA *et al.*, 2009; HENDRIKS *et al.*, 2009; ZABED *et al.*, 2016 ). Alguns autores como Lavarack *et al.*, (2002) afirmam que a escolha do tipo de pré-tratamento ideal depende do tipo e composição da biomassa e da finalidade 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 otimizar a liberação de carboidratos tanto de hemiceluloses quanto de celulose, favorecendo assim os processos fermentativos de produção de biocombustíveis.

De forma geral, o principal objetivo das técnicas de pré-tratamento é dissociar ou romper as interações existentes dentro do complexo lignocelulósico (reduzir o tamanho das partículas, aumentar a área superficial e volume de poros, reduzir o teor de lignina e diminuir a cristalinidade da celulose), facilitando o acesso e a digestibilidade enzimática e microbiológica (HENDRIKS *et al.*, 2009; SANTOS, 2017).

Dentre as técnicas de pré-tratamento disponíveis, destacam-se os processos físico-químicos que utilizam ácidos (concentrados ou diluídos) combinados ou não com temperaturas elevadas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O uso de ácidos para hidrólise lignocelulósica é um processo muito eficaz e bem conhecido para obter uma estrutura adequada (CHIARAMONTI *et al.*, 2012) para conversão em biocombustíveis. Porém, são necessárias novas descobertas para minimizar custos e aprimorar a sustentabilidade em termos de eficiência energética (PAPA *et al.*, 2015).

Até o momento, nenhum estudo foi realizado usando ácido cítrico diluído como estratégias de pré-tratamento em direção à perspectiva para a produção de biogás.

O ácido cítrico é um agente acidulante, conservante, emulsificante, aromatizante, sequestrante e tamponante amplamente utilizado em muitas indústrias, especialmente em produtos alimentícios, bebidas, farmacêuticos, nutricionais e cosméticos (CIRIMINNA *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2006). Do ponto de vista ambiental, o ácido se degrada rapidamente nas águas superficiais e não apresenta riscos ao meio ambiente ou à saúde humana (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

Devido às suas notáveis propriedades físico-químicas e natureza ambientalmente benigna, o uso do ácido cítrico em vários setores industriais aumentou rapidamente ao longo do século XIX, quando o ácido foi extraído diretamente do suco concentrado de frutas, sendo substituído pela rota de fermentação de carboidratos, desde o final da década de 1920 (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

Argumentos em relação à sua extensa gama de aplicações, produções (alta demanda) e mercado (preços fixos por décadas devido às altas produções e queda dos preços), sustentam o ponto de vista de que o ácido cítrico se tornará um produto químico essencial na bioeconomia emergente (CIRIMINNA *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2006; SHOW *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Normalmente, estudos com o pré-tratamento com ácidos diluídos sugerem diferentes cargas de biomassa (m/m), tempo e temperatura (TAHERZADEH *et al.*, 2007b; BUDDADEE *et al.*, 2008; GÁMEZ *et al.*, 2006), opções a serem considerados para o controle da perspectiva custo-benefício, sustentabilidade e da viabilidade do processo como um todo.

Após a etapa de pré-tratamento, a biomassa pré-tratada residual ainda possui grande quantidade de celulose e lignina, que atuam como uma barreira física e impedem

a degradação anaeróbia, e, por vezes, uma pequena quantidade de hemiceluloses residuais, que também atua como uma barreira física ao ataque enzimático da celulose (LEITÃO *et al.*, 2013). Esses resíduos sólidos são ricos em celulose e podem ser hidrolisados via hidrólise química por processo convencional de hidrólise ácida, básica ou via hidrólise enzimática, e os açúcares fermentescíveis liberados podem ser usados para produção anaeróbia de biogás (metano e hidrogênio), por exemplo, ou seja, aumentando a biodegradabilidade anaeróbia (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; LEITÃO *et al.*, 2013).

Destacam-se como vantagens da hidrólise enzimática, os elevados rendimentos devido a especificidade das enzimas, o que elimina a geração de subprodutos indesejáveis, além de serem operadas em condições de temperatura próxima a ambiente (35-40°C), pressão atmosférica e pH levemente ácido (4,5-5,0) (MADIGAN, 2015; LIMA, 2018). A bioconversão enzimática da fração polissacarídica do bagaço de cana tem despertado interesse das usinas sucroalcooleiras, uma vez que é possível produzir etanol celulósico 2G, aumentando a produção total de etanol sem aumentar as áreas de cultivo da cana-de-açúcar e podendo ser usado, também, para a conversão à biogás.

Embora diversas técnicas de pré-tratamento sejam potencialmente aplicáveis ao bagaço de cana, torna-se particularmente difícil realizar estudos comparativos com base nos dados da literatura em virtude das diferenças nas metodologias de pesquisa, nas características físicas do material, bem como nos métodos de preparação da matéria-prima. Entretanto, salienta-se a importância de se aperfeiçoar o conhecimento acerca das diferenças entre os diversos tipos de pré-tratamento, bem como do efeito de cada processo sobre as demais operações. Tal medida pode facilitar a seleção dos equipamentos e sequências operacionais do sistema integrado, além de reduzir riscos associados à implementação do processo em escala industrial, bem como identificar oportunidades de melhoria ao longo do sistema integrado, conduzindo a uma otimização da eficiência operacional (BONOMI, 2010) e a formas competitivas em termos de desempenho (rendimentos) e custos (CHIARAMONTI *et al.*, 2012) na produção de biogás.

Assim, visto que após o pré-tratamento são obtidas frações sólidas e líquidas, é possível produzir biogás (metano e hidrogênio) tanto através da fração sólida na digestão anaeróbia clássica em fase sólida, como através do uso da fração líquida (hidrolisado) obtido no pré-tratamento pelo processo de digestão anaeróbia em fase

líquida (GOUVEIA *et al.*, 2009, SANTOS, 2017). A maioria dos estudos disponíveis na literatura considera o uso completo de biomassa pré-tratada, ou seja, frações sólidas e líquidas, para produzir biogás ( $\text{CH}_4$  ou  $\text{H}_2$ ) e estimar os efeitos do pré-tratamento na digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar, mas não o uso separado dessas frações (ADARME *et al.*, 2017).

A geração de biogás em processo anaeróbio é facilitada pela liberação de matéria orgânica fermentescível resultante do pré-tratamento e subsequente da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Processos chave, visto que, reduzem as cadeias de carboidratos estruturais longas da parede celular a moléculas menores de açúcares monoméricos fermentescíveis menores (PAPA *et al.*, 2015; NARTKER *et al.*, 2014). Os açúcares liberados são transformados em metano por meio de diferentes reações realizadas por distintos micro-organismos anaeróbios. Inicialmente a matéria orgânica é parcialmente degradada por micro-organismos hidrolíticos e os subprodutos gerados nesta etapa são convertidos em ácidos intermediários (ex.: ácido fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) pelas bactérias acidogênicas (GERARDI, 2006; PRADO *et al.*, 2008).

A produção de biogás se torna promissor na sucessão da evolução dos combustíveis por possuir vários benefícios (inclusive elevado valor energético), além de ser uma alternativa sustentável aos métodos convencionais de produção desse gás, podendo ser executada em pressão atmosférica e temperatura ambiente (ou com aquecimento brando  $\sim 55^\circ\text{C}$ ) (LIMA, 2018).

Portanto, considerando a possibilidade de aproveitamento do bagaço de cana para produção de biocombustíveis, destacam-se os principais escopos desse trabalho. Inicialmente, utilizando ferramentas estatísticas de otimização multivariada (dois planejamentos), avaliou-se a técnica de pré-tratamento com ácido cítrico diluído em bagaço de cana-de-açúcar. Caracterizações das propriedades físico-químicas foram realizadas, tais como teor de celulose, lignina e hemiceluloses, o índice de cristalinidade da biomassa e análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para identificar diferenças morfológicas nas amostras antes e após condições alternativas de pré-tratamento. O teor de açúcares após a hidrólise enzimática foi comparado com as diferentes condições de pré-tratamento e modificações nas propriedades do material. Diante disso, foi feita a seleção das amostras que apresentaram maior potencial de produção de biogás, em benefício da simplicidade operacional e da economicidade do

processo. O poder calorífico das amostras sólidas após a hidrólise enzimática foi feito para avaliar o aproveitamento energético e para o estudo da eficiência de utilização desses insumos, o que em muitos casos se torna vantajoso devido aos baixos custos de obtenção desses resíduos. Conforme Lizcano (2015) e Santos (2013), o potencial energético de uma cultura é uma função da quantidade de biomassa produzida e do poder calorífico que essa apresenta.

A revisão da literatura mostra que apesar da existência de estudos envolvendo diferentes tipos de pré-tratamento, grande parte dos estudos ainda contempla o uso de pré-tratamentos clássicos como os ácidos e alcalinos. O presente trabalho de pesquisa tem como objetivo examinar as opções atuais de pré-tratamento (dois planejamentos) com ácido cítrico diluído para a produção de biogás (não encontrado estudos, até o momento), identificar os principais pontos fortes e fracos dos diferentes conceitos e desenvolver um pré-tratamento adequado para demonstração em escala industrial. A estratégia, validada através da campanha experimental relatada aqui, é desenvolver um sistema inovador e eficiente de pré-tratamento ácido que possa efetivamente extrair açúcares C5 e C6 limitando a formação de inibidores.

### **1.1 Organização da tese**

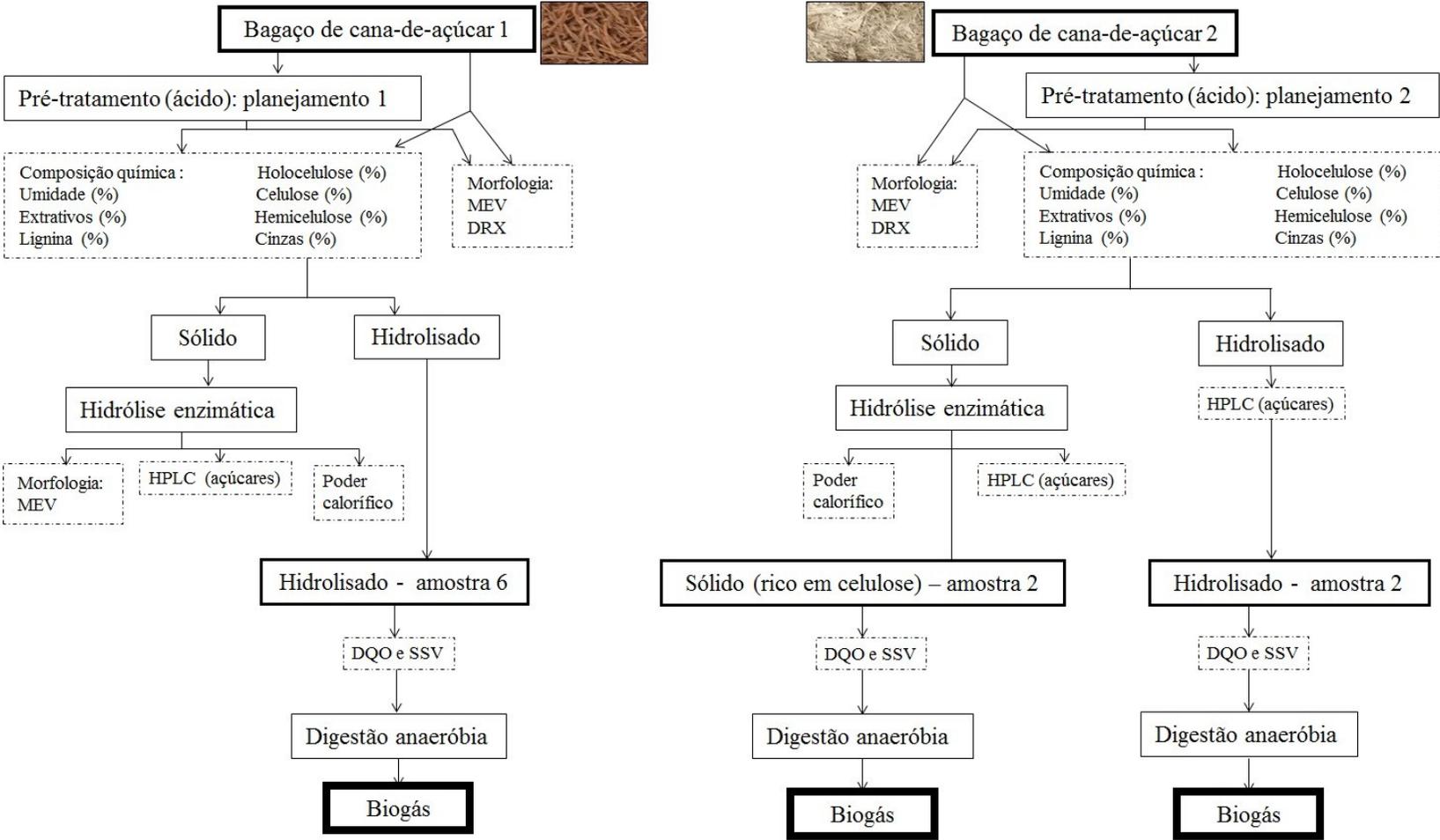
O item 1 e 2 apresentaram a introdução do trabalho e os objetivos, respectivamente. O item 3 exhibe a revisão da literatura, abordando brevemente conceitos de biomassa e suas estruturas lignocelulósicas (destaque para o bagaço de cana-de-açúcar) e pré-tratamentos, dando ênfase ao pré-tratamento por ácido diluído, hidrólise enzimática e produção de biogás.

A metodologia básica para o planejamento 1 foi explicada no item 4. Neste foram exibidas também as metodologias gerais para o andamento do estudo, os procedimentos específicos inerentes a cada etapa e os resultados, associados ao planejamento 1. No item 5 os resultados, discussões e conclusão parcial do planejamento 1 foram expostos.

O item 6 apresentou os procedimentos dos pré-tratamentos do planejamento fatorial 2, assim como as caracterizações, os resultados, as discussões e a conclusão parcial estão descritas no item 7.

A separação em itens foi realizada para facilitar o entendimento. O fluxograma geral do presente estudo está representado de forma esquemática na Figura geral.

**Figura geral.** Fluxograma esquemático das etapas dos procedimentos experimentais proposto para a produção de biogás.



Fonte: Autora

Realizou-se 2 planejamentos fatoriais, nas quais no planejamento 1 avaliou-se o pré-tratamento (pré-hidrólise ácida diluída) do resíduo do bagaço de cana-de-açúcar, em sistema de refluxo (pressão atmosférica), utilizando-se o planejamento experimental do tipo ( $2^2$ ), com um ponto central, com variáveis operacionais como tempo ( $t$ ) e razão sólido-líquido ( $RSL$ ). No planejamento 2, utilizou-se um planejamento experimental ( $2^3$ ) e as condições de pré-tratamento (sistema pressurizado) de bagaço de cana-de-açúcar, com ácido cítrico, foram otimizadas por meio do planejamento experimental Doehlert (Pedersen e Meyer) quadrático. As variáveis avaliadas foram temperatura ( $T$ , °C), tempo ( $t$ , min) e a razão sólido líquido ( $RSL$ ,  $g.mL^{-1}$ ).

Por fim, o item 8 destina-se a apresentar, para finalização, uma conclusão geral dos dois planejamentos e o item 9 apresenta as referências que auxiliaram no estudo e na elaboração da tese.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral foi avaliar o potencial do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico diluído, em dois diferentes efeitos - sob pressão atmosférica e em sistema pressurizado para produção de biogás. Caracterizou-se o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado para produção de biogás. Produziu-se biogás a partir de amostras que resultaram melhores condições pré-tratadas, em ambos os planejamentos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar as condições de pré-tratamento por hidrólise ácida (ácido cítrico) do bagaço de cana-de-açúcar, variando, em primeiro momento, tempo e concentração de solução de ácido cítrico, em pressão atmosférica. Em segundo, variando tempo, temperatura e razão sólido-líquido, em sistema pressurizado.
- ✓ Verificar o efeito dos parâmetros dos processos de pré-tratamentos, em relação aos teores de lignina, celulose e hemiceluloses, principalmente, visando gerar um substrato com característica passível de ser utilizado para conversão de biogás.
- ✓ Após o pré-tratamento aplicado no resíduo lignocelulósico, o mesmo foi utilizado em processo de hidrólise enzimática. Para tanto, utilizou-se enzima comercial como a Cellic® CTEC 3. Esperou-se com esse processo enzimático a liberação de açúcares fermentescíveis que alimentaram reatores anaeróbios para produção de biogás.

✓ Selecionar as melhores condições dentre cada planejamento e produzir biogás. No primeiro planejamento, produzir biogás somente da fração líquida após o pré-tratamento, com a finalidade de direcionamento para o planejamento 2. Para o planejamento 2, produzir biogás tanto da fração líquida após pré-tratamento e fração sólida após a hidrólise enzimática.

✓ Determinar o poder calorífico do sólido após a hidrólise enzimática com a finalidade de aproveitamento para queima de resíduo, uma oportunidade de particular importância para colaborar na oferta de energia, ou seja, para aproveitamento energético.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Biomassa lignocelulósica**

Por biomassa lignocelulósica compreende toda a matéria de origem vegetal, advinda de floresta nativa ou plantada; resíduos sólidos municipais, culturas agrícolas e seus resíduos (ex. cascas e galhos de árvores, bagaço e palha de cana; cascas de arroz, palha e sabugo de milho ou cascas de café, palha de trigo, etc.); bem como os resíduos de madeira e da indústria de papel e esterco de animais ruminantes. A biomassa lignocelulósica é a fonte biológica renovável mais abundante na Terra e é uma fonte natural e barata que abre a possibilidade de sua utilização para a produção de biocombustíveis (DINIZ, 2008; RAHIKAINEN *et al.*, 2011; SANTOS, 2013).

Muitas vezes a destinação dada a esses materiais lignocelulósicos é pouco nobre e representa uma perda do potencial de produção energético, além de gerarem um passivo ambiental (BRAGATTO, 2010). Sendo o Brasil o terceiro maior exportador agrícola, o volume de resíduos oriundos do setor agrícola e agroflorestal no país são conseqüentemente altos. Tais biomassas residuais estão disponíveis em uma forma razoavelmente limpa e em grandes quantidades (BRAGATTO, 2010; BAÊTA, 2016, CANILHA *et al.*, 2012).

A maximização da utilização dos resíduos lignocelulósicos como matriz energética é regida, basicamente, pela sua disponibilidade (quantidade e qualidade), custo do plantio e manutenção da biomassa, a localização do consumidor, o tipo e o valor de mercado dos serviços de energia, e qualquer coprodutos ou benefícios que podem resultar (IEA, 2007). Além disso, os diversos resíduos lignocelulósicos disponíveis continuam sendo uma fonte rica de bioenergia na forma de polímeros e macromoléculas orgânicas e, conseqüentemente, podem e devem ser mais bem

aproveitados como fonte de matéria prima para produção de biocombustíveis, energia e produtos químicos de elevado valor agregados. Portanto, a utilização desse resíduo por um lado fornece um substrato de fonte renovável, com potencial energético considerável e por outro contribui para minimizar os problemas de poluição ambiental (SANCHEZ; CARDONA, 2008; SANTOS, 2017).

A biomassa abundante e não dispendiosa não compete com a produção de alimentos. Economicamente, a lignocelulose tem uma vantagem sobre outras importantes matérias-primas agrícolas para biocombustíveis, tais como amido de milho, soja e cana-de-açúcar, devido ao fato de ser produzida rapidamente e a um custo significativamente menor que os alimentos. Biomassa lignocelulósica é também um importante componente das culturas mais abundantes já mencionadas; é a porção não comestível da planta, que é normalmente subaproveitada, mas pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis (QUINTERO-RAMIREZ, 2010).

A produção de biomassa para fins energéticos renováveis gera empregos e requer menor investimento por posto de trabalho criado do que os combustíveis fósseis. Além disso, descentraliza a produção regionalmente, tem o ciclo de carbono fechado (o que significa diminuição das emissões de poluentes) e economiza as fontes não-renováveis. Essas são apenas algumas vantagens, porém seu uso deve se dar de forma sustentável, de acordo com técnicas apropriadas de manejo e cultivo e de forma a não concorrer com a agricultura (OLIVEIRA, 2014).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente dos biopolímeros celulose, lignina e hemiceluloses, juntamente com uma pequena quantidade de outros materiais como proteínas, sais minerais e metabólitos secundários, sendo que sua composição química varia consideravelmente de espécie para espécie, com variação até na mesma espécie, dependendo da idade, fase de crescimento, tipo de solo, estresse hídrico, índice de radiação solar, dentre outros (PÉREZ *et al.*, 2002; SANTOS, 2017; ZHANG, 2008), ou seja, alguns fatores como o tipo de plantio, solo, terreno, irrigação, luz solar e nutrientes podem acarretar uma variabilidade dos principais componentes de uma biomassa lignocelulósica para outra e dentro de um mesmo tipo de biomassa.

Os carboidratos da parede celular, na forma de celulose (glicose) e hemiceluloses (arabinose, galactose, glicose, xilose e manose), representam substratos que podem ser convertidos em biocombustíveis, através da conversão microbiana de carboidratos em estruturas menos complexas, liberando assim açúcares fermentescíveis

(C5 e C6). Contudo, a alta complexidade das interações dos três constituintes principais (celulose, hemiceluloses e lignina) na parede celular é o grande desafio tecnológico para a recuperação e fermentação dos carboidratos (SANTOS, 2017; SANCHEZ; CARDONA, 2008; PU *et al.*, 2013) para aumento da digestibilidade enzimática e consequentemente uma maior produção de açúcares fermentescíveis.

Dessa forma, é necessário estudar novas técnicas de pré-tratamento, bem como otimizar aquelas já existentes de forma a potencializar o uso, no nosso país, de bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, para a produção sustentável de energia e insumos químicos (BRAGATTO, 2010; BAËTA, 2016).

### **3.2 Bagaço de cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma gramínea, cujo potencial, variado e complexo, ainda pode ser muito explorado. Tem origem asiática e pertence a uma das mais importantes e maiores famílias de angiospermas. As espécies de cana existentes, sendo um total de cinco, possuem diferentes características quanto à sua composição, desenvolvimento, exigência de solo, dentre outros, o que confere vantagens e desvantagens particulares (GEHLEN, 2013).

O bagaço de cana, obtido como subproduto nas usinas de açúcar e álcool, é um resíduo lignocelulósico fibroso gerado durante a operação de esmagamento dos colmos da cana-de-açúcar para extração do caldo da cana. Essa etapa é utilizada no processo de fabricação do açúcar e etanol de 1ª geração (SANCHEZ *et al.*, 2010; BAËTA, 2016).

É um resíduo gerado em grande quantidade nos países tropicais, principalmente no Brasil, como nos Estado de São Paulo, Goiás e Minas Gerais. Com isso, é importante buscar tecnologias para melhor reaproveitar tal como resíduo ou fonte de energia, com baixo custo (SANCHEZ *et al.*, 2010; CARASCHI *et al.*, 1996; BATALHA *et al.*, 2015 ).

Tradicionalmente, no Brasil os resíduos de biomassa têm sido utilizados para geração de energia elétrica por meio de sua combustão direta. Somente na safra de 2018/2019 o setor agroindustrial brasileiro teve uma estimativa de aproximadamente 615 milhões de toneladas (71.326 kg/ha) de bagaço de cana-de-açúcar (CONAB, 2018b). Como consequência, uma elevada quantidade de resíduos lignocelulósicos, aproximadamente 240 kg de bagaço de cana-de-açúcar bruto (BB) com 50 % de umidade por tonelada de cana-de-açúcar (BAËTA, 2016; CONAB, 2018a), é produzida

a partir de tal *commodity*. Atualmente, grande parte deste bagaço é queimada em caldeiras nas indústrias sucro-alcooleiras para obtenção de vapor utilizado *in loco* ou para a venda na forma de eletricidade. Como essa destinação resulta em excesso de energia/vapor e com intuito de melhor aproveitar o potencial energético dessa biomassa, os centros de pesquisas vêm investindo intensamente na criação de processos que visam rotas de conversão do bagaço de cana em produtos de maior valor agregado, tais quais combustíveis gasosos (metano e hidrogênio), bioetanol, eletricidade, alimentos, biopolímeros e outros produtos (CARASCHI *et al.*, 1996; PASQUINI, 2004; NOVO *et al.*, 2011; NOVO, 2012; LIMA, 2018). 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 (BAÊTA, 2016).

Esses resíduos possuem como vantagens o fato de 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 metano (CH<sub>4</sub>) e células a combustível para o hidrogênio (H<sub>2</sub>) (BAÊTA, 2016).

O bagaço de cana-de-açúcar é classificado como uma biomassa vegetal altamente oxigenada, sendo, portanto, o carbono e oxigênio os constituintes majoritários desse material. Uma caracterização realizada em sessenta amostras de bagaço de cana do nordeste do Brasil por Rocha *et al.*, (2015) apontou para uma baixa variabilidade entre as amostras e uma composição elementar em que o oxigênio aparece em maior abundância (48,74 ± 1,50%), seguida do carbono (44,90 ± 1,07%), hidrogênio (6,10 ± 0,85%), nitrogênio (0,27 ± 0,10) e cinzas (2,84 ± 1,22).

Novo (2012) cita autores que, em seus estudos, após o processo de moagem em uma usina sucroalcooleira cerca de 50% da massa do bagaço de cana-de-açúcar corresponde à umidade, 45% corresponde a estruturas fibrilares lignocelulósicas e 5% corresponde a extrativos e componentes inorgânicos.

Portanto, o bagaço de cana-de-açúcar, assim como outras biomassas lignocelulósicas, é composto principalmente por polímeros naturais, principalmente a lignina, a hemiceluloses e a celulose (SANCHEZ *et al.*, 2010), representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estudos provenientes da literatura envolvendo a composição química do bagaço de cana-de-açúcar

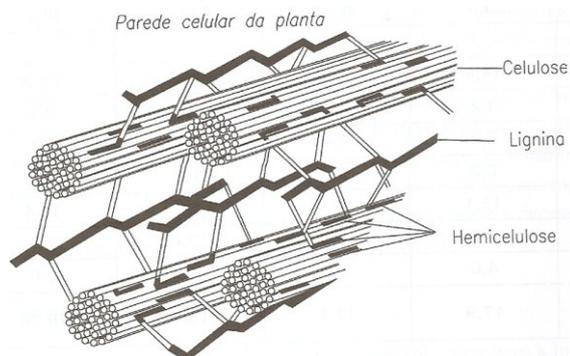
Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Autor
20 - 60	20 - 30	10 - 30			PANDEY <i>et al.</i> , 2000; FREITAS <i>et al.</i> , 2013
40 - 50	25 - 35	10 - 35			BAËTA, 2016
39 - 45	25 - 30	18 - 26	1 - 5	2 - 10	ROCHA <i>et al.</i> , 2015
30 - 45	25 - 30	25 - 30			BAËTA, 2016
41 - 44	25 - 27	20 - 22		4	PASQUINI, 2004; NOVO, 2012
40 - 45	30 - 35	20 - 30			BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016
25 - 47	20 - 35	15 - 35			LEITÃO, 2013
41 - 45	22 - 26	19 - 22	1 - 3	6 - 10	BAËTA, 2016; CANILLHA <i>et al.</i> , 2012
40 - 50	25 - 35	15 - 35			TRAVAINI, 2016
42,4 - 42,6	25,2 - 28,3	19,6 - 21,7	1,4 - 1,6	2,1	CANILLHA <i>et al.</i> , 2012; BAËTA, 2016
38,8	26,0	32,4	2,8		CANILLHA <i>et al.</i> , 2012; BAËTA, 2016
38,4	23,2	25,0	1,5		RABELO <i>et al.</i> , 2011; CANILLHA <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Autora

Todos estes compostos estão organizados dentro da matriz lignocelulósica e suas interações, principalmente, entre a celulose, as hemiceluloses e a lignina (Figura 1) provêm das propriedades físicas e químicas desse compósito. Em menor proporção encontram-se os compostos como os extrativos e as cinzas (compostos inorgânicos) que cumprem funções biológicas e metabólicas, respectivamente (SAXENA *et al.*, 2009).

Além da composição química (percentagem de polissacarídeos, lignina e cinzas) o bagaço de cana-de-açúcar pode ser caracterizado fisicamente, onde é avaliado o seu tamanho, volume de poros, cristalinidade, acessibilidade por área superficial, abrasividade e distribuição física da lignina. Tais parâmetros possuem grande influência no tipo de processamento que será adotado para o bagaço de cana e por isso devem ser estudados (GARÍA-CUBERO *et al.*, 2009).

**Figura 1.** Principais componentes químicos da biomassa lignocelulósica.



Fonte: LORA; VENTURINI (2012)

Perante outros resíduos lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta algumas vantagens, ainda, para a produção de bioenergia por processos de bioconversão (BUDDADEE *et al.*, 2008). Possui elevados rendimentos de armazenamento de energia solar (~ 80 Ton/ha) comparado com outras biomassas como o trigo (~ 1 Ton/ha), outras gramíneas (~ 2 Ton/ha) e árvores (20 Ton/ha). Apresenta elevados teores de açúcares fermentescíveis (~70%) além de baixo teor de cinzas (~2%), conferindo inúmeras vantagens em comparação com outros resíduos de culturas, tais como palha de arroz e palha de trigo, que têm teor de cinzas de 17,5% e 11,0%, respectivamente (PANDEY *et al.*, 2000b; LIMA, 2018).

Segundo pesquisadores do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar é extremamente importante para otimizar e maximizar os resultados em quaisquer aplicações, como em reações químicas, processos de deslignificação e na produção de biocombustíveis (ROCHA *et al.*, 2015). As principais características e propriedades físico-químicas dos principais constituintes principais do bagaço de cana-de-açúcar foram apresentadas a seguir.

### **3.3 Estrutura da biomassa lignocelulósica**

#### **3.3.1 Celulose**

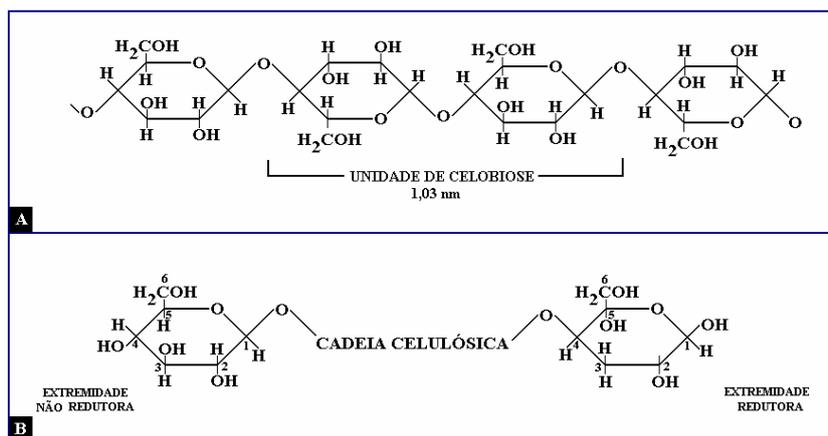
O homopolímero celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é o composto orgânico natural mais abundante e ocorre em espécies vegetais superiores como árvores (representa cerca de 40 a 60% da parede celular das plantas), no bagaço de cana (sendo relatado na literatura teores entre 32 e 47%) e em organismos primitivos como algas marinhas e bactérias (PASQUINI, 2004; SANTOS, 2013; AGBOR *et al.*, 2011; MEIGHAN, 2016, ROCHA *et al.*, 2015; LIMA, 2018).

É um polímero linear (não ramificado), sua estrutura pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas (posição equatorial), tendo o dímero celobiose como unidade monomérica básica de repetição (SANTOS, 2013; PASQUINI, 2004; AGBOR *et al.*, 2011; SANTOS, 2017). O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, bem como pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas,

formando-se agregados com determinada estrutura cristalina. Esses agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em grande número de outros solventes (SANTOS, 2013; MEIGHAN, 2016).

Dois monômeros de glicose adjacentes, na estrutura da celulose, são ligados pela eliminação de uma molécula de água e esta ligação dá origem à celobiose. A cadeia de celulose pode conter até 10.000 a 15.000 unidades de glicose, (SANTOS, 2017) que podem formar estirpes ou fibrilas devido à formação de ligações de hidrogênio entre cadeias de polímero que geram estruturas recalcitrantes (TRAVAINI *et al.*, 2016; LIMA, 2018). A Figura 2 apresenta de modo simplificado a estrutura molecular da celulose, enfatizando a celobiose (dímero da celulose) bem como as principais ligações e grupos químicos (FENGEL; WEGENER, 1989).

**Figura 2.** Fórmula da celulose (A) e Grupos terminais da cadeia polimérica de celulose (B).

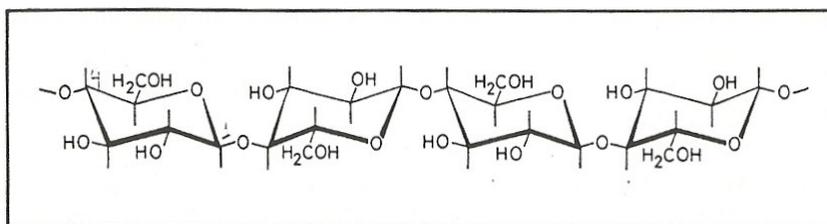


Fonte: FENGEL; WEGENER (1989) (adaptado)

A estrutura da celulose é formada por regiões cristalinas altamente ordenadas e por regiões amorfas que apresentam pouca organização (TURUMTAY, 2015). As regiões cristalinas e amorfas são mantidas por ligações de hidrogênio e pelas forças de Van der Waals, no entanto na parte amorfa existem torções que alteram o arranjo ordenado da celulose. Sua forma depende da origem do material da parede celular e de como ele foi obtido (SANTOS, 2017; BRIENZO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2012).

Fengel; Wegener, (1989) descrevem que a rede de ligações inter- e intramoleculares formada por microfibrilas que se unem formando as fibras de celulose, conferindo à celulose considerável flexibilidade, rigidez, alto desempenho mecânico (resistência) e funcionalidade. Dessa forma, as fibras lignocelulósicas conferem o principal reforço para as árvores, plantas, algas e bactérias. Os arranjos estruturais formados por essas ligações podem ser bem definidos acarretando em uma celulose altamente cristalina (cadeias fortemente organizadas conferindo maior resistência mecânica) ou podem formar uma celulose de grau de cristalinidade de ordem inferior (intermediário e amorfa) onde há uma menor compactação das cadeias (menor resistência mecânica). Ambas as formas ocorrem em proporções características em celuloses de diferentes biomassas. A fórmula estereo-química relevante é apresentada na Figura 3.

**Figura 3.** Fórmula estereo-química da celulose

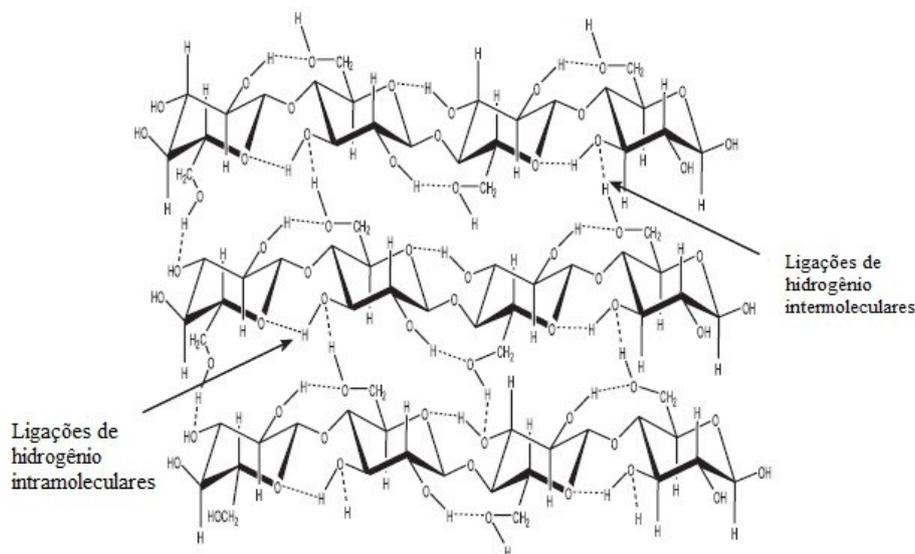


**Fonte:** FENGEL; WEGENER (1989)

Em complemento, Santos *et al.* (2012) mencionam que as ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas conferem resistência à celulose. As interações intermoleculares entre hidroxilas são responsáveis pela formação da fibra vegetal, onde de seis a oito moléculas de celulose se alinham paralelamente para formar uma fibra, eliminando as moléculas de água, tornando a microfibrila extremamente longa e resistente (Figura 4). Sobre a superfície das microfibrilas, aderem-se as hemiceluloses que cobrem a celulose, formando o chamado domínio celulose-hemicelulose da parede celular. As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (SANTOS *et al.*, 2012; ZHANG, 2008). A formação de ligações de hidrogênio é o principal fator que influencia as propriedades físicas da celulose, tais como solubilidade, reatividade e cristalinidade (SANTOS *et al.*, 2012; KONDO, 1997). A interação entre os grupos hidroxila via ligações de hidrogênio entre

as cadeias limita o acesso de agentes aos grupos funcionais da cadeia, o que dificulta tanto sua solubilização como reações (SANTOS *et al.*, 2012; LAL, 2004).

**Figura 4.** Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose



**Fonte:** SANTOS *et al.* (2012)

Além de fornecer resistência e rigidez, a estrutura impede que a célula inche, com consequente ruptura da membrana plasmática, quando as condições osmóticas favorecem a entrada excessiva da água na célula (SANTOS, 2013).

A celulose, em decorrência da sua estrutura complexa, não é facilmente degradada. Para que sua cadeia seja convertida em monômeros de glicose é necessária uma etapa de hidrólise, que pode ser ácida ou até mesmo com o uso de enzimas específicas (BAÊTA, 2016). Entretanto, a presença de hemiceluloses e lignina dificulta a ação de ácidos e, principalmente, de enzimas, demandando assim uma etapa de pré-tratamento na biomassa para maximizar a etapa de hidrólise (SANTOS, 2017).

Os açúcares liberados na etapa de hidrólise podem ser inseridos na biorrefinarias para produção de etanol por meio da sua fermentação na presença de leveduras ou produção de outros compostos químicos, tais quais como etileno, propeno, buteno, propileno, ácidos acrílicos, poliéster, dentre outros, por bactérias (SANTOS, 2017; HUANG *et al.*, 2015; BAÊTA, 2016), assim como para a produção de biogás. Portanto, a molécula de celulose tem enorme valor comercial para diferentes setores industriais.

### 3.3.2 Hemiceluloses (Polioses)

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos (macromoléculas heterogêneas) não celulósicos presentes nos materiais lignocelulósicos. As hemiceluloses também são denominadas como polioses e os dois termos são utilizados sem distinção na literatura (FENGEL; WEGENER, 1989; PASQUINI, 2004; SANTOS, 2017; BAËTA, 2016).

As hemiceluloses são um dos polissacarídeos mais abundante na natureza e representam cerca de 12 a 41% em massa da biomassa lignocelulósica (LIMA, 2018; SANTOS, 2017). As unidades de açúcares (monômeros) que formam as hemiceluloses bem como sua composição química podem variar de acordo com origem botânica, parte da planta, o tipo de tecido, o estágio, as condições de crescimento e os locais de armazenamento (SANTOS, 2013; MARABEZI, 2009; SANTOS, 2017; TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

As hemiceluloses garantem elasticidade, flexibilidade e rigidez ao complexo lignocelulósico e estão localizadas principalmente na parede celular completamente associadas com as microfibras de celulose (ligações de hidrogênio) e com a lignina (ligações covalentes). Essa associação desempenha uma integridade estrutural importante nas paredes celulares (TRAVAINI *et al*, 2016; SANTOS, 2017, BAËTA, 2016, SANTOS, 2013).

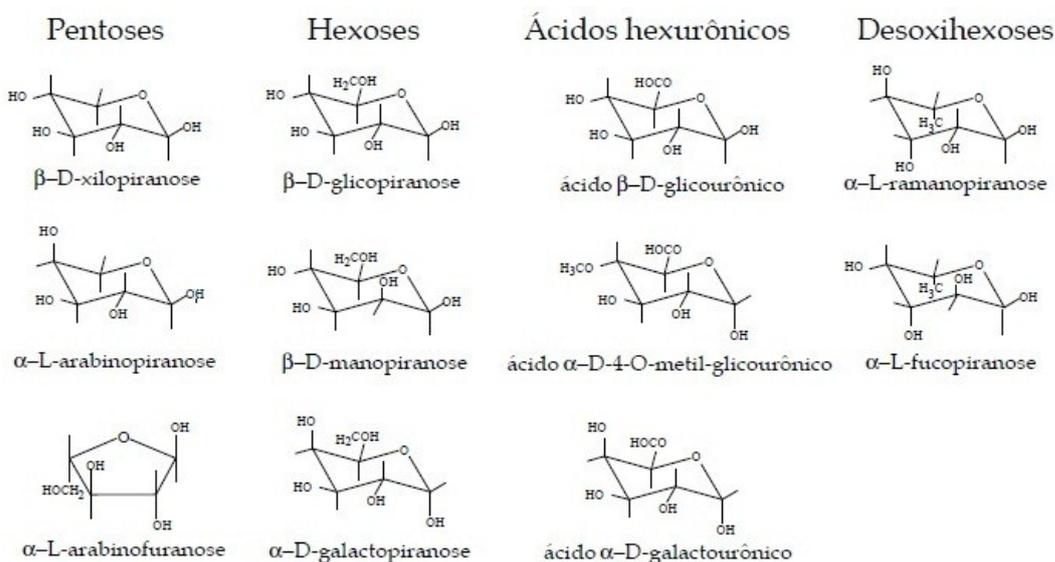
As hemiceluloses diferem da celulose por apresentarem diferentes açúcares, cadeias ramificadas e longas, massa molar mais baixa que a celulose e possuem um caráter amorfo (PASQUINI, 2004; TRAVAINI *et al*, 2016). A elevada solubilidade é devido à presença de grupos hidroxila, ácido carboxílico e grupos acetila. A principal diferença das hemiceluloses para a celulose é que a primeira possui ramificações em sua cadeia principal com cadeias laterais curtas de diferentes açúcares que, por isso apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Essa reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo desses polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ *et al*, 2002; SANTOS, 2017; BAËTA, 2016).

Os açúcares que compõem as hemiceluloses podem ser divididos em quatro grupos (Figura 5), pentoses (açúcares de 5 carbonos como a  $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses (açúcares de 6 carbonos como a  $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose e  $\alpha$ -D-galactose), ácidos urônicos (ácidos de cadeia cíclica como o  $\beta$ -D-glicourônico,  $\alpha$ -D-galactourônico e o  $\alpha$ -D-4-O-metilglicourônico) e desoxi-hexoses. As hemiceluloses são

classificadas basicamente de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas (unidades de 1,4-β-D-xilose ligadas (principais e mais abundantes)), mananas (unidades de -1,4-D-β-manose ligadas), arabinanas (unidades de 1,5-α-L-arabinose ligadas), glucanas, galactanas (unidades de 1,3-β-D-galactose ligadas) e pectinas (PASQUINI, 2004; MCKENDRY, 2002; MARABEZI, 2009; TRAVAINI *et al.*, 2016, BUCKERIDGE *et al.*, 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

De acordo com alguns autores como Spiridon e Popa (2008) e Oliveira (2014), a xilana é um dos maiores constituintes dos materiais lignocelulósicos representando cerca de 30%.

**Figura 5.** Estruturas dos açúcares componentes das polioses

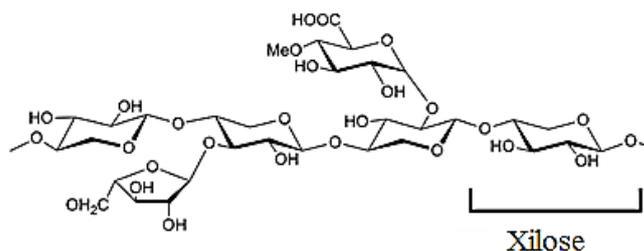


Fonte: LORA; VENTURINI (2012)

A Figura 6 apresenta a estrutura química da xilana e seu monômero xilose. Destaca-se a elevada presença de grupos hidroxilas capazes de realizar ligações de hidrogênio.

Além disso, as hemiceluloses possuem alguns açúcares com grupos funcionais como o acetilo, o que pode dificultar a ação tanto das hemicelulases quanto das enzimas celulases. A remoção desses grupos funcionais aumenta a acessibilidade das hemiceluloses às hemicelulases e conseqüentemente, a exposição da celulose às celulases (BRIENZO *et al.*, 2017).

**Figura 6.** Esquema da estrutura química da xilana e seu monômero xilose (principal constituinte da hemiceluloses).



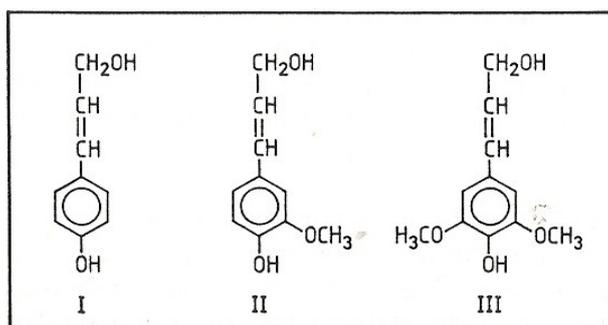
**Fonte:** SPIRIDON; POPA (2008); SANTOS *et al.* (2012) (adaptado)

### 3.3.3 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante na superfície terrestre, superada apenas pela celulose, representando de 15 a 35% da massa seca dos materiais lignocelulósicos (BRAGATTO, 2010; KAMM; KAMM, 2004; LIMA, 2018; BELGACEM e GANDINI, 2008). Vários autores consideram a lignina como um material heteropolímero amorfo e polifenólico, com elevada massa molar e possui baixa polaridade.

É formada pela reação de polimerização desidrogenativa de três álcoois: cumarílico(I), coniferílico(II) e sinapílico(III), apresentados na Figura 7 (FENGEL; WEGENER, 1989; SANTOS, 2013; RAHIKAINEN *et al.*,2011; SANTOS, 2017; BELGACEM e GANDINI, 2008), dando origem às unidades de fenilpropano (C6 C3).

**Figura 7.** Estruturas dos álcoois cumarílico(I), coniferílico(II) e sinapílico(III)

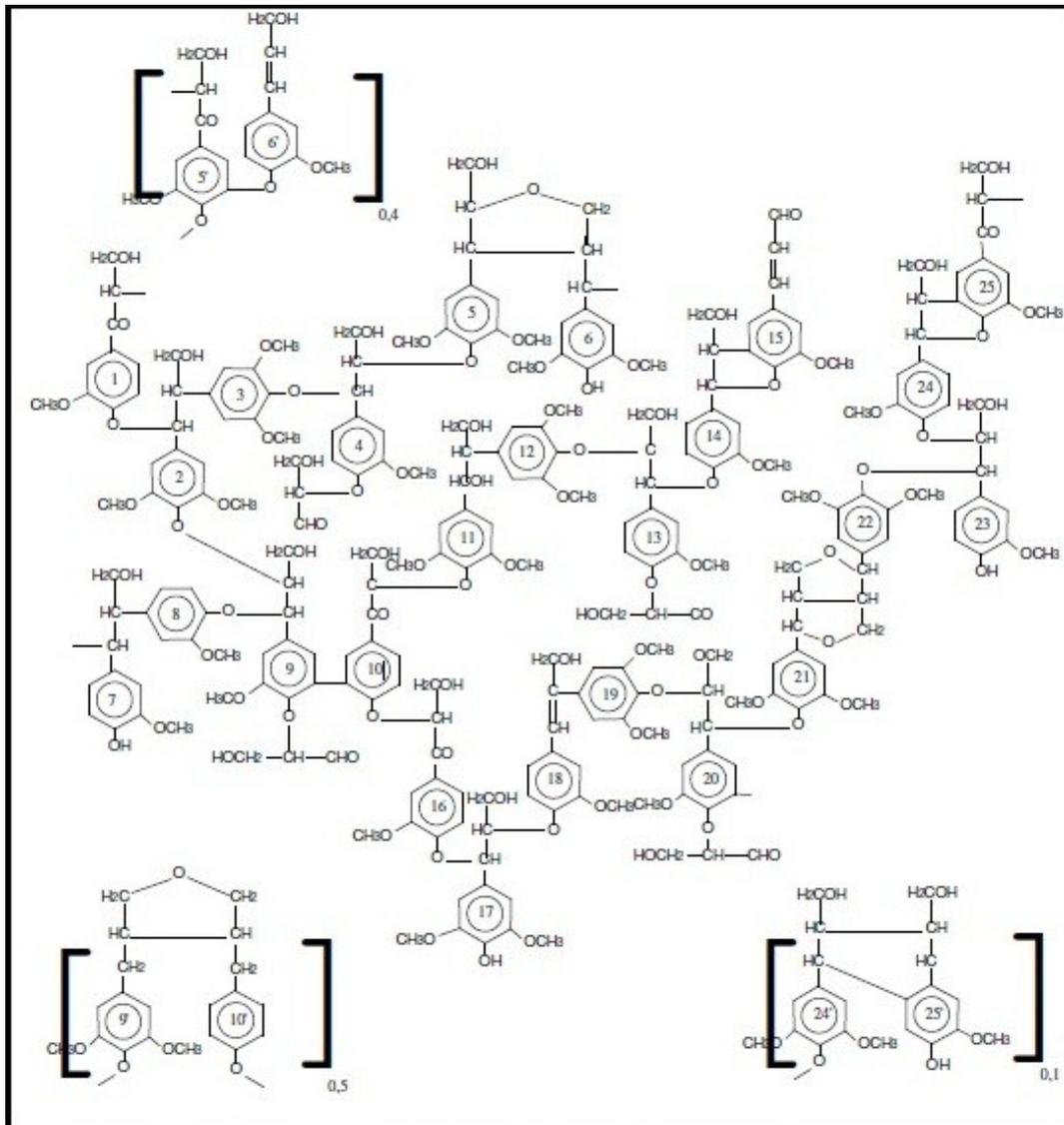


**Fonte:** FENGEL; WEGENER (1989)

A estrutura básica da lignina é classificada de acordo com dois componentes: uma parte é aromática e a outra é a cadeia C3 (alifática) (BAÊTA, 2016). O processo de biossíntese da lignina leva a um crescimento aleatório de uma macromolécula com

diferentes tipos de ligações entre as unidades monoméricas, principalmente do tipo éter e carbono-carbono (PASQUINI, 2004; MARTÍNEZ *et al.*, 2008; DEL RÍO *et al.*, 2012).

**Figura 8.** Esquema estrutural da lignina de folhosas



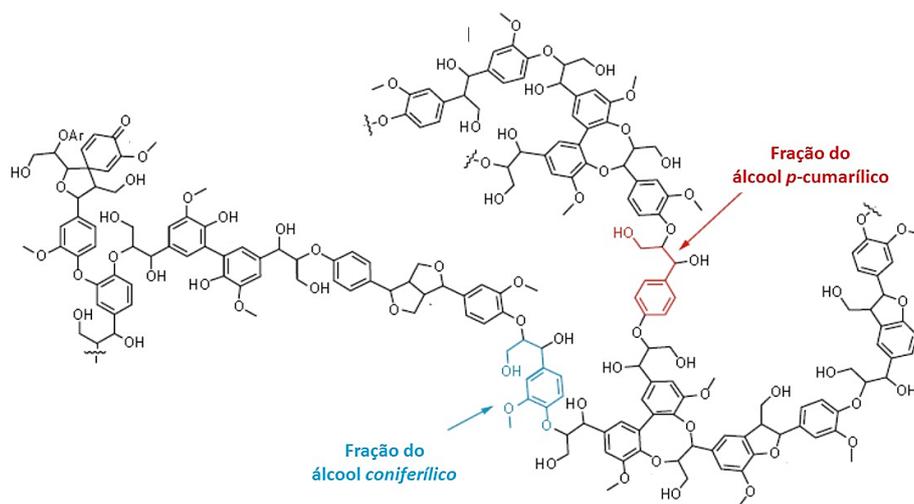
Fonte: FENDEL; WEGENER (1989); PASQUINI (2004)

A estrutura da lignina pode ser representada por modelos, como o mostrado a seguir, que devem ser vistos apenas como veículos de ilustração dos tipos e modos de ligação dos elementos estruturais. Um exemplo destes modelos é mostrado na Figura 8. Embora não esteja indicado no modelo estrutural, há evidências de que a lignina está

ocasionalmente ligada aos polissacarídeos, principalmente através de unidades de arabinose, xilose e galactose (PASQUINI, 2004).

A presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre essas unidades faz com que a estrutura da macromolécula de lignina seja bem mais complexa que as estruturas da celulose e das hemiceluloses. Na literatura existem vários modelos de lignina construídos a partir de análises de grupos funcionais e análises espectroscópicas. A estrutura da lignina ainda é matéria de estudo e modelos vêm sendo propostos (SANTOS, 2017). A Figura 9 mostra uma representação esquemática de uma macromolécula de lignina de madeiras moles.

**Figura 9.** Representação esquemática de uma macromolécula de lignina de madeiras moles.



**Fonte:** SANTOS (2017)

A lignina de bagaço de cana-de-açúcar apresenta, em seus extremos, unidades de ácido p-cumárico que estão ligados à lignina através de ligações éster. Este tipo de ligação pode ser facilmente rompida, gerando então como um dos produtos de degradação desta lignina o ácido p-cumárico (PASQUINI, 2004).

A estrutura química da lignina possui elevada massa molar devido às inúmeras ramificações com cadeias laterais de 3 carbonos ligadas aos anéis aromáticos (HATAKEYAMA *et al.*, 2010). Conforme pode ser observado na Figura 8, a lignina possui distintos grupos funcionais em sua superfície, os quais são formados em função da sua origem (VALLEJOS *et al.*, 2011). Entretanto, destaca-se que as reações com a lignina ocorrem, predominantemente, nos grupos hidroxilas (OH) presentes em fenóis e álcoois primários e secundários (HATAKEYAMA *et al.*, 2010).

A distribuição dos grupos funcionais existentes na lignina pode variar de acordo com a região morfológica da planta, com a espécie da planta e com o método de isolamento, já que a lignina precisa ser fragmentada para que possa ser retirada da planta e dependendo dos reagentes utilizados no processo de isolamento podem ser gerados diferentes tipos de grupos funcionais (PASQUINI, 2004; OLIVEIRA, 2014).

Sua complexa estrutura de caráter fenólico, reticulado, desempenha papel importante para o suporte mecânico das plantas, formando uma estrutura rígida que promove ao tecido das plantas e às fibras individuais força compressiva e à parede celular resistência contra a deformação (BRAGATTO, 2010; TRAVAINI *et al.*, 2016). Permite, também, o transporte de água, nutrientes e metabólicos por tornar a parede celular hidrofóbica (que inibe o inchamento de uma célula em água), podendo ser considerada a chave para a evolução das plantas vasculares. Ademais, a lignina acarreta resistência biológica à planta contra micro-organismos, insetos, patógenos e saprófitos, pois dificulta a penetração das enzimas degradadoras dos polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1984; NOVO, 2012; AGBOR *et al.*, 2011, SANTOS, 2017; SANTOS, 2013; BRIENZO *et al.*, 2017; MESCHÉDE *et al.*, 2012).

Em suma, a estrutura tridimensional faz com que a lignina seja altamente recalcitrante à degradação química e biológica (SANTOS, 2017; SATTLER; FUNNELL-HARRIS, 2013; SANTOS, 2013). Ademais, como recobre os demais polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) representa um problema ao se tentar utilizar o bagaço de cana para obtenção de biocombustíveis (bioetanol e biogás) e subprodutos de valor agregado, pois a lignina e os compostos derivados da lignina solúvel podem causar inibição enzimática (RAHIKAINEN *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017). Dessa forma, em muitas aplicações o bagaço de cana deve ser deslignificado previamente para posterior aplicação.

### **3.3.4 Extrativos e outros**

Os extrativos são compostos orgânicos que são depositados no lume das células e em outros espaços vazios, têm baixo peso molecular e são solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados (SJÖSTRÖM, WESTERMARK, 1999; SANTOS, 2013; TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

Podem ser extraídos utilizando solventes polares e apolares. Os extrativos são frequentemente responsáveis por determinadas características da planta, como a cor, o

cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e as propriedades abrasivas. Nos extrativos, podem ser encontrados os terpenóides e esteroides, gorduras, ceras e substâncias fenólicas, incluindo estilbenos, lignanas, taninos e flavonoides. Além dos extraíveis também são encontrados na parede celular os compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (SANTOS, 2013; TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

Nas seções em seguida abordam algumas técnicas de pré-tratamento para ruptura dos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, para melhor aproveitamento na produção de bioenergia.

### **3.3.5 Poder Calorífico**

A co-geração constitui-se na geração simultânea de energia térmica e mecânica, a partir de um mesmo combustível (gás natural, resíduos de madeira, casca de arroz, bagaço de cana, palha, etc.). A energia mecânica obtida pode ser utilizada na forma de trabalho ou transformada em eletricidade, através de geradores. Já a energia térmica pode ser utilizada como fonte de calor em um processo industrial ou no setor comercial/serviços (GEHLEN, 2013). Contudo, devido as dificuldade de armazenamento e conservação do bagaço - por ser um material muito volumoso e gerado em quantidades significativas - e poder propiciar sua degradação, a energia elétrica obtida pela co-geração tende a apresentar uma grande desproporcionalidade de preços. Estes fatos contribuem para certa inviabilidade de produção de energia para fins comerciais, sendo esta produção vantajosa, particularmente, para o consumo interno das próprias usinas (GEHLEN, 2013).

Assim, para avaliar o potencial energético do bagaço de cana e para o aproveitamento racional e adequado de resíduos agrícolas e florestais, é necessário o estudo de suas propriedades energéticas (PROTÁSIO *et al.*, 2011). O comportamento da biomassa frente ao processo de queima é o somatório do comportamento de cada um de seus componentes: celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Alguns autores afirmam que o teor de fibra (celulose + hemicelulose + lignina) no bagaço de cana é influenciado pela variedade, maturidade, disponibilidade de água no solo (irrigação), métodos de colheita e eficiência da unidade de moagem da usina e/ou destilaria (LIZCANO, 2015; MESCHEDE *et al.*, 2012; SANTOS, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Sheng e Azevedo (2005) e Protásio *et al.*, 2011 mencionaram que as correlações baseadas na composição química (lignina e extrativos) não são viáveis devido à variação das propriedades dos componentes.

De acordo com Protásio *et al.*, (2011), Lizcano (2015) e Oliveira (2014), o poder calorífico é um excelente parâmetro para se avaliar a potencialidade energética de combustíveis de biomassa, sendo definido como a quantidade de energia liberada na combustão completa de uma quantidade unitária de um espécime, sólido ou líquido, em determinadas condições (PROTÁSIO *et al.*, 2011; LIZCANO, 2015; OLIVEIRA, 2014); a maioria dos sistemas de combustão de biomassa e gaseificação operam a pressão e volume constante (LIZCANO, 2015; OLIVEIRA, 2009).

O poder calorífico pode ser representado por: poder calorífico superior (PCS) e poder calorífico inferior (PCI) (OLIVEIRA, 2014).

O poder calorífico é chamado de superior (PCS) quando a combustão efetua a volume constante ou unidade de massa seca e no qual a água gerada durante o processo é condensada e o calor latente do vapor d'água não é perdido (PROTÁSIO *et al.*, 2011; LIZCANO, 2015; SANTOS, 2013; OLIVEIRA, 2014; ARANTES, 2014; OLIVEIRA, 2009). É expresso em joules por quilograma ( $\text{J.kg}^{-1}$ ) ou em calorias por grama ( $\text{cal.g}^{-1}$ ) (LIZCANO, 2015; OLIVEIRA, 2014; ARANTES, 2014; OLIVEIRA, 2009).

O poder calorífico inferior (PCI) é definido como o calor produzido pela combustão de uma quantidade unitária de combustível, líquido ou sólido, quando queimado a pressão constante de 0,1 MPa (1 atm), sob condições tais que toda a água formada durante a queima permanece na forma de vapor após a combustão (LIZCANO, 2015; OLIVEIRA, 2014).

Alguns estudos afirmam que os PCS do bagaço de cana são bastante próximos em várias regiões do mundo sendo que as diferenças ficam por conta do seu teor de cinzas e da umidade presente (LIZCANO, 2015).

Silva e Morais (2008) mensuraram PCS do bagaço de cana em diferentes níveis de umidade (Tabela 2).

Protásio *et al.*, (2011) e Lizcano (2015) relatam que o PCS da biomassa diminui com o seu teor de cinzas e conforme o conteúdo de umidade é maior, ou seja, o valor máximo de liberação de energia se obtém quando a umidade do material é próxima de zero. Dessa forma, quando o material contém umidade, parte liberada na combustão é

absorvida pela água existente no material até evaporar (LIZCANO, 2015; PROTÁSIO *et al.*, 2011).

**Tabela 2.** Poder calorífico superior (PCS) para o bagaço de cana-de-açúcar mensurado por Silva e Morais (2008)

Umidade (%)	0	10	20	30	50
PCS (MJ.kg <sup>-1</sup> )	18,25	16,68	15,24	13,17	9,52
PCS (kcal.kg <sup>-1</sup> )	4360	3985	3641	3145	2275

Fonte: Autora

Considerando que o teor de umidade do bagaço ao sair da moagem é, em média, de 50%, em seu estudo, Gehlen (2013) determinou o poder calorífico superior e inferior do bagaço para os diversos teores de umidade. O maior poder calorífico superior obtido (PCS, medido em kcal/kg) foi de 4552, com a umidade de 0%; enquanto o menor PCS foi de 2206 com umidade de 51%.

Os altos teores de cinzas, também, contribuem para a redução do poder calorífico, visto que os materiais minerais (cinzas) não participam do processo de combustão, mas são contabilizados na massa do combustível submetido ao processo de queima (PROTÁSIO *et al.*, 2011).

A média geral observada para o PCS para biomassa residual de bagaço seco de cana-de-açúcar, em estudos, foi de 15,79 a 19,51 MJ.kg<sup>-1</sup> (LIZCANO, 2015; PROTÁSIO *et al.*, 2011).

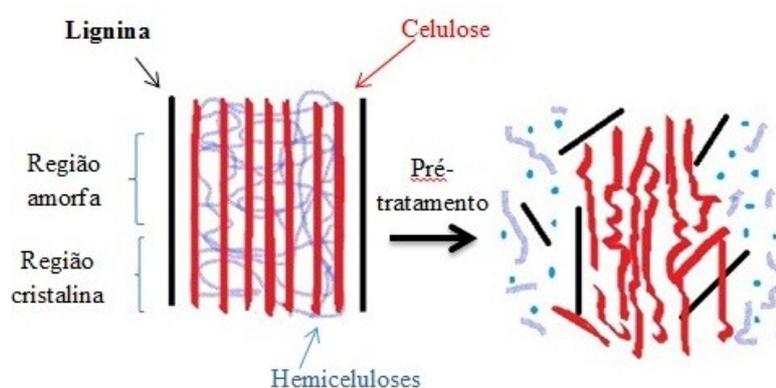
### 3.4 Pré-tratamentos dos resíduos lignocelulósicos

Os pré-tratamentos tornam-se uma importante etapa na biorrefinaria lignocelulósica, mesmo sabendo que seu uso acarreta custos ao reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Segundo o Laboratório de Energia Renovável dos EUA - NREL (2011), o pré-tratamento é considerado o segundo processo mais caro ao realizar a conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis. Travaini *et al.*, (2015) mensuram o custo da fase de pré-tratamento em ~20% dos custos totais da biorrefinaria. Portanto, sua correta otimização e a geração de subprodutos de valor agregado são essenciais para tornar todo o processo viável e de custo competitivo.

Em decorrência da complexidade estrutural apresentada pelas biomassas lignocelulósicas e para maximizar a produtividade de bioenergia, seu uso como matéria-

prima para produção de bioenergia como o biogás, etanol e compostos químicos de elevado valor agregados, necessita de uma etapa de pré-tratamento (SANTOS, 2017; LIMA, 2018). Com isso, pode modificar as características físico-químicas e melhorar a acessibilidade da celulose às enzimas, por exemplo, alterando a proporção e a distribuição de cada fração, a morfologia estrutural (Figura 10) e rompendo a região cristalina da celulose (LIU *et al.*, 2017; BRIENZO *et al.*, 2017; HENDRIKS *et al.*, 2009; MOSIER *et al.*, 2005).

**Figura 10.** Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento



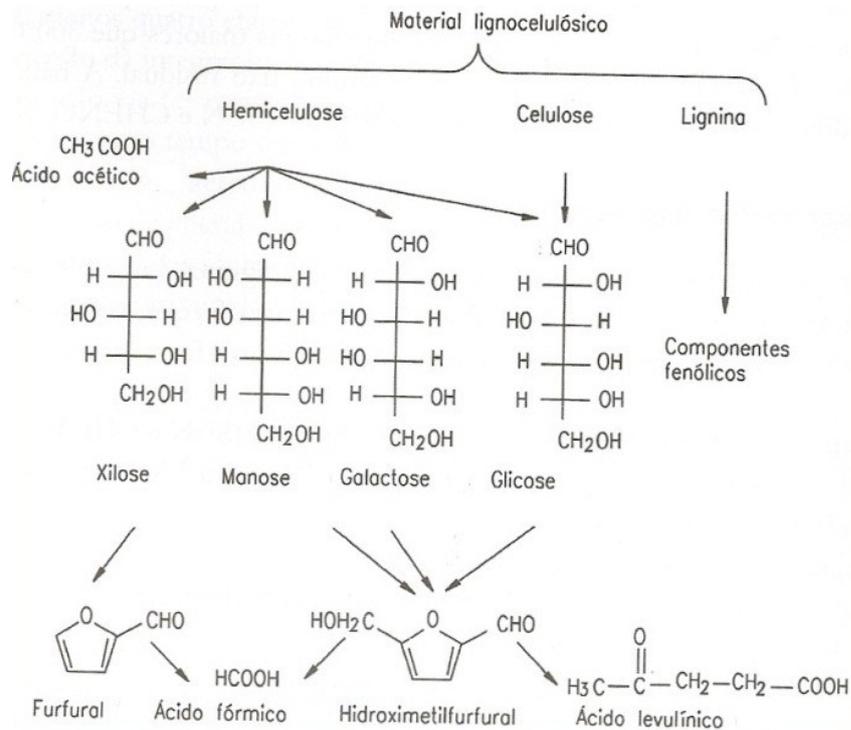
Fonte: LORA; VENTURINI (2012) (adaptado)

Porém, os métodos de pré-tratamento são etapas desafiadoras, não é tão simples e é uma etapa muito importante que visa maior eficiência destes no processo posterior (Amin *et al.*, 2017). Para alcançar a produtividade máxima de bioenergia, deve-se implementar o melhor método e as melhores condições de pré-tratamento, dependendo fortemente do tipo de biomassa, da sua composição e do bioproduto desejado (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; HENDRIKS *et al.*, 2009; MOSIER *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2014).

Além de romper ou modificar o complexo lignocelulósico (redução do grau de polimerização), os pré-tratamentos devem ser otimizados para reduzir o teor de lignina e ou hemiceluloses, diminuir a cristalinidade da celulose, reduzir o tamanho de partícula, aumentar a área superficial e aumentar a porosidade da biomassa (ROCHA *et al.*, 2015; AGBOR *et al.*, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2008; ROSSI, 2015). Dessa forma, facilita a acessibilidade à fração polissacarídica, visando, ainda, minimizar a formação de substâncias inibidoras às enzimas e aos micro-organismos (HENDRIKS; ZEEMAN,

2009; SANTOS, 2017; SARKAR *et al.*, 2012). Exemplos desses inibidores são: lignina e seus compostos fenólicos oriundos da sua degradação, 2-furfuraldeído (degradação de pentoses) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) (degradação de hexoses) e diferentes ácidos orgânicos como acético, fórmico, urônico, levulínico, 4-hidroxibenzóico e vanílico e outros (SHEN *et al.*, 2012; PANDEY; SOCCOL, 2000; LARSSON *et al.*, 2000; TAHERZADEH; KARINI, 2007b; DORAN *et al.*, 1994) (Figura 11). A presença de tais compostos tóxicos tem sido relatada recentemente, as quais possuem a capacidade de reduzir a produção de metano por degradação anaeróbia (BAÊTA *et al.*, 2016).

**Figura 11.** Reações que ocorrem durante o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos



**Fonte:** LORA; VENTURINI (2012)

Chemnés *et al.* (2013) e Rossi (2015) relatam que, para um pré-tratamento ser eficaz, este precisa disponibilizar grandes quantidades de açúcares fermentescíveis, evitar degradação de carboidratos, formação de subprodutos inibidores para os processos de hidrólise e fermentação, além de ser viável economicamente.

Para produzir biocombustíveis, dependendo das forças de interação compreendidas na biomassa, os pré-tratamentos requeridos podem ser classificados em

três categorias: físicos, químicos, físico-químicos, térmicos e biológicos, sendo que a combinação deles também tem sido muito utilizada (SANTOS, 2017; ROSSI, 2015).

Alguns exemplos de pré-tratamento incluem ácidos diluídos, álcalis, solventes orgânicos, sais metálicos, sulfito, líquidos iônicos, explosão supercrítica de dióxido de carbono e processos oxidativos empregando ozônio, peróxido de hidrogênio ou oxidação úmida (SANTOS, 2017).

Pré-tratamentos físicos visam aumentar a área superficial da biomassa e reduzir a cristalinidade da celulose. Tais métodos não utilizam compostos químicos nem microrganismos durante o processo (SANTOS, 2017). Diferentes tipos de pré-tratamento físico são citados na literatura como moagem (moinho de esferas, de rolo, de martelos, de faca), trituração, ultrassom e até o uso de radiações (raios gama e feixe de elétrons) (GRIMALDI, 2013). Zheng *et al.*, (2014) incluem alguns exemplos: o pré-tratamento mecânico, pré-tratamento de extrusão, pirólise, pré-tratamento usando irradiação de micro-ondas, água quente líquida (hidrotérmico) e vapor (explosão a vapor) (ZHENG *et al.*, 2014; SANTOS, 2017). Entretanto, os processos físicos são correlacionados a grandes gastos energéticos quando utilizados em escalas industriais.

Os pré-tratamentos químicos envolvendo ácidos ou bases diluídas são realizados, comumente, com elevação de temperaturas e ou pressões. Os alcalinos muitas vezes utilizam hidróxido de sódio (GAO *et al.*, 2013), hidróxido de cálcio (RABELO, 2010) e solução amoniacal (KIM *et al.*, 2003). O meio básico favorece a redução do teor de lignina com posterior solubilização de seus componentes e fragmentos, e de alguns componentes das hemiceluloses como grupos acetila, acarretando assim em uma maior biodegradabilidade do substrato (CARVALHEIRO *et al.*, 2008). Outra característica desses pré-tratamentos químicos é a capacidade de proporcionar a redução do grau de polimerização da lignina, promovendo a sua remoção por solvência em meio aquoso (AGBOR *et al.*, 2011; MTUI, 2009).

Os tratamentos ácidos consistem em colocar a biomassa em contato direto com ácidos diluídos ou concentrados para solubilizar as hemiceluloses, aumentando a acessibilidade dos ácidos às moléculas de hemiceluloses (SANTOS *et al.*, 2012) devido às ligações glicosídicas (LIU *et al.*, 2017). Normalmente, é utilizado o ácido clorídrico (YU *et al.*, 2013) ou sulfúrico (CANILHA *et al.*, 2011).

Os processos químicos mais famosos são o Bergius e o método Scholler (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b). O primeiro consiste na hidrólise com ácido

clorídrico concentrado a baixa temperatura, enquanto o outro, com ácido sulfúrico diluído a alta temperatura. Os dois processos são eficientes na hidrólise do material lignocelulósico, porém apresentam baixos rendimentos devido à degradação dos açúcares monoméricos formando subprodutos indesejáveis, altamente inibitórios à etapa de fermentação, tais como o furfural e hidroximetilfurfural, e outros citados anteriormente (LARSSON *et al.*, 2000; TAHERZADEH; KARINI, 2007b; DORAN *et al.*, 1994). Assim, os hidrolisados obtidos necessitam ser purificados para permitir a fermentação dos açúcares e várias metodologias podem ser utilizadas para esse fim (OLIVEIRA, 2012).

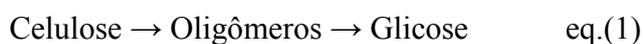
Outra forma de evitar a degradação dos monossacarídeos é realizar a etapa de hidrólise com ácido em duas ou mais etapas (TAHERZADEH; KARINI, 2007b). Na primeira etapa, que pode ser realizada em condições brandas, a hemicelulose é convertida em monômeros. Na segunda etapa, o sólido residual é hidrolisado sob condições mais severas, permitindo a hidrólise da celulose (OLIVEIRA, 2012).

Em contraste ao processo ácido diluído, o processo ácido concentrado pode dar rendimentos maiores de glicose em baixas temperaturas. Por outro lado, o custo do ácido é relativamente alto e esse deve ser recuperado para tornar o processo viável. Avanços na separação da solução ácida contendo os açúcares com a habilidade de recuperar o ácido têm permitido a renovação do interesse no processo de hidrólise ácida concentrada (GURGEL, 2010).

Entretanto, a desvantagem da utilização de ácidos fortes é a corrosão dos reatores e a degradação dos açúcares a furanos, compostos inibidores do metabolismo microbiano. A condensação e a precipitação de componentes de lignina solubilizada também é uma reação indesejada, uma vez que diminui a digestibilidade (SANTOS, 2013). Como alternativa, alguns ácidos orgânicos como o fórmico, acético, maléico, cítrico, tartárico têm sido testados (QIN *et al.*, 2012).

Enquanto isso, a pré-extração de ácido diluído tem sido amplamente reconhecida e utilizada devido às suas inúmeras vantagens, como alta eficiência, processo simples e baixo custo (LIU *et al.*, 2017, CANILHA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2015). É relatado que a pré-extração ácida diluída pode melhorar a eficiência de hidrólise enzimática, aumentando a acessibilidade da celulose e alterando a distribuição da lignina (LIU *et al.*, 2017).

O primeiro modelo cinético para descrever o processo de hidrólise da celulose com ácido diluído foi proposto por Saeman (1945), sugerindo a seguinte sequência de reação: celulose gerando glicose, que por sua vez é degradada em hidroximetilfurfural. Esse modelo cinético foi baseado na formação de ácido conjugado, levando à clivagem das ligações glicosídicas, adição de moléculas de água e liberação de íons  $H^+$ . Entretanto, Bouchard *et al.*, (1990), demonstrou que os produtos iniciais da hidrólise da celulose são primariamente oligômeros solúveis e glicose proveniente da quebra instantânea da porção amorfa (ver equação 1). Os autores demonstraram que a hidrólise de ambas as frações da celulose pode ser simulada por duas reações paralelas de pseudoprimeira ordem, sendo que alguma cristalização da parte amorfa pode ocorrer, embora em proporção insignificante, sob as condições usuais do processo.



Dentre os pré-tratamentos que utilizam solventes orgânicos para a deslignificação destaca-se o processo organossolve. Sua aplicação envolve a utilização de um solvente orgânico (ex.: metanol, etanol, acetona ou glicerol) associado à água em temperaturas elevadas (170 a 250° C), podendo haver ou não presença de um catalisador ácido ou básico (MOOD *et al.*, 2013).

O pré-tratamento hidrotérmico também denominado como autohidrólise (*liquid hot water* – LHW) é um pré-tratamento onde a biomassa é submetida a elevadas temperaturas e ou pressões em diferentes razões líquido-sólido. Esse pré-tratamento é comumente realizado em reatores de aço inox e possui a vantagem de não necessitar de adição de ácidos ou bases, possibilitando um fracionamento da biomassa sem corrosão do reator (BAETA *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2012). Nesse pré-tratamento, elevadas frações de hemiceluloses são rapidamente hidrolisadas, solubilizadas e convertidas a monossacarídeos sem afetar significativamente as frações de lignina e celulose, obtendo assim um hidrolisado rico em xilose, arabinose e glicose com baixa concentração de produtos de degradação de açúcares e lignina, compostos inibidores do metabolismo microbiano, desde que as condições reacionais não empreguem uma severidade muito alta (GARROTE *et al.*, 1999). Entretanto, em função da temperatura e do tempo reacional (fator severidade) existe a possibilidade de formação de derivados de furanos

como o furfural (2-furfuraldeído) e o HMF (5-hidroximetil-2-furfuraldeído) (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

A combinação de pré-tratamentos físicos e químicos tem sido descrita por ocasionar alterações nas estruturas da lignina, além de promover a solubilização das hemiceluloses, acarretando em melhorias na acessibilidade da celulose durante a hidrólise enzimática (HENDRIKS *et al.*, 2009). O principal exemplo de pré-tratamento que envolve a combinação de processo físico e químico é o pré-tratamento por explosão a vapor (*Steam explosion*) (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

O pré-tratamento biológico, em comparação com os métodos de pré-tratamento físico e químico, possui as principais vantagens: geralmente requer menor gasto de energia; é conduzido em condições muito mais suaves, de modo que poucos inibidores, que podem afetar negativamente a digestão anaeróbica, são gerados e o alto rendimento de produtos desejáveis (SANTOS, 2017; RABELO *et al.*, 2012). Estes pré-tratamentos envolvem a utilização de microrganismos (fungos e bactérias ou enzimas (lacases)) para a deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemiceluloses. Apesar de ser efetivo, limpo e sem produção de metabólitos indesejáveis, a taxa de degradação é lenta. Além disso, tais processos requerem um controle rigoroso das condições experimentais (KUHAR *et al.*, 2008) e esses microrganismos não são seletivos, assim, além de degradarem hemiceluloses e lignina, degradam a celulose (SANTOS, 2013).

De outro modo, Rossi (2015) expõe que as formas de tratamento biológico são reduzidas devido à complexidade do material, pois envolve a hidrólise enzimática de ligações glicosídicas responsáveis por afetar a degradação natural e a ação de microrganismos. Sendo assim, o material lignocelulósico torna-se recalcitrante à hidrólise. Em contrapartida, há diversas formas de pré-tratamentos que podem ser utilizados para a degradação do material lignocelulósico.

Dessa forma, em resumo, independentemente do tipo de pré-tratamento, ele deve ser implantado com menor consumo de produtos químicos e energia, alcançando o menor custo operacional, baixo investimento (ROCHA *et al.*, 2015, CANILHA *et al.*, 2012; GALBE e ZACCHI, 2010; SANTOS, 2013), produção mínima de resíduos, reações rápidas e/ou reagentes químicos não corrosivos para minimizar o custo do reator, altos rendimentos de produtos nas operações subsequentes com custos mínimos, carga baixa de enzima adequada para se atingir digestibilidade superior a 90% da

celulose pré-tratada e facilitar a recuperação da lignina e outros constituintes para conversão em coprodutos de maior valor agregado e etapas de purificação (GALBE; ZACCHI, 2010; SANTOS, 2013). Devido a sua importância, o desenvolvimento de novos pré-tratamentos, e o estudo de como esses afetam as demais etapas das bioconversões energéticas de biomassa, estão em constante avanço.

A avaliação geral de uma estratégia de pré-tratamento depende da determinação de rendimentos de recuperação confiáveis. No entanto, a heterogeneidade de materiais lignocelulósicos é uma barreira crítica para essa tarefa e balanços de massa razoáveis só podem ser derivados de uma combinação de vários procedimentos analíticos, variando da determinação precisa do teor de umidade até a análise estrutural mais complexa (incluindo quantificação) de polímeros naturais tais como celulose e lignina (RAMOS, 2003; CIRNE *et al.*, 2007).

Considerando-se que os tratamentos químicos e físicos mais utilizados tendem a ser muito agressivos e dispendiosos, pode-se utilizar alternativamente tratamentos mais brandos, baseando-se nos estudos de Rossi (2015), que buscou estudar a modificação do material por degradação química gerada por duas formas de pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar, utilizando-se ácido cítrico em autoclave e solução de ureia com hidróxido de sódio em baixa temperatura ou como o utilizado por Rodrigues (2006) que desenvolveu a modificação química no material lignocelulósico (madeira), utilizando solução  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido cítrico e porém em temperaturas elevadas.

No entanto, a escolha de uso do ácido cítrico foi proposta neste estudo objetivando um pré-tratamento eficaz, para disponibilizar grandes quantidades de açúcares fermentescíveis para os processos de hidrólise e fermentação, além de ser viável economicamente.

### **3.5 Ácido Cítrico**

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanetricarboxílico) possui fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (CIRIMINNA *et al.*, 2017; SHOW *et al.*, 20015), tem boa solubilidade em água, ponto de fusão de  $153^\circ\text{C}$  e peso molecular de  $192,12 \text{ g.mol}^{-1}$ . Apresenta-se na forma de cristais translúcidos brancos, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico (CARGILL, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2009; SOCCOL *et al.*, 2006). Quando aquecido começa a se decompor em outras substâncias a  $175^\circ\text{C}$  (RODRIGUES, 2006; SHOW *et al.*, 2015).

É o principal constituinte das frutas cítricas (ex. laranja, limão e lima) (SHOW *et al.*, 2015) e está presente em todas as células vivas que necessitam de compostos de carbono como fonte de energia; é um metabólito normal no organismo humano sendo quase completamente metabolizado quando consumido (ABOU-ZEID; ASHY, 1984; RODRIGUES, 2006).

O ácido cítrico é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, principalmente por fermentação submersa de meios a base de sacarose ou amido, devido, entre outras características, a sua baixa toxicidade quando comparado a outros acidulantes utilizados pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (PANDEY *et al.*, 2000a; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; VANDENBERGHE *et al.*, 2000). É produzido principalmente por fermentação submersa usando *Aspergillus niger* ou *Candida* sp. de diferentes fontes de hidratos de carbono (PANDEY *et al.*, 2000a; SHOW *et al.*, 2015; VANDENBERGHE *et al.*, 2000). O ácido cítrico produzido a partir de frutas é conhecido como ácido cítrico natural, em contraste com a fermentação de ácido cítrico (ABOU-ZEID; ASHY, 1984; SHOW *et al.*, 2015). Devido à sua grande aplicação, ser facilmente biodegradável e baixos preços, o fornecimento global de ácido cítrico nas últimas duas décadas aumentou de menos de 0,5 para mais de 2 milhões de toneladas, tornando-se o maior produto químico obtido por fermentação de biomassa e o produto orgânico ácido mais amplamente empregado (CIRIMINNA *et al.*, 2017; SHOW *et al.*, 2015).

No Brasil, quase toda a demanda de ácido cítrico é atendida por meio de importações (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O ácido cítrico tem uso bastante variado. Cerca de 70% é usado pela indústria de alimentos e bebidas, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias. Estudos recentes mostram que têm sido desenvolvidos vários testes relacionados aos efeitos do uso de ácidos orgânicos como complemento das rações para animais (RODRIGUES, 2006; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; CIRIMINNA *et al.*, 2017). Desta forma há um crescente interesse na procura de soluções para produção em larga escala do ácido cítrico (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

Esse ácido tem a capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido à crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais. Também, essa propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais tem permitido seu uso

na limpeza de caldeiras e instalações especiais (RODRIGUES *et al.*, 2009; CIRIMINNA *et al.*, 2017; SOCCOL *et al.*, 2006).

Vale destacar um ponto positivo para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, já que diferentes desses resíduos, como bagaço de maçã, casca de coco, palha de trigo, resíduos de abacaxi, bagaço de mandioca, banana, casca de beterraba, casca de kiwi, etc. são investigados com técnicas de fermentação sólida, para potencial de ser usado como substratos para produção de ácido cítrico (VANDENBERGHE *et al.*, 2000).

### **3.6 Hidrólise enzimática**

Enzimas são proteínas e interagem com elevada especificidade com um substrato promovendo uma atividade catalítica altamente específica. Em meio às reações, as enzimas atuam como catalisadores sendo aplicadas em baixas concentrações, acarretando em maiores taxas reacionais e sendo regeneradas no final do processo juntamente com os desejáveis produtos formados. Destaca-se a sua regeneração como vantagem para seu reaproveitamento, tornando menos onerosa sua aplicação em escalas industriais (LIMA, 2018, MEIGHAN, 20016).

O processo de hidrólise pode ser dividido em hidrólise ácida, básica e enzimática. Na hidrólise ácida ou básica empregam-se ácidos ou bases como catalisadores, enquanto que na enzimática utilizam-se enzimas.

Atualmente, a hidrólise enzimática tem sido preferida à hidrólise ácida, uma vez que as reações são altamente específicas, o que minimiza a geração de subprodutos indesejáveis (ex.: furanos) (WOLF, 2011, KLINKE *et al.*, 2003), podendo ser realizada sob condições operacionais brandas (pH em torno de 5, temperatura inferior a 50°C e pressão atmosférica) (BALLESTEROS *et al.*, 2002, ODEGA, PETRI, 2010, WOLF, 2011, TAHERZADEH; KARIMI, 2007a) que levam a um menor consumo de energia e menor impacto ambiental. Além disso, evita problemas de corrosão provocada pelo uso de ácidos minerais (MARTÍN *et al.*, 2007; WOLF, 2011, MEIGHAN, 2016) e fornece um alto rendimento de glicose com baixa formação de subprodutos, favorecendo a utilização do hidrolisado em processos de bioconversão. No entanto, para a obtenção de bons rendimentos com a hidrólise enzimática são necessários tempos longos de reação e para melhorar a acessibilidade da enzima à celulose é necessário, como já citado,

submeter à matéria-prima a um estágio de pré-tratamento (MARABEZI, 2014; SANTOS, 2017; WOLF, 2011).

Em princípio, as conversões enzimáticas aparecem como opções promissoras, em termos de custo global, em virtude da possibilidade de atingir rendimentos glicosídicos próximos ao teórico (BONOMI, 2010).

Entretanto, em detrimento da sua elevada especificidade exigem condições reacionais controladas como temperatura, pH do meio e grau de agitação. Pequenas variações nessas condições podem promover sua desnaturação e comprometimento de suas atividades catalíticas (MADIGAN *et al.*, 2015; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Além disso, uma reação enzimática está sujeita a uma inibição reacional física ou química de forma reversível ou irreversível (LIMA, 2018).

Autores como Huang *et al.* (2015), Laureano-Perez *et al.* (2005) e Yang *et al.* (2011) citam ainda, que o processo de hidrólise enzimática dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) presentes na biomassa pode ser limitado por diferentes fatores, como a cristalinidade, grau de polimerização e área superficial da celulose, percentual de lignina e o grau de acetilação das hemiceluloses (SANTOS, 2017; CANILHA *et al.*, 2011; MOSIER *et al.*, 2005). Além disso, as enzimas podem não ser produtivas e podem se unir irreversivelmente aos componentes da lignina, resultando na perda de atividades enzimáticas (HUANG *et al.*, 2015).

Santos (2017), Batalha *et al.* (2015), Canilha *et al.* (2012) em seus estudos, mencionam que o rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: presença de inibidores oriundos do pré-tratamento na superfície das fibras, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, concentração de substrato no meio, dentre outros.

Vale destacar que na literatura, autores têm demonstrado que a digestibilidade enzimática da biomassa é aumentada pela diminuição do teor de lignina e hemiceluloses (ZHU *et al.*, 2008; CARVALHEIRO *et al.*, 2008). A lignina pode promover intensa adsorção das enzimas diminuindo sua eficiência de bioconversão e reduzindo a sua reutilização (CANILHA *et al.*, 2011). Novo *et al.* (2011), estimam-se que reduzir o seu teor em até aproximadamente 70-80% em relação à quantidade inicial seja suficiente.

Portanto, a deslignificação do bagaço juntamente com a recuperação das enzimas são opções favoráveis a uma maior viabilidade econômica do processo de

conversão enzimática e conseqüentemente, é necessário otimizar as condições de hidrólise para se obter um funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (CANILHA *et al.*, 2012; SANTOS, 2017).

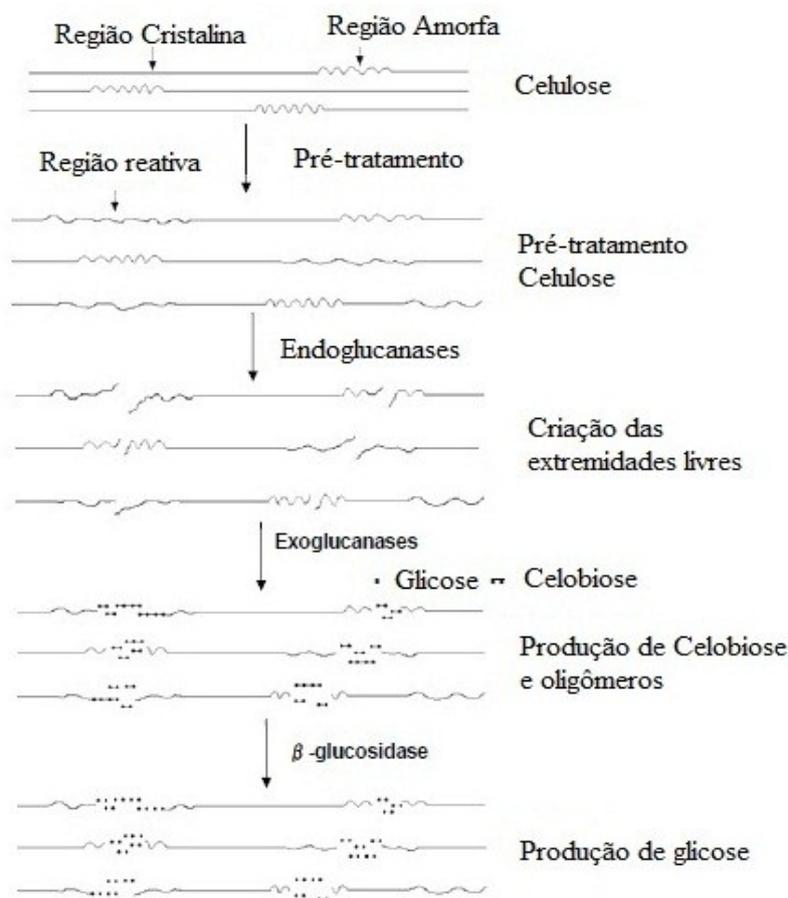
Wolf (2011) cita ainda, que embora a remoção da lignina no pré-tratamento evite diminuição da velocidade de reação devido à adsorção inespecífica das celulases, estudos recentes apontam que o aumento da área superficial acessível à celulase é o mais importante efeito deste para alcançar uma alta conversão enzimática.

Após o pré-tratamento, a fração sólida, rica em celulose, passa pela etapa de hidrólise enzimática e uma série de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas atuam em sinergia produzindo, respectivamente, monômeros de glicose e xilose (considerando que as hemiceluloses são constituídas principalmente de xilana) (SANTOS, 2017; ZHANG *et al.*, 2010; PITARELO, 2007). A xilose é o principal açúcar hemicelulósico e pode ser usado como fonte de carbono e energia na fermentação processos (AGUILAR *et al.*, 2002).

Dentre as várias classes enzimáticas destacam-se as hidrolases - enzimas responsáveis pelas reações de hidrólise. Desse grupo, o presente trabalho destaca as enzimas celulolíticas denominadas celulases, as quais são de grande interesse comercial (GALBE; ZACCHI, 2010) e responsáveis pela hidrólise da celulose com conseqüente liberação de dímeros (celobiose) e monômeros (glicose).

O complexo enzimático (denominado de celulase) é composto, principalmente, por três enzimas: endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanases) e as  $\beta$ -glicosidases (WOLF, 2011; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a; COSTA *et al.*, 2014). A Figura 12 apresenta a ação catalítica desse complexo. Todas atuam na degradação das fibras de celulose, mas em partes distintas desse substrato. As enzimas endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise das macromoléculas de celulose atuando nas ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  ao longo de toda fibra em regiões de baixa cristalinidade das fibras de celulose e criando extremidades de cadeias livres, produzindo oligômeros curtos. Tal fato contribui para a redução do grau de polimerização (aumento da solubilização) das fibras celulósicas (CANILHA *et al.*, 2012; SANTOS, 2017; LYND *et al.*, 2002; WOLF, 2011; ODEGA; PETRI, 2010, DORAN *et al.*, 1994).

**Figura 12.** Apresentação esquemática da hidrólise da celulose a glicose por enzimas celulolíticas



Fonte: TAHERZADEH; KARIMI, 2007a (adaptado)

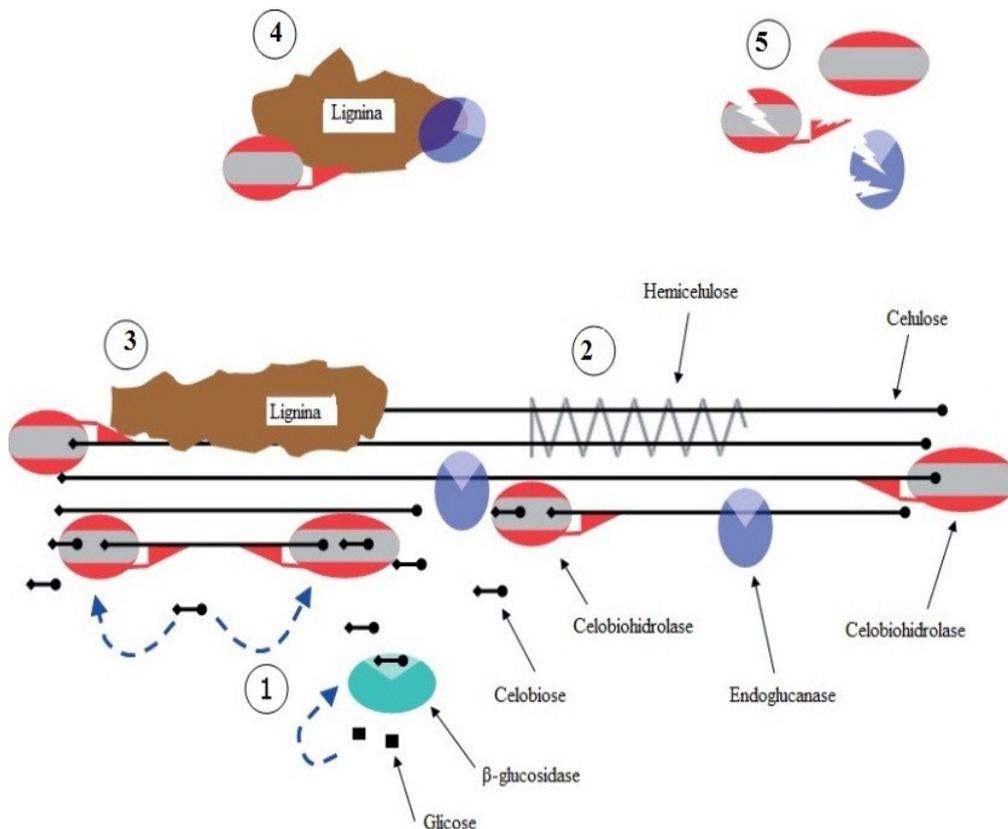
Além disso, as hemiceluloses possuem alguns açúcares com grupos funcionais como o acetilo, o que pode dificultar a ação tanto das hemicelulases quanto das enzimas celulases. A remoção desses grupos funcionais aumenta a acessibilidade da hemiceluloses às hemicelulases e conseqüentemente, a exposição da celulose às celulases (BRIENZO *et al.*, 2017).

Segundo Wolf (2011), Jørgensen *et al.* (2007), Mosier *et al.* (2005) e Pitarelo (2007) a ação das celulases, mesmo operando em condições favoráveis, pode ser limitada por vários fatores, conforme Figura 13, destacando-se:

- ① Inibição das enzimas exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases pelos produtos (celobiose e glicose, respectivamente);
- ② Impedimento estérico das celulases à celulose pela hemicelulose;
- ③ Impedimento estérico das celulases à celulose pela lignina;

- ④ Adsorção inespecífica das enzimas à lignina;
- ⑤ Perda da atividade enzimática devido à desnaturação térmica das enzimas em reações muito longas, ao efeito da agitação mecânica (cisalhamento) e a possíveis produtos de degradação provenientes de pré-tratamentos mais drásticos.

**Figura 13.** Visão geral simplificada de fatores que limitam a hidrólise eficiente da celulose (simbolizada pelas linhas retas).



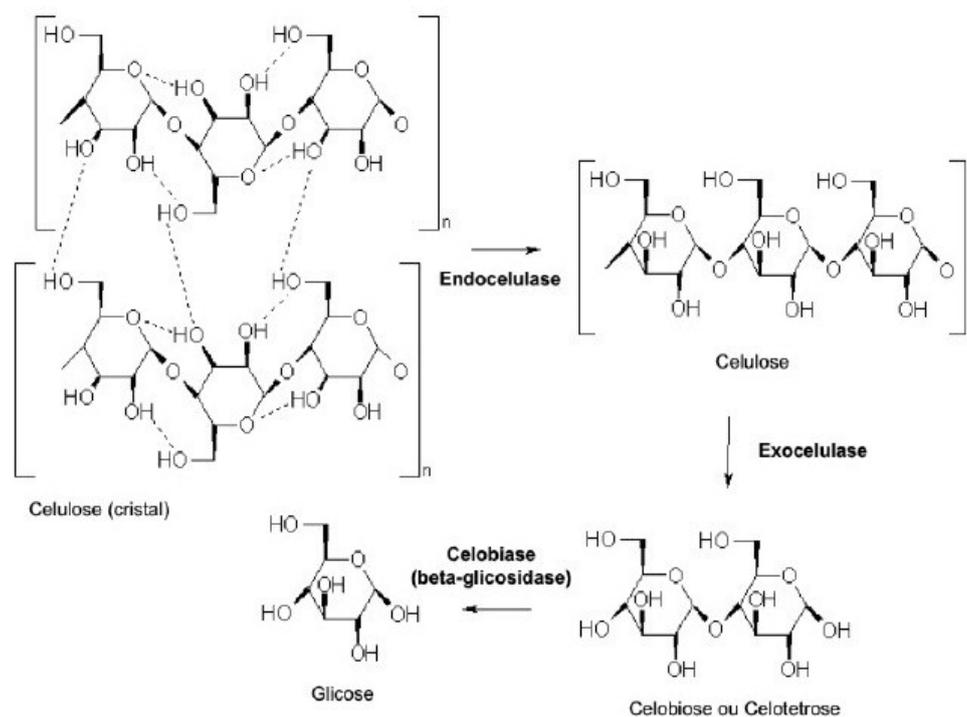
Fonte: JØRGENSEN *et al.*, (2007) (adaptado)

A ação simultânea das enzimas do complexo enzimático que atuam no processo de hidrólise da celulose, é ilustrada, em relação a estereoquímica, na Figura 14.

As atividades das celulasas são mensuradas para fins de cálculos de eficiências de rendimentos. De forma geral, é determinada pela liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de um substrato celulósico. Tradicionalmente, a metodologia estabelecida por Ghose (1987) é recomendada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) a qual permite estabelecer as eficiências da hidrólise. Para tanto, nesses ensaios são utilizados filtros de papel à base de celulose como substrato para a atuação das celulasas. Com isso, suas atividades podem ser mensuradas em

função da sua capacidade de degradação desse material e consequente, liberação de açúcares redutores, sendo expressas como unidade de papel de filtro - *FPU* (*filter paper unit*) (LIMA, 2018).

**Figura 14.** Ação enzimática das celulases: endo-1,4-β-glicanase – hidrólise das cadeias de celulose em fragmentos menores; exo-1,4-β-glicanase – hidrólise das cadeias (fragmentos menores) de celulose à celobiose e 1,4-β-glicosidase – hidrólise de celobiose a glicose



Fonte: MEIGHAN (2007) (adaptado)

Para comparações entre distintos estudos envolvendo atividades de celulases, um valor arbitrário fixo foi adotado pela IUPAC. Nesse caso, uma unidade de papel de filtro (FPU) equivale a produção de 2,0 mg de açúcar redutor (glicose) a partir de 50 mg de papel de filtro (equivalente a 4% de conversão) durante 1 h em meio tamponado (pH = 4,8) e com controle de temperatura (50°C). Dessa forma, ao final é possível estabelecer uma eficiência de produção enzimática em termos de FPU por volume de solução enzimática (FPU.mL<sup>-1</sup>) (GHOSE 1987; LIMA, 2018).

Ressalta-se que a metodologia supracitada é recomendada para determinação das atividades das enzimas produzidas por fungos e deve ser realizada previamente à hidrólise enzimática de outros substratos. Para as enzimas produzidas por bactérias faz-

se necessários pequenos ajustes das condições experimentais (temperatura, pH, tempo, tipo e concentração do substrato) (GHOSE 1987; LIMA, 2018).

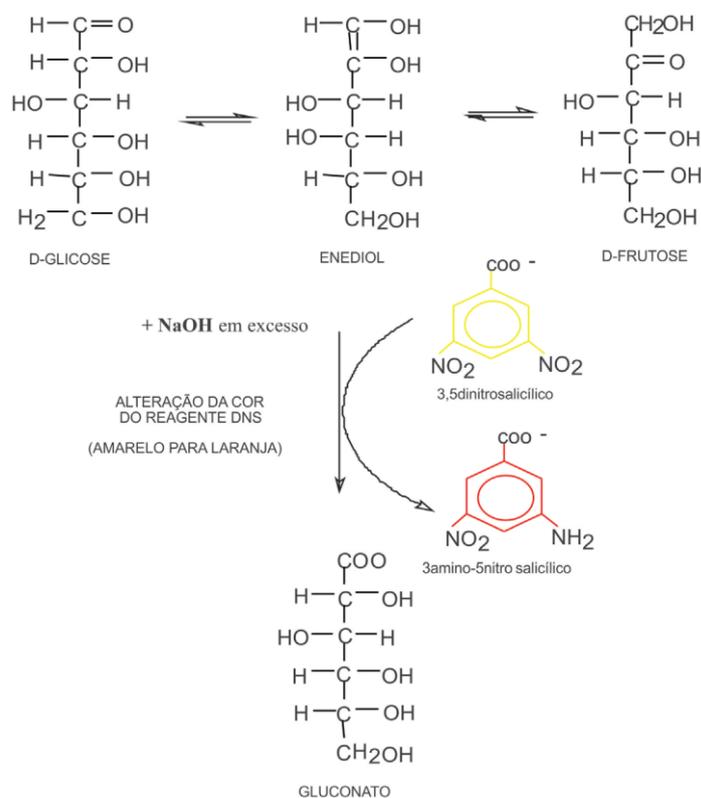
Nesse contexto, o gasto com as celulases pode atingir até 18% dos custos de uma biorrefinaria (WINGREN *et al.*, 2003). Entretanto, alguns autores como Ertas e seus colaboradores (2014) mencionam que valores reduzidos como de 4 a 5 FPU/g<sub>substrato</sub> já contribuem para tornar economicamente viável a hidrólise de materiais lignocelulósicos por via enzimática. O retorno financeiro segundo Batalha *et al.*, (2015) pode alcançar a ordem de 12% ao produzir etanol 2G utilizando hidrólise enzimática (5 FPU/g) a partir de bagaço de cana pré-tratado.

Alguns dos principais estudos envolvendo hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar podem ser citados. Nos estudos utilizando Novozymes® Cellic-CTec2 e Cellic-HTec2 como coquetel enzimático, Batalha *et al.*, 2015, nas condições experimentais de 96 h, com teor de sólido de 5 % (m/v), temperatura de 50°C; agitação de 180 rpm e pH 4,8, obteve-se eficiência de hidrólise de 77% de glicose (10 FPU) e de 72% (5 FPU). Biswas *et al.*, 2014, nas condições experimentais de 96 h, teor de 8 % (m/v) e 2,5 mL de volume reacional, temperatura de 50°C, agitação de 1440 rpm e pH 4,8, resultou em eficiência de hidrólise de 95% (568 g glicose/kg substrato). Já nos trabalhos envolvendo somente Cellic CTec2 (Novozymes®), Ramos *et al.*, 2015, nas condições experimentais com teor de sólido a 20% (m/v), por 96 h, temperatura de 50°C, volume reacional 100 mL, obteve eficiência de hidrólise de 92,5% (76,8g/L de glicose) e um aumento de 39% na produção de etanol. Rabelo *et al.*, 2012, com teor de sólido a 10 % (m/v), por 72 h, a 50°C; por 300 rpm, pH 4,8 e em 1 L de volume reacional, obteve eficiência de hidrólise de 82%. Rabelo *et al.*, 2011, com teor de sólido a 0,33% (m/v), por 72 h, a 50°C, com agitação de 60 rpm, com pH 4,8 e volume reacional de 300 mL, obteve rendimento de 691 mg glicose/g de bagaço.

Os testes de açúcares são baseados em reações de óxido– redução pelo grupo hidroxílico hemiacetálico do monossacarídeo, que pode reagir com íons e formar complexos coloridos ou por reações coloridas provenientes da condensação de produtos de degradação dos açúcares em ácidos fortes com vários compostos orgânicos como fenol e antrona. Os monossacarídeos são açúcares redutores (são assim denominados por apresentarem grupo carbonílico ou cetônico livre, capaz de ser oxidado na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas). O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo),

que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (MALDONADE *et al.*, 2013; GEHLEN, 2013), conforme o exposto na Figura 15.

**Figura 15.** Esquema das reações envolvidas no método DNS



Fonte: MALDONADE *et al.*, 2013

### 3.7 Biogás produzido a partir da biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar é normalmente queimado diretamente em caldeiras para aproveitamento da energia. No entanto, a eficiência desse processo, em condições controladas, é muito baixa e gera emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Uma alternativa mais amigável ambientalmente para o uso do resíduo é fazer sua digestão anaeróbia (DA) para produção de biogás visando à geração de energia renovável. Celulose e hemicelulose podem ser convertidas em metano por fermentação anaeróbia, produzindo energia e aumentando o potencial energético do agronegócio sucroalcooleiro (LEITÃO *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2014; SANTOS, 2017; BAÊTA, 2016).

O biogás é a conversão microbiana da matéria orgânica, por digestão anaeróbia, em biogases constituídos, basicamente, por metano (CH<sub>4</sub>), hidrogênio (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) com concentração variável. Tal variação pode ser decorrente das características do substrato utilizado na alimentação, dos biodigestores e dos parâmetros operacionais (ex.: tempo de detenção hidráulica, carga orgânica aplicada, agitação, temperatura e relação substrato – micro-organismo) (LIMA, 2018; OLIVEIRA, 2009, BAÊTA, 2016). Os principais parâmetros serão discutidos no subitem 3.7.2.

A digestão anaeróbia consiste em um processo biológico em que na ausência de oxigênio atmosférico, as bactérias facultativas ou estritamente anaeróbias degradam compostos orgânicos complexos, que sofrem uma série de processos oxidativos em sequencia e são convertidos, em substâncias mais simples, como suprácitado, em metano, água, produtos inorgânicos (dióxido de carbono) e biofertilizantes (matéria orgânica estabilizada), através da ação combinada de diferentes microrganismos (GEHLEN, 2012; OLIVEIRA, 2009; PROBIOGÁS, 2016; JARDIM, 2013; KADAM; PANWAR, 2017) com atividades específicas, organizados na forma de um consórcio microbiológico (LIMA, 2018; GEHLEN, 2012). Dessa forma, o produto gerado por uma classe de micro-organismo torna-se o substrato da etapa seguinte, resultando em um equilíbrio dinâmico interespecies. Os principais resultados desse processo são a fração líquida constituída por biocompostos simples solúveis (baixa DQO), fração gasosa formada pelo biogás (rico em metano e hidrogênio) e a fração sólida (lodo anaeróbio) (LIMA, 2018). As etapas do processamento da DA será discutido no subitem 3.7.1.

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. Nas últimas duas décadas, processos com tecnologia anaeróbia têm sido comercializados com sucesso, tanto para o tratamento de águas residuais quanto para resíduos sólidos (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2000), incluindo àqueles ricos em material lignocelulósico (ANTONI *et al.*, 2007; LEVIN *et al.*, 2007).

Por fim, a digestão anaeróbia da biomassa requer um menor investimento de capital e custo por unidade de produção, em relação a outras energias renováveis, tais como hídrica, solar e eólica. Além disso, a energia renovável obtida a partir da biomassa

está disponível nas áreas rurais, como um recurso doméstico, não estando sujeita a flutuações dos preços mundiais, ou às incertezas de abastecimento como de combustíveis importados e convencionais (GEHLEN, 2012). A representação da digestão anaeróbia pode ser feita pela equação (OLIVEIRA, 2009):



Como o biogás é produzido por digestão anaeróbia de matéria orgânica, ele é considerado um combustível limpo e ambientalmente favorável e tem sido usado para geração de calor, vapor e eletricidade e, ainda, como combustível automobilístico (similar ao gás natural veicular - GNV) (APPELS *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009; GEHLEN, 2012) e substituição ao gás natural e/ou gás liquefeito de petróleo (GLP) (GEHLEN, 2012; BAÊTA, 2016).

Baêta (2016) apresenta, ainda, que a produção de CH<sub>4</sub> 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, em resumo, 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.

Conforme Oliveira (2009), o biogás é composto por grande parcela de gás metano (CH<sub>4</sub>), que quando lançado na atmosfera apresenta potencial de poluição 21 vezes superior ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no que se refere ao efeito estufa, sendo que sua utilização na geração de energia leva a uma redução do potencial de poluição ambiental. Entretanto, comparativamente a outros combustíveis fósseis, a queima do metano gera menos poluentes atmosféricos por unidade de energia gerada, por isso, é caracterizado como um combustível limpo e o seu uso em equipamentos, veículos, aplicações industriais e geração de energia tende a aumentar.

A produção mundial de biogás está concentrada na Europa, cerca de 60% da produção total, enquanto na América do Norte está limitada a 22 % e com contribuições muito menores pelas regiões Ásia-Pacífico (cerca de 11%), latino-americanas (6%) e Oriente Médio-Africano (cerca de 1%) (CORNO *et al.*, 2015).

No Brasil, durante o período da crise energética na década de 70, a busca energias alternativas despertou o interesse em aplicar a tecnologia da biodigestão anaeróbia. O interesse maior está relacionado à sua capacidade de estabilização de resíduos, devido à necessidade cada vez maior de preservação do meio ambiente (OLIVEIRA, 2009, KIM, 2018).

Um aspecto atrativo do biogás refere-se ao conteúdo energético do mesmo. A Tabela 3 mostra que a capacidade calorífica do hidrogênio e do metano, quando comparadas em termos de massa, são superiores às do etanol e da gasolina. Além do aspecto energético, a geração de energia a partir de biogás (CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>) acaba sendo mais favorável do ponto de vista ambiental, uma vez que em ambos os combustíveis a geração de CO<sub>2</sub> é menor do que na queima do etanol ou gasolina.

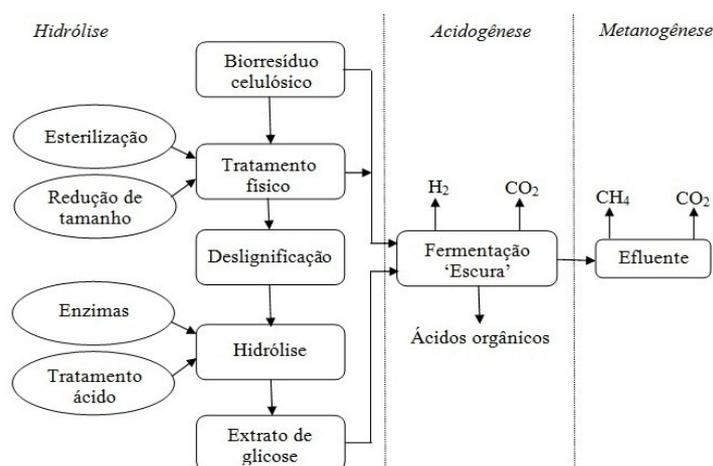
**Tabela 3.** Capacidade calorífica de alguns combustíveis

Combustível	Capacidade calorífica superior (KJ.Kg <sup>-1</sup> )	Capacidade calorífica inferior (KJ.Kg <sup>-1</sup> )	Referências
Gás metano	50,02 x 10 <sup>3</sup>	55,53 x 10 <sup>3</sup>	Aragonese <i>et al.</i> , (2006); Santos;
Gás hidrogênio	120,01 x 10 <sup>3</sup>	141,85 x 10 <sup>3</sup>	Santos (2005);
Gasolina	43,95 x 10 <sup>3</sup>	46,88 x 10 <sup>3</sup>	Oliveira (2009)
Etanol	26,79 x 10 <sup>3</sup>	29,72 x 10 <sup>3</sup>	

Fonte: Autora

A Figura 16 mostra o esquema de um processo integrado de produção de metano e hidrogênio a partir de material celulósico pré-tratado.

**Figura 16.** Esquema das possibilidades de produção de hidrogênio a partir da celulose

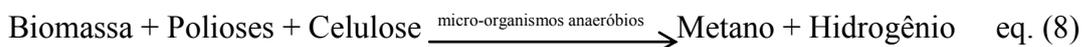
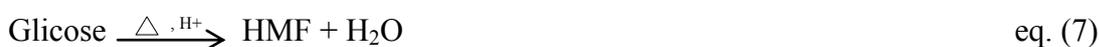


Fonte: Adaptado - Chong *et al.* (2009)

O hidrogênio é produzido predominantemente durante a etapa de acetogênese da digestão anaeróbia, no entanto sua concentração no biogás é pequena uma vez que ele é utilizado como fonte de energia para produção de metano por alguns micro-organismos metanogênicos. Assim, para que o hidrogênio se acumule no meio há necessidade de interromper sua utilização por grupos hidrogenotróficos do consórcio anaeróbio (LIMA; ZAIAT, 2012; FERNANDES *et al.* 2010; ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; KAPDAN; KARGI, 2006; CHEN *et al.*, 2001).

Sabe-se que carboidratos são os principais precursores de biogás e assim, resíduos da agricultura ricos em carboidratos poderiam ser usados como substratos (KAPDAN; KARGI, 2006). Substratos puros tais como glicose, sacarose e celulose (CHEN *et al.*, 2001), águas residuais ricas em açúcares fermentescíveis (LIN; LAY, 2005), efluentes domésticos e efluentes/resíduos industriais (BAÊTA, 2016) são materiais de partida mais estudados em laboratório. Porém, até o momento, relativamente poucos trabalhos foram conduzidos para investigar a produção de biogás por resíduos lignocelulósicos da agroindústria (FANG *et al.*, 2006; TENCA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, os subprodutos e os principais biocombustíveis gerados a partir da utilização da biomassa lignocelulósica são representados nas Equações (3) a (8), podendo ser realizados por diferentes técnicas e processos de uma biorrefinaria (LIMA, 2018).



O biogás produzido via DA a partir do bagaço de cana-de-açúcar possui elevado teor de metano (até 75%), sendo sua geração vinculada à remoção de demanda química de oxigênio (DQO) do meio, e a baixos custos, o que permite agregar valor ao bagaço de cana e minimizar os impactos ambientais decorrentes da sua queima direta (LIMA, 2018).

Dentre as configurações possíveis da digestão anaeróbia (DA) para produção de biogás a partir de elevadas cargas de bagaço de cana, destaca-se a digestão anaeróbia em fase sólida (DA-S), também é conhecida como digestão seca (*dry digestion*), fermentação seca (*dry fermentation*) ou ainda por fermentação em estado sólido (*solid-state fermentation - SSF*) (LIMA, 2018).

Sua principal característica é a bioconversão de elevadas cargas de substratos orgânicos sólidos em biogás (60 a 70% de metano) e um resíduo orgânico rico em nitrogênio (LI *et al.*, 2011). A DA-S está tornando-se notório para estudos em escala laboratorial e piloto, devido ao seu menor custo e potenciais produtos gerados.

O efeito da composição da biomassa lignocelulósica no rendimento de biogás já foi estudado extensivamente; no entanto, a maioria desses estudos se limitou à digestão anaeróbia em fase líquida (DA-L), que opera com um teor sólidos totais (ST) de 15% ou menos, mesmo que a AD de estado sólido (DA-S), que geralmente é operada em uma ST teor de 15% ou mais (BROWN *et al.*, 2012), favorecendo a degradação de uma maior massa.

O DA-S tem muitas vantagens sobre o DA-L, características que promove para sua aplicação em grandes escalas, incluindo um volume menor do reator para o mesmo carregamento de sólidos, menos partes móveis, menor consumo de energia para aquecimento e mistura e mais fácil de manusear o produto final (LI *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2012). Além disso, a DA-S ainda permite elevadas velocidades de degradação e produção de biogás e baixa geração de efluentes líquidos. Somada a essas características, sua produtividade volumétrica de biogás pode ser de 2 a 7 vezes maior do que a tradicional digestão anaeróbia em fase líquida (LIMA, 2018; BROWN *et al.*, 2012).

Apesar das muitas vantagens da tecnologia DA-S e do progresso nos projetos de sistemas, há vários aspectos que precisam ser aprimorados para posterior comercialização da tecnologia. O tempo de retenção do DA-S foi documentado em até três vezes mais que o DA-L devido ao transporte de massa mais lento no DA-S do que o DA líquido. A melhoria da eficiência e da economia da produção é necessária, assim como os avanços no pré-tratamento da matéria-prima, do sistema de digestão, do controle de estabilidade e no projeto do reator estão em questão (Li *et al.*, 2011).

Os tratamentos envolvendo a DA-S podem ser realizados em um único reator ou em sistema de duplo estágio, podendo ser alimentado de forma contínua ou em

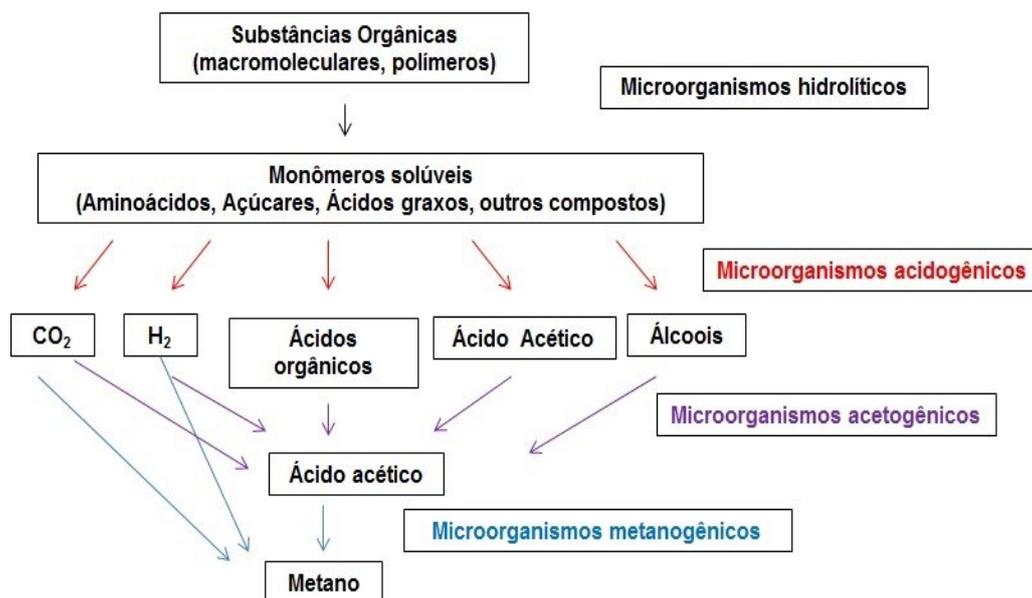
batelada (KOTHARI *et al.*, 2014). Devido à maior simplicidade e menor custo operacional, comumente é realizada em batelada. Operacionalmente o biodigestor é preenchido de uma única vez com o substrato e inóculo, os quais misturados irão passar por todas as fases da degradação anaeróbia, em meio com um baixo teor de umidade (LIMA, 2018). Em particular, vários autores relataram que o processo de digestão anaeróbia em comparação com a tradicional, em um único estágio, levaria a diferenciar a produção de biocombustíveis (bio-hidrogênio e bio-metano), melhorar os rendimentos globais da produção de biogás e permitir maiores concentrações de CH<sub>4</sub> no biogás produzido no segundo estágio, diminuindo os custos de purificação de biogás. No entanto, hoje, a maioria das plantas de biogás em grande escala na Europa dependem do processo de estágio único e a tecnologia em duas etapas permanece não comprovada no campo. Isto é principalmente porque a estabilidade do processo de fermentação escura e a maximização dos rendimentos da produção de hidrogênio na primeira etapa ainda são incertas (TENCA *et al.*, 2011).

A principal característica da DA-S que favorece sua aplicação no setor gerador de resíduos lignocelulósicos é a utilização direta do bagaço de cana para a produção de biogás. Em uma planta industrial lignocelulósico, esse processo pode ser alimentado com bagaço de cana residual do processo de produção de etanol (1G) e açúcar. Além disso, pode ser utilizado o bagaço de cana residual de etapas de pré-tratamento ou até mesmo da produção de etanol 2G (resíduo da hidrólise enzimática e fermentação) (LIMA, 2018). Tais opções tecnológicas foram avaliadas neste trabalho de tese visando aproveitar toda energia contida no bagaço de cana.

### **3.7.1 Etapas da digestão anaeróbia (DA)**

A digestão anaeróbia pode ser dividida em (Figura 17) cadeia de processamento na qual ocorre sempre em quatro etapas: *i*) hidrólise, *ii*) acidogênese, *iii*) acetogênese e *iv*) metanogênese (PROBIOGÁS, 2016; JARDIM, 2013; KADAM; PANWAR, 2017; BAÊTA, 2016; LIMA, 2018; OLIVEIRA, 2009).

**Figura 17.** As quatro etapas da degradação microbológica anaeróbica



Fonte: Autora – adaptado de STERNAD, 2010

De forma simplificada, inicialmente a matéria orgânica é transformada a compostos solúveis (açúcares, aminoácidos, triglicerídeos) por bactérias hidrolíticas. Uma vez solubilizados, estes compostos são utilizados por micro-organismos fermentativos acidogênicos e convertidos a acetato, outros ácidos graxos de cadeia curta (propiónico, butírico, valérico), álcoois, hidrogênio e gás carbônico. A etapa seguinte da digestão anaeróbia consiste na ação de bactérias acetogênicas envolvidas na conversão dos produtos orgânicos a ácido acético, hidrogênio e gás carbônico que serão então utilizados por micro-organismos metanogênicos na produção de metano. A etapa de hidrólise tem sido considerada a etapa limitante no caso da digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991; GEHLEN, 2012), de forma que o pré-tratamento deste material é fundamental para aumentar a eficiência e as taxas de produção de metano.

As bactérias acidogênicas e as arqueas metanogênicas apresentam características diferentes, principalmente em relação às exigências nutricionais, a fisiologia, o pH, o crescimento e a sensibilidade quanto a variações de temperatura. Em relação à velocidade de reprodução, quando comparadas às bactérias acidogênicas, as arqueas metanogênicas apresentam menor velocidade além de serem mais sensíveis às condições adversas ou alterações das condições ambientes (OLIVEIRA, 2009).

A seguir, as etapas de forma detalhada:

## **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, podendo 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; KARIMI, 2008; DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011). As equações gerais (LIMA, 2018; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011) do processo DA podem ser representadas:



Gehlen, 2012 traz que, durante a hidrólise ocorre a conversão das fibras em açúcares redutores. Os carboidratos são os macronutrientes mais abundantes. Eles são classificados em mono, oligo e polissacarídeos. Os monossacarídeos são açúcares simples não hidrolisáveis, ou seja, os açúcares redutores, porém, a obtenção desses açúcares requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva, como neste caso, a hidrólise ácida. Após a conversão das fibras em açúcares redutores, estes são recuperados para fermentação e posterior continuidade no processo de produção de biogás.

Sendo assim, essa etapa passa a ser de fundamental importância para o processo de obtenção de biogás a partir de biomassas lignocelulósicas (BAËTA, 2016). Esse mecanismo ocorre pela ação de exoenzimas excretadas por micro-organismos anaeróbios facultativos e/ou estritamente anaeróbios. Nesta etapa os micro-organismos consomem grande parte do oxigênio dissolvido presente na água provocando um abaixamento no potencial redox do meio garantindo assim condições ideais para a ação (DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011; GEHLEN, 2012; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Com intuito de tornar esse processo mais factível do ponto de vista de aplicação, 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.*, 2016.), 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) e para facilitar a ação das exoenzimas liberadas durante esta etapa (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; BAÊTA, 2016).

Essa etapa inicial é fundamental para a redução do tamanho das partículas e sua solubilização, uma vez que as arqueas metanogênicas não são capazes de assimilar diretamente as macromoléculas que constituem o complexo lignocelulósico (GERARDI, 2006; LIMA, 2018).

### ***ii) Acidogênese***

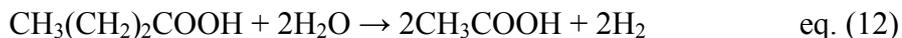
Esta etapa ocorre de forma concomitante à etapa de hidrólise, uma vez que os micro-organismos acidogênicos convertem as substâncias mais simples produzidas na hidrólise em ácidos de cadeia curta, moléculas C1-C5 (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, acetato e ácido butírico), álcoois, hidrogênio, óxido de nitrogênio, sulfato de hidrogênio e CO<sub>2</sub> (DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011; COSTA *et al.*, 2014). A concentração de íons H<sup>+</sup> formada intermediariamente durante a acidogênese determina os tipos de produtos de fermentação. 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; DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011; BAÊTA, 2016).

### ***iii) Acetogênese***

Esse estágio 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 (por isso são chamados de microrganismos sintróficos acetogênicos) com os micro-organismos metanogênicos e podem, portanto, obter a energia necessária para sua sobrevivência e crescimento apenas em concentrações muito baixas de H<sub>2</sub>. 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 CH<sub>4</sub>. Para que isto não ocorra, existe a dependência de outra classe de micro-organismos metanogênicos, que utiliza CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para produção de CH<sub>4</sub>, minimizando o aumento excessivo da pressão de hidrogênio. Sendo assim, fica claro que a elevada conversão de CH<sub>4</sub> a partir de qualquer fonte de carbono é altamente dependente do equilíbrio entre as fases de acetogênese e metanogênese (BAËTA *et al.*, 2013; DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011; GEHLEN, 2012; COSTA *et al.*, 2014).

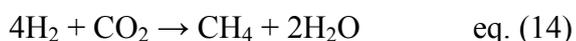
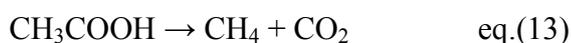
Oliveira, 2009, apresenta que na fase das bactérias acetogênicas há a produção de acetato e hidrogênio através do metabolismo das substâncias produzidas pelas bactérias hidrolíticas fermentativas, equações 11 e 12. Nessa etapa, alguns produtos da fase anterior como o etanol, propionato, butirato, valerato e lactato, em baixa pressão do gás hidrogênio, são oxidados a acetato, havendo a formação de dióxido de carbono e hidrogênio. Os produtos gerados pelas bactérias acetogênicas são apropriadas para as arqueas metanogênicas.



#### ***iv) Metanogênese***

Nesta etapa a formação de CH<sub>4</sub> 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 CH<sub>4</sub>. Os micro-organismos acetoclásticos convertem moléculas de acetato em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, ao passo que as hidrogenotróficos convertem CO<sub>2</sub> (aceptor de elétrons) e H<sub>2</sub> (doador de elétrons) em CH<sub>4</sub> (equações 13 e 14). Para elevadas taxas de produção de CH<sub>4</sub> 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 CH<sub>4</sub>. Esse fato deve-se as baixas taxas de crescimento específico apresentada pelos micro-organismos metanogênicos, e a conseqüente sensibilidade a mudanças de pH, temperatura e presença de compostos inibidores (ZHENG *et al.*, 2014; BAËTA, 2016; GEHLEN, 2012; OLIVEIRA, 2009). Quando a formação de metano funciona, não há problemas na

fase acetogênica. Quando a formação de metano é perturbada, ocorre uma superacidificação (DEUBLEIN; STEINHAUSERM, 2011).



A reação expressa pela primeira equação é responsável pela produção de aproximadamente 70% do metano produzido durante o processo de digestão anaeróbia, em que o grupo metil é reduzido a metano e o grupo carboxílico é oxidado a gás carbônico (OLIVEIRA, 2009). Costa *et al.*, (2014) menciona que de todo metano produzido, 70% é formado na rota do acetato pelas archeas metanogênicas acetoclásticas e 30% na rota do H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pelas archeas metanogênicas hidrogenotróficas.

Como forma de verificar a capacidade máxima de produção de metano pelo consórcio anaeróbio, a atividade metanogênicas específica (AME) pode ser determinada e monitorada. A AME é normalmente realizada com substratos (ex. glicose) passível de ser degradado de forma a manter todas as classes envolvidas (acidogênica, acetogênica e metanogênica) no consórcio anaeróbio, permitindo a determinação real da atividade do inóculo anaeróbio. Sua unidade é g DQOCH<sub>4</sub>/g SSV, ou seja, é a produção de metano do inóculo avaliado por dia. Vale destacar que, o uso de glicose no teste de AME não avalia a etapa de hidrólise, por não depender da atividade das bactérias hidrolíticas (LIMA, 2018).

### 3.7.2 Parâmetros importantes para DA e composição do biogás

Os parâmetros que, além de influenciarem na taxa de crescimento dos micro-organismos, também direcionam o tipo de metabolismo que eles irão realizar, maximizando as eficiências da produção de biogás, são:

- Quantidade de matéria seca: A digestão anaeróbia pode ser classificada com base no percentual de sólidos totais (ST). Segundo alguns autores como Zheng *et al.* (2014) e Brown *et al.*, 2012, quando o processo de digestão anaeróbia acontece com quantidade de sólidos totais (ST) superiores a 15%, ele pode ser considerado como digestão anaeróbia em meio sólido (DA-S), ao passo que quantidades de ST inferiores a 15% caracterizam uma digestão anaeróbia em meio líquido (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; BAËTA, 2016).

De acordo com Oliveira (2009), para que a produção de metano ocorra de forma satisfatória é necessário que a concentração de matéria seca seja de até 25%, isto é, a cada 25 kg de matéria seca para cada 100 litros de biomassa.

- concentração de nutrientes: a presença de alguns macronutrientes como o carbono, nitrogênio, potássio, fósforo e enxofre, alguns micronutrientes minerais, vitaminas e aminoácidos são indispensáveis para o desenvolvimento das arqueas metanogênicas, sendo assim, o conhecimento da composição química e o tipo de biomassa utilizada são importantes. Se for necessário, pode ser feita a dosagem de nutrientes e ativadores químicos para que ocorra uma boa fermentação da biomassa (OLIVEIRA, 2009; DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

A relação carbono e nitrogênio (C/N) tem grande influência na degradação anaeróbia dos resíduos lignocelulósicos (DEUBLEIN; STEIBHAUSER, 2011; LIMA, 2018; OLIVEIRA, 2009).

É conhecido que a relação C/N na biomassa lignocelulósica é elevada (superior a 50:1) e tal fato contribui negativamente para a produção de biogás (ROCHA *et al.*, 2015). Nesse aspecto o processo de co-digestão tem sido citado como principal alternativa para adequar a relação C/N às condições ótimas de digestão de resíduos lignocelulósicos. A co-digestão promove a digestão simultânea de duas ou mais matérias-primas, com isso a razão C/N pode atingir valores mais adequados (20:1) e proporcionar maiores rendimentos na produção de metano (LIMA, 2018).

Artigos de revisão publicados na literatura reúnem os principais benefícios da co-digestão de materiais lignocelulósicos com outros ricos em nitrogênio, como os resíduos agroindustriais (ex.: resíduos da pecuária bovina, suína e avicultura), esgoto sanitário e ainda com resíduos sólidos urbanos (LIMA, 2018).

Além das melhorias na relação C/N, o processo de co-digestão do bagaço de cana contribui para sua biometanização por meio da diluição de compostos tóxicos (gerados no pré-tratamento), manutenção do pH em valores próximos à neutralidade e maior sinergismo nas comunidades microbianas. Dessa maneira, a contribuição da co-digestão é favorecer as condições nutritivas e/ou biológicas, visando maximizar as atividades metanogênicas (LIMA, 2018).

- pH acidez ou alcalinidade: em digestores, a faixa de operação está entre pH 6,0 a 8,0, sendo que o ponto ideal encontra-se em pH 7,0 (OLIVEIRA, 2009; NARTKER *et al.*, 2014). De acordo com Deublein; STEINHAUSER (2011), Oliveira (2009) o pH ótimo do microorganismo formador de metano é 6,7-7,5. Valores abaixo dessa faixa determina a queda de produção do biogás, podendo chegar à paralisação quando o pH atinge valores inferiores a 6,0. Para conversão de proteínas a aminoácidos, a faixa de operação ótima do biodigestor se encontra entre pH 7,0 e 7,5, ao passo que para a conversão de aminoácidos a ácidos o valor ótimo do pH é aproximadamente 6,3. Para bactérias acidogênicas o pH ótimo se encontra na faixa de 5,5 a 6,0 enquanto que para arqueas metanogênicas a faixa de pH ótimo se encontra entre 6,8 a 7,2. Caso a taxa de hidrólise seja mais alta que a taxa metanogênica e a alcalinidade não seja suficientemente elevada, pode ocorrer o acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) e de hidrogênio. Durante o funcionamento de um biodigestor pode haver a necessidade de correção tanto da acidez quanto da alcalinidade do meio. Para maior alcalinidade recomenda-se a utilização de cal, carbonato de sódio, soda cáustica, bicarbonato de sódio ou bicarbonato de potássio. Para maior acidez recomenda-se o emprego de ácido acético, acetato de sódio, ácido carbônico, amoníaco ou cloreto de amônio.

- temperatura interna do biodigestor: o processo de fermentação é influenciado diretamente pela temperatura, agilizando-o e, conseqüentemente, diminuindo o tempo de retenção da massa no interior do biodigestor; além do que a porcentagem de metano na constituição do biogás é maior quando o processo de fermentação ocorre em temperaturas mais elevadas, garantindo dessa forma, um maior poder calorífico à mistura. Assim, como o funcionamento na faixa de temperatura adequada, o biodigestor poderá ter seu volume diminuído pela metade ou menos para o mesmo volume de gás produzido, representando economia de material na construção, ou caso seja desejável, apresentar uma maior produção de gás com um volume pré-estabelecido. Em um processo anaeróbio, o mais importante é manter uma temperatura constante dentro do reator, devido, principalmente, ao fato de que as arqueas metanogênicas são mais sensíveis a variações bruscas de temperatura, apesar da formação de metano poder ocorrer em condições extremas, como 0 a 97°C. As arqueas metanogênicas podem ser divididas em dois grupos, as mesofílicas, que operam em temperaturas situadas na faixa de 20 a 40°C, e as termofílicas, que operam na faixa de 50 a 60°C. Quando a temperatura de operação está em torno de 35 a 37°C o processo de digestão e

gaseificação é altamente acelerado. Para temperaturas inferiores a 35°C o processo de digestão é menor e, para temperaturas inferiores a 15°C, a produção é muito reduzida, podendo ser cessada (OLIVEIRA, 2009). Quanto maior a temperatura durante o processo de fermentação, menor é a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvida em água (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- tempo de detenção hidráulica: tempo de detenção hidráulica ou período de detenção hidráulica é o tempo que o material permanece no interior do biodigestor, ou seja, tempo entre a entrada do efluente e a saída do afluente do digestor. De acordo com os diferentes substratos (biomassa) utilizados para a alimentação do biodigestor, e dos demais fatores, o tempo de retenção varia de 4 a 60 dias (OLIVEIRA, 2009). De um modo geral, a decomposição anaeróbica da biomassa melhora com um maior tempo de exposição. No final do tempo de residência, o teor de metano aumenta desproporcionalmente, especialmente quando o processo de hidrólise do CO<sub>2</sub> começa a ser desativado (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

Entretanto, devido ao elevado valor de ST, a DA-S apresenta maiores limitações de transferência de massa necessitando de maior tempo de retenção. Em condição operacional termofílica (48-55°C) exige-se, aproximadamente, 15 dias de retenção do substrato. O tempo de retenção aumenta (15 a 60 dias) ao se trabalhar em condição mesofílica (3-42°C) (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; KOTHARI *et al.*, 2014). Além de tempos elevados de processamento, a possível acumulação de AGV e amônia pode ocorrer, influenciando negativamente a eficiência do processo (LIMA, 2018).

- concentração de sólidos voláteis (SV): os sólidos voláteis são fermentados para produzir o biogás, daí a importância e necessidade de saber qual a concentração dos mesmos, se possível. Quanto maior a concentração de sólidos voláteis na biomassa, maior será a produção de gás, lembrando que isso também dependerá da eficiência do sistema digestor (OLIVEIRA, 2009).

- a preparação do substrato: o substrato deve estar propício para agilizar e intensificar a decomposição (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- a fonte de alimentação: uma perda na fonte de alimentação deve ser evitada para que a hidrólise do material seja completa e suficiente. É importante que o material seja completamente decomposto (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- teor de líquido no biorreator: um maior teor de líquido no biorreator resulta em uma maior concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido na água, reduzindo o nível de CO<sub>2</sub> na fase gasosa (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- a estrutura do substrato: se o substrato estiver bem intrincado em estruturas de lignina, o tipo de desintegração do substrato torna-se importante. A estrutura deve ser triturada ou desfibrada (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- A ativação do material: o processo de fermentação ocorre muito mais rápido e mais uniformemente se o material no biorreator estiver bem e homogêneo ativado. O tempo de exposição pode ser menor (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

- inóculo: A razão substrato-inóculo (S/I) na DA-S é elevada e possui ampla faixa (2 a 10) dependendo das condições operacionais, das características do substrato e dos produtos almejados. Entretanto, os melhores resultados são apresentados com razões de 2 e 3 (em condições mesofílicas). Com o aumento da temperatura (termofílica) essa razão aumenta ainda mais, alcançando os melhores resultados com razões de 4 e 5 (LIEW *et al.*, 2012; LIMA, 2018). Essas maiores razões S/I reduzem a necessidade de adição de água no substrato, fazendo com que essa técnica também seja utilizada em regiões com escassez hídrica. Devido à menor transferência de massa (baixo teor de umidade), um adequado balanço nutricional e condições experimentais contribuem para melhores eficiências. As relações entre carbono e nitrogênio (C/N) são recomendadas para valores entre 20 e 30. Enquanto para a relação DQO/N são orientados valores próximos de 70 (LIMA, 2018).

Para tanto, uma alternativa de baixo custo é utilizar um inóculo formado por micro-organismos de fontes diferentes. Micro-organismos presentes em reatores de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) estão adaptados com cargas orgânicas e substratos diferentes dos que, por exemplo, estão presentes no rumem bovino ou no estrume. Todos esses realizam degradações anaeróbias de substrato orgânico de composições variadas. Dessa maneira, um inóculo constituído por tais micro-organismos possui maior sinergismo e possibilidade de biometanização do bagaço de cana (LIMA, 2018). Kothari *et al.*, (2014) relatam uma redução do tempo de retenção para a faixa de 12 a 18 dias ao se misturar estrume bovino ao inóculo anaeróbio e na faixa de 10 a 15 dias com o acréscimo de estrume suíno.

## 4 MATERIAIS E METODOS DO PLANEJAMENTO 1

### 4.1 Preparação do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar (BB) utilizado foi fornecido por Vale do Tijuco Açúcar e Álcool S.A., da cidade de Uberaba – MG e o mesmo foi lavado e seco ao sol, triturado em liquidificador e armazenado em baldes hermeticamente fechados, à temperatura ambiente.

### 4.2 1º Planejamento experimental

O ensaio para a condição de pré-tratamento foi gerado pelo planejamento experimental fatorial  $2^2$  (Statistica®), descrito na Tabela 4. Com base em testes prévios e estudos de Canilha *et al.* (2012), Papa *et al.* (2015), Zabed *et al.* (2016) e Li *et al.* (2013), o pré-tratamento apresenta favorável em condições suaves, como níveis moderados da relação biomassa e líquido/realgente, baixos períodos reacionais e temperaturas mais baixas (100°C), na qual este é preferido para o menor consumo de energia. As variáveis avaliadas foram o tempo ( $t$ , min) e concentração ácido cítrico (sólido – líquido) (%), em aquecimento por sistema de refluxo.

**Tabela 4.** Planejamento Fatorial de pré-tratamento

Variável	Níveis de tempo ( $t$ )				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
<b>.t (min)</b>	17,57	30	60	90	102,43
	Níveis de concentração ácido cítrico				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
<b>Concentração (%)</b>	0,35	2,0	6,0	10,0	11,65

Experimento	Concentração (%)	$t$ (min)
<b>1</b>	6,0	60
<b>1.1 (duplicata do 1)</b>	6,0	60
<b>2</b>	2,0	30
<b>3</b>	10,0	30
<b>4</b>	0,35	60
<b>5</b>	2,0	90
<b>6</b>	6,0	102,43
<b>7</b>	10,0	90
<b>8</b>	11,65	60
<b>9</b>	6,0	17,57

Fonte: Autora

### 4.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi conduzido em balão de fundo redondo de 1,0 L, em sistema de refluxo, utilizando manta de aquecimento, temperatura constante de aproximadamente 100°C. Padronizou-se massa inicial de 25 g de bagaço bruto (BB) e 625 mL de solução água/ácido cítrico.

O tempo de reação variou-se de aproximadamente de 17 a 102 min e a concentração da solução de ácido cítrico foi de 0,35 a 11,65% (m/m), conforme apresentado na Tabela 4.

O BB pré-tratado (fração sólida) foi filtrado, lavado com água até pH neutro e seco em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 h. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos zip lock, hermeticamente fechados.

De acordo com Galbe e Zacchi (2010) e Canilla e seus colaboradores (2012) é comum lavar os sólidos gerados no pré-tratamento para evitar a inibição causada por compostos solúveis em água, liberados ou formados durante o processo.

O volume da fração líquida liberada após filtragem foi armazenado em tubos falcons fechados, em geladeira, reservadas para os ensaios de digestão anaeróbia.

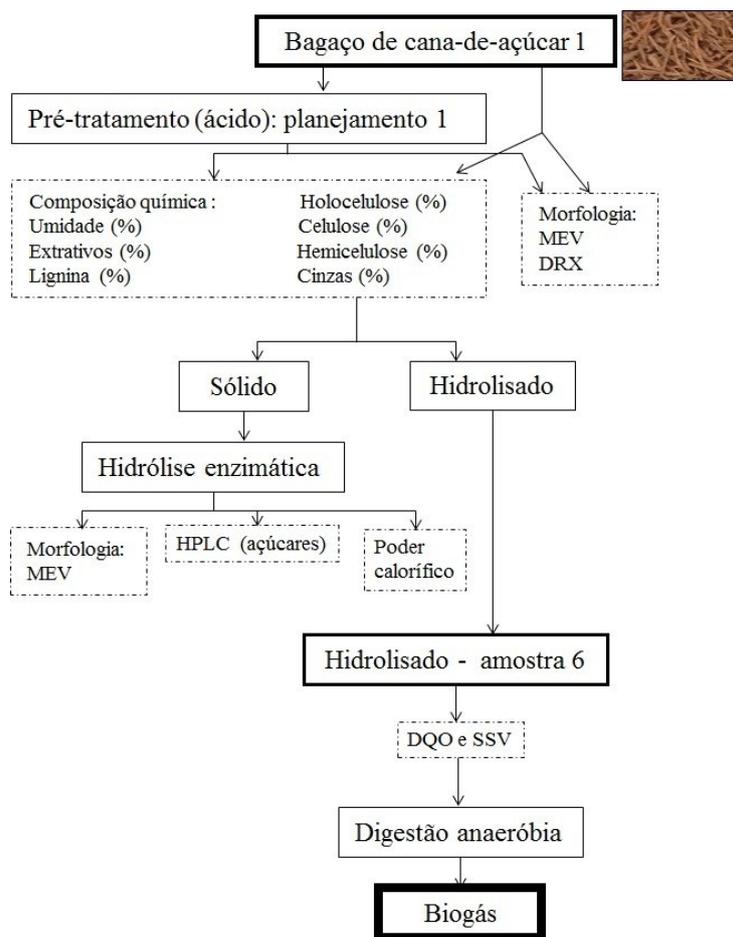
A caracterização, após o pré-tratamento, foi realizada por metodologias de referências, sendo: umidade (descrito no item 4.4.1), lignina Klason insolúvel e solúvel (descrito no item 4.4.4), holocelulose (descrito no item 4.4.5), celulose (descrito no item 4.4.6) e hemiceluloses por medida indireta da diferença entre os teores de holocelulose e celulose. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) descrito no item 4.5, difração de raios-X (DRX) descrito no item 4.6 e poder calorífico descrito no item 4.12 também foram realizados.

Todas as análises químicas foram realizadas em triplicata e os valores dos constituintes presentes na biomassa foram expressos em base seca e corrigidos pelo rendimento dos pré-tratamentos.

A otimização dessas condições para o pré-tratamento de BB pode garantir uma melhor utilização da fração líquida para produção de biogás.

O fluxograma do presente estudo, para o planejamento 1, está representado de forma esquemática na Figura 18.

**Figura 18.** Fluxograma esquemático das etapas do procedimento experimental para o 1º planeamento.



Fonte: Autora

#### 4.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento

##### 4.4.1 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado em triplicata pelo analisador de umidade (OHAUS® MB23) (Figura 19). Pesou-se cerca de 1,0 g da amostra na balança termogravimétrica e 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 resultado do teor de umidade é expresso em %.

**Figura 19.** Analisador de umidade



Fonte: Autora

#### 4.4.2 Teor de extrativos

##### a) Determinação do teor de extrativos solúveis em água

Pesou-se 5,0 g de amostra e foi submetida a uma extração em um extrator soxhlet utilizando-se 150,0 mL de água destilada por um período de 50 horas, conforme norma TAPPI T204 cm-97 modificada.

Este procedimento foi realizado em triplicata e o teor de extrativos solúveis em água quente foi determinado com base na diferença em massa da amostra seca antes e depois do processo de extração (equação 15).

$$\text{Teor de extrativos (\%)} = ((ma - md)/ma) \times 100 \quad \text{eq. (15)}$$

Onde:

$ma$  = a massa(g) de amostra antes da extração.

$md$  = a massa (g) de amostra seca após a extração.

O teor de extrativos foi corrigido de acordo com o teor de umidade, através da equação 16.

$$\text{Teor de extrativos (\%) Corrigido} = TE \times (100-TU)/100 \quad \text{eq. (16)}$$

Onde,

TE= teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

## **b) Determinação do teor de extrativos solúveis em ciclohexano/etanol**

A presença dos extrativos na fibra lignocelulósica pode tornar o processo de hidrólise incompleta, pois estes compostos podem reduzir o acesso à celulose e hemiceluloses. Valores altos de extrativos podem interferir na análise de quantificação da lignina, prejudicando uma caracterização mais precisa dos resíduos lignocelulósicos (RODRIGUES, 2016).

Pesou-se 5,0 g de amostra que foi submetida a uma extração em água, descrito no item 4.4.2 (a) e colocou-se em cartucho de papel de filtro para extração em um extrator Soxhlet, utilizando-se 150,0 mL de uma mistura de ciclohexano/etanol (1:1, v/v) por um período de 50 horas, conforme norma TAPPI T204 cm-97 modificada.

Após esse período, o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 12 horas. Este procedimento foi realizado a fim de remover os extrativos solúveis nesta mistura de solventes, em triplicatas. O conteúdo de extrativos solúveis foi determinado através da diferença de massa da amostra seca antes e após o processo de extração (equação 17).

$$\text{Teor de extrativos (\%)} = ((ma - md)/ma) \times 100 \quad \text{eq. (17)}$$

Onde:

$ma$  = a massa(g) de amostra antes da extração.

$md$  = a massa (g) de amostra seca após a extração.

O teor de extrativos foi corrigido de acordo com o teor de umidade, através da equação 18.

$$\text{Teor de extrativos (\%) Corrigido} = TE \times (100-TU)/100 \quad \text{eq. (18)}$$

Onde,

TC= teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

O teor de extrativos totais resulta na soma do teor de extrativos solúveis em água com teor de extrativos solúveis em ciclohexano/etanol.

#### 4.4.3 Teor de cinzas

As cinzas são os produtos inorgânicos oxidados resultantes da combustão dos componentes orgânicos. O teor de cinzas de uma biomassa afeta tanto a manipulação e os custos de processamento da conversão global de energia da biomassa. A energia do combustível é reduzida em proporção à magnitude do teor de cinzas (ARANTES, 2014).

O teor de cinzas do bagaço foi determinado pelo teor de resíduos resultantes da queima completa do bagaço conforme norma TAPPI T211 om-93 modificada, no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do Instituto de Física (LNMIS- UFU).

Cerca de 1,0 g de bagaço é adicionado em um cadinho de porcelana de massa conhecida. Este cadinho foi levado em mufla, marca Jung®, a uma temperatura de 800°C por um período de 2 horas. Posteriormente, o sistema (cadinho e amostra calcinada) foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. O teor de cinzas foi determinado considerando a percentagem de massa do resíduo (após calcinação) com relação à massa inicial de amostra seca, segundo a equação 19. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = (mf / mi) \times 100 \quad \text{eq. (19)}$$

Onde,

$mf$  = a massa final (após a calcinação)

$mi$  = a massa inicial de amostra livre de umidade.

O teor de cinzas foi corrigido de acordo com o teor de extrativos e umidade, através da equação 20.

$$\text{Teor de Cinzas (\%) Corrigido} = TC \times (100 - (TE + TU)) / 100 \quad \text{eq. (20)}$$

Onde,

TC = Teor de cinzas (%)

TE = teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

#### 4.4.4 Teor de lignina

A determinação do teor de lignina Klason insolúvel foi realizada seguindo a norma TAPPI T222 om-98 modificada. Pesou-se cerca de 1,0 g de amostra seca e transferiu-se para um almofariz com 15,0 mL de ácido sulfúrico 72% (d=1,6389 g/mL). Esta mistura foi macerada cuidadosamente até obter-se um máximo de desfibramento e deixou-se a reação prosseguir por 2 horas. Após esse período, transferiu-se a mistura para um balão de 1,0 L, completou-se o volume até 0,560 L com água destilada e aqueceu-se sob refluxo por 4 horas.

Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em um funil de vidro sinterizado nº 4, previamente seco a 105 °C e tarado. O filtrado foi armazenado para análise de lignina Klason solúvel por espectroscopia na região do ultravioleta.

Secou-se o funil com a lignina insolúvel em estufa a 105°C por 12 horas. Resfriou-se em dessecador até obtenção de massa constante e pesou-se. A porcentagem de lignina Klason insolúvel foi determinada pela equação 21.

$$\text{Teor de lignina insolúvel (\%)} = (ma / mb) \times 100 \quad \text{eq. (21)}$$

Onde:

$ma$  = massa (g) de lignina Klason insolúvel seca.

$mb$  = massa (g) de bagaço inicial seco.

O teor de lignina insolúvel foi corrigido de acordo com o teor de extrativos e umidade, através da equação 22.

$$\text{Teor de Lignina (\%) Corrigido} = TL \times (100 - (TE + TU)) / 100 \quad \text{eq. (22)}$$

Onde,

TL = Teor de lignina insolúvel (%)

TE = teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

A quantidade de lignina solubilizada em meio ácido foi analisada através da espectroscopia na região do ultravioleta de acordo a norma TAPPI T13M-54

modificada. As soluções para as análises foram preparadas tomando o filtrado da etapa anterior e diluindo-o com água até concentração final de ácido sulfúrico de 0,05 mol/L. Preparou-se uma solução de referência, a partir do ácido sulfúrico 72%, de concentração de 0,05 mol/L. Foram feitas medidas de absorvância do filtrado nos comprimentos de onda de 280 nm e 215 nm. A concentração (g/L) de lignina Klason solúvel foi calculada pela seguinte equação 23.

$$C(g/L) = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \quad \text{eq. (23)}$$

Onde:

$C(g/L)$  = concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido.

$A_{215}$  = valor da absorvância a 215nm.

$A_{280}$  = valor da absorvância a 280nm.

A equação 23 aplica os princípios da lei de Lambert-Beer. Os dois valores de absorvância refletem a necessidade de se fazer uma correção para os compostos de furfural gerados durante a hidrólise, que interferem na medida do teor de lignina Klason solúvel. A absorvância em 280 nm é uma correção para os compostos de furfural e em 215 nm é uma medida da concentração de lignina solúvel, como mostram as equações A e B respectivamente:

$$A_{280} + 0,68 C_D + 18 C_L \quad (\text{A})$$

$$A_{215} + 0,15 C_D + 70 C_L \quad (\text{B})$$

Onde:

$A_{280}$  = valor da absorvância a 280 nm

$A_{215}$  = valor da absorvância a 215 nm

$C_D$  = concentração dos carboidratos (g. L<sup>-1</sup>)

$C_L$  = concentração da lignina solúvel (g. L<sup>-1</sup>)

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

O teor de lignina solúvel foi corrigido de acordo com o teor de extrativos e umidade, através da equação 24.

$$\text{Teor de Lignina (\% Corrigido)} = \text{TLS} \times (100 - (\text{TE} + \text{TU})) / 100 \quad \text{eq. (24)}$$

Onde,

TLS= Teor de lignina solúvel (%)

TE = teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

Os valores dos constituintes presentes na biomassa foram corrigidos em relação ao volume e diluição para a realização da caracterização de lignina Klason insolúvel e solúvel.

#### 4.4.5 Teor de holocelulose

A holocelulose é o produto resultante da extração da lignina e é constituída por celulose e hemiceluloses. Nesse trabalho, a holocelulose foi determinada pelo processo de deslignificação que utiliza o clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) e está baseado na reação entre lignina e  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{ClO}^-$ , produtos estes formados em reações redox de  $\text{ClO}_2^-$  em meio ácido segundo a equação:



O procedimento para obtenção da holocelulose foi realizado em triplicata pelo método do clorito ácido como descrito por Browning (BROWNING, 1967). Uma massa de 5,0 g de amostra seca foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL com 100,0 mL de água destilada. O erlenmeyer foi colocado em banho-maria, a 75°C e adicionados 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o erlenmeyer para evitar a perda do gás produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio. Esse processo foi feito em triplicata.

A mistura foi então resfriada a 10°C, filtrada em funil de vidro sinterizado n° 2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5°C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água utilizada

na lavagem (em torno de 7 - 8). Em seguida, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105°C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o rendimento da holocelulose. O percentual de holocelulose foi calculado pela relação entre a massa de holocelulose obtida e a massa inicial da amostra (equação 26).

$$\text{Teor de Holocelulose (\%)} = (md/mi) \times 100 \quad \text{eq. (26)}$$

Onde:

$md$  = massa (g) de holocelulose seca.

$mi$  = massa (g) de bagaço inicial seco.

O teor de holocelulose foi corrigido de acordo com o teor de extrativos e umidade, através da equação 27.

$$\text{Teor de holocelulose (\%) Corrigido} = TH \times (100-(TE+TU))/100 \quad \text{eq. (27)}$$

Onde,

TH= Teor de holocelulose (%)

TE = teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

#### 4.4.6 Teores de celulose e hemiceluloses

A celulose distingue-se analiticamente das hemiceluloses pela sua insolubilidade em soluções alcalinas aquosas. A extração sucessiva da holocelulose (preparada pelo método do clorito ácido) com hidróxido de potássio (KOH) 5 e 24 % resulta em valores que, somados, representam a fração de hemiceluloses. Logo, o resíduo fibroso, após as duas extrações é designado celulose (BROWNING, 1967).

Transferiu-se 3,0 g de holocelulose seca para um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100,0 mL de solução de KOH (5 %) e fez-se uma atmosfera inerte pelo borbulhamento de gás nitrogênio, durante os cinco minutos iniciais da extração para evitar a oxidação da celulose. O erlenmeyer foi vedado e mantido em agitação constante por 2 horas. A mistura foi então filtrada em funil de vidro sinterizado n° 2, lavada com 50,0 mL de solução de KOH (5 %) e em seguida com 100,0 mL de água destilada.

O resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o erlenmeyer de 250,0 mL. O mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH (24 %). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25,0 mL de solução de KOH (24%), 50,0 mL de água destilada, 25,0 mL de ácido acético (10 %) e 100,0 mL de água destilada, respectivamente. Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de hidróxido de potássio, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. O resíduo foi então lavado com 50,0 mL de acetona, seco a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 6 horas, e pesado. O conteúdo de celulose foi determinado como a percentagem da massa de resíduo em relação à massa inicial de amostra seca, levando em consideração o rendimento calculado na obtenção da holocelulose (equação 28).

$$\text{Teor de celulose (\%)} = (md/mi) \times 100 \quad \text{eq. (28)}$$

Onde:

$md$  = massa (g) de celulose seca.

$mi$  = massa (g) de holocelulose inicial seca.

O teor de celulose foi corrigido de acordo com o teor de extrativos e umidade, através da equação 29.

$$\text{Teor de celulose (\%)} \text{ Corrigido} = (\text{TH} \times \text{TCE})/100 \quad \text{eq. (29)}$$

Onde,

TH = teor de holocelulose (%)

TCE= Teor de celulose (%)

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a percentagem da diferença entre os teores de holocelulose e celulose em relação à massa inicial de amostra seca (equação 30), considerando o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

$$\text{Teor de hemiceluloses (\%)} \text{ Corrigido} = \text{TH}_{\text{corrigido}} - \text{TCE}_{\text{corrigido}} \quad \text{eq. (30)}$$

Onde,

$TH_{\text{corrigido}}$  = teor de holocelulose corrigido (%)

$TCE_{\text{corrigido}}$  = Teor de celulose corrigido (%)

#### 4.4.7 Rendimento, deslignificação , balanço de massa e perda de massa

a) O cálculo de rendimento do processo de pré-tratamento foi calculado em relação à massa final da biomassa após o pré-tratamento (base seca) e a massa inicial da biomassa *in natura*, conforme equação 31. Todas as caracterizações foram corrigidas conforme o rendimento.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100 \quad \text{eq. (31)}$$

Onde,

$mf$  = massa final (g) obtida após o pré-tratamento organossolve

$mi$  = massa inicial (g) antes do pré-tratamento

b) As amostras pré-tratadas obtidas foram submetidas à análise do teor de lignina residual pelo método Klason conforme descrito no item 4.4.4. A extensão de deslignificação é determinada pelo emprego da equação 32.

$$\text{Deslignificação (\%)} = \frac{LK_b - [(LK_{pt} \times R) / 100]}{LK_b} \times 100 \quad \text{eq. (32)}$$

Onde:

$LK_b$  = Lignina Klason do bagaço (%)

$LK_{pt}$  = Lignina Klason da bagaço pré-tratado (%)

$R$  = Rendimento do processo de pré-tratamento (%)

c) Balanço de massa foi calculado através da equação 33:

$$\text{Balanço de massa (\%)} = TC_t + TH_t + TL_t \quad \text{eq. (33)}$$

Onde,

$TC_t =$  Teor de celulose total (%)

$TH_t =$  Teor de hemiceluloses total (%)

$TL_t =$  Teor de lignina total (%)

d) a perda de massa foi calculada através da equação 34:

$$PM (\%) = 100 - [(m_f \times 100)/m_i] \quad \text{eq. (34)}$$

Onde,

PM = perda de massa (%)

$m_f$  = massa da amostra final (g)

$m_i$  = massa da amostra inicial (g)

#### 4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise da superfície das amostras, sem tratamento e pré-tratadas, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura modelo Carl Zeiss® EVO 10 MA, Laboratório multiusuário de microscopia da Faculdade de Engenharia Química (UFU). As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita de carbono e metalizadas com ouro. As imagens de MEV foram obtidas com ampliações de 350x, 500x e 1000x, e tensão de aceleração de 5.0 kV.

#### 4.6 Difração de Raios-X (DRX)

As análises de difração de raios-x da biomassa, *in natura* e pré-tratada, foram realizadas em um difratômetro Shimadzu® LabX XRD-6000, operando a uma potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA e radiação de Cu K $\alpha$  (1,5406 Å), com intervalo de 2 $\theta$  de 5 a 40° e velocidade de varredura de 2°/min. Para esta análise, as amostras foram secas a 50 °C durante 12 horas em uma estufa. A análise foi feita no laboratório multiusuário da Química (UFU).

O índice de cristalinidade (IC) das amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram determinados de acordo com o método de Segal *et al.*, 1959, através da medida do pico em 2 $\theta \equiv 22^\circ$  e do halo em 2 $\theta \equiv 18^\circ$ , como mostra a equação 35.

$$IC = ((I_{200} - I_{AM})/I_{200}) \times 100 \quad \text{eq. (35)}$$

Onde:

$I_{200}$  é a intensidade de difração máxima em unidades arbitrárias do plano 200, no pico cristalino à aproximadamente  $2\theta \equiv 22^\circ$  e representa as regiões cristalinas e amorfas da celulose tipo I.

$I_{AM}$  é a intensidade de difração em difração em  $2\theta \equiv 18^\circ$ , representa apenas a parte amorfa.

#### 4.7 Ensaio de hidrólise enzimática

Após os diferentes pré-tratamentos aplicados nos resíduos lignocelulósicos, os mesmos foram utilizados em processos de hidrólise enzimática. Para tanto, foi utilizada enzima comercial Cellic® CTec 3 (Novozymes®). Espera-se com esses processos enzimáticos a liberação de açúcares fermentescíveis.

Os parâmetros operacionais do processo de hidrólise foram definidos de acordo com as recomendações descritas na ficha técnica do complexo enzimático de celulases e hemicelulases, Cellic® CTec 3 (NOVOZYMES, 2012).

Cellic® CTec3 é um cocktail multi-enzima usado na produção de biocombustíveis e é 1,5 vezes melhor do que o melhor produto anterior no mercado, Cellic® CTec 2 da Novozymes (FAQ Cellic® CTec3), dependendo da biomassa e se esta passou pela técnica de pré-tratamento ou não.

A atividade da enzima na solução estoque foi previamente determinada atingindo o valor de 162,92 FPU/mL (*filter paper unit* por unidade volumétrica da solução enzimática). Essa metodologia foi realizada no Laboratório de microbiologia ambiental, Instituto de Ciências Agrárias (LAMIC-UFU).

A razão líquido-sólido aplicada nos ensaios foi de 10:1 (mL.g<sup>-1</sup>), sendo que a massa da fração sólida de 1,0 g. Durante os ensaios a concentração inicial da enzima foi fixada em 8,5 FPU/mL em relação à celulose presente no substrato.

De acordo com Galbe e Zacchi (2010) a dosagem enzimática é elevada no procedimento de avaliação, 25 FPU por grama de substrato ou mesmo maior. A carga enzimática na escala industrial deve ser bem menor.

Inicialmente, biomassa seca peneirada (2 mm) foi umidificada, em frascos erlenmeyers de 50 mL, em 10 mL de tampão de citrato de sódio 50 mM (pH= 4,8) sob agitação em uma incubadora a 150 rpm da marca NOVATECNICA®, mantida a 25°C por 24 horas.

A faixa de condição ótima foi sugerida pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (UIPAC) nos procedimentos padrão para determinar atividades de celulasas (GHOSE, 1987; OLIVEIRA, 2012). Esse órgão sugere condição de pH 4,8 e de temperatura a 50°C para o teste enzimático. Galbe e Zacchi (2010) citam que a atividade máxima ocorre em  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  e em pH 4 a 5.

O complexo enzimático foi adicionado aos frascos reacionais, mantidos sob agitação de 150 rpm, 50°C por 72 hs. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Após as 72h, a hidrólise enzimática foi interrompida, o substrato filtrado e os hidrolisados foram centrifugados (Micro-centrífuga de bancada NI1801 - NOVA®) por 10 min, a 8000 rpm e temperatura de 4°C, possibilitando a separação das frações sólida e líquida. Uma amostra da fração líquida foi coletada para determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART), utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi determinada pelo método do (DNS), com 300  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 300  $\mu\text{L}$  de DNS. O volume final foi fervido por 10 minutos, a reação foi interrompida, imergindo os erlenmeyers em banho de gelo durante 10 min e acrescido de 2400  $\mu\text{L}$  de água destilada. A determinação de ART foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Após esse período, o DNS é reduzido e se liga aos açúcares redutores formando o ácido aldônico e os açúcares oxidados (grupos carboxílicos), que são quantificados em espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm (MALDONADE *et al.*, 2013).

A partir da equação da reta, da determinação da curva-padrão (absorbância x ART), calculou-se a concentração de açúcar redutor (ART) nas amostras (g/L).

Considerou-se nos cálculos as diluições efetuadas nas amostras, multiplicando o resultado por esse fator (MALDONADE *et al.*, 2013).

Paralelamente, as frações líquidas foram filtradas em filtros de nitrocelulose com tamanhos de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e para quantificação dos açúcares (glicose e xilose), submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema Shimadzu HPLC equipado com uma coluna Aminex HPX 87H (300  $\times$  7,8 mm Bio-Rad) mantido a 55°C (Shimadzu, modelo CTO-30A) usando um detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-6A) para açúcar e um detector UV-VIS (Shimadzu SPD-

10AV) ajustado nos comprimentos de onda de 210 nm e 274 nm para ácidos orgânicos e produtos de degradação de açúcar, respectivamente. O ácido sulfúrico (5 mmol L<sup>-1</sup>) foi utilizado como eluente com vazão de 0,6 mL/min (ADARME *et al.*, 2017; LIMA, 2018). A quantificação de açúcares foi realizado no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP).

A perda de massa (PM) do processo de hidrólise enzimática foi calculada em relação à massa final da biomassa após o pré-tratamento (base seca) e a massa inicial da biomassa *in natura*, conforme equação 36.

$$PM (\%) = 100 - \left[ \frac{mf \times 100}{mi} \right] \quad \text{eq. (36)}$$

Onde:

PM = perda de massa (%)

mf = massa final da amostra (g)

mi = massa inicial da amostra (g)

Os resíduos da hidrólise foram separados para posterior quantificação de massa residual e teste do poder calorífico. A conversão enzimática de celulose (OLIVEIRA, 2012; WOLF, 2011) foi calculada pela equação 37 a seguir:

$$CC = \frac{m_{glicose} \times f_h}{m_{inicial} \times \gamma_i} \times 100 \quad \text{eq. (37)}$$

Onde:

CC = conversão enzimática da celulose (%)

m<sub>glicose</sub> = massa de glicose presente no hidrolisado (g)

m<sub>inicial</sub> = massa seca de material lignocelulósico (g)

γ<sub>i</sub> = teor de celulose no material lignocelulósico

f<sub>h</sub> = fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9)

A otimização das condições para o pré-tratamento de BB juntamente com a hidrólise enzimática pode garantir uma melhor utilização da fração líquida para produção de biogás.

#### 4.8 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO

O resultado desta medida é expressa em g/l de oxigênio, que é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente todos os compostos orgânicos, a água e o dióxido de carbono.

A concentração de DQO depende predominantemente da matéria-prima utilizada (LI *et al.*, 2011; RAPOSO *et al.*, 2011) e indica o nível da alimentação de solubilização (material dissolvido) que afeta diretamente a produção de biogás (RAZAVIARANI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2011; SCHIEVANO *et al.*, 2009).

As análises de DQO foram realizadas (no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP)) fundamentadas no método colorimétrico de refluxo fechado, como descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/ WEF, 2005; UNE 77004, 2002; LIMA, 2018).

Foi realizado DQO da fração líquida após o pré-tratamento da melhor condição (amostra 6) para a produção de biogás.

#### **4.9 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)**

Realizou-se SSV do inoculo anaeróbico, parâmetro importante para predizer a qualidade da matéria orgânica (SCHIEVANO *et al.*, 2009; RAPOSO *et al.*, 2011; NARTKER *et al.*, 2014), de acordo com a norma de Standard Methods (method 2540 B, method 2540 E, method 2540 F) (KNAPIK, 2016; RICE *et al.*, 2012; NORMA TÉCNICA INTERNA SAPESP, 1999), na qual prescreve os meios de determinação de sólidos, aplicável em água potável, superficiais, salinas, bem como esgoto doméstico, industrial e sedimentos. Esta determinação foi realizada no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP).

#### **4.10 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos**

Para a quantificação da produção do biogás, utilizou-se o método baseado na DQO removida, com a correção da temperatura e da pressão, nas Condições Normais de Temperatura e Pressão – CNTP (273,15 K e 101,315 Pa), a partir da degradação de açúcares. Como açúcares são totalmente biodegradáveis e a DQO mede exatamente a fração biodegradável do efluente, pode-se adotar a mesma relação para a produção de biogás em termos de DQO (PRADO *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2014).

Os testes de digestão anaeróbia (DA), foram utilizados como substrato o resíduo do pré-tratamento do bagaço de cana, fração líquida (DA-L) e a fração sólida (DA-S), resultante da hidrólise enzimática do bagaço de cana, baseando-se nos estudos de Baêta (2016), Baêta *et al.* (2016), Adarme *et al.* (2017) e Lima (2018) . Os ensaios foram realizados em duplicatas e no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP).

Um teste controle (branco), sem substrato, também foi incluído nos ensaios para verificar a atividade de degradação anaeróbica da matéria orgânica biodegradável do inóculo. Todos os experimentos foram realizados em condições mesofílicas em reatores de vidro de 120 mL, vedados com tampas de borracha, que foram incubados a  $35,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm em shaker (Incubadora Shaker SL221) pelo tempo necessário ao encerramento da produção de biogás. O volume de trabalho foi de 60 mL, sendo 60% dedicados ao *head space*.

O inóculo anaeróbico usado para os testes de produção de biogás foi obtido a partir de um reator UABB alimentado com esgoto sanitário bruto operado em escala de demonstração no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG-COPASA, na estação Arrudas, Belo Horizonte, MG. O inóculo foi previamente incubado por quatro dias a  $35^{\circ}\text{C}$  para eliminar a produção de metano a partir da biodegradação de qualquer material orgânico residual. Para o sólido, o inóculo foi concentrado com o mínimo de água.

Conforme, Baêta (2016), 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, visto que, na grande maioria das vezes, a fração sólida é submetida à 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 2ª geração.

Assim sendo, uma amostra do hidrolisado residual (fração líquida) (DA-L) da etapa de pré-tratamento (6,0 mL) foi adicionada aos frascos de vidro para manter uma razão substrato/micro-organismo de 0,4 gDQO/gSSV. Cada frasco continha volumes variados de inóculo dependendo da concentração de DQO no hidrolisado.

Os ensaios de DA-S foram realizados com o bagaço residual (~5,0 g) da etapa de hidrólise enzimática. Nesses ensaios foi mantido um teor de sólidos totais (ST) de aproximadamente 15% e uma relação substrato/micro-organismos de 4gSV/gSV. Alguns pesquisadores sugerem a utilização da razão inóculo/substrato (I/S)  $\geq 2$  com base na quantidade de sólidos voláteis para avaliar a produção de biogás em misturas contendo lodo de esgoto (RAPOSO *et al.*, 2011; NARTKER *et al.*, 2014; JENSEN *et al.*, 2014).

Em cada experimento, adicionou-se uma solução contendo bicarbonato de sódio (tampão) e micro- e macronutrientes (solução estoque de 5,0 g/L) (FANGKUM; REUNGSANG, 2011; LIMA 2018). A concentração destes compostos foram de 20000 mg/L em relação SSV e DQO.

Para completar o volume de 60 mL, adicionou-se água destilada e o pH inicial em cada frasco reator foi mantido em 7 – 8 (RAPOSO *et al.*, 2011) adicionando gotas de solução básicas ou ácidas, quando necessário.

A comparação entre DA-S e DA-L indica que a DA-L geralmente tem uma maior taxa de reação e tempos menores 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 (BAÊTA, 2016) e serviu para nortear e comparar com 2º planejamento.

#### **4.11 Monitoramento do biogás**

Destaca-se que para o planejamento experimental apresentado na Tabela 4, foram criadas superfícies de respostas para variáveis estudadas: eficiência de deslignificação, teor de celulose, teor de hemiceluloses e rendimento de hidrólise enzimática. Em função dessas otimizações foi feito o biogás (somente da fração líquida) da melhor condição do planejamento 1.

A produção de biogás foi monitorada, diariamente (duração, média, de 51 dias), no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP), por meio da aferição da pressão (Manometer®, modelo PM-9100HA) dos frascos.

Com base nos valores de produção de gás, o volume de biogás acumulado (mL) foi normalizado considerando as CNTP, conforme definido pela IUPAC (União

Internacional de Química Pura Aplicada), sendo, então, obtido expresso em NmL (volume acumulado de biogás) e NmLbiogás/gDQOsubstrato (volume acumulado de biogás por DQO adicionada).

Os testes foram finalizados quando a produção diária de gás foi menor que 1% de sua acumulação total.

#### **4.12 Determinação de Poder calorífico**

Segundo Pessoa Filho (2013), o poder calorífico é a propriedade mais importante na avaliação energética de um combustível, pois fornece a quantidade de energia bruta do mesmo (ARANTES, 2014).

O valor do poder calorífico foi obtido experimentalmente através da análise da biomassa utilizando, como equipamento, uma bomba calorimétrica. Tal equipamento é destinado a medir variações energéticas onde ocorrem alterações de temperatura e/ou transferências de calor para o ambiente (ARANTES, 2014).

A determinação do poder calorífico superior (PCS) das amostras (BB *in natura* e após a hidrólise enzimática e da amostra ótima (amostra 6)) foi obtida experimentalmente, seguindo o manual do calorímetro, através da bomba calorimétrica marca PARR 6400 Calorimeter, por meio da metodologia estabelecida no Compendio Brasileiro de Alimentação Animal/2013, realizada pela Labornutri Análises Bromatológicas, situado na cidade de Uberlândia (MG). Em um cadinho de metal, foi colocado em torno de 0,5 g da amostra e o mesmo foi introduzido no equipamento para a realização da análise. A determinação do PCS foi realizada em triplicata e utilizando como resultado a média dos valores.

Essa análise pode nos dar o potencial energético do bagaço de cana-de-açúcar na forma bruta e após a hidrólise enzimática, assim como da amostra ótima após a hidrólise enzimática, porque a co-geração pode ser uma fonte favorável de produção de energia para fins comerciais e até mesmo para consumo interno das próprias usinas e uma forma de aproveitar toda a biomassa.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÕES DO PLANEJAMENTO 1**

### **5.1 Pré-tratamento e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar**

A razão sólido-solução ácida e a umidade da biomassa são variáveis que devem ser levadas em consideração durante o processo de pré-tratamento. 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 (BAÊTA, 2016; RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

O ácido diluído, de acordo com a literatura e já mencionado, é um dos principais métodos de pré-tratamento utilizados na desconstrução da biomassa, por ser identificado como uma etapa limite, apresentando um gargalo técnico e econômico, devido à estrutura complexa e recalcitrante das paredes celulares da planta lignocelulósica (ADANI *et al.*, 2011; PAPA *et al.*, 2015; BRIENZO *et al.*, 2017). O alvo deste método é a solubilização de hemiceluloses e lignina deixando o material pré-tratado poroso, enriquecido com celulose adequado para ação enzimática. Durante este processo, as ligações de lignina molecular também podem ser quebradas, seguido de condensação radical e precipitação na superfície da fibra. A modificação da lignina permite ainda uma melhor ação enzimática e adsorção catalítica à celulose, aumentando assim a acessibilidade da celulose (BRIENZO *et al.*, 2017; PAPA *et al.*, 2015).

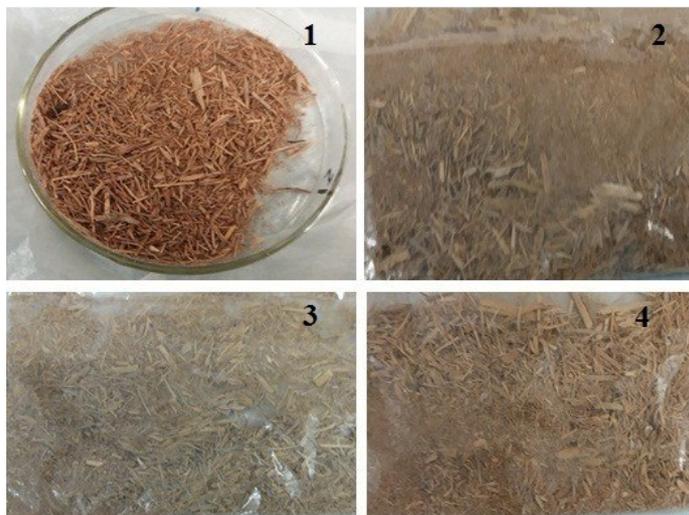
Inúmeras abordagens de pré-tratamento têm sido investigadas ao longo dos anos e são necessárias novas descobertas para minimizar custos e aumentar a sustentabilidade em termos de eficiência energética. É necessário investigar se os processos combinados poderiam melhorar significativamente a eficiência da produção de energia (MARTIN *et al.*, 2014; DERERIE *et al.*, 2011; RABELO *et al.*, 2011) e reduzir os custos do pré-tratamento de biomassa (PAPA *et al.*, 2015). Diversos estudos sugerem diferentes biomassas, pré-tratamentos, temperaturas e tempos, como opções a serem usadas, porém a quantidade de energia, eficiência e custos são aspectos importantes a serem considerados.

Diante disso, nesta etapa, os experimentos foram planejados para estudar os efeitos do tempo de reação e porcentagem de solução de ácido cítrico, seguindo o planejamento fatorial mostrado na Tabela 4, do item 4.2.

Algumas amostras de bagaços de cana pré-tratados (amostras 2, 4 e 9) apresentaram uma coloração mais escura quando comparados ao bagaço *in natura* (Figura 20). De acordo com Curreli *et al.* (2002) o escurecimento da biomassa tratada com ácido pode ser proveniente da formação de produtos de degradação da celulose e hemiceluloses e/ou da catálise ácida das ligações entre a lignina e os carboidratos.

Håseth (2012) atribuiu o escurecimento da biomassa tratada com líquidos iônicos à condensação da lignina.

**Figura 20.** Bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados



**Fonte:** Autora. (1 - Bagaço de cana *in natura*; 2 - bagaço pré-tratado: amostra 2; 3 - bagaço pré-tratado: amostra 4; 4 - bagaço pré-tratado: amostra 9).

As caracterizações do bagaço bruto e das amostras pré-tratadas estão descritas na Tabela 5.

Os valores encontrados experimentalmente para o bagaço *in natura* encontram-se próximos da faixa de valores descritos na literatura, visto que esta faixa é relativamente ampla e que os valores são fundamentalmente dependentes, por exemplo, da localização geográfica das plantas ou mesmo do tempo de cultivo (PASQUINI, 2004).

De acordo com os valores citados na literatura, representados na Tabela 1, os teores de lignina, celulose, extrativos e cinzas encontram-se dentro da faixa reportada para materiais lignocelulósicos. Somente a hemiceluloses que apresentou valor um pouco a baixo das mencionadas.

**Tabela 5.** Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com ácido cítrico.

<b>Amostra/Teste *</b>	<b>BB</b>	<b>1</b>	<b>1. 1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Tempo (min)</b>	-----	60	60	30	30	60	90	102,43	90	60	17,57
<b>Concentração (%)</b>	-----	6,0	6,0	2,0	10,0	0,35	2,0	6,0	10,0	11,65	6,0
<b>Rendimento (%)</b>	100,0	86,20	84,40	86,65	84,98	85,63	86,84	84,99	83,76	84,10	87,71
<b>Umidade (%)</b>	3,75 ± 0,27	3,92 ± 0,04	3,62 ± 0,33	1,93 ± 0,17	2,69 ± 0,27	2,78 ± 0,21	3,79 ± 0,15	3,12 ± 0,12	3,94 ± 0,26	3,82 ± 0,16	4,02 ± 0,09
<b>Extrativos Totais (%) <sup>1</sup></b>	8,62 ± 1,90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>Total lignina (%)</b>	22,25 ± 1,83	24,88 ± 0,91	23,29 ± 0,42	24,14 ± 0,01	24,49 ± 0,69	22,71 ± 0,36	24,07 ± 0,33	22,65 ± 1,03	23,20 ± 0,12	23,67 ± 0,11	24,10 ± 0,78
<b>Celulose (%)</b>	39,84 ± 1,28	36,89 ± 1,60	35,57 ± 1,14	34,31 ± 2,73	33,04 ± 0,14	32,63 ± 1,05	24,96 ± 0,80	35,43 ± 1,54	34,83 ± 1,12	36,06 ± 1,56	24,28 ± 1,05
<b>Hemiceluloses (%)</b>	17,19 ± 0,97	16,42 ± 1,38	14,67 ± 1,23	18,41 ± 5,21	16,30 ± 1,12	17,57 ± 0,93	27,27 ± 1,54	18,25 ± 1,03	15,16 ± 1,27	13,57 ± 1,14	14,23 ± 1,19
<b>Cinzas (%) <sup>1</sup></b>	4,54 ± 1,91	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>Balanco de massa (%)</b>	96,20	78,19	73,54	78,80	73,82	72,91	76,30	76,33	73,20	73,29	62,60

\* Considerando o rendimento e umidade no pré-tratamento.

<sup>1</sup> Não foi feito para os pré-tratamentos.

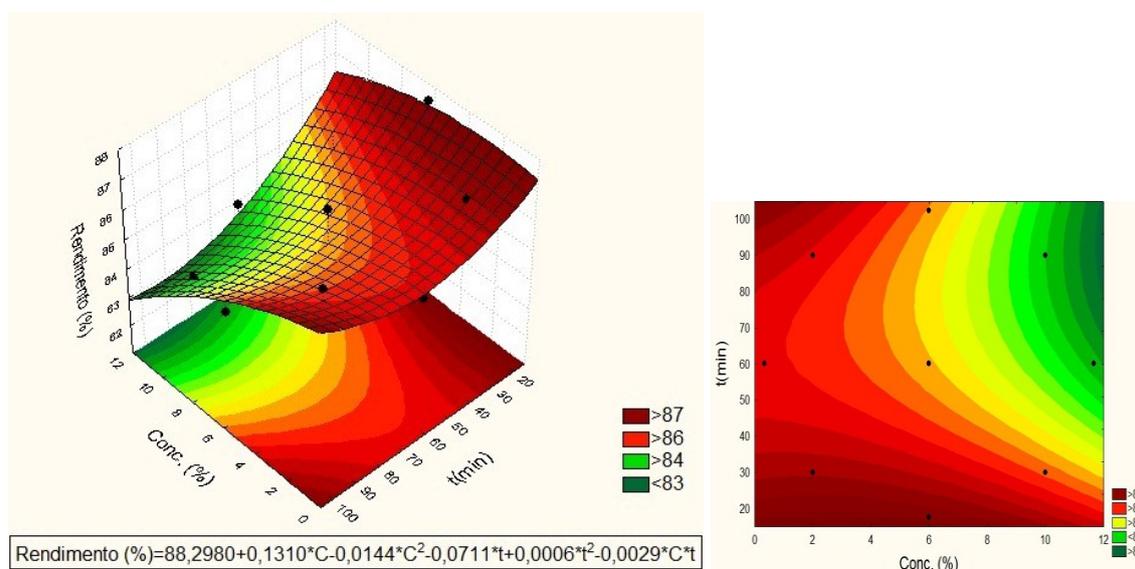
**Fonte:** Autora

Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e OriginPro 8®.

Através da análise dos dados mostrados na Tabela 5, Figuras 21 e 22, permite realizar uma comparação em relação ao rendimento com o planejamento experimental proposto.

Os menores valores de rendimentos (na faixa de 83 – 84%) alcançados, atribuídos às condições do meio reacional, foram para as concentrações acima de 10% e tempos acima de 60 min. O pré-tratamento ácido ocasiona altas taxas de rendimento (ZABED et al., 2016; AGBOR et al., 2011)

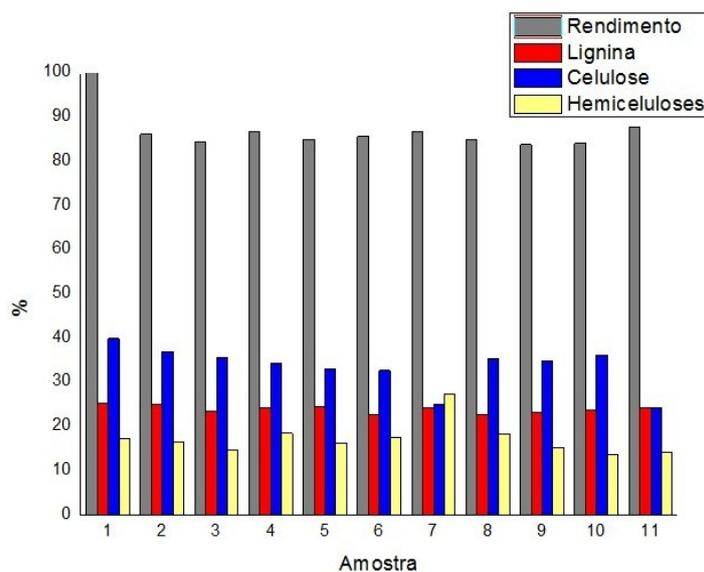
**Figura 21.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com rendimento (%), após o pré-tratamento.



Fonte: Autora

As amostras 9 (17,57 min; 6,0%), 5 (90 min; 2,0%), 2 (30 min; 2,0%), 1 (60 min; 6,0%) e 4 (60 min; 0,35%), apresentaram os maiores resultados de rendimento, em massa seca, de 87,71; 86,84; 86,65; 86,2 e 85,63%, respectivamente. Os maiores valores de rendimento alcançados foram para as concentrações inferiores a 6,0% e independentemente do tempo, tornando-se um ponto positivo para o uso de baixas concentrações de reagentes e reduzindo os custos do processo.

**Figura 22.** Variações dos valores de rendimento, lignina, celulose e hemiceluloses das amostras pré-tratadas.



**Fonte:** Autora (1- Bagaço *in natura*; 2- amostra 1; 3- amostra 1.1; 4- amostra 2; 5- amostra 3; 6- amostra 4; 7- amostra 5; 8- amostra 6; 9- amostra 7; 10- amostra 8; 11- amostra 9).

Com o aumento da concentração, as variações nos valores de lignina, não seguem uma ordem crescente ou decrescente. Inclusive, os valores são maiores em relação ao bagaço de cana bruto. De forma semelhante, os resultados de celulose e hemiceluloses não há correspondência direta com a concentração.

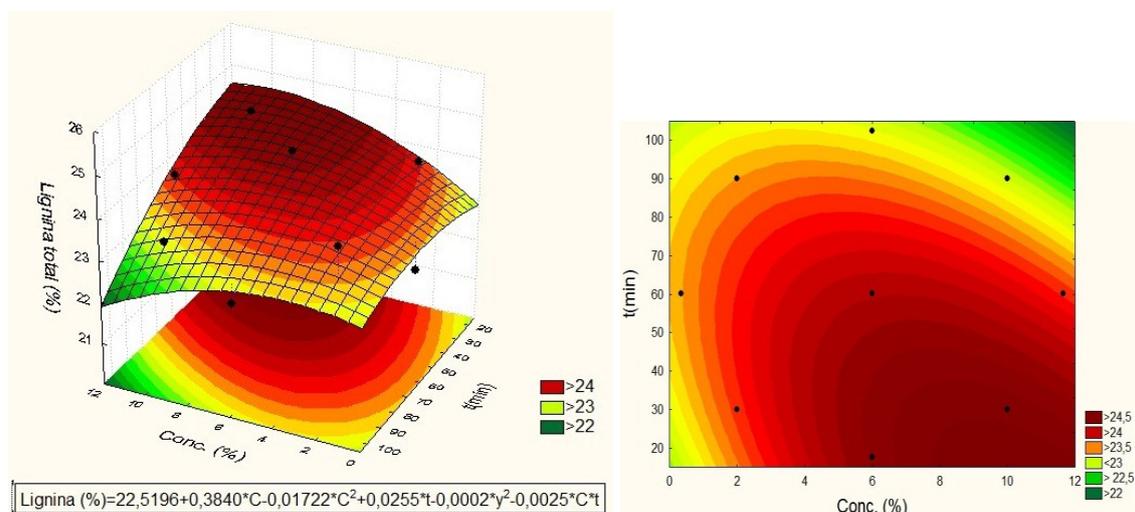
A correlação do tempo com a quantidade de lignina percebe-se que em tempos menores, os valores permanecem constantes (faixa de 24 %). Entre os tempos intermediários (60 min) propicia o aumento (faixa de 22 a 25%), porém não significativo. Acima de 90 min, os valores são variáveis. No caso da celulose, até 30 min, os valores aumentam. Variam, em ordem crescente (32 a 37%), no tempo central (60 min) e (25 a 35%) nos tempos acima de 90 min. No caso de hemiceluloses, aumentam nos tempos reduzidos e nos tempos de 60 min. Em tempos elevados, não segue uma linearidade.

Durante o processo de pré-tratamento com ácido diluído, as ligações na lignina e na 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 e 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 (BÂETA, 2016; FANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008).

Dessa forma, dentro do planejamento estudado e baseando-se na Figura 23, observou-se que para concentrações altas e para maiores tempos, resultou-se em menores valores de lignina.

**Figura 23.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com lignina.



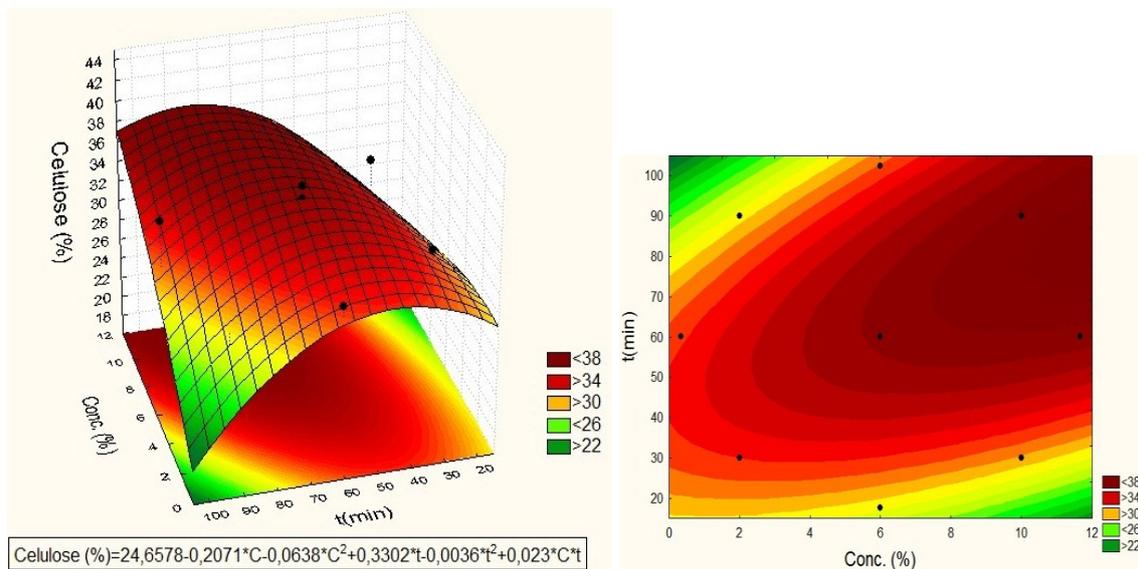
Fonte: Autora

Embora nem todos os pré-tratamentos resultem em deslignificação substancial dos materiais lignocelulósicos, as alterações ocasionadas na lignina podem causar modificações em sua estrutura e melhorias nos resultados de bioconversão. Dessa forma, a biomassa pré-tratada pode se tornar mais digestível via enzimática do que a biomassa *in natura* mesmo se possuir o mesmo teor de lignina, desde que o pré-tratamento empregado não produza compostos inibitórios (AGBOR *et al.*, 2011). Quando o efeito da presença da lignina é minimizado (deslignificação), a acessibilidade à celulose de baixa cristalinidade pelas enzimas celulolíticas torna-se o mais importante fator para alcançar elevadas eficiências de hidrólise enzimática (JEOH *et al.*, 2007; LIMA, 2018).

Analisando as porcentagens de celulose (Figura 24), os valores elevados foram 36,9 % para experimento 1 (6,0% e 60 min), 36,0 %, para o experimento 8 (11,65% e

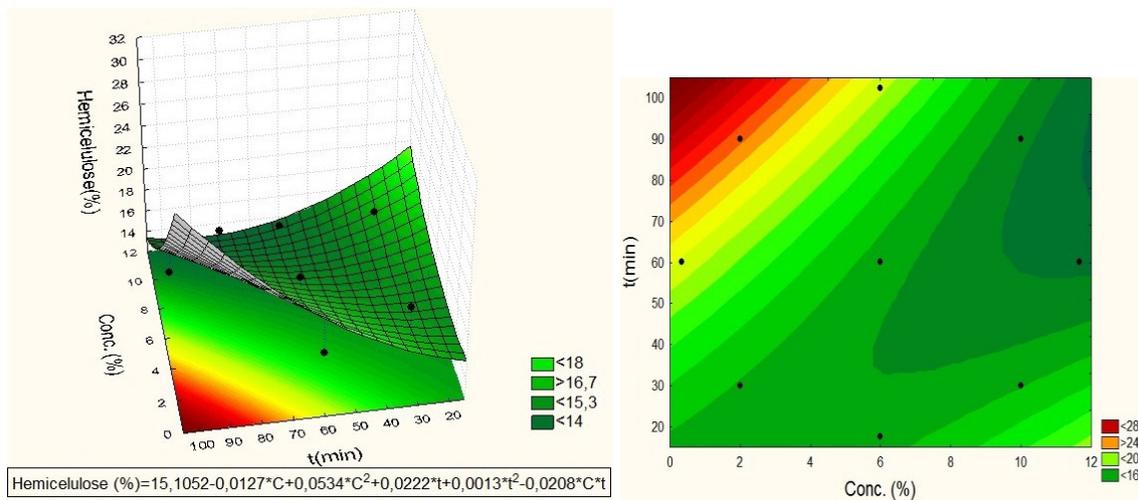
60 min) e 35,6 % para o experimento 1.1 (6,0% e 60 min). Isto é, os maiores valores de celulose derivaram de concentrações acima de 6,0% e tempos superiores a 60 min.

**Figura 24.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com celulose.



Fonte: Autora

**Figura 25.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com hemiceluloses (%).



Fonte: Autora

Os experimentos 8 (11,65% e 60 min), 9 (6,0 % e 17,57 min) e 1.1 (6,0 % e 60 min) mostram melhores condições para valores reduzidos de hemiceluloses, de 13,6 %, 14,2 % e 14,7%, respectivamente, o que se verifica na Figura 25. É possível observar que para uma grande faixa de valores da concentração (superiores a 6,0 %), a remoção de hemiceluloses foi mais elevada em tempos abaixo de 60 min, isto evidencia que maiores concentrações no processo estão atrelados a maiores rendimentos de solubilização de hemiceluloses (AGBOR *et al.*, 2011).

## 5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

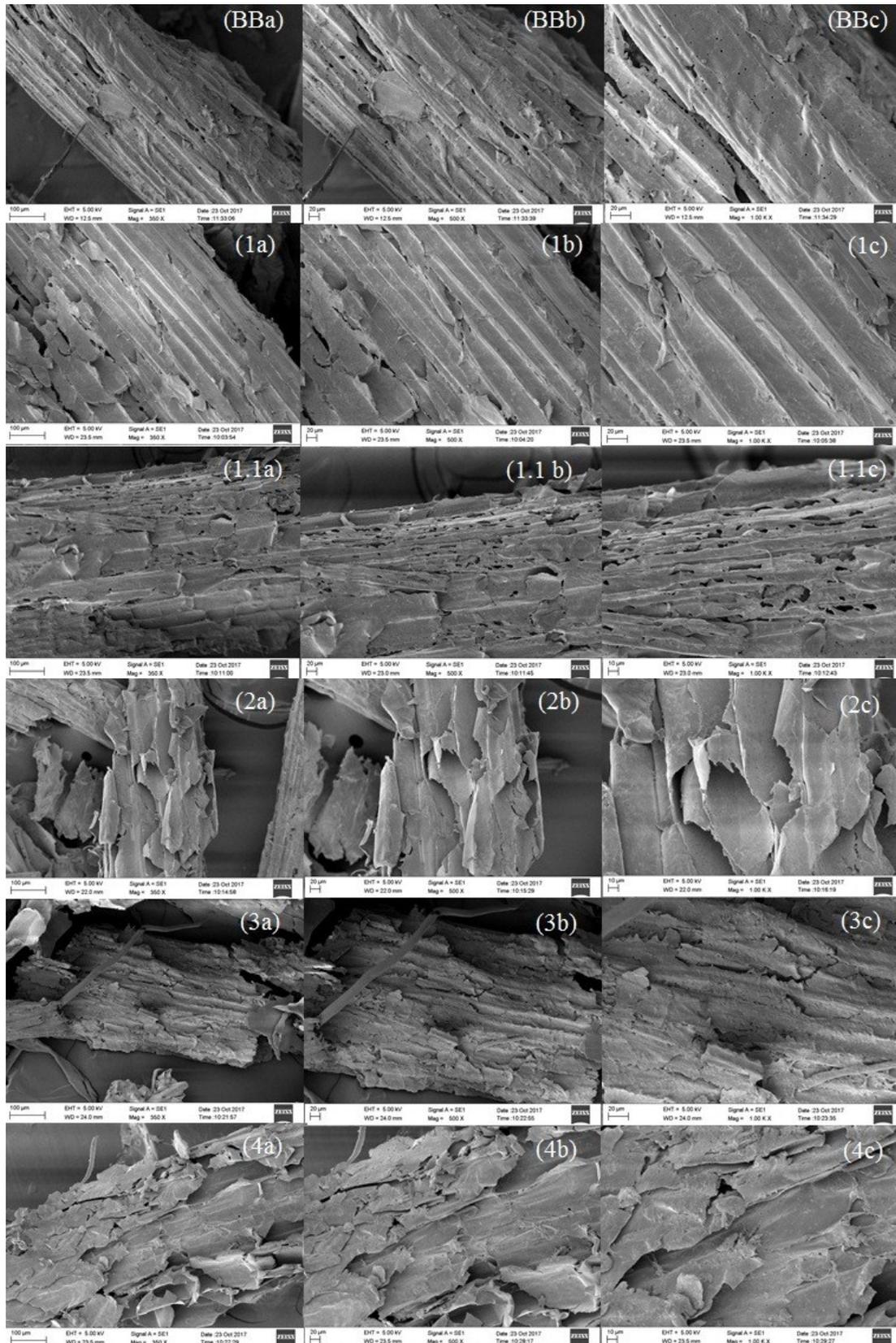
As micrografias de MEV do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado comprovam a estrutura compacta do material lignocelulósico antes do pré-tratamento, bem como as alterações estruturais que ocorreram na superfície das fibras após a realização dos pré-tratamento com ácido cítrico (Figura 26).

Observa-se que o pré-tratamento com ácido promoveu uma desestruturação ou descamação da fibra quando comparado ao bagaço *in natura*. A formação de sulcos superficiais no material pode ter ocorrido pela remoção parcial da lignina, da celulose e das hemiceluloses da biomassa.

As maiores modificações estruturais das fibras lignocelulósicas após o processo de pré-tratamento foram observadas nas amostras 2 (2,0% e 30 min), 4 (0,35% e 60 min), 5 (2,0% e 90 min), 6 (6,0% e 102,43 min), 7 (10,0% e 90 min) e 9 (6,0% e 17,57 min). As mudanças estruturais não ficaram tão evidentes a relação com concentração e/ou tempo.

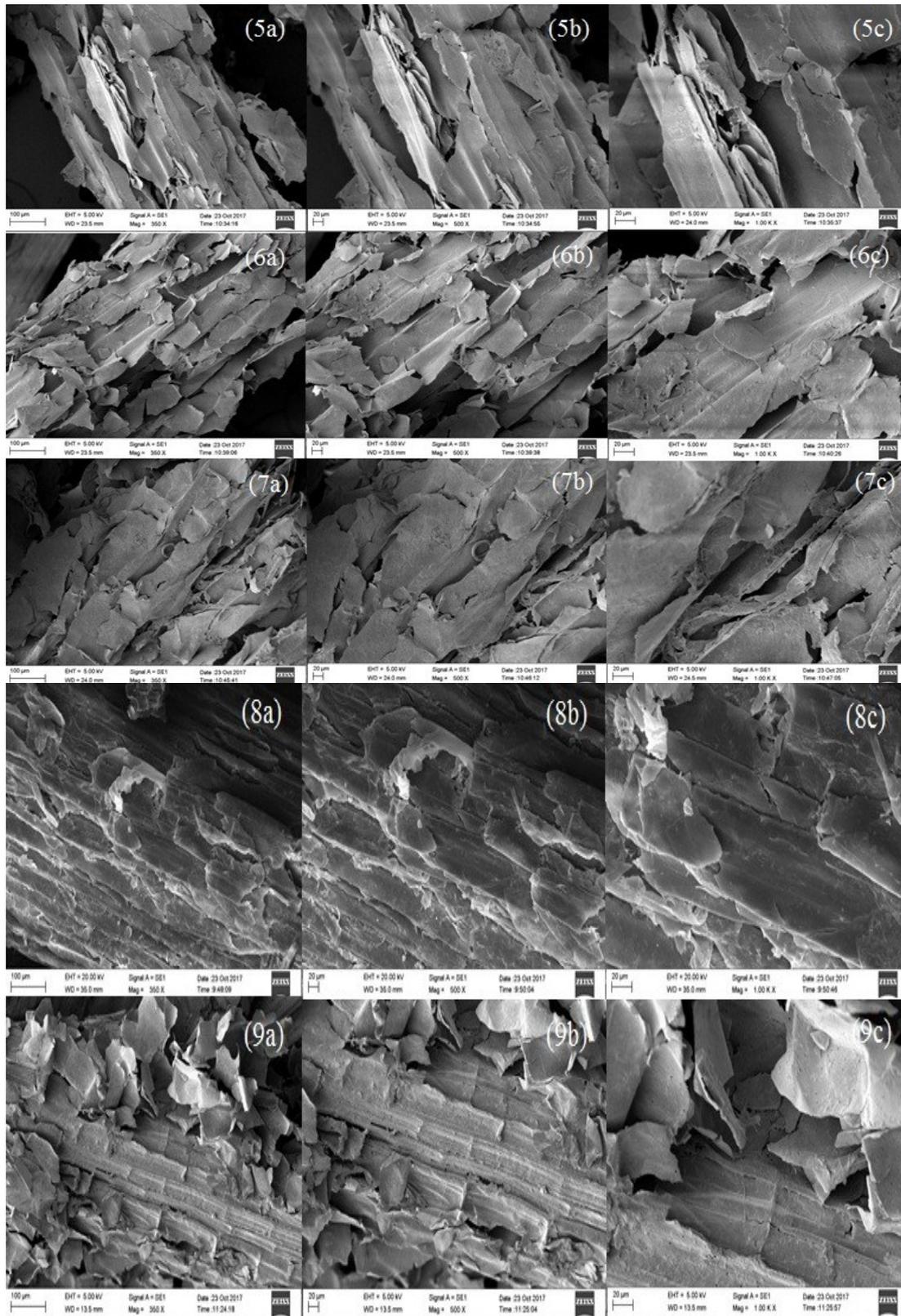
Tais modificações ocorridas após o pré-tratamento, provocam a ruptura da estrutura recalcitrante da parede celular das fibras vegetais, sugerindo melhor acessibilidade de enzimas ao complexo de carboidratos e, conseqüentemente, favorecer o aumento no rendimento do processo de hidrólise enzimática, como será exposto no item 5.4.

**Figura 26.** Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado com ácido cítrico.



(cont.)

**Figura 26.** Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado com ácido cítrico (cont.)



**Fonte:** Autora (BB-Bagaço de cana-de-açúcar bruto; 1, 1.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 – amostras pré-tratadas com ácido cítrico; a–ampliação 350x; b- ampliação 500x; c-ampliação 1000x).

### 5.3 Difração de Raios-X (DRX)

A celulose apresenta estruturas cristalinas, cujo o índice de cristalinidade (IC) expressa a porção de regiões cristalinas presentes na celulose com relação ao total (regiões amorfas + cristalinas). Esta característica está relacionada com a acessibilidade aos grupos hidroxilas presentes na celulose, sendo que as amostras de alto IC possuem uma estrutura mais ordenada e limita a acessibilidade ao solvente. As regiões cristalinas da celulose estão agrupadas em núcleos denominados cristalitos. O IC é usualmente determinado por difração de Raio-X (MARABEZI, 2014).

A cristalinidade das amostras foi determinada (Tabela 6) com a finalidade de analisar as modificações na estrutura da celulose frente aos pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar. Um efetivo pré-tratamento deve remover seletivamente a lignina, as hemiceluloses e reduzir a cristalinidade do material, melhorando assim a acessibilidade à celulose e produzindo materiais mais adequados para as operações de hidrólise, ácida e/ou enzimática (BATALHA *et al.*, 2015; AGBOR *et al.*, 2011).

**Tabela 6.** Índice de Cristalinidade (IC)

<b>Amostra</b>	<b>IC (%)</b>
<b>BB</b>	47
<b>1</b>	61
<b>1.1</b>	64
<b>2</b>	54
<b>3</b>	59
<b>4</b>	62
<b>5</b>	60
<b>6</b>	54
<b>7</b>	62
<b>8</b>	57
<b>9</b>	52

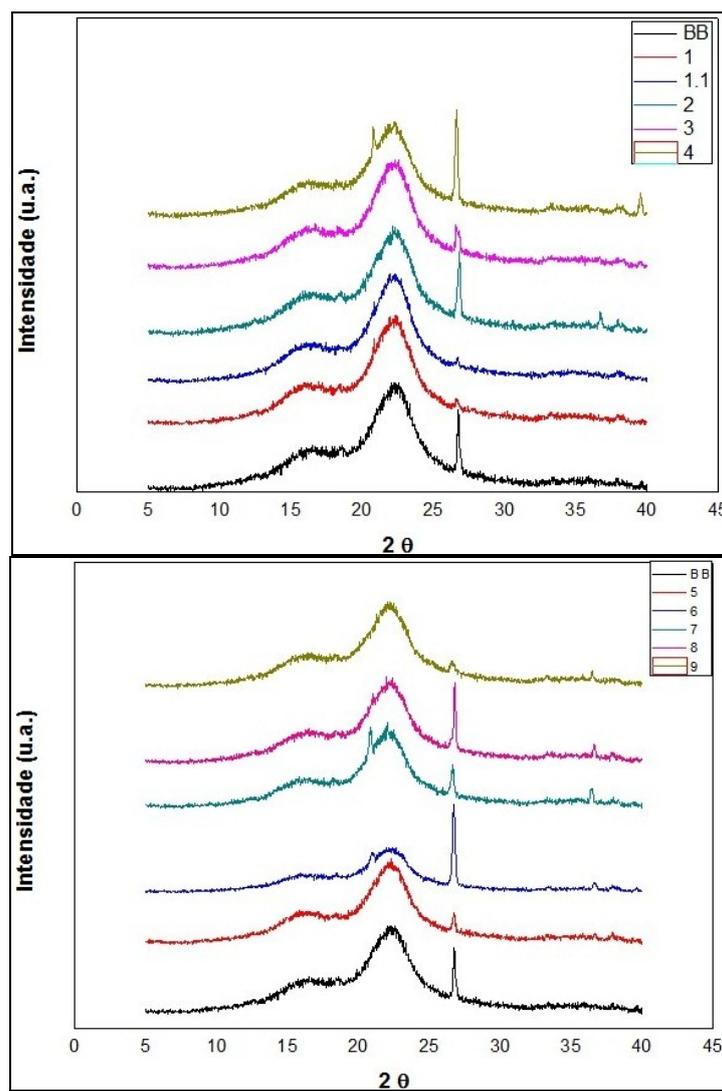
**Fonte:** Autora

O bagaço bruto apresentou menor cristalinidade que as amostras pré-tratadas, com IC de 47%. A cristalinidade do BB pode ser devida à presença de maior produção de lignina e hemiceluloses que são componentes amorfos (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; CANILHA *et al.*, 2012).

Os difratogramas obtidos para o bagaço sem tratamento e após a realização do pré-tratamento são apresentados na Figura 27. Os difratogramas obtidos para a

biomassa sem tratamento e após a realização dos pré-tratamentos com ácido cítrico são característicos de materiais semicristalinos, apresentando um halo amorfo e picos cristalinos característicos de celulose tipo I, a qual apresenta domínios cristalinos em  $2\theta \cong 18^\circ$  (plano 101) e  $22.5^\circ$  (plano 200) (BORYSIK; GARBARCZYK, 2003).

**Figura 27.** Difratoogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado.



Fonte: Autora

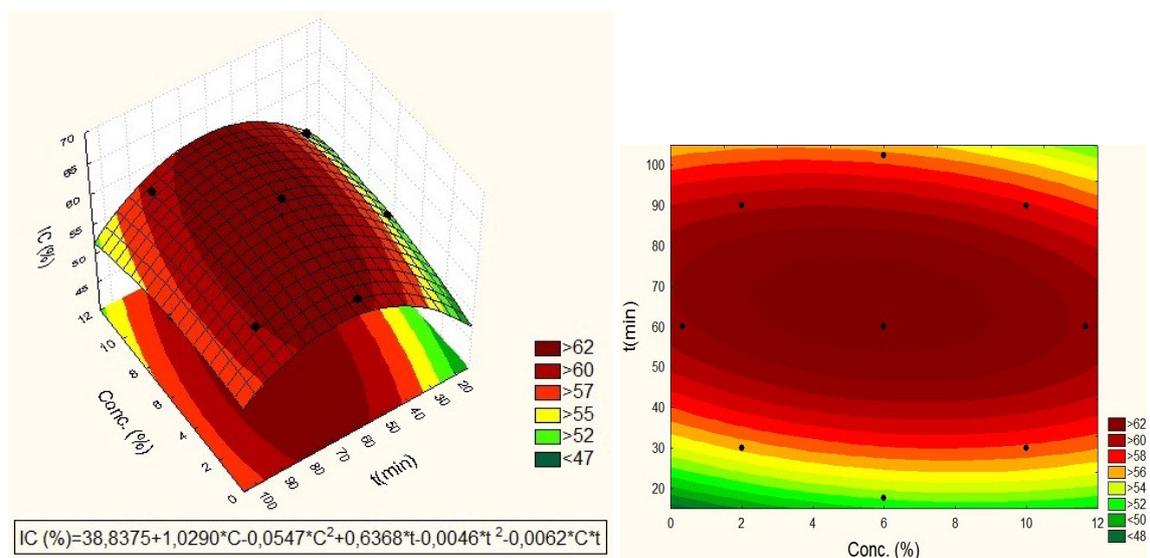
O aumento da cristalinidade da biomassa após diferentes pré-tratamento vem sendo relatado na literatura, como nos trabalho de Corrales *et al.* (2012); Guilherme *et al.* (2015) e Asada *et al.* (2015), os quais elucidaram que esse aumento ocorre devido a solubilização de componentes amorfos, como a lignina e as hemiceluloses, e também

pela remoção da fração amorfa da celulose. Segundo Perrone *et al.*, (2016) esse aumento da cristalinidade em materiais lignocelulósicos pré-tratados não necessariamente indica que ocorreu alterações na estrutura cristalina da celulose.

Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com o programa Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e os gráficos de superfície e de contorno estão representados na Figura 28.

O aumento no índice de cristalinidade da celulose é devido à remoção parcial da lignina, hemiceluloses e partes amorfas da celulose. Assim, os maiores IC foram das amostras 1.1 (64 %), 4 (62 %) e 7 (62 %), na qual apresentaram os valores de lignina e hemiceluloses (23,3% e 14,7%), (22,7% e 17,6%) e (23,2% e 15,2%), respectivamente. Os valores de celuloses destas demonstraram intermediários de 35,6%, 32,6% e 34,8%, respectivamente.

**Figura 28.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com índice de cristalinidade (%).



Fonte: Autora

Observou-se que os valores elevados de IC estão acima de 60 min e independentemente da concentração. As condições mais severas de pré-tratamento ácido diluído podem atacar o componente celulósico, provavelmente a fração amorfa da biomassa, gerando celulose residual ainda mais cristalina (BRIENZO *et al.*, 2017).

#### 5.4 Hidrolise enzimática

A Tabela 7 apresenta a concentração de açúcares redutores totais (ART) obtida para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e das amostras pré-tratadas, em base seca, após a hidrólise enzimática. A perda de massa foi calculada de acordo com a eq. 36.

**Tabela 7.** Concentração de açúcares redutores totais (ART) e perda de massa (PM)

Amostra/Teste	ART (g/L)	PM (%)
<b>BB</b>	3,06	12,98
<b>1</b>	7,49	9,83
<b>1. 1</b>	6,30	10,21
<b>2</b>	10,48	10,94
<b>3</b>	9,80	18,08
<b>4</b>	10,68	10,51
<b>5</b>	11,12	13,19
<b>6</b>	28,21	8,56
<b>7</b>	9,95	11,45
<b>8</b>	8,22	17,43
<b>9</b>	4,57	11,15

Fonte: Autora

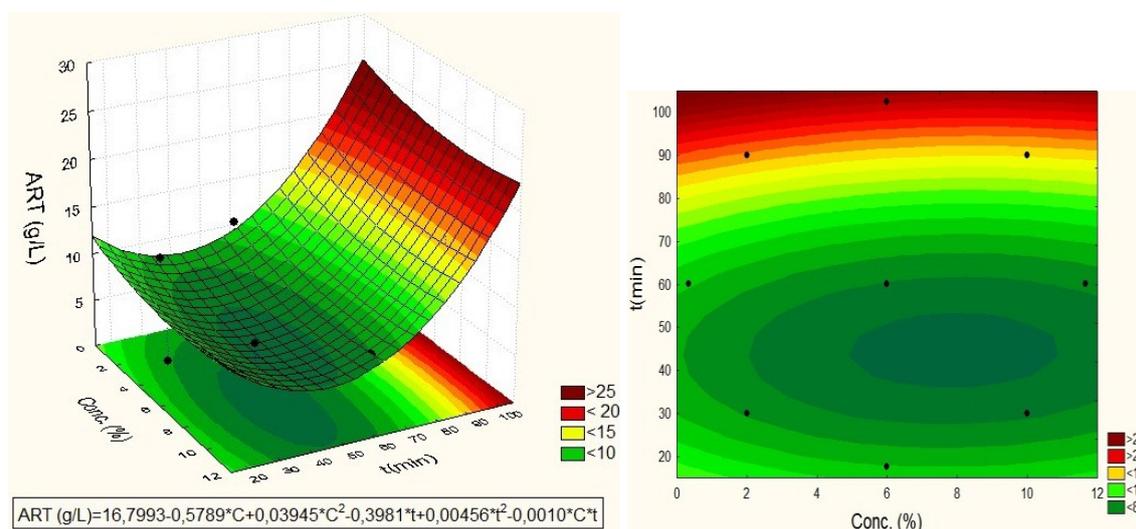
A concentração de ART para a biomassa sem tratamento, base seca, atingiu o máximo de 3,06 g.L<sup>-1</sup> após 72 h de hidrólise, enquanto que para a amostra 6 foi de 28,21 g.L<sup>-1</sup>. A amostra 6, também, apresentou perda de massa reduzida (8,56%). A maior produção de ART obtida após a hidrólise da amostra 6 pode ser atribuída à remoção da lignina e também uma das maiores desestruturações da fibra, como observado no MEV (Figura 30 - 6(a), 6(b) e 6(c)) que ocorreu no pré-tratamento em questão, tornando assim as cadeias de celulose mais acessíveis ao ataque enzimático.

Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com o programa Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e os gráficos de superfície e de contorno estão representados na Figura 29. Independente das concentrações e tempos acima de 90 min, temos concentrações mais altas de ART.

A correlação identificada está de acordo com alguns autores como Brienzo *et al.*, (2107); Liu *et al.*, (2017), Canilha *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2009; Bonomi, 2010 o qual afirmam que a matriz de lignina pode impor várias barreiras estruturais na celulase e prevenir a ligação eficaz das suas enzimas, levando a baixa digestão de celulose, ou seja, a lignina atua como barreira protetora aos carboidratos (hemiceluloses e celulose) que devem ser hidrolisados em seus respectivos monômeros. Portanto, a deslignificação

é uma opção favorável quando se almeja uma maior viabilidade do processo de aproveitamento das biomassas lignocelulósicas.

**Figura 29.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com ART (g/L).



Fonte: Autora

Costa *et al.* (2014) expõe, que, apesar de haver despolimerização da lignina durante o pré-tratamento com ácido diluído, também há repolimerização e redistribuição superficial, o que implica uma possível diminuição da biodegradabilidade.

Alguns pré-tratamentos não apresentaram uma conversão enzimática satisfatória. Em suas pesquisas, Rollin *et al.* (2011) mostrou caso semelhante, na qual o pré-tratamento mais efetivo na remoção de lignina apresentou menor rendimento enzimático que outro onde o material continha alto teor residual de lignina. Conforme os autores isso pode ser explicado pela distribuição da lignina remanescente, já que no caso de teor menor de lignina estava distribuída de maneira mais homogênea na superfície da celulose, o que deve ter impedido o acesso da celulase à celulose. Diferentemente, no material com alto teor de lignina residual, esta se encontrava aglomerada, o que deve permitir maior acessibilidade da enzima à celulose e sua maior conversão.

No trabalho de Siqueira *et al.* (2013) reportou-se que em amostras de bagaço de cana-de-açúcar com menor teor de lignina foram mais facilmente hidrolisadas, evidenciando que a presença de lignina é um fator limitante para a eficiência do processo de hidrólise enzimática. Silva (2017), em seu trabalho com pré-tratamento do

bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico por explosão à vapor, utilizando Cellic® CTec 3 (10 FPU/g substrato), obteve-se no máximo de 7,96 g.L<sup>-1</sup> de ART.

Sabendo que o custo de produção de enzimas para processo de hidrólise é bastante alto (PANDEY *et al.*, 2000a), destaca-se que obteve valores aceitáveis de ART, utilizando concentração inicial da enzima baixo (8,5 FPU/mL) em relação a valores encontrados na literatura, o que torna o processo de hidrólise usando enzimas vantajoso e viável.

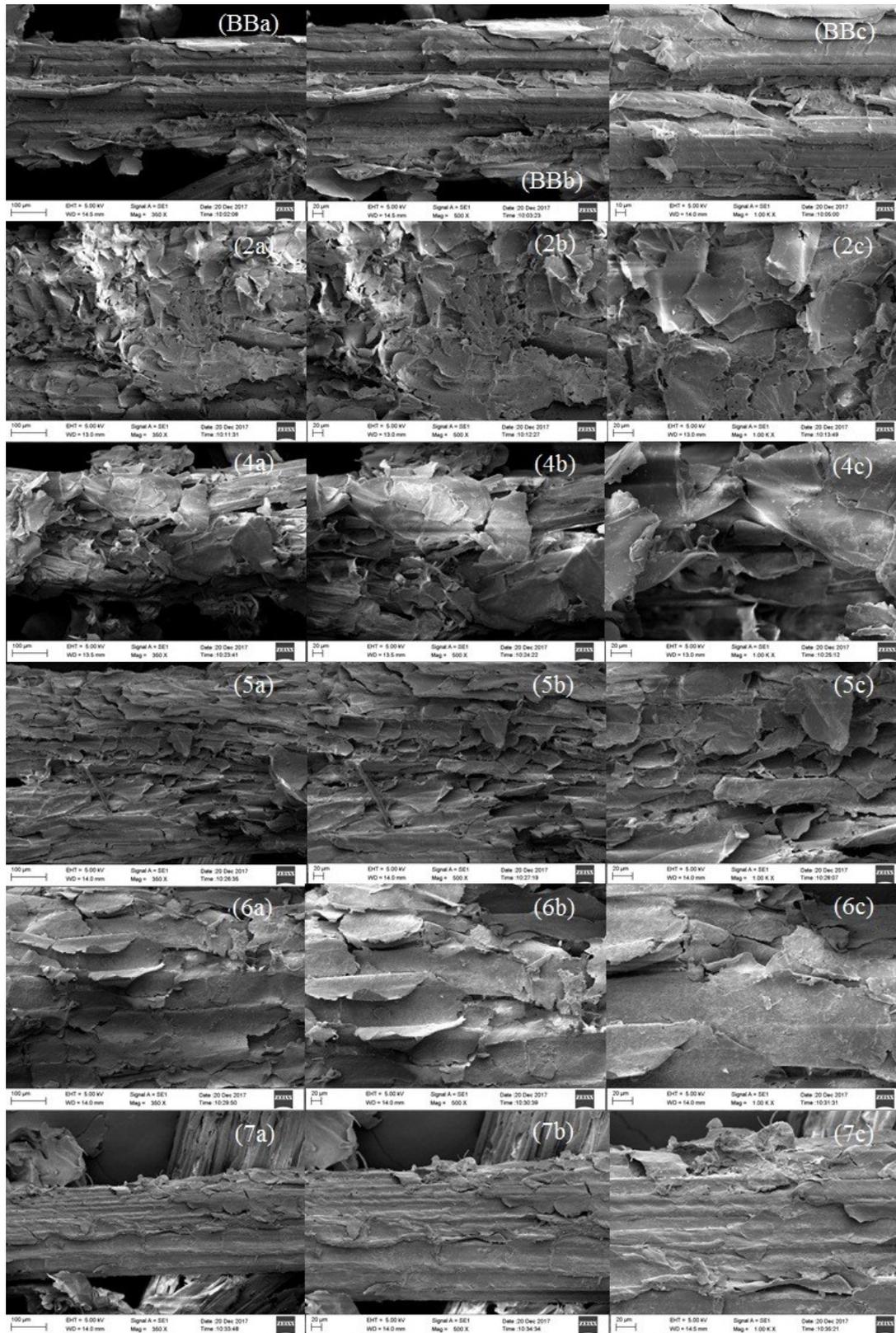
As imagens de MEV (Figura 30), obtidas após a hidrólise enzimática, corrobora a relação com a modificação estrutural e a eficiência do processo.

As maiores desestruturações das fibras lignocelulósicas, após a hidrólise enzimática, são observadas nas amostras 6 (6,0% e 102,43 min), 5 (2,0% e 90 min), 4 (0,35% e 60 min) e 2 (2,0% e 30 min) concomitantes com as concentrações superiores de ART 28,2 g.L<sup>-1</sup>, 11,1 g.L<sup>-1</sup>, 10,7 g.L<sup>-1</sup> e 10,5 g.L<sup>-1</sup>, apresentadas na Tabela 7 e na superfície de resposta e de contorno (Figura 19). A amostra 7 (10,0% e 90 min) exibiu, também, uma alta concentração de ART (9,951%), contudo a modificação estrutural não foi tão evidente.

Em conformidade com a literatura, como mencionado anteriormente, embora nem todos os pré-tratamentos resultem em deslignificação substancial dos resíduos lignocelulósicos, as alterações ocasionadas na lignina podem causar modificações em sua estrutura e melhorias nos resultados de bioconversão. Dessa forma, a biomassa pré-tratada torna-se mais digerível enzimaticamente do que a biomassa bruta mesmo se possuir o mesmo teor de lignina (AGBOR *et al.*, 2011). Quando o efeito da presença da lignina é minimizado, a acessibilidade à celulose pelas enzimas celulolíticas torna-se o mais importante fator para alcançar elevadas eficiências de hidrólise enzimática (JEOH *et al.*, 2007).

Diversos fatores, além da distribuição de lignina, podem afetar a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica, são eles referentes ao substrato: concentração do substrato (é um dos fatores mais importantes que afetam a produção e a velocidade inicial de hidrólise enzimática da celulose); características estruturais do substrato (cristalinidade da celulose, grau de polimerização da celulose, área superficial, acessibilidade aos polissacarídeos e as inúmeras ligações da lignina com as hemiceluloses) (SANTOS, 2013; BRIENZO *et al.*, 2107; LIU *et al.*, 2017; CANILHA *et al.*, 2011; MOSIER *et al.*, 2005; LIMA, 2018).

**Figura 30.** Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado após a hidrólise enzimática.



**Fonte:** Autora. (BB-Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*; 2, 4, 5, 6, 7 – amostras pré-tratadas após a hidrólise enzimática; a - ampliação 350x; b - ampliação 500x; c - ampliação 1000x).

As concentrações de glicose e xilose das amostras, determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e a conversão enzimática da celulose estão descritos na tabela 8.

**Tabela 8.** Concentração de glicose (g/L) e xilose (g/L) e conversão enzimática da celulose (CC).

<b>Amostra</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Xilose (g/L)</b>	<b>CC (%)</b>
<b>BB1</b>	6,21	4,31	14,02
<b>1</b>	1,27	0,91	3,11
<b>1.1</b>	0,89	0,66	2,25
<b>2</b>	1,54	0,76	4,05
<b>3</b>	1,42	0,86	3,86
<b>4</b>	1,62	0,76	4,47
<b>5</b>	1,47	0,78	5,31
<b>6</b>	1,37	1,01	3,48
<b>7</b>	2,26	1,34	5,84
<b>8</b>	1,65	1,02	4,11
<b>9</b>	0,93	0,60	3,44

Fonte: Autora

As maiores conversões enzimáticas, indicadas na tabela 8, foram de 5,81 e 5,31 (amostras 7 e 5 respectivamente), nos tempos de reação de 90 min.

Autores consideraram, na literatura que a adsorção das enzimas sobre a lignina, não catalisam a hidrólise, o que diminui o efeito desta e o rendimento de açúcares. A inibição das enzimas pelos produtos da reação é outro fator. A celobiose e a glicose são os dois produtos da reação que provocam inibição das enzimas celulolíticas. Oliveira (2012) afirma que estudos mostraram que a inibição por celobiose é maior que por glicose, na qual, a glicose inibi a  $\beta$ -glicosidase enquanto a celobiose inibi a endoglucanase. As exogluconases sofrem inibição por estes compostos. O principal papel inibidor da lignina é atribuído à adsorção inespecífica da enzima na lignina e à inacessibilidade à celulose, devido ao impedimento estérico.

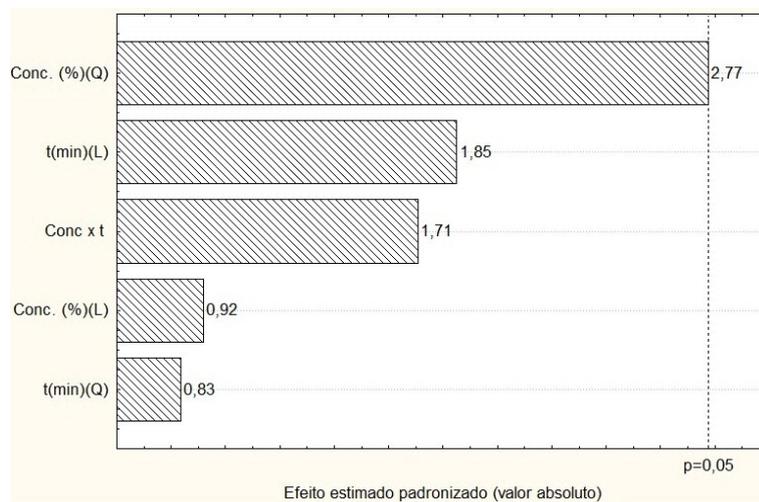
Os resultados de concentração de glicose e xilose foram analisados com o programa Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático). Análise de variância (ANOVA) e diagrama de pareto para a concentração de glicose apresentados na tabela 9 e figura 31, respectivamente, confirmam a influência significativa da variável concentração (quadrática) ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

**Tabela 9.** Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose (g/L).

ANOVA – Glicose					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
Conc. (%)	0,06	1	0,06	0,84	0,41
Conc. (%) <sup>2</sup>	0,55	1	0,55	7,70	0,05
t (min)	0,245	1	0,24	3,42	0,14
t (min) <sup>2</sup>	0,05	1	0,05	0,70	0,45
Conc x t	0,21	1	0,21	2,92	0,16
Erro	0,29	4	0,07		
Total	1,36	9			

Fonte: Autora

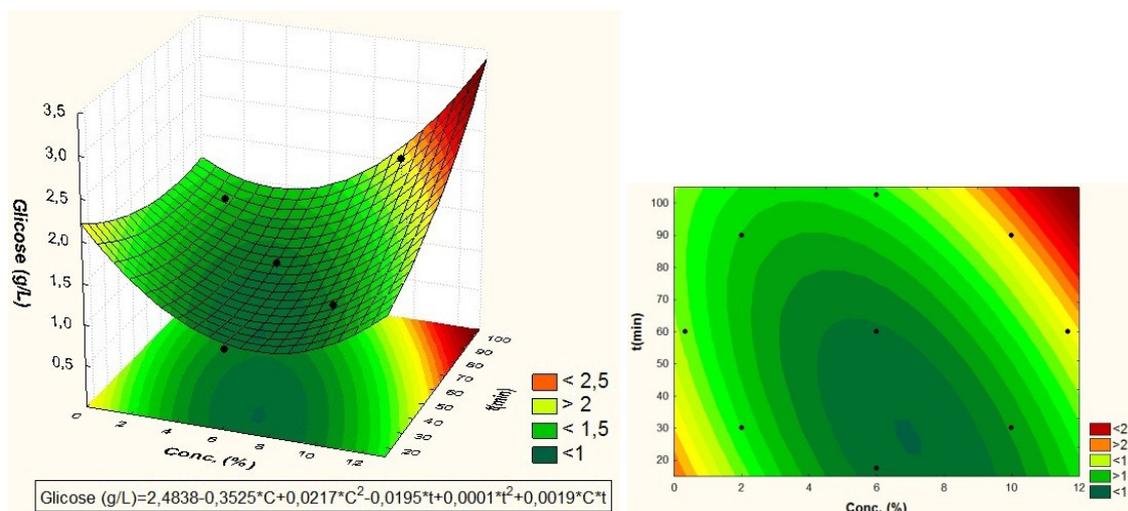
**Figura 31.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min), em relação a concentração de glicose (g/L).



Fonte: Autora

Na tabela 9 e os gráficos de superfície e de contorno representados na figura 32 corroboram que altos rendimentos da hidrólise enzimática em relação à conversão a glicose são necessárias altas concentrações, evidenciadas nas amostras 7 e 8 (10 e 11,65%, respectivamente)

**Figura 32.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com glicose (g/L).



Fonte: Autora

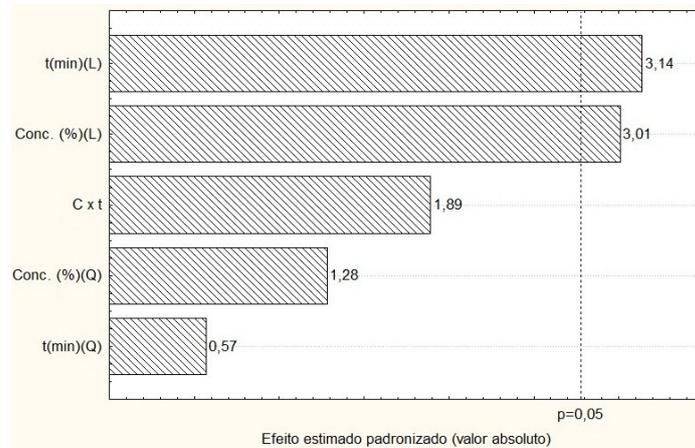
Análise de variância (ANOVA) e diagrama de pareto para a concentração de xilose apresentados na tabela 10 e figura 33, respectivamente, apresenta que as variáveis tempo e concentração foram significativas ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) no processo de eficiência da hidrólise enzimática (efeitos padronizados positivos), sendo o tempo mais significativas.

**Tabela 10.** Análise de variância (ANOVA) para a concentração de xilose (g/L).

ANOVA – Xilose					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	$p$ -valor
Conc. (%)	0,13	1	0,13	9,04	0,040
Conc. (%) <sup>2</sup>	0,02	1	0,02	1,64	0,27
t (min)	0,15	1	0,15	9,85	0,03
t (min) <sup>2</sup>	0,00	1	0,0	0,32	0,60
Conc x t	0,05	1	0,05	3,58	0,13
Erro	0,06	4	0,015		
Total	0,42	9			

Fonte: Autora

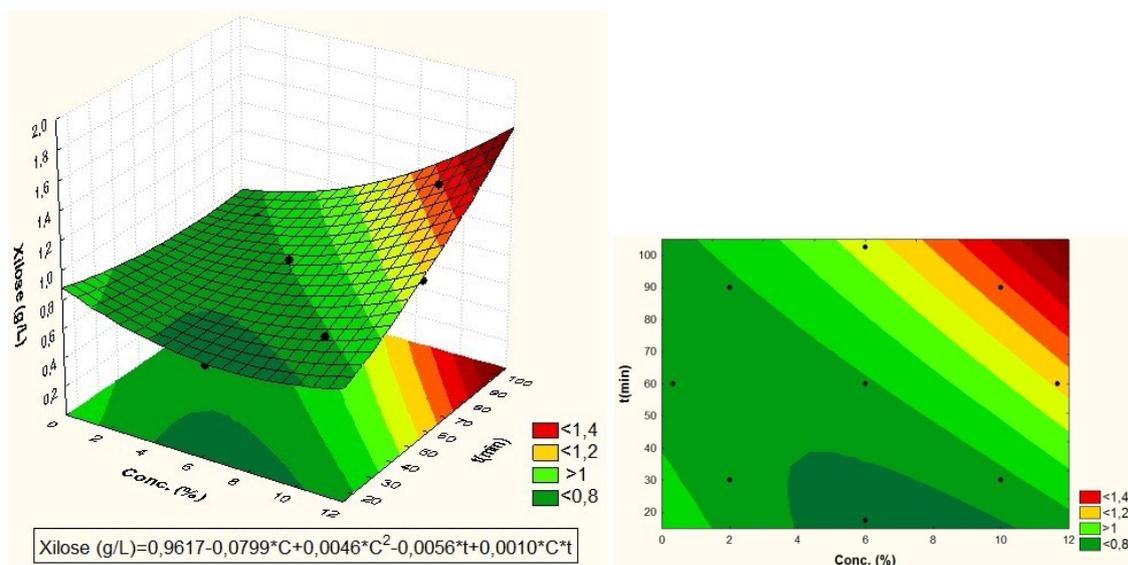
**Figura 33.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min), em relação a concentração de xilose (g/L).



Fonte: Autora

Altos rendimentos da hidrólise enzimática em relação à conversão a xilose são necessárias altas concentrações e longos tempos de reação, que foram demonstradas (amostras 7, 8 e 6) na tabela 10 e que confirmam com os gráficos de superfície e de contorno representados na figura 34. Conforme Baêta (2016), em tempos altos favorecem reações de hidrólise das xilanas presentes nas fibras, conseqüentemente, maior a chance de solubilização dos xilo-oligomeros.

**Figura 34.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da concentração (Con.) (%) e tempo (t) (min) com xilose (g/L).

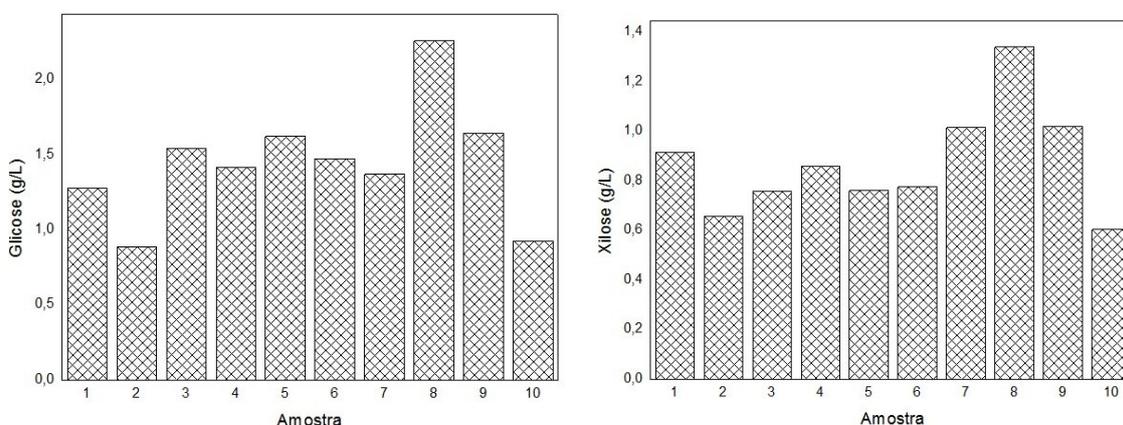


Fonte: Autora

Santos (2017), Marabezi (2014) e Wolf (2011) justificam em seus trabalhos, que para obtenção de bons rendimentos de monossacarídeos com a hidrólise enzimática e melhorar a acessibilidade da enzima à celulose, são necessários longos tempos de reação, o quê foi evidenciado neste estudo.

A tecnologia de biodigestão apresenta resultados positivos para os dados apresentados (figura 35), tendo percentuais elevados onde, concentrações remanescentes de açúcar e outras substâncias orgânicas solúveis ainda presentes no bagaço podem ser melhor processadas (GEHLEN, 2013).

**Figura 35.** Composição de açúcares das amostras pré-tratadas



**Fonte:** Autora (1- amostra 1; 2- amostra 1.1; 3 – amostra 2, 4 – amostra 3; 5 – amostra 4; 6 – amostra 5; 7 – amostra 6; 8 – amostra 7; 9 – amostra 8; 10 – amostra 9)

Portanto, a ferramenta estatística de desejabilidade foi capaz de gerar as condições desejáveis para pré-tratamento, bem como a composição química esperada para o hidrolisado e sólido. De tal modo, estabeleceu-se a melhor condição reacional: concentração de 6,0% e maior tempo, remoção significativa de lignina, aparente descamação da fibras (MEV) e ponto máximo alcançado na hidrólise enzimática. O teste para avaliação de produção de biogás, pelo meio da digestão anaeróbia (DA), com o hidrolisado (fração líquida), depois do pré-tratamento, foi da amostra 6 (condição de 6,0% e 102,43 min).

### 5.5 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO

Para a produção de biogás, atrelada à remoção de DQO do meio, obteve-se o valor de 37,20 g O<sub>2</sub>/L da fração líquida da amostra 6, após o pré-tratamento com ácido cítrico diluído.

## 5.6 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

De forma a atingir uma relação substrato/micro-organismo do inoculo anaeróbico, a determinação de SSV resultou no valor de 0,032 g/gamostra.

## 5.7 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos (DA)

O aproveitamento da fração líquida da biomassa pré-tratada, permitiu a conversão dos monossacarídeos fermentescíveis (ex. xilose e glicose) presentes no bagaço de cana e melhorias na biogásificação do bagaço de cana.

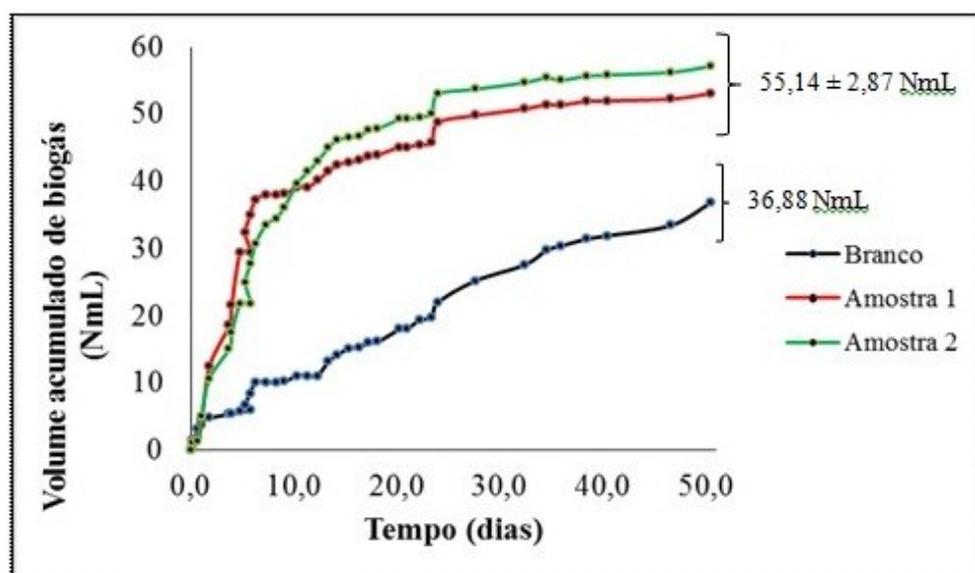
A DA dessa fração líquida proporcionou como parâmetro de comparação e melhoramento para o planejamento 2.

## 5.8 Monitoramento do biogás

Todos os resultados da produção de biogás (volume acumulado de biogás e volume acumulado de biogás por DQO adicionada) dos ensaios de DA da fração líquida depois do pré-tratamento é apresentado na figura 36 (a) e (b). A amostra 6 foi feita em duplicata (amostra 1 e 2).

**Figura 36.** Produção de biogás da fração líquida após o pré-tratamento da amostra 6, em (a) relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e (b) volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias)

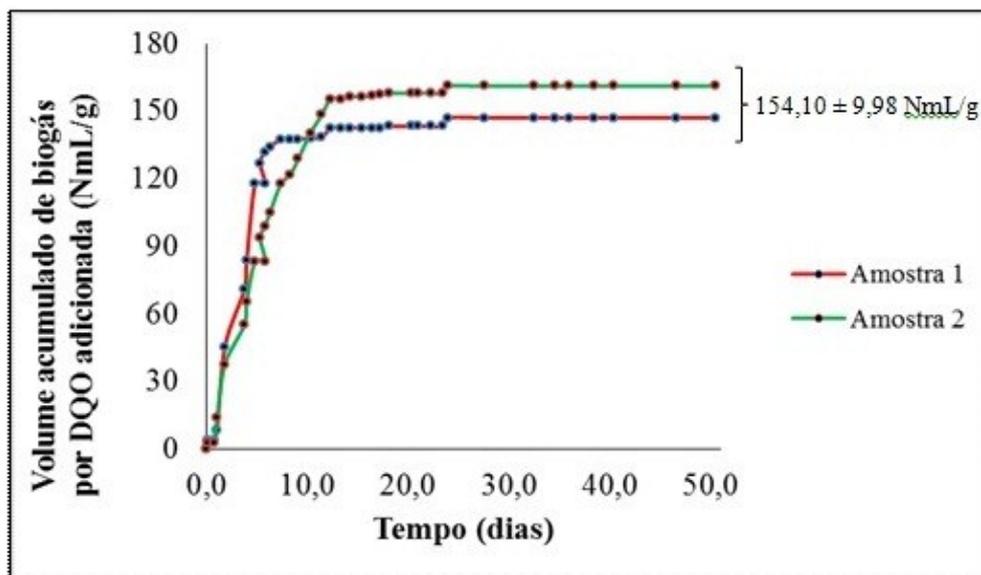
(a)



(cont.)

**Figura 36.** Produção de biogás da fração líquida após o pré-tratamento da amostra 6, em (a) relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e (b) volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias) (cont.)

(b)



Fonte: Autora

Na figura 36 (a) e (b) demonstra que produção de biogás iniciou-se nas primeiras horas, demonstrando que os micro-organismos encontraram um substrato mais biodegradável.

Observa-se que houve produção expressiva (figura 36 (a)) da amostra 6 (media máxima de 55,14 NmL) em relação ao teste de controle (branco) (máxima de 36,88 NmL). A maior produção de biogás alcançada da amostra 6 (figura 36 (b)), foi depois do 24<sup>a</sup> dia, estabilizando no volume máximo de 154,10 NmL/g. Em ambas as figuras, verifica-se a ausência da fase *lag* (fase inicial de adaptação) do bagaço de cana pré-tratado.

### 5.9 Determinação de Poder calorífico

Tendo em vista o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para o processo de combustão, foi realizada análise do poder calorífico superior. Os resultados obtidos (Tabela 11) confirmam com os encontrados na literatura.

O poder calorífico foi maior no caso do BB (após HE) em relação ao BB *in natura* e amostra 6 devido ao teor de lignina e/ou a combinação dos componentes: celulose, hemiceluloses e lignina.

Protásio *et al.* (2011), Lizcano (2015) e Arantes (2014) afirmam que PCS da biomassa diminui com o seu alto teor de cinzas e que o PCS decresce com o aumento da umidade. A relação da umidade com o PCS é devido ao gasto de energia para o aquecimento e vaporização da água durante o processo de combustão da biomassa (ARANTES. 2014). Outros autores como Lizcano (2015) e Meschede *et al.*(2012) citam que o teor de lignina também pode influenciar no PCS.

**Tabela 11.** Determinação do poder calorífico após a HE

<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Poder Calorífico (kcal/kg)</b>	<b>Poder Calorífico (MJ/kg)</b>	<b>Desvio padrão (kcal/kg)</b>
<b>BB (<i>in natura</i>)*</b>	9,64	3211	13,44	22
<b>BB</b>	12,98	3384	14,17	17
<b>6</b>	8,56	3019	12,64	15

\*(cinzas *in natura* de 4,54%)

**Fonte:** Autora

Em estudos de Lizcano (2015) autores apresentaram o PCS da biomassa para as variedades cultivadas na região de Ribeirão Preto, no estado de São Paulo, nos valores de 18,33 e 15,79 MJ.kg<sup>-1</sup>. Arantes (2014) traz em seu estudo de bagaço de cana-de-açúcar (base seca) um valor de 4483 ± 16,82 kcal/kg de PCS.

No estudo relacionando com umidade, percebeu-se que a variação do PCS diminuiu de 4483 ± 16,82 Kcal/Kg, na qual o teor de umidade era de 0% para 1637 ± 35 Kcal/Kg para teor de umidade de 60%, para o bagaço de cana-de-açúcar, observando uma tendência inversamente proporcional entre esses dois fatores (LIMA *et al.*, 2008), comprovando com a literatura. Lizcano (2015) traz para as condições da região canavieira do Centro-Sul do Brasil, o bagaço com 50% de umidade fornece 7,49 MJ.kg<sup>-1</sup> e com 20 % de umidade fornece 13,58 MJ.kg<sup>-1</sup>. Arantes (2014) destaca, ainda que, o bagaço de cana com teor de umidade em 50% diminui a eficiência térmica das caldeiras, devido a queima irregular da biomassa.

Houve uma boa repetibilidade dos experimentos, pois os valores de desvio padrão não ultrapassaram os valores estabelecidos pela norma ABNT NBR 8633/1984

que é de 28,662 Kcal/Kg (ARANTES, 2014) e os resultados de PCS das amostras após a HE foram bem próximos ao BB *in natura*, sendo benéfica para aproveitamento da biomassa para o processo de combustão.

### **5.10 Conclusões do Planejamento 1**

Não foi possível afirmar uma relação direta das variáveis em relação ao teor de lignina, celulose e hemiceluloses nas amostras pré-tratadas. Em concentrações altas e em tempos acima de 60 min, resultaram em valores baixos de lignina. Para baixos valores de hemiceluloses foram em concentrações acima de 6,0 % e tempos inferiores a 60 min. Já para maiores valores de celulose, foram em concentrações acima de 6,0 % e tempos superiores a 60 min.

Diante do estudo, a amostra 6 (6,0% e 102,43 min) mostrou o menor teor de lignina (22,65%), índice de cristalinidade baixo (54%), desestruturações ou descamações das fibras (após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática) e maior concentração de açúcares redutores totais (28,21 g/L). Esta amostra, igualmente, mostrou-se favorável para o processo de combustão, resultando em um valor de 12,640 MJ/kg do poder calorífico.

Além disso, os MEVs confirmaram que as estruturas dos materiais foram alteradas após pré-tratamento, possibilitando a acessibilidade à celulose. Confirmado, semelhantemente, pelas concentrações de açúcares redutores totais maiores em comparação ao bagaço de cana bruto.

A amostra demonstrou potencial de produção de biogás, com volume de aproximadamente 55 NmL e 154 NmL/g (em relação ao DQO adicionada). Como as citações na literatura trazem a importância do emprego de diferentes temperaturas para obter grandes extensões de deslignificação e eficiência de pré- tratamentos e consecutivamente, obtendo êxito na produção de biogás, um 2º planejamento foi proposto em sistema pressurizado para inclusão desta variável, juntamente com razão sólido-líquido e tempo, levando a comparações (item 8) com este 1º planejamento experimental, visando produção de biogás de modo eficaz e executável.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS DO PLANEJAMENTO 2

### 6.1 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 2015/2016. O bagaço de cana-de-açúcar, coletado com uma umidade de aproximadamente 50%, foi submetido a um processo de lavagem com água destilada a 60°C por um período de 1 h, visando à remoção dos açúcares residuais do processo de moagem da cana-de-açúcar feito pela usina e conseqüentemente, melhor preservação do material durante o armazenamento. Após esse procedimento, o bagaço de cana-de-açúcar foi espalhado para secagem natural durante aproximadamente 15 dias, até que sua umidade chegasse a valores próximos de 10%. O bagaço foi estocado em ambiente com temperatura inferior a 0°C para melhor conservação.

A caracterização do bagaço bruto (BB) foi efetuada pela equipe do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental- Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP-MG) e as informações foram cedidas por estes.

### 6.2 2º Planejamento experimental

Realizou-se um 2º planejamento experimental ( $2^3$ ), Tabela 12. As condições de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, com ácido cítrico, foram otimizadas por meio do planejamento experimental Doehlert (Pedersen e Meyer) quadrático.

Este planejamento permite avaliar vários níveis entre os pontos extremos e o ponto central, assim como verificar quais variáveis foram significativas para o pré-tratamento proposto, além de estabelecer as melhores condições para remoção significativa de lignina, a melhor relação entre as variáveis, bem como, verificar os melhores resultados para alcançar um ponto máximo na hidrólise enzimática e conseqüentemente, a produção de biogás. As variáveis avaliadas foram temperatura ( $T$ , °C), tempo ( $t$ , min) e a razão sólido líquido ( $RSL$ ,  $g.mL^{-1}$ ).

A inclusão da variável temperatura foi feita baseando-se no 1º planejamento e em estudos citados na literatura, que mostram que maiores tempos e temperaturas são favoráveis à solubilização da celulose (PAPA *et al.*, 2015; CHIARAMONTI *et al.*, 2012; CANILLHA *et al.*, 2011; BENJAMIN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; MEIGHAN *et al.*, 2017).

**Tabela 12.** 2º Planejamento Fatorial de pré-tratamento

Variável	Níveis de razão sólido-líquido ( <i>RSL</i> )						
	-1	-0,5	0	0,5	1		
RSL (g/mL)	3	5,25	7,5	9,75	12		
T (°C)	Níveis de temperatura ( <i>T</i> )						
	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
	120	130	140	150	160	170	180
t (min)	Níveis de tempo ( <i>t</i> )						
		-0,817	0	0,817			
		20	55	90			

Experimentos	<i>RSL</i> (g.mL <sup>-1</sup> )	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)
1	5,25	120	55
2	9,75	120	55
3	7,5	130	90
4	5,25	140	20
5	9,75	140	20
6 (c)	7,5	150	55
7 (c)	7,5	150	55
8	12	150	55
9 (c)	7,5	150	55
10 (c)	7,5	150	55
11	3	150	55
12 (c)	7,5	150	55
13	9,75	160	90
14	5,25	160	90
15	7,5	170	20
16	9,75	180	55
17	5,25	180	55

c: ponto central

**Fonte:** Autora

Chiaramonti e seus colaboradores (2012) traz que a temperatura de reação é um parâmetro operacional importante, mesmo que seja uma etapa que consuma energia. A hidrólise ácida pode ser realizada a baixa temperatura com ácidos concentrados ou a alta temperatura com ácidos diluídos, sendo esta última, uma opção mais adequada e provavelmente o método mais comum entre os pré-tratamentos químicos. Outro parâmetro-chave do processo na hidrólise ácida é o tempo de reação. O pré-tratamento com ácido diluído pode ser realizado em tempo de retenção curto (1 - 5 min) e em alta temperatura, ou em tempo de retenção longo (30 - 90 min) e em temperatura mais baixa.

Se o tempo de reação for superior a 1 h, a concentração de xilose diminui devido à degradação.

Pu e colaboradores (2013) acrescentam ainda, que estudos de pré-tratamentos com ácidos diluídos, envolvem tratamentos da biomassa com combinação de pH ácido, calor e pressão com tempos de permanência que variam de menos de um minuto a 1 h. Geralmente realizados com 0,4 – 2,0% (p/p) à uma temperatura de 140 – 200°C.

### 6.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Os ensaios de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados, no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP), em reator tubular de aço inox 316 L do tipo autoclave com anel de vedação feito de politetrafluoretileno (PTFE) (Figura 37 - 1) e capacidade de 475 mL.

Para o aquecimento dos reatores durante a etapa de hidrólise utilizou-se um banho termostatizado de 25,0 L contendo glicerina como fluido de aquecimento da marca Marconi. As temperaturas ideais foram programadas e monitoradas com auxílio de um termopar (Figura 37 - 2).

**Figura 37:** Sistemas usados no pré-tratamento



**Fonte:** Autora (1- Reator tubular de aço inoxidável; 2 - Banho termostatizado contendo glicerina como fluido de aquecimento)

As dimensões do reator de pré-tratamento devem ser limitadas para reduzir o volume e os custos e o uso de materiais dispendiosos devem ser evitados (isso também depende das condições operacionais do processo, como temperatura e pressão), ou seja, o design ideal é um ajuste entre desempenho e custos (CHIARAMONTI *et al.*, 2012).

O conteúdo de água (aproximadamente 146,0 mL) do bagaço de cana foi contabilizado somente nos balanços de massa. A massa de BB utilizada foi de 30,0 g, fundamentado-se em estudos dos autores como Novo *et al.* (2011), Adarme *et al.*, 2017 e Meighan *et al.* (2017).

Após o pré-tratamento, o reator foi imediatamente resfriado num banho de gelo e aberto, e o BB pré-tratado foi prensado a 9 toneladas em uma prensa hidráulica da marca SOLAB®.

O volume da fração líquida liberada após filtração foi armazenado em recipientes (tubos falcons) fechados, em geladeira. Parte foi filtrada em filtros de nitrocelulose com tamanhos de poros de 0,45 µm, para quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema Shimadzu HPLC equipado com uma coluna Aminex HPX 87H (300 × 7,8 mm Bio-Rad) mantido a 55 ° C (Shimadzu, modelo CTO-30A) usando um detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-6A) para açúcar e um detector UV-VIS (Shimadzu SPD-10AV) ajustado nos comprimentos de onda de 210 nm e 274 nm para ácidos orgânicos e produtos de degradação de açúcar, respectivamente. O ácido sulfúrico (5 mmol L<sup>-1</sup>) foi utilizado como eluente com vazão de 0,6 mL/min (ADARME *et al.*, 2017; LIMA, 2018). Uma quantidade de hidrolisado sem filtrar foi reservada para os ensaios de digestão anaeróbia.

O bagaço pré-tratado (fração sólida) (sem lavagem após prensagem) foi pesada e armazenada em sacos zip lock, em geladeira, para caracterizações. Antes de cada caracterização, as amostras foram lavadas com água destilada até pH neutro e seco em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 horas.

As caracterizações das amostras pré-tratadas foram realizadas por metodologias de referência, sendo: umidade (descrito no item 4.4.1), lignina Klason insolúvel e solúvel (descrito no item 4.4.4), holocelulose (descrito no item 4.4.5), celulose (descrito no item 4.4.6) e hemiceluloses por medida indireta da diferença entre os teores de holocelulose e celulose. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) descrito no item

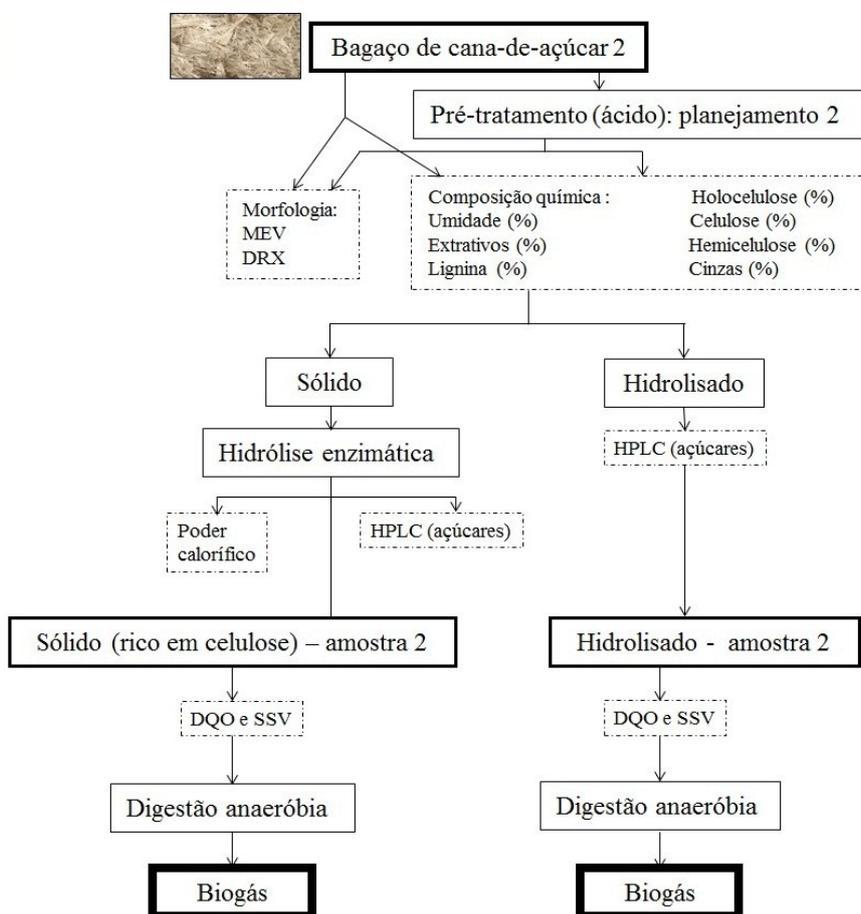
4.5, difração de raios-X (DRX) descrito no item 4.6 e poder calorífico descrito no item 4.12 foram realizados juntamente.

Todas as análises químicas descritas foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos em base seca e considerando o rendimento dos pré-tratamentos.

A otimização dessas condições para o pré-tratamento de BB pode garantir uma melhor utilização da fração líquida para produção de biogás.

O fluxograma do presente estudo, para o planejamento 2, está representado de forma esquemática na Figura 38.

**Figura 38.** Fluxograma esquemático das etapas do procedimento experimental para o 2º planejamento.



Fonte: Autora

## **6.4 Caracterizações do bagaço de cana-de-açúcar antes e após pré-tratamento**

### **6.4.1 Teor de Umidade**

A determinação do teor de umidade das amostras foi realizada em balança OHAUS® MB23, de acordo com descrição no item 4.41.

### **6.4.2 Teor de extrativos**

A quantificação dos extrativos presentes na biomassa foi determinada conforme item 4.4.2.

### **6.4.3 Teor de Cinzas**

O teor de cinzas da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T211 om-02, no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental do Departamento de Química (UFOP).

Os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 525°C por 4 h e em seguida, resfriados, à temperatura ambiente, em dessecador e tarados. Cerca de 1,0 (com precisão de 0,001 g) 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. 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 as equações no item 4.4.3.

### **6.4.4 Teor de lignina**

O teor de lignina da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T222 om-98, modificada, de acordo com o descrito item 4.4.4.

### **6.4.5 Teor de holocelulose**

O teor de holocelulose da amostra foi determinado de acordo com o descrito item 4.4.5.

#### **6.4.6 Teores de celulose e hemiceluloses**

O teor de celulose da amostra foi determinado de acordo com o descrito item 4.4.5.

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a percentagem da diferença entre os teores de holocelulose e celulose em relação à massa inicial de amostra seca, considerando o rendimento calculado na obtenção da holocelulose, descrito no item 4.4.6.

#### **6.4.7 Rendimento e deslignificação e balanço de massa e perda de massa**

O cálculo de rendimento do processo de pré-tratamento, da influência de deslignificação, balanço e perda de massa foram determinados segundo item 4.4.7.

#### **6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para análise da superfície, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura, de acordo com item 4.5.

#### **6.6 Difração de Raios-X (DRX)**

As análises de difração de raios-x foram realizados segundo item 4.6.

#### **6.7 Ensaio de hidrólise enzimática**

Após os diferentes pré-tratamentos aplicados nos resíduos lignocelulósicos, os mesmos foram utilizados em processos de hidrólise enzimática (HE), conforme descrito no item 4.7.

Para essa etapa, as amostras foram lavadas com água destilada até pH neutro, seca em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 horas. De acordo com Taherzadeh e Karimi (2007a) diferentes inibidores químicos podem ser produzidos durante o pré-tratamento ácido que reduz a atividade da celulase e, portanto, a lavagem com água é necessária para a biomassa pré-tratada antes da hidrólise enzimática.

Vale destacar que, durante os ensaios, a concentração inicial da enzima foi fixada em 10 FPU/mL em relação à celulose presente no substrato. Essa dosagem foi utilizada uma vez que é considerada viável economicamente (BATALHA *et al.*, 2015; LIMA, 2018).

A fração sólida, após a hidrólise enzimática, foi lavada com água destilada até pH neutro e seca em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 h. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos zip lock, hermeticamente fechados e reservadas para caracterizações (teor de umidade e poder calorífico) e para os ensaios de digestão anaeróbia.

Além da determinação da concentração de ART, as frações líquidas foram filtradas em filtros de nitrocelulose com tamanhos de poros de 0,45 µm e para quantificação dos açúcares (glicose e xilose), submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito no item 4.7.

A perda de massa (PM) do processo de hidrólise enzimática foi calculada em relação à massa final da biomassa após o pré-tratamento (base seca) e a massa inicial da biomassa *in natura*, conforme equação 36 (item 4.7). Os resíduos da hidrólise foram separados para posterior quantificação de massa residual. A conversão enzimática de celulose, de acordo com a equação 37, do item 4.7.

A otimização das condições para o pré-tratamento de BB juntamente com a HE pode garantir uma melhor utilização da fração sólida para produção de biogás.

### **6.8 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO**

As análises de DQO foram realizadas de acordo com descrito item 4.8.

Foi realizado DQO da fração sólida (após HE) e líquida (após o pré-tratamento) da melhor condição para a produção de biogás.

### **6.9 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)**

A determinação de SSV do inoculo anaeróbico e do sólido resíduo obtido após a HE foi de acordo com o descrito item 4.9.

### **6.10 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos**

Para os testes de digestão anaeróbia (DA) foram utilizados como substrato o resíduo do pré-tratamento do bagaço de cana (fração líquida) e a fração sólida resultante da hidrólise enzimática do bagaço de cana, conforme descrito no item 4.10.

Destaca-se que para o planejamento experimental apresentado na Tabela 12 foram criadas superfícies de respostas para variáveis estudadas: eficiência de deslignificação,

teor de celulose, teor de hemicelulose e rendimento de hidrólise enzimática. Em função dessas otimizações foram feitos o biogás da melhor condição do planejamento 2.

### **6.11 Monitoramento do biogás**

A produção de biogás (fração líquida e sólida) foi monitorada, diariamente, registrando por meio da aferição da pressão volume acumulado de biogás, conforme citado no item 4.11.

### **6.12 Determinação do poder calorífico**

O valor do poder calorífico foi obtido experimentalmente através da análise da biomassa, descrito no item 4.13.

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **7.1 Pré-tratamento e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar**

Apesar de alguns autores defenderem a inclusão de etapas de moagem antes do pré-tratamento, alguns pesquisadores (BALLESTEROS, 2002; MOSIER *et al.*, 2005) defendem 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 trituração (BAÊTA, 2016), por tal motivo no presente estudo optou-se por não utilizar uma etapa previa de moagem (Figura 39) do BB.

Algumas amostras apresentaram coloração mais escura e amarronzada diferente do bagaço *in natura*, provavelmente está associada com a quebra química da lignina e extrativos (SUN *et al.*, 2005) e/ou ser relacionada com os produtos de degradação de açúcares que são gerados em temperaturas elevadas durante o pré-tratamento (caramelização dos açúcares) (OLIVEIRA, 2012). Alternativamente, o aparecimento de produtos acastanhados em amostras tratadas pode estar relacionado com a formação de pseudo-melanoidinas a partir de produtos de degradação de açúcar que são produzidos a temperaturas de pré-tratamento de vapores superiores (aproximadamente 190°C) (SUN *et al.*, 2005).

**Figura 39.** Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados



**Fonte:** Autora. (1 - Bagaço de cana *in natura*; 2 - bagaço pré-tratado: amostra 2; 3 - bagaço pré-tratado: amostra 5; 4 - bagaço pré-tratado: amostra 15; 5 - bagaço pré-tratado: amostra 17).

De acordo com alguns autores como Pérez *et al.* (2007), as variáveis consideradas mais importantes durante os processos de pré-tratamento envolvendo biomassas lignocelulósicas incluem, temperatura, tempo de residência, tamanho de partícula e razão sólido-líquido. Ballesteros *et al.* (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 Karagöz *et al.* (2004) mostraram que a preservação de produtos como açúcares C5 e C6 é possível em menores temperaturas e maiores tempos de residência.

No caso da hidrólise ácida, esta é uma técnica efetiva na solubilização do componente hemicelulósico da biomassa, provocando a desacetilação e despolimerização da fração hemicelulósica, tornando a celulose mais acessível à digestão. Combinações entre concentração de ácido, temperatura e tempo de reação podem gerar grandes quantidades de açúcares provenientes dessa fração. Durante o pré-tratamento ácido, os catalisadores liberam prótons (íon  $H_3O^+$ ) que clivam as ligações

heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias macromoleculares da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose (GEHLEN, 2013; LIU, 2010).

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 (LIU, 2010; BAËTA, 2016) e os ácidos orgânicos, liberados durante o pré-tratamento em função do vapor em alta temperatura, atacam as ligações glicosídicas dos carboidratos, reduzindo também o grau de polimerização da molécula (OVEREND e CHORNET, 1987). Como as hemiceluloses tem uma estrutura supramolecular amorfa e de maior acesso aos reagentes químicos do que a celulose (FENGEL e WEGENER, 1989), a impregnação de vapor provoca hidrólise preferencialmente das hemiceluloses, removendo-a do material pré-tratado (OLIVEIRA, 2012).

Para o pré-tratamento com ácido cítrico e autoclave, Rossi (2015) menciona que é imprescindível, para a eficiência do processo de extração, o aumento de 40% na concentração de ácido cítrico. O tempo de permanência do material na autoclave tem significância menor (3,2%) nos resultados, indicando que o processo em 15 minutos tem eficiência similar ao tempo de 30 minutos. Isto é importante, pois se pode diminuir o custo energético do processo.

Bonomi, (2010) aborda que é de fundamental importância com respeito à eficiência do pré-tratamento hidrolítico ácido, o qual demanda concentrações adequadas de íons hidroxônios ( $H_3O^+$ ), formados a partir da água e do ácido dissociado. A insuficiência de água na biomassa resultaria em menor formação de íon hidroxônio, bem como reduzida disponibilidade de fluido de transporte deste no interior da biomassa, e conseqüente perda de eficiência da capacidade hidrolítica. Portanto, neste caso, o desafio consiste em determinar a quantidade ótima de água no bagaço, de modo a garantir efetiva impregnação da biomassa, enquanto se obtém uma carga de sólidos no reator, principalmente em processos de explosão a vapor.

Por fim, Martin *et al.*, 2007, evidencia que a hidrólise de celulose com ácido diluído é realizada a alta temperatura e para pré-hidrólise de hemiceluloses, o processo é realizado a temperaturas relativamente baixas. A pré-hidrólise com ácido diluído pode ser usada como um método de pré-tratamento para aumentar a reatividade da celulose em direção às celulases.

Logo, abordou-se as 3 variáveis (temperatura, RSL e tempo) para avaliar as influências destas em relação ao pré-tratamento com ácido cítrico diluído, como as referências mencionadas.

Prossegue-se a análise da composição química e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar bruto e após o pré-tratamento.

A composição química do bagaço bruto (BB) (Tabela 13) está de acordo com aquela encontrada por outros autores.

**Tabela 13.** Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

<b>Amostra/Teste</b>	<b>BB</b>
<b>Umidade (%)</b>	9,97 ± 0,06
<b>Extrativos (%)</b>	2,31 ± 0,02
<b>Lignina Total (%)</b>	26,49 ± 0,04
<b>Celulose (%)</b>	40,94 ± 0,59
<b>Hemiceluloses (%)</b>	56,13 ± 0,65
<b>Cinzas (%)</b>	0,41 ± 0,02
<b>Balanco de massa (%)</b>	123,97

Fonte: Autora

A Tabela 14 apresenta os resultados de caracterização dos bagaços pré-tratados pelo processo ácido cítrico diluído.

Analisando os rendimentos, obteve-se valores acima de 80% para os experimentos 5 (RSL= 9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=140°C e t=20 min), 1 (RSL= 5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=120°C e t=55 min), 3 (RSL= 7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=130°C e t=90 min), 4 (RSL= 5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=140°C e t=20 min), 8 (RSL= 12,0 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min), 15 (RSL= 7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=170°C e t=20 min), 2 (RSL= 9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=120°C e t=55 min) e 9 (RSL= 7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min).

Em temperaturas altas (180°C) os rendimentos foram baixos, como esperado, há uma perda de massa em função da degradação irreversível dos polissacarídeos (PASQUINI, 2004). Os maiores rendimentos ficaram na faixa abaixo de 140° C, sem relação com a razão sólido-líquido e tempo.

**Tabela 14.** Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido cítrico.

Amostra/ Teste	RSL (g.mL <sup>-1</sup> )	T (°C)	t (min)	Rendimento (%)	Umidade (%)	Lignina Total (%) <sup>*</sup>	Deslignificação (%)	Celulose (%) <sup>*</sup>	Hemiceluloses (%) <sup>*</sup>	Balanco de Massa (%)
1	5,25	120	55	94,23	2,58 ± 0,00	22,56 ± 0,05	10,44	25,05 ± 1,08	36,08 ± 1,56	83,69
2	9,75	120	55	80,95	2,44 ± 0,00	22,03 ± 0,00	12,52	51,72 ± 8,60	0,10 ± 0,02	73,86
3	7,50	130	90	91,36	2,35 ± 0,01	25,18 ± 0,68	0,03	44,38 ± 2,97	19,75 ± 1,32	89,31
4	5,25	140	20	89,81	2,11 ± 0,00	23,17 ± 2,01	8,01	40,98 ± 3,29	22,98 ± 3,82	87,14
5	9,75	140	20	95,68	2,39 ± 0,01	27,59 ± 1,64	-9,55	35,97 ± 1,15	29,79 ± 0,95	93,36
6 (c)	7,50	150	55	70,67	2,28 ± 0,01	18,34 ± 1,35	27,21	36,20 ± 10,63	11,32 ± 3,32	65,87
7 (c)	7,50	150	55	78,87	2,37 ± 0,01	20,02 ± 2,91	20,52	40,25 ± 7,62	13,06 ± 2,47	73,32
8	12,00	150	55	83,94	2,45 ± 0,01	21,05 ± 0,45	16,42	40,01 ± 5,41	14,82 ± 2,00	75,88
9 (c)	7,50	150	55	80,74	2,46 ± 0,00	19,58 ± 4,42	22,27	41,63 ± 7,02	11,07 ± 1,87	72,29
10 (c)	7,50	150	55	78,91	2,55 ± 0,01	16,27 ± 3,83	35,40	39,28 ± 7,42	12,07 ± 2,28	67,62
11	3,00	150	55	73,12	2,45 ± 0,01	21,90 ± 4,88	13,07	36,74 ± 9,55	13,13 ± 3,41	71,77
12 (c)	7,50	150	55	74,83	2,14 ± 0,01	19,52 ± 2,40	22,49	36,26 ± 8,62	13,65 ± 3,25	69,43
13	9,75	160	90	78,18	2,43 ± 0,01	21,61 ± 3,11	14,23	40,17 ± 7,93	11,01 ± 2,17	72,78
14	5,25	160	90	74,53	2,23 ± 0,00	14,99 ± 1,84	40,46	40,73 ± 9,84	10,18 ± 2,46	65,90
15	7,50	170	20	83,80	2,51 ± 0,01	12,52 ± 2,16	50,28	41,57 ± 5,68	16,71 ± 2,29	70,81
16	9,75	180	55	65,22	2,39 ± 0,00	16,33 ± 0,28	35,16	36,52 ± 13,77	7,39 ± 2,79	60,24
17	5,25	180	55	64,92	2,16 ± 0,02	22,55 ± 0,67	10,47	39,14 ± 14,95	4,90 ± 1,87	66,59

<sup>\*</sup>Considerando o rendimento e umidade no pré-tratamento.

Fonte: Autora

Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático).

Os resultados de rendimento foram analisados por ANOVA (Tabela 15) sendo possível a construção de um diagrama de Pareto (Figura 40) para observar os efeitos significativos, do ponto de vista estatístico, das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) sobre a variável dependente (rendimento). As análises de variância (ANOVA e Pareto) dos resultados experimentais foram realizadas para eliminar os efeitos não significativos.

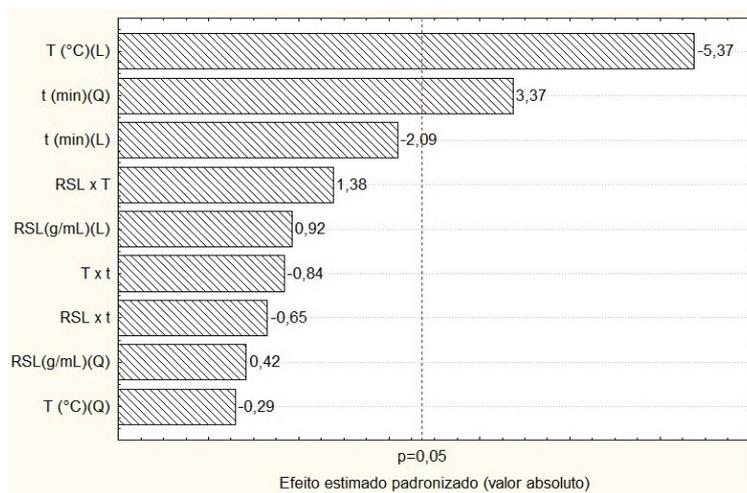
**Tabela 15.** Análise de variância (ANOVA) para rendimento.

ANOVA - Rendimento					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	<i>p</i> -valor
RSL(g/mL)	20,62	1	20,62	0,85	0,39
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	4,24	1	4,24	0,18	0,69
T (°C)	697,84	1	697,84	28,91	0,00
T (°C) <sup>2</sup>	2,08	1	2,08	0,09	0,78
t (min)	105,92	1	105,92	4,39	0,07
t (min) <sup>2</sup>	274,12	1	274,12	11,36	0,01
RSL x T	46,01	1	46,01	1,91	0,21
RSL x t	10,25	1	10,25	0,42	0,53
T x t	16,99	1	16,99	0,70	0,43
Erro	168,95	7	24,14		
Total	1347,46	16			

Fonte: Autora

O diagrama de Pareto (Figura 40) mostra que a variável *T* possui um efeito significativo negativo e a variável *t* por efeito ao quadrado tem efeito positivo sobre a variável dependente rendimento, o que é confirmado pelos *p*-valores inferiores a 0,05 na análise de variância realizada (Tabela 15). Assim, os maiores rendimentos foram em baixas temperaturas.

**Figura 40.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) em relação ao rendimento.



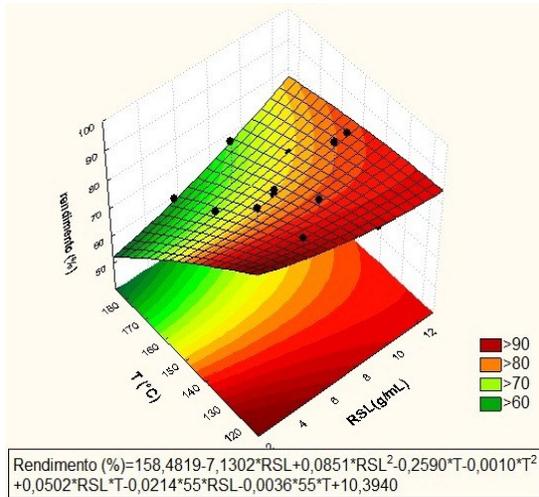
**Fonte:** Autora

A escolha do melhor processo para a conversão de biomassa não deve focar somente em resultados de uma única etapa e sim pela análise do efeito combinado de todas as etapas envolvidas nesse processo (GALBE; ZACCHI, 2010). Para isso, é necessário calcular o rendimento global do processo, o que facilita a escolha da melhor configuração de etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática para o processo de conversão de celulose a açúcares fermentescíveis (OLIVEIRA, 2012). Em outras palavras, as conversões globais do rendimento do pré-tratamento deve ser levado em conta, pois pode decair o valor em condições mais severas. O que facilita na escolha da melhor configuração para o processo de conversão de celulose à açúcares fermentescíveis e conseqüentemente, uma viabilidade econômica do processo.

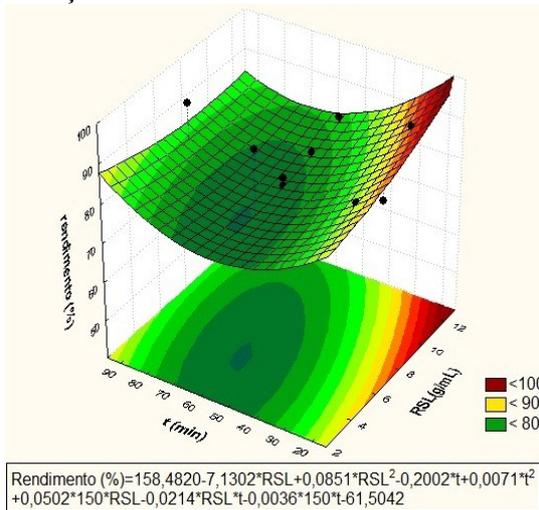
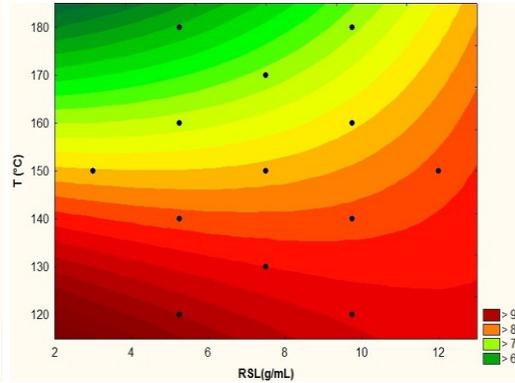
Perante o exposto, foram construídas superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno (Figura 41) para expressar graficamente as melhores condições experimentais.

Nas razões sólido-líquido intermediárias (RSL: 5,25 a 9,75 g.mL<sup>-1</sup>), temperaturas baixas (T: 120 a 140°C) e nos 3 níveis de tempo de retenção (t: 20, 55 e 90 min), converteram em balanço de massa na faixa de 80 a 95%.

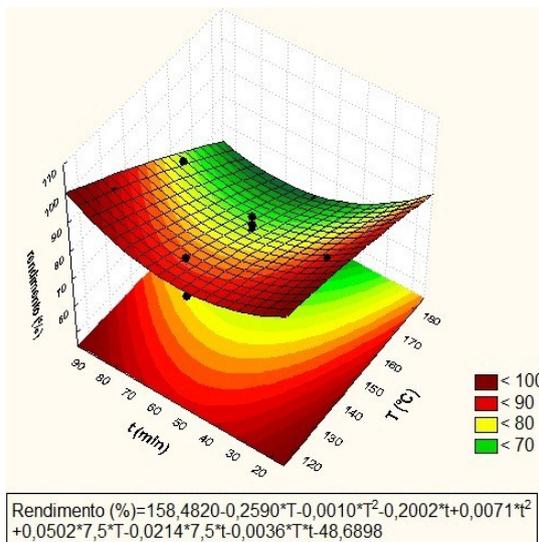
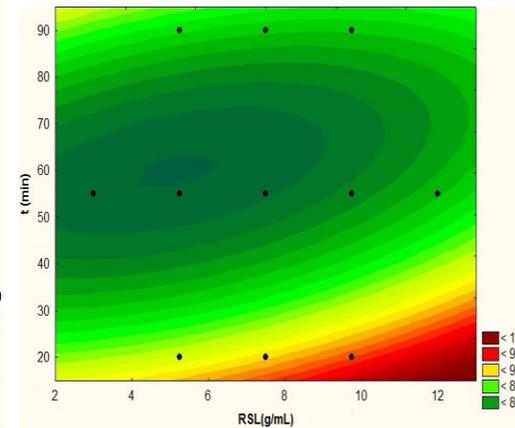
**Figura 41.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com rendimento (%).



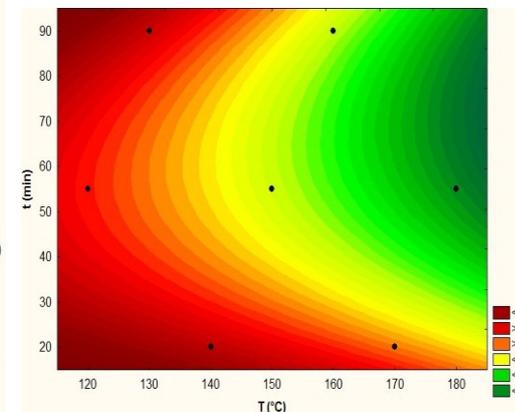
Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t



Fonte: Autora

Conforme a Tabela 14 é possível observar que os pré-tratamentos das amostras 15 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=170°C e t=20 min), 14 (RSL=5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=160°C e t=90 min), 10 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min), 16 (RSL=9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=180°C e t=55 min), 6 (RSL= 7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min), 12 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min), 9 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min) e 7 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C e t=55 min) acarretaram em valor de lignina abaixo de 20 %: 12,52%, 14,99%, 16,27%, 16,33%, 18,34%, 19,52%, 19,58% e 20,02 % respectivamente. Porém, todo o material pré-tratado apresentou valores de lignina inferior ao encontrado no material de partida (BB), indicando a eficiência do procedimento ácido, exceto a amostra 5. Em relação aos pontos centrais (amostras 6,7,9,10 e 12) a deslignificação resultou em média de 25,78%.

Pré-tratamentos da biomassa com ácido diluído podem causar a fragmentação da lignina, resultando em remoção da lignina de 2 – 24% (PU *et al.*, 2013).

Perante o exposto, foram construídas superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno para expressar graficamente as melhores condições experimentais. Essas superfícies são apresentadas na Figura 42 para lignina.

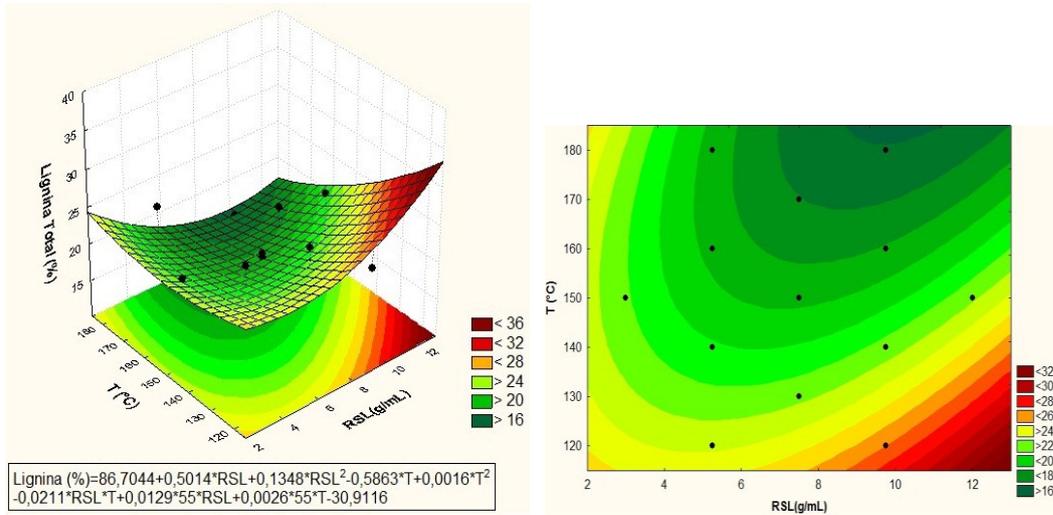
As superfícies de resposta e de contorno expressam graficamente as regiões experimentais ótimas. É possível perceber que as condições de temperaturas acima de 150°C e na faixa de 5,25 a 9,75 (g/mL) induziram a uma deslignificação maior. No que se refere à t e RSL, tempos acima de 20 min e níveis de 5,25 a 9,75 (g/mL) mostram condições favoráveis para obtenção de baixos teores de lignina. A maior influencia, no processo de pré-tratamento com ácido cítrico diluído em relação à deslignificação, foi em temperaturas altas (acima de 150°C), porém não foi definitivo em relação ao tempo.

Esses resultados sugerem, a princípio, em resumo, que nas condições de RSL de 5,25 a 9,75 g.mL<sup>-1</sup> e de temperatura superior a 150 °C ocasionaram a redução do teor de lignina, independente do tempo de reação. As deslignificações altas corroboram com esta afirmação.

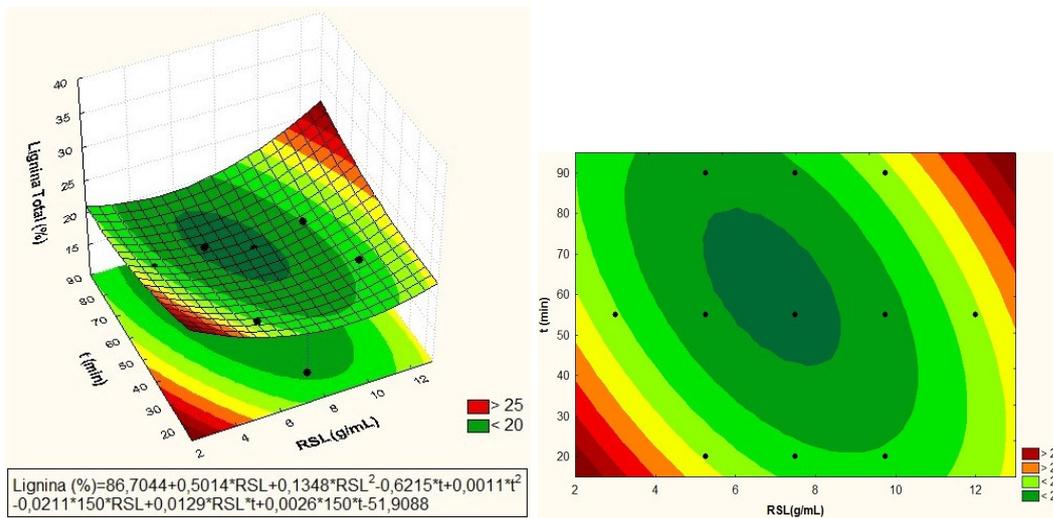
Algumas amostras podem ter remoção alta de lignina, porém houve um rendimento do processo de pré-tratamento baixo. Isso pode ser explicado pelo processo ser agressivo, em condições severas, como por exemplo, a amostra 16.

Em temperaturas superiores (acima de 100°C) e em meio ácido, as ligações químicas da lignina, tais como  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4, podem ser rompidas, permitindo as reações de condensação e a modificação da lignina na parede celular da planta (PU *et al.*, 2013; BAËTA *et al.*, 2016).

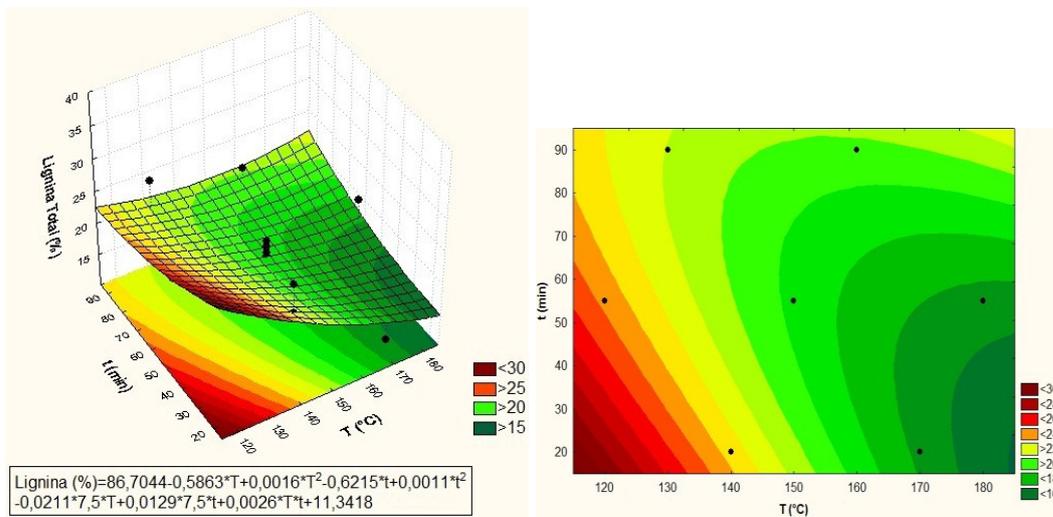
**Figura 42.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com lignina (%).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Bonomi (2010) apresenta que a solubilização e fracionamento da lignina associada a elevadas severidades de processo são potencialmente prejudiciais às etapas subsequentes (hidrólise enzimática e fermentação, por exemplo), em virtude da deposição de lignina sobre a superfície da polpa celulósica, bem como da geração de compostos inibidores da fermentação, tais como derivados fenólicos e ácidos orgânicos.

Os resultados da análise de variância univariada (ANOVA) para a celulose encontra-se na Tabela 16. A interação das variáveis RSL x T foi significativa ( $p$ -valor < 0,05), do modo que o diagrama de Pareto, apresentado na Figura 43, confirma influência e é possível perceber que a aplicação dessas variáveis em seus níveis inferiores favorecem a eficiência da hidrólise da celulose.

**Tabela 16.** Análise de variância (ANOVA) para celulose.

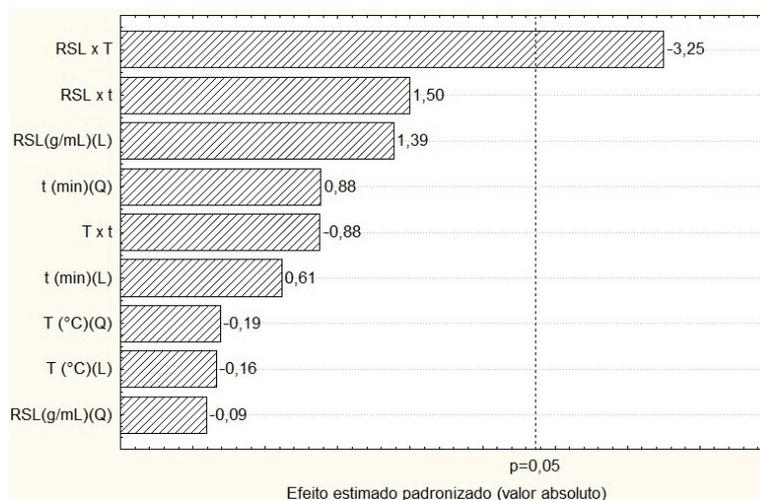
ANOVA - Celulose					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	$p$ -valor
RSL(g/mL)	39,13	1	39,13	1,92	0,21
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	0,18	1	0,18	0,01	0,93
T (°C)	0,52	1	0,52	0,02	0,88
T (°C) <sup>2</sup>	0,72	1	0,72	0,03	0,86
t (min)	7,61	1	7,61	0,37	0,56
t (min) <sup>2</sup>	15,84	1	15,84	0,78	0,41
RSL x T	214,62	1	214,62	10,57	0,01
RSL x t	45,51	1	45,51	2,24	0,18
T x t	15,58	1	15,58	0,77	0,41
Erro	142,17	7	20,31		
Total	445,05	16			

Fonte: Autora

O teor de celulose eleva-se após o pré-tratamento, considerando o rendimento da etapa, na faixa de 52 a 41 %, para as amostras 2 (RSL=9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=120°C, t=55 min), 3 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=130°C, t=90 min), 9 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=150°C, t=55 min), 15 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=170°C, t=20 min), 4 (RSL=5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=140°C, t=20 min) e 14 (RSL= 5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=160°C, t=90 min).

Em comparação, o teor de celulose obtido do BB foi de 40,94% e para os pontos centrais, foi um teor médio de 38,72%.

**Figura 43.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) em relação à celulose.



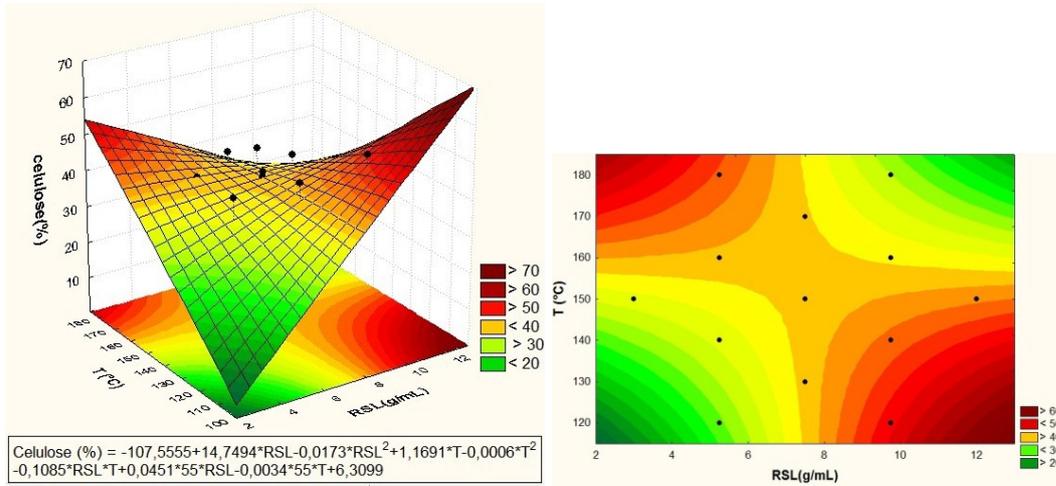
**Fonte:** Autora

Estudos mostram que a celulose em temperatura elevada (acima de 170°C) sofre reações de ruptura na sua cadeia polimérica, diminuindo o seu grau de polimerização, além de sofrer também reações de degradação (desidratação dos açúcares levando a hidroximetilfurfural) (FENGEL; WEGENER, 1989, OLIVEIRA, 2012), sendo que quanto maior a temperatura do pré-tratamento, maior a velocidade de degradação (OLIVEIRA, 2012; GLASSER; WRIGHT, 1998; RAMOS, 2003).

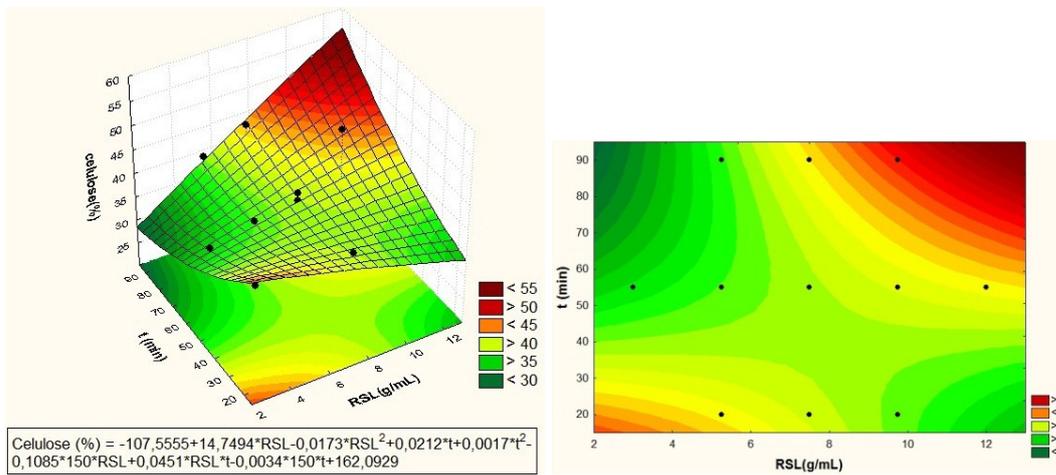
Perante o exposto, foram construídas superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno para expressar graficamente as melhores condições experimentais. Essas superfícies são apresentadas na Figura 44 para celulose.

Analisando os dados, em relação ao teor de celulose, verifica-se que os maiores valores são obtidos nas condições: menor RSL, entre 5,25 e 7,5 g/mL (exceto para amostra 2), T abaixo de 160°C (exceto amostra 15) e t independentemente.

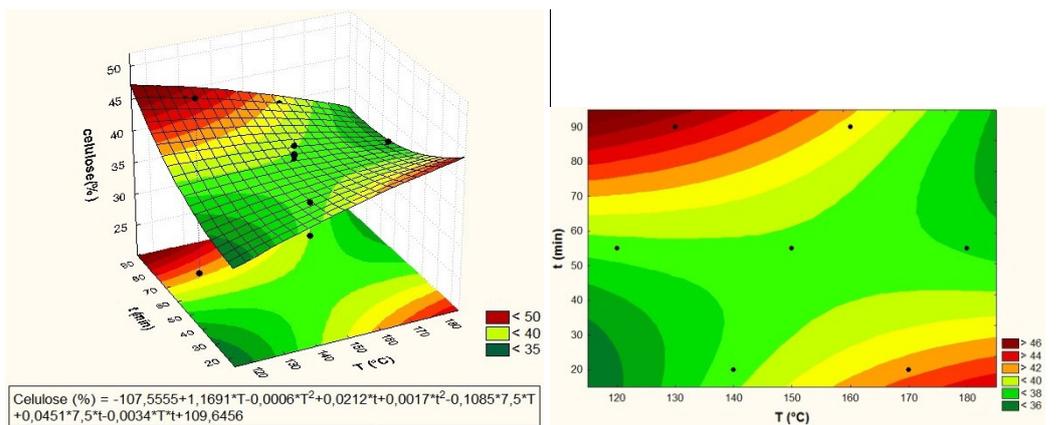
**Figura 44.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com celulose (%).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

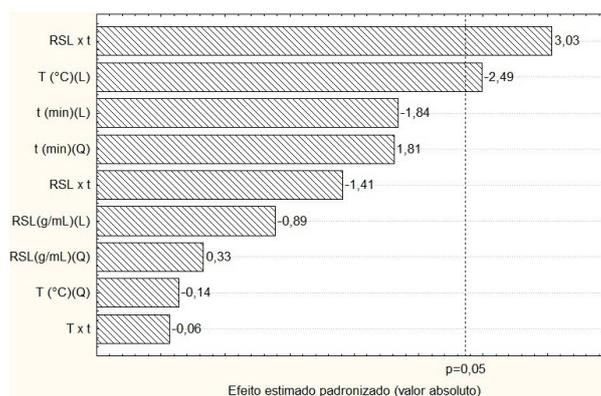
As interações das variáveis RSL x t e a variável T foram significativas para a eficiência de hemiceluloses ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). A análise de variância univariada (ANOVA), tabela 17, e o diagrama de Pareto apresentado na Figura 45 confirmam o valor positivo dos efeitos padronizados, sendo a influência das interações das variáveis RSL x t a mais significativa. Além disso, a variável T foi significativa, em seus níveis inferiores, favorecendo a eficiências de hemiceluloses (efeitos padronizados negativos).

**Tabela 17.** Análise de variância (ANOVA) para hemiceluloses.

ANOVA - Hemiceluloses					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	$p$ -valor
RSL(g/mL)	31,57	1	31,57	0,78	0,40
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	4,32	1	4,32	0,10	0,75
T (°C)	249,09	1	249,09	6,19	0,04
T (°C) <sup>2</sup>	0,78	1	0,78	0,02	0,89
t (min)	135,95	1	135,95	3,38	0,11
t (min) <sup>2</sup>	131,46	1	131,46	3,27	0,11
RSL x T	369,93	1	369,93	9,20	0,02
RSL x t	79,54	1	79,54	1,98	0,20
T x t	0,16	1	0,16	0,00	0,95
Erro	281,55	7	40,22		
Total	1217,39	16			

Fonte: Autora

**Figura 45.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (RSL, T e t) em relação à hemiceluloses.



Fonte: Autora

A estrutura amorfa de hemiceluloses possui cadeias ramificadas e longas (bem menores que as da celulose em termos de grau de polimerização) com presença de

grupos hidroxila, ácido carboxílico e grupos acetila, acarretando em maiores solubilidades em meio aquoso quando comparado com a celulose (LIMA, 2018). Assim, os maiores teores de hemiceluloses, após o pré-tratamento, considerando o rendimento da etapa, formaram as amostras 1 (RSL=5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=120°C, t=55 min), 5 (RSL=9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=140°C, t=20 min), 4 (RSL=5,25 g.mL<sup>-1</sup>, T=140°C, t=20 min), 3 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=130°C, t=90 min) e 15 (RSL=7,5 g.mL<sup>-1</sup>, T=170°C, t=20 min). Para os pontos centrais (amostras 6, 7, 9, 10 e 12), o teor médio foi de 12,23%.

Para condições intermediárias (150°C/ 55 min / 3 e 7,5 g/mL) foi de ± 12,38%, enquanto em condições mais severas (180°C/ 55 min / 5,25 e 9,75 g/mL), esse valor foi de ± 9,84% na condição de pré-tratamento com ácido diluído. Esse efeito de solubilização da hemicelulose pela ação do vapor ocorre devido à ruptura dos grupos acetil presentes nas hemiceluloses desencadeando a autohidrólise das ligações glicosídicas dos carboidratos e pelo próprio efeito da temperatura sobre as cadeias de hemiceluloses. Maloney *et al.*, (1985) demonstraram em seus estudos de cinética de hidrólise de hemiceluloses que a remoção dos grupos acetilas ocorre preferencialmente a baixas temperaturas entre 100°C a 130°C, enquanto a taxa de remoção de xilanas se faz a temperaturas entre 150-170°C.

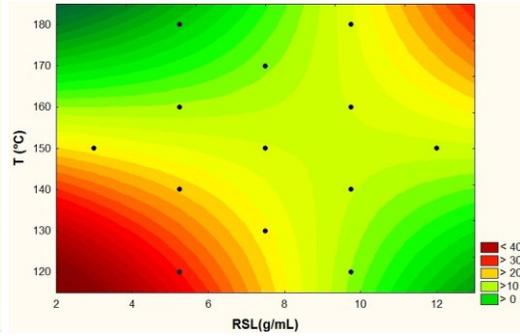
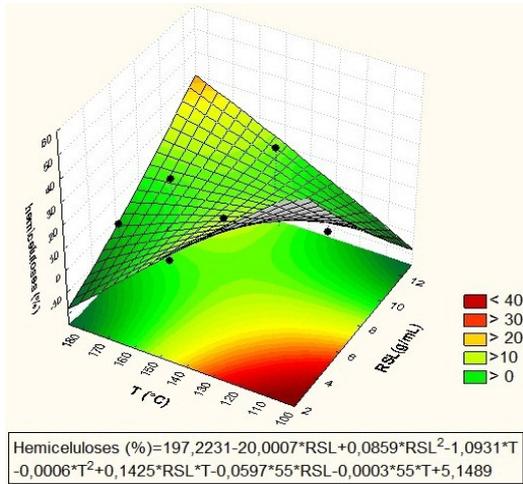
Para os conteúdos de hemiceluloses, há uma reversão das tendências observadas para celulose em relação à RSL.

Foram construídas superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno para expressar graficamente as melhores condições experimentais. Essas superfícies são apresentadas na Figura 46 para hemiceluloses.

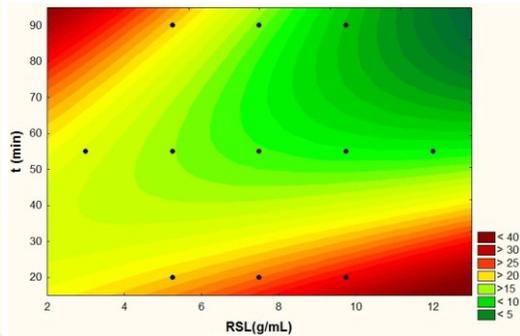
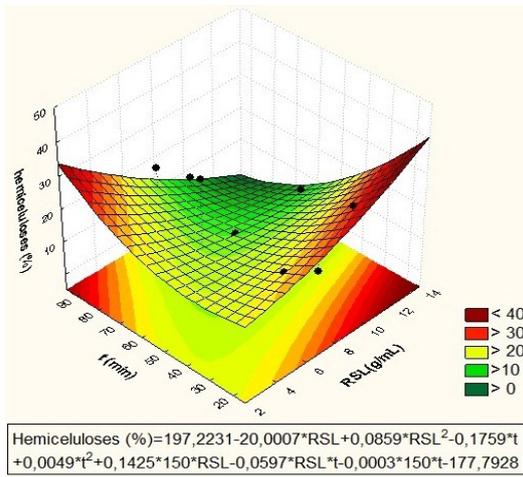
No compendio dos dados, os maiores conteúdos de hemiceluloses obtidos foram com as seguintes combinações: maior RSL (superior a 5,25 g/mL), T abaixo de 150 °C (exceto amostra 15) e t inferiores a 55 min (exceto amostra 3).

Vale ressaltar que, na literatura, autores demonstraram que a digestibilidade enzimática da biomassa é aumentada pela diminuição do teor de lignina e hemiceluloses (ZHU *et al.*, 2008; CARVALHEIRO *et al.*, 2008). Novo *et al.* (2011), estima-se que reduzir seu conteúdo em até aproximadamente 70-80% em relação ao montante inicial é suficiente. A amostra 2 (RSL=9,75 g.mL<sup>-1</sup>, T=120°C, t=55 min) foi a que apresentou maior remoção de hemiceluloses.

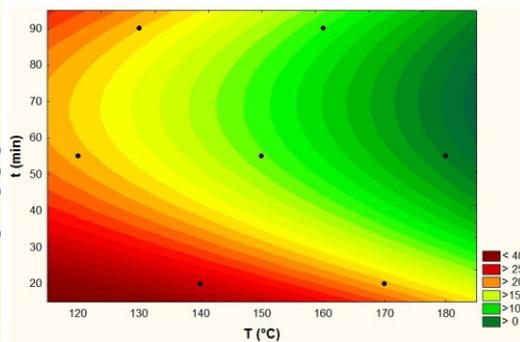
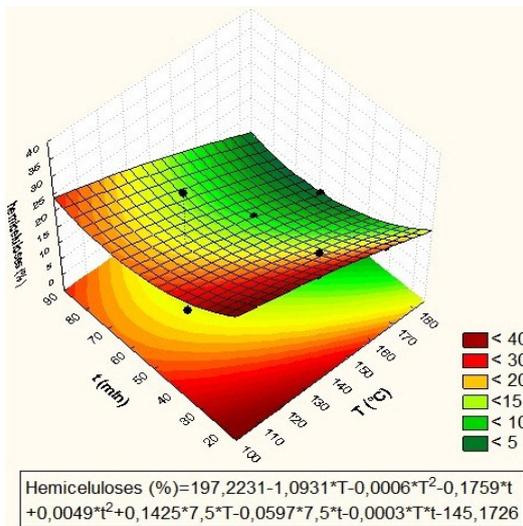
**Figura 46.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com hemiceluloses (%).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Desta forma, estudar as variáveis do processo de pré-tratamento empregando ácido cítrico diluído neste 2º planejamento mostrou-se alta remoção de lignina (12-28%) e hemicelulose (0,1-36%) com concomitante preservação da fração celulósica (25-52%) em relação ao 1º planejamento, na qual obteve-se 22-25% de remoção de lignina e 13-18% de hemicelulose e teor de celulose na ordem de 24-37%.

Em razão de comparação, destacam-se algumas composições (% p/p, base seca) de amostras de bagaço de cana, relatadas na literatura. Martín *et al.* (2007) utilizando pré-hidrólise a 22°C, durante 20, 40 ou 60 min, com 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na proporção sólido-líquido de 1:10, obtiveram 43,1 (celulose), 31,1 (hemiceluloses), 11,4 (lignina) e 14,4 (outros). Neureiter *et al.* (2002) testaram os efeitos da concentração de ácido sulfúrico, temperatura, tempo e concentração de matéria seca na hidrólise da hemiceluloses, foram estudados reatores de hidrólise em bateladas e usando delineamento experimental estatístico. A composição foi de 40,2, 26,4, 25,2 e 8,2 para celulose, hemiceluloses, lignina e outros, respectivamente. No estudo de Aguilar *et al.* (2002), obtiveram 38,9 para celulose, 26,2 para hemiceluloses, 23,9 para lignina e 1,0 para outros, nos quais utilizaram hidrólise de ácido sulfúrico em várias temperaturas (100, 122 e 128°C) e concentrações de ácido (2%, 4% e 6%). As condições ótimas encontradas foram 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 122°C por 24 min.

Nesse contexto, os valores da literatura supracitados podem ter sido superiores ou próximos aos alcançados nesse estudo, todavia usou-se ácido cítrico diluído, que é menos agressivo, viável economicamente e ambientalmente, tornando o processo eficiente. Ademais, em processos que utilizam ácidos fortes, pode ocorrer uma elevada formação de inibidores enzimáticos. O uso de ácido cítrico diluído, que é um ácido fraco, justifica-se pelo fato de minimizar a produção de compostos inibitórios e, como consequência, não interferir na ação das enzimas.

A composição do líquido após o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido cítrico diluído está representado na tabela 18.

Em consequência das altas temperaturas e do tempo reacional (fator severidade) empregado nos pré-tratamentos durante a hidrólise ácida, os inibidores incluem o ácido acético, liberado pela desacetilação (hidrólise dos grupos acetila) das hemiceluloses, os ácidos fórmico e levulínico, que são produtos de degradação do açúcar; compostos fenólicos que são formados principalmente pela degradação parcial da lignina, e os furanos aldeídos, furfural (FF) e 5-hidroximetilfurfural (HMF), que são formados pela

degradação de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), respectivamente (MARTÍN *et al.*, 2007; FANGKUM *et al.*, 2011; BONOMI, 2010; LARSSON *et al.*, 2000; QUINTERO-RAMIREZ, 2010; NEUREITER *et al.*, 2002). Por sua vez, o furfural pode degradar-se em ácido fórmico ou se polimerizar e o HMF pode originar quantidades equimolares de ácido fórmico e levulínico (COSTA *et al.*, 2014; BONOMI, 2010). Ademais, desses dois ácidos alifáticos (fórmico e levulínico), forma-se ácido acético procedente da hidrólise da hemicelulose (BONOMI, 2010; CHIARAMONTI *et al.*, 2012). De modo a ter um bioprocesso eficiente, é desejável reduzir tanto quanto possível a formação de inibidores durante a hidrólise.

**Tabela 18.** Composição do líquido após o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido cítrico diluído

Amostra	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ác. Fórmico (g/L)	Ác. Acético (g/L)	HMF (g/L)	FF (g/L)
1	6,20	20,22	3,34	0,07	0,07	0,01	0,05
2	5,50	20,44	5,38	3,34	2,25	0,15	0,03
3	4,85	17,22	4,12	2,36	0,49	0,03	0,10
4	2,86	13,36	0,19	2,43	0,03	0,00	0,05
5	4,61	16,07	3,14	2,41	0,23	0,03	0,04
6	4,34	18,72	3,84	4,48	2,57	0,54	0,15
7	4,00	16,29	3,53	4,36	2,11	0,52	0,12
8	4,53	17,86	2,51	3,57	2,72	0,43	0,19
9	4,05	15,63	3,81	3,54	2,10	0,47	0,10
10	1,90	7,15	1,20	1,49	0,85	0,16	0,04
11	4,04	13,82	3,28	3,81	1,57	0,25	0,07
12	4,97	21,91	3,24	4,29	2,98	0,47	0,13
13	8,57	18,78	2,47	6,31	6,45	1,39	1,61
14	8,85	24,70	3,22	7,66	5,36	1,51	0,66
15	4,89	17,06	2,87	3,20	1,30	0,26	0,08
16	9,15	17,03	1,28	7,89	9,54	1,79	3,12
17	2,43	4,03	0,28	1,49	0,95	0,50	0,28

Fonte: Autora

Além dos compostos inibitórios já mencionados, a inibição pelo produto (glicose) também deve ser considerada. Isso ocorre quando a concentração de glicose é muito alta, podendo reprimir atividade da celulase, conhecida como inibição “feedback” (COSTA *et al.*, 2014). Segundo Xiao *et al.* (2004), 100 g/L de glicose causaram 50% de inibição da hidrólise enzimática da celobiose e, segundo Oh *et al.* (2000), 5 g/L de glicose causaram 80% de inibição da atividade  $\beta$ -glucosidase. O efeito inibitório foi também observado para outros açúcares, como manose, xilose e galactose, no entanto a glicose foi o único açúcar que inibiu ambas as atividades  $\beta$ -glucosidase e celulase (Xiao

*et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2014). Por outro lado, concentração baixa de glicose pode estimular a atividade da celulase. Na digestão anaeróbia de resíduos complexos, a glicose geralmente não é detectada porque é imediatamente consumida pelas bactérias (COSTA *et al.*, 2014).

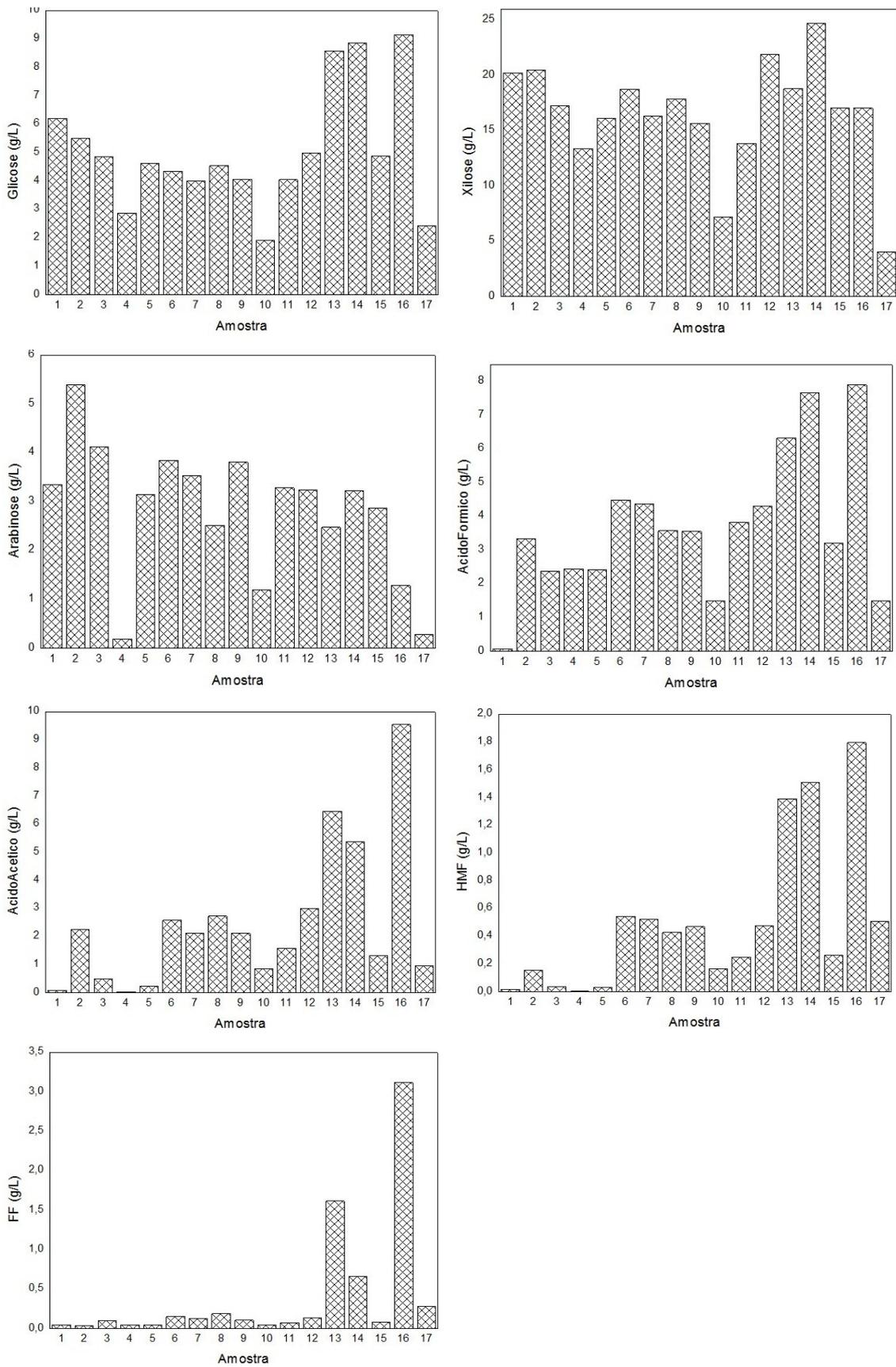
Como esperado, a concentração da maioria dos inibidores, aumentou com o aumento da severidade do tratamento ácido (exceto para as amostras 15 e 17) (Figura 47), como exposto por Baêta *et al.*, 2016 e Chiaramonti *et al.*, 2012, que argumentam que o hidrolisado hemicelulósico rico em xilose, arabinose e glicose possui baixa concentração de produtos de degradação de açúcares e lignina, bem como de compostos inibidores, desde que as condições reacionais não empreguem uma severidade elevada.

De acordo com Fangkum *et al.* (2011); Gámez *et al.* (2006) e Aguilar *et al.* (2002), o ácido acético é liberado dos grupos acetila na fração hemicelulósica e pode ser um inibidor do crescimento microbiano quando presente de 4 a 10 g/L. Pode atravessar as membranas celulares e diminuir o pH intracelular, afetando assim o metabolismo do microrganismo. No entanto, outros autores relatam que a concentração de ácido acético de 9 e 10 g/L pode estimular o crescimento de microrganismos. Neste estudo, o ácido acético foi detectado e as concentrações máximas foram de 9,54 g/L, 6,45 g/L e 5,36 g/L, amostras 16, 13 e 14 respectivamente. As amostras restantes exibiram menores níveis, abaixo do efeito tóxico.

As maiores concentrações de inibidores, o ácido acético (gerado pela hidrólise das hemiceluloses e/ou derivado do ácido fórmico) e o ácido fórmico (produtos de degradação do açúcar, FF e/ou HMF), encontrados nos pré-hidrolisados de bagaço, foram nas amostras em que as hemiceluloses foram hidrolisadas em maior grau (exceto amostra 2).

A baixa concentração de ácido fórmico das demais amostras e a ausência de ácido levulínico nos pré-hidrolisados líquidos, pode indicar que a degradação dos aldeídos de furano foi modesta. Maior formação de ácido fórmico era esperada em condições de hidrólise severas.

**Figura 47.** Composição de açúcares das amostras pré-tratadas (fração líquida)



Fonte: Autora

As concentrações de aldeídos de furano, seguindo o perfil do ácido acético e fórmico, foram relativamente baixas, mas aumentaram com o aumento da temperatura de pré-tratamento (acima de 160°C), exceto amostras 15 e 17. Maiores concentrações de FF poderiam possivelmente estar relacionadas ao teor relativamente alto de lignina de bagaço de cana ou como produto de degradação de pentose, por exemplo a xilose (AGUILAR *et al.*, 2002; PANDEY; SOCCOL, 2000). No caso das concentrações máximas de HMF, pode estar relacionadas ao alto teor de lignina e/ou glicose contidos no bagaço de cana de açúcar. Segundo Aguilar e seus colaboradores (2002), os compostos fenólicos do tipo furfural e solúveis aumentam com o tempo de reação e com a concentração do catalisador ácido, o que foi confirmado também, nesse estudo. Costa *et al.* (2014), Bonomi (2010) e Liu (2010) apresentaram, ainda, que quando uma maior temperatura ou maior tempo de retenção são aplicados, os monossacarídeos formados serão posteriormente hidrolisados, acelerando a formação de furfural e HMF.

Belgacem e Gandini (2008) apresentam de forma mais explicativa que os rendimentos até cerca de 15% de furfural em relação à matéria seca são obtidos a partir de processos que envolvem sempre um meio aquoso acidificado e uma temperatura bastante elevada. A sequência de reação que conduz ao furfural passa pela hidrólise das pentoses poliméricas até o monossacarídeo correspondente (aldopentose), que é então desidratado progressivamente e finalmente ciclizado para dar furfural (da xilose), e em proporções muito menores, 5-metilfurfural (MF) (a partir de ramnose).

O hidrolisado hemicelulósico consiste principalmente de xilose, glicose, manose, arabinose, galactose e traços de outros açúcares, dependendo do tipo de lignocelulósico ou madeiras (PANDEY; SOCCOL, 2000; PANDEY *et al.*, 2000b).

Foi importante determinar a concentração de glicose, porque esse açúcar é a principal fonte de carbono para a maioria dos microrganismos, convertendo a biogás.

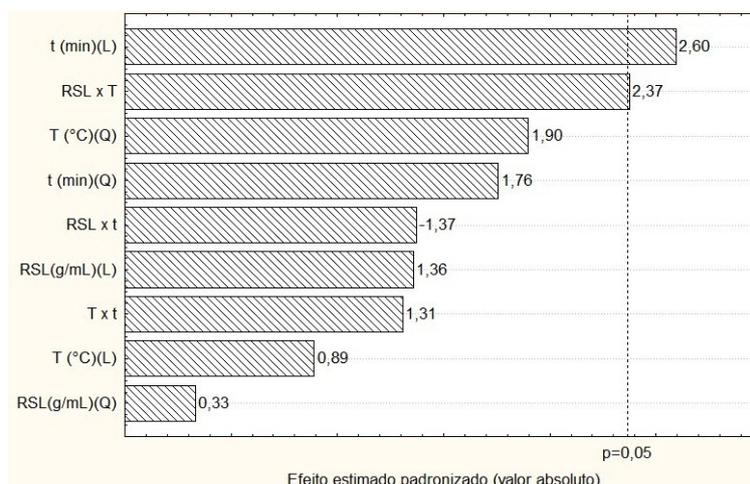
As interações das variáveis RSL x T e a variável t foram significativas para a eficiência de glicose ( $p$ -valor < 0,05). A análise de variância univariada (ANOVA), tabela 19, e o diagrama de Pareto apresentado na Figura 48 confirmam o valor positivo dos efeitos padronizados, sendo a influência da variável t a mais significativa.

**Tabela 19.** Análise de variância (ANOVA) para glicose.

ANOVA - glicose					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
RSL(g/mL)	4,49	1	4,49	1,85	0,22
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	0,27	1	0,27	0,11	0,75
T (°C)	1,93	1	1,93	0,79	0,40
T (°C) <sup>2</sup>	8,77	1	8,77	3,60	0,10
t (min)	16,39	1	16,39	6,73	0,04
t (min) <sup>2</sup>	7,52	1	7,52	3,09	0,12
RSL x T	13,73	1	13,73	5,64	0,05
RSL x t	4,58	1	4,58	1,88	0,21
T x t	4,17	1	4,17	1,71	0,23
Erro	17,05	7	2,43		
Total	70,92	16			

Fonte: Autora

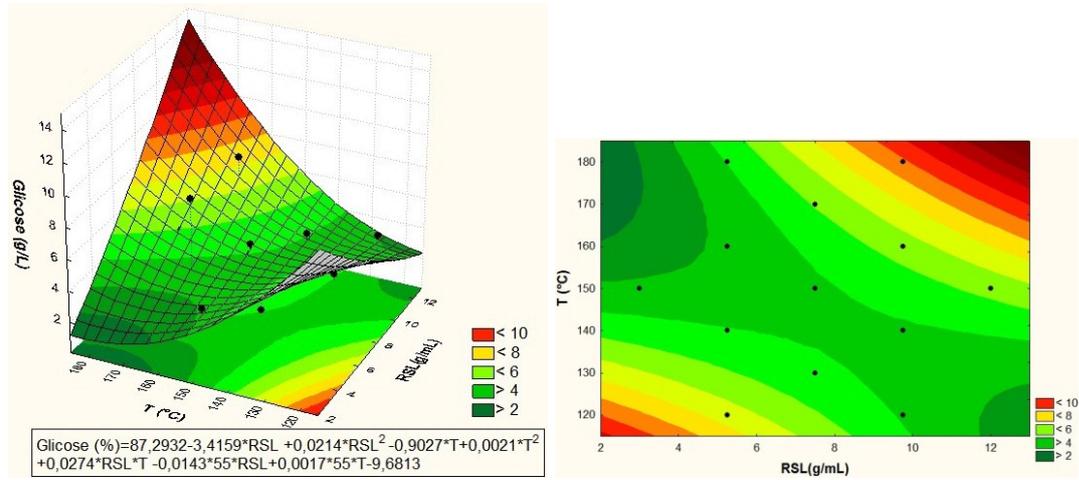
**Figura 48.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar (fração líquida) considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) em relação à glicose.



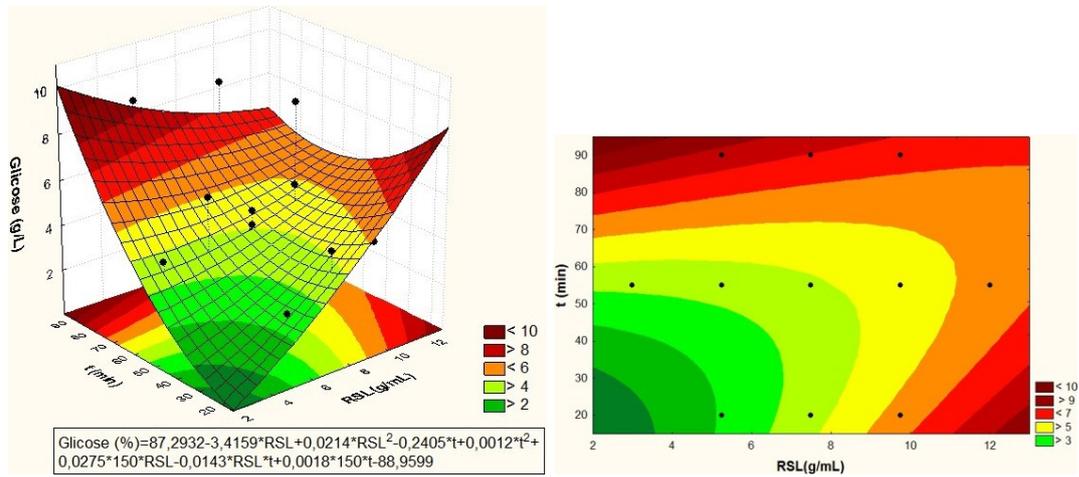
Fonte: Autora

Foram construídas superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno para expressar graficamente as melhores condições experimentais. Essas superfícies são apresentadas na Figura 49 para glicose.

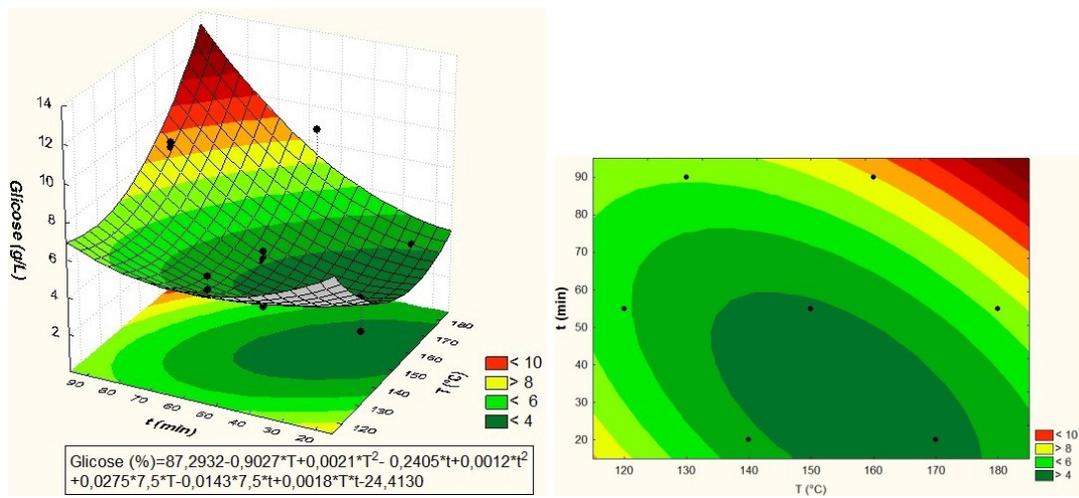
**Figura 49.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com glicose (%).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Como citado anteriormente, a glicose liberada na hidrólise ácida pode proceder tanto de heteropolímeros hemicelulósicos quanto de celulose. A glicose da celulose geralmente não é hidrolisada na faixa de condições operacionais comumente usadas para a hidrólise ácida. Portanto, é provável que a glicose liberada prossiga quase quantitativamente a partir das hemiceluloses (AGUILAR *et al.*, 2002).

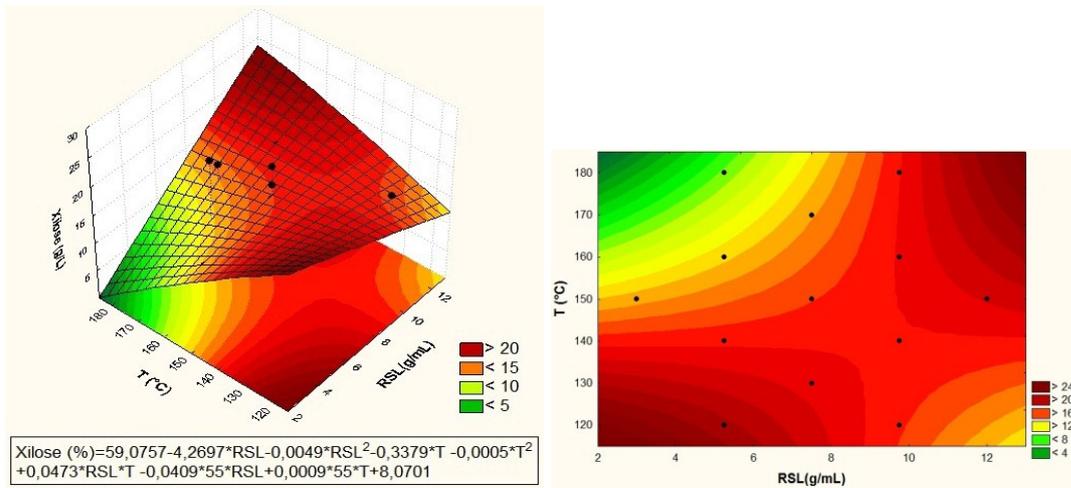
Nesse estudo, em relação à tabela 18, à figura 47 e à figura 49, as maiores concentrações (amostras 16, 14 e 13) de glicose foram em experimentos realizados em condições severas (superior a 160°C), nos valores de 5,25 e 9,75 g.mL<sup>-1</sup> e em períodos longos (55 e 90 min). Essas mesmas amostras apresentaram valores altos dos produtos de decomposição como ácido acético, FF e HMF.

A média obtida para os pontos centrais (condições intermediárias) foi de 3,85 g/L.

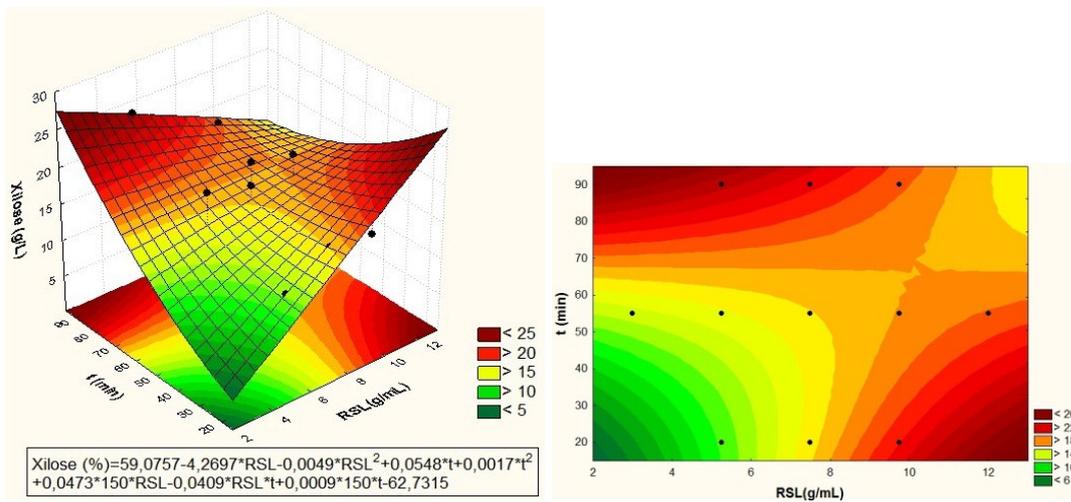
Em relação às concentrações de xilose, as melhores condições foram RSL intermediário, tempos de 55 e 90 min e temperatura variável (120, 150 e 160°C), referentes às amostras 14 (24,70 g/L), 12 (21,91 g/L) e 2 (20,44 g/L). As superfícies de respostas e suas respectivas curvas de contorno são apresentadas na Figura 50.

Obteve-se 15,94g/L de xilose, em média, para os pontos centrais (RSL= 7,5 g/mL, T=150°C e t=55 min).

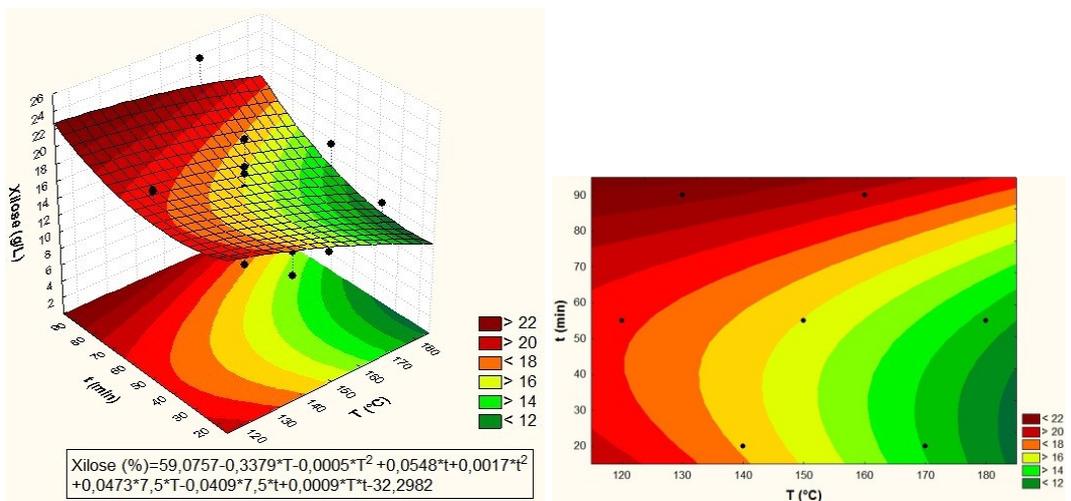
**Figura 50.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com xilose (%).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Condições menos severas levaram a produção de um pré-tratado líquido com maiores teores de arabinose (amostras 2 e 3). A arabinose é um substituinte na cadeia de hemiceluloses (FANGKUM *et al.*, 2011), e, portanto, é mais facilmente hidrolisada em comparação com a xilose, o principal constituinte da cadeia de hemiceluloses (NEUREITER *et al.*, 2002). A solubilização mais fácil da arabinose durante o pré-tratamento faz com que a molécula de arabinose permaneça 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 (BAÊTA, 2016; BAÊTA *et al.*, 2016).

Para os pontos centrais alcançou-se concentração média de 3,12 g/L de arabinose.

Algumas bactérias anaeróbias e facultativas preferem utilizar arabinose como substrato ao invés de xilose (BAÊTA, 2016; BAETA *et al.*, 2016). Isto pode explicar a utilização de amostras com teor alto de arabinose para produção de biogás.

A conversão enzimática da celulose de cada amostra foi calculada e apresentada na tabela 20. A taxa máxima de conversão de açúcares fermentescíveis foi de 22,54 %.

**Tabela 20.** A conversão enzimática da celulose (CC) após o pre-tratamento

<b>Amostra</b>	<b>CC (%)</b>
1	22,26
2	9,58
3	9,85
4	6,28
5	11,54
6	10,79
7	8,95
8	10,19
9	8,75
10	4,35
11	9,90
12	12,34
13	19,20
14	19,56
15	10,58
16	22,54
17	5,58

**Fonte:** Autora

Esses resultados são importantes para demonstrar que a condição de pré-tratamento que leva à conversão da hemicelulose e maior teor de açúcar no hidrolisado não é necessariamente a melhor para a produção de biogás, ao contrário do que é normalmente empregado por diferentes pesquisadores (COSTA *et al.*, 2014), sendo necessário levar em consideração todas as condições utilizadas no processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Com a finalidade de comparação, alguns trabalhos encontrados na literatura são mencionados a seguir. Sarrouh *et al.* (2005), em seus estudos com bagaço de cana-de-açúcar, conseguiram uma taxa máxima de conversão de açúcares fermentescíveis de 97,5%, utilizando concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 30%, 2% de sólidos e uma temperatura de 50 °C por 1 h. Aguilar *et al.* (2002) realizaram estudos para produzir xilose a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a temperaturas entre 100 e 128°C e concentrações entre 2 e 6%. Modelos cinéticos foram desenvolvidos para explicar a variação com o tempo de xilose, glicose, ácido acético e furfural gerado na hidrólise. A condição ótima encontrada foi concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 2% com temperatura de 122°C durante 24 min. Com estes parâmetros, o hidrolisado formado continha 21,6 g/L de xilose, 3,0 g/L de glicose, 0,5 g/L de furfural e 3,65 g/L de ácido acético. Nestas condições, 90% da hemicelulose foi hidrolisada.

Nos estudos Fangkum *et al.* (2011), a condição ideal para o pré-tratamento foi obtida quando o bagaço de cana de açúcar foi hidrolisado por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% do volume, o que resultou em 11,28 g/L de açúcar total (1,46 g de glicose/L; 9,10 g de xilose/L; 0,72 g de arabinose/L). Furfural estava presente em uma pequena quantidade, a maior concentração de furfural (0,34 g/L) foi observada em 5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Martín *et al.* (2007) conseguiram valores médios de 3,3 g/L de glicose, 18,4 g/L de xilose e 2,1 g/L de arabinose, em tempos que variavam de 20 a 60 min, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído (RSL de 10g/g) e temperatura de 122°C. A conversão de xilose foi de 73-81%. Para os inibidores, obteve, em média, 2,7 g/L de ácido acético, 0,18 g/L de ácido fórmico, 0,25 g/L de furfural, 0,05 g/L de HMF.

Bustos *et al.* (2003) também realizaram experimentos com bagaço de cana-de-açúcar, usando HCl entre 2 e 6%, tempos de reação entre 0 e 300 min. e temperaturas entre 100 e 128 °C. A condição ótima encontrada foi: temperatura de 128 °C, concentração de 2% de HCl e tempo de reação de 51,1 min. O hidrolisado continha 22,6 g/L de xilose, 3,31 g/L de arabinose, 3,59 g/L de ácido acético e 1,54 g/L de furfural.

Gómez *et al.* (2006) realizaram hidrólise com bagaço de cana-de-açúcar, utilizando ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) com concentração entre 2 e 6%, tempos de reação entre 0 e 300 min. e temperatura de  $122^\circ\text{C}$  para usar o hidrolisado como substrato para fermentação. A condição ótima encontrada foi 4% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e temperatura de  $122^\circ\text{C}$  durante 300 min. Dentro dessas condições o hidrolisado obtido foi analisado e obteve-se 17,6 g/L de xilose; 2,6 g/L de arabinose; 3,0 g/L de glicose; e 1,2 g/L de furfural e 4 g/L de ácido acético. Rodríguez-Chong *et al.* (2004) realizaram experimentos com bagaço de cana-de-açúcar, utilizando  $\text{HNO}_3$  (concentração entre 2 e 6%), tempos de reação entre 0 e 300 min. e temperatura entre  $100$  e  $128^\circ\text{C}$ . A condição ótima encontrada foi temperatura de  $122^\circ\text{C}$ , concentração de 6% de ácido nítrico durante 9,3 min. O hidrolisado obtido na condição ótima consistia de 18,6 g/L de xilose; 2,04 g/L de arabinose; 2,87 g/L de glicose; 0,9 g/L de ácido acético e 1,32 g/L de furfural.

Ao analisar os resultados obtidos em experimentos com diferentes ácidos, de alguns trabalhos citados na literatura, conforme apresentados anteriormente, é possível observar que houve eficiência na conversão do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido cítrico diluído em açúcares. Porém houve um aumento significativo das concentrações dos interferentes, que podem ser inibidores microbianos, mas pode não representar riscos de inibição para o consórcio anaeróbio.

Vale destacar, também, que nos pré-tratamentos ácidos citados, além de utilizarem ácidos não diluídos, a concentração de ácido exigida para a hidrólise foi elevada em alguns casos, o que pode implicar um custo elevado de operação e inviabilidade do processo. Costa *et al.* (2014) cita, ainda, que o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pode apresentar uma taxa elevada de hidrólise em torno de 90%, no entanto, em se tratando de digestão anaeróbia essa opção deve ser descartada, pois a produção de metano pode ser reduzida em virtude da competição das arqueas metanogênicas com as bactérias redutoras de sulfato, em virtude do  $\text{SO}_4^{2-}$  oriundo da reação.

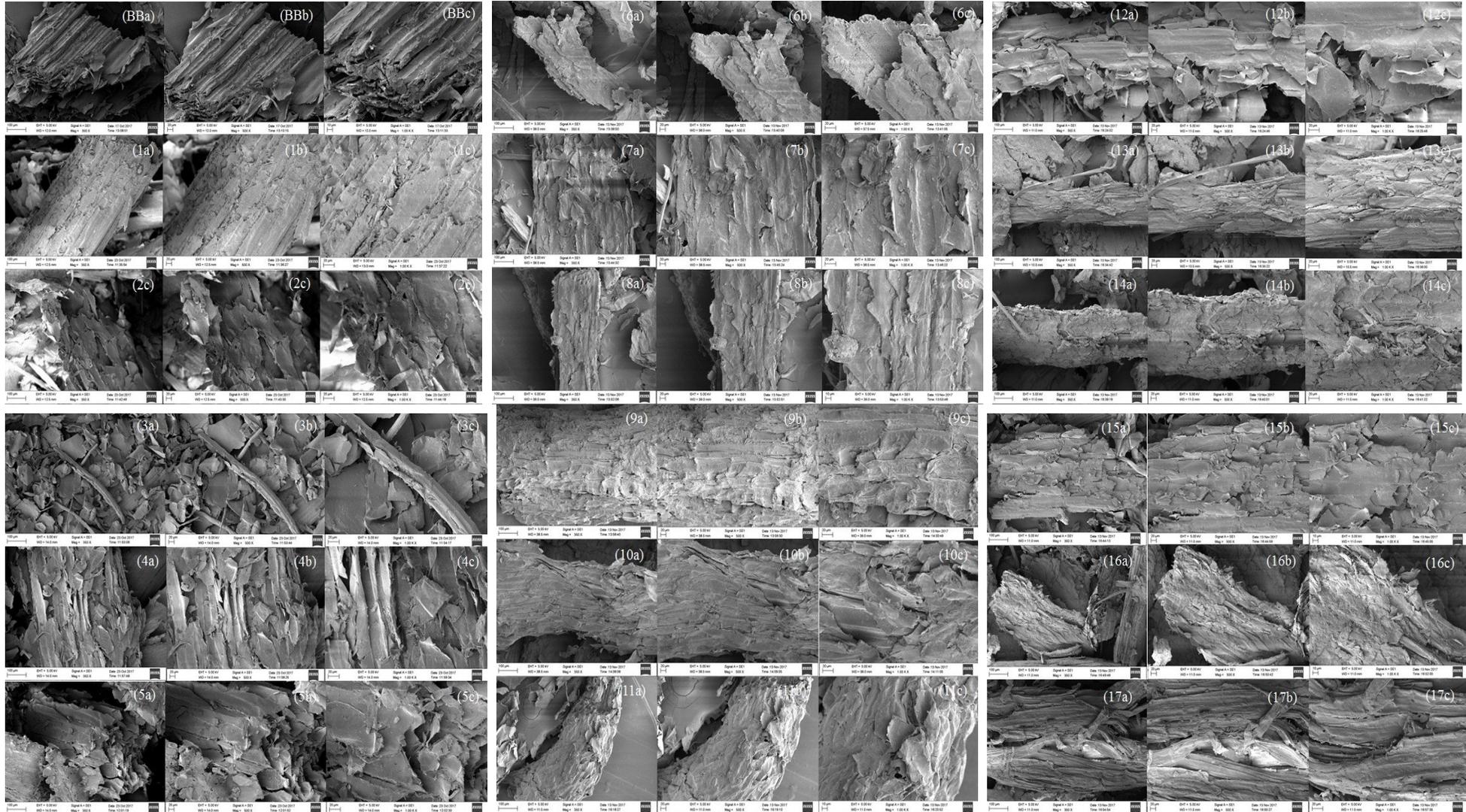
Em virtude da alta reatividade das pentoses (particularmente xilose e arabinose) em temperaturas inferiores a  $150^\circ\text{C}$ , RSL intermediária e tempos de reação superiores a 55 min, no processo de hidrólise ácida e evitando promover a formação de inibidores através da degradação dos açúcares, para não comprometer a produção de biogás, partiu-se, a princípio, da otimização da melhor condição da etapa de pré-tratamento.

## 7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir da Figura 51 que mostra a morfologia das frações sólidas residuais dos pré-tratamentos e do BB sem pré-tratamento obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível confirmar visualmente as seguintes hipóteses:

- 1) A micrografia da fibra de bagaço in natura (Figura 51, BB(a), BB(b), BB(c)) apresenta uma superfície lisa e continua com as fibras ordenadas de forma compacta.
- 2) percebe-se as modificações estruturais em quase todas as amostras em relação ao BB. As maiores alterações das fibras do bagaço de cana, após o pré-tratamento são observadas nas amostras 10 (Figura 51 - 10(a), 10(b), 10(c)), 12 (Figura 51 - 12(a), 12(b), 12(c)), 14 (Figura 51 - 14(a), 14(b), 14(c)), 15 (Figura 51 - 15(a), 15(b), 15(c)), 16 (Figura 51 - 16(a), 16(b), 16(c)) e 17 (Figura 51 - 17(a), 17(b), 17(c));
- 3) as mudanças estruturais não ficaram evidentes em relação à temperatura, RSL e tempo, porém comprova a relação com as deformações morfológicas com a eficiência do processo. Observa-se que o pré-tratamento promoveu uma fragmentação na estrutura, permitindo uma maior abertura das fibras;
- 4) as imagens do MEV reforçam os valores de deslignificação, onde os menor valores foram nas amostras, citadas anteriormente, 15 (RSL= 7,5, T=170°C e t=20 min), 14 (RSL= 5,25, T=160°C e t=90 min), 10 (RSL= 7,5, T=150°C e t=55 min), 16 (RSL= 9,75, T=180°C e t=55 min) e 12 (RSL= 7,5, T=150°C e t=55 min);
- 5) é possível verificar o aumento da rugosidade da superfície das amostras. O tratamento ácido cítrico promoveu a descamação da matriz lignocelulósica, provocando a ruptura da estrutura recalcitrante da parede celular das fibras vegetais, tornando as estruturas fibrilares mais expostas à ação das enzimas.

**Figura 51.** Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado com ácido cítrico.



**Fonte:** Autora (BB-Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 – amostras pré-tratadas com ácido cítrico; a – ampliação 350x; b - ampliação 500x; c - ampliação 1000x).

### 7.3 Difração de Raios-X (DRX)

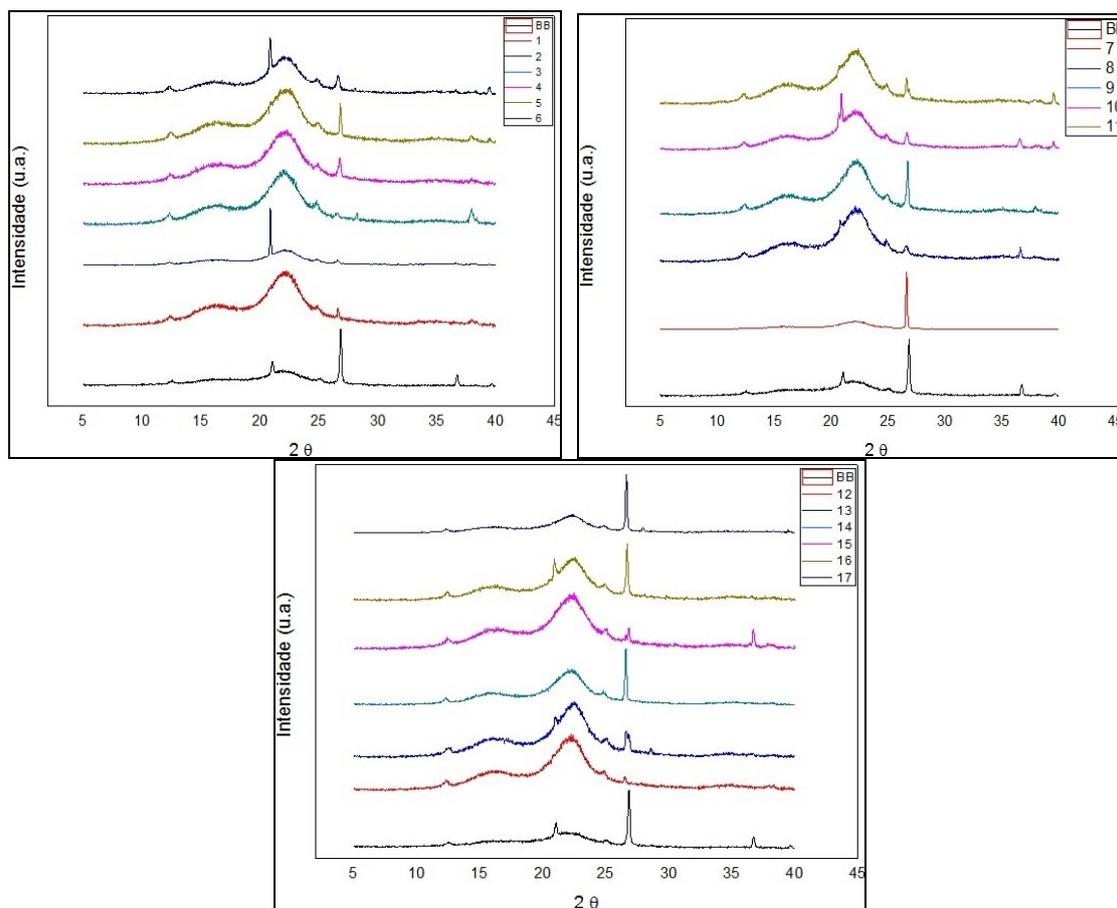
As microfibrilas são formadas por regiões cristalinas (arranjo geométrico bem definido), resultante da ação combinada e organizada da biopolimerização e cristalização da celulose, e por regiões amorfas (menor ordem da rede cristalina). Ambas as formas ocorrem em proporções características em celuloses de diferentes biomassas. A proporção entre as regiões cristalina e amorfa resulta no grau de cristalinidade da celulose, sendo que o grau de cristalinidade influencia em suas principais características e propriedades. As pontes de hidrogênio, inter e intramoleculares, entre os grupamentos hidroxila, mantêm as regiões cristalinas e torna a celulose resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (COSTA *et al.*, 2014; FENGEL; WEGENER, 1989; TAMANINI *et al.*, 2004).

Além disso, a região cristalina firmemente compactada faz com que as moléculas de água não consigam penetrar, tornando a celulose insolúvel em água, dificultando a biodegradação. As regiões amorfas são porções menos ordenadas que, em geral, compreendem aproximadamente 15% da estrutura celulósica (COSTA *et al.*, 2014)

A Figura 52 apresenta os difratogramas de raios-X das fibras de bagaço *in natura* e dos pré-tratados. Os difratogramas das fibras apresentam a ocorrência de dois picos intensos próximo aos valores  $2\theta \equiv 22^\circ$  e do halo em  $2\theta \equiv 18^\circ$ , que representam os planos cristalográficos  $I_{101}$  e  $I_{002}$ , respectivamente. O primeiro pico está relacionado à parte amorfa da fibra enquanto que o segundo pico, mais intenso, é referente à parte cristalina da fibra, que no caso de fibra lignocelulósica é a celulose.

Analisando os espectros foi possível observar que os picos, característicos de materiais lignocelulósicos, são similares para as fibras nas diferentes condições de tratamento (*in natura* e pré-tratamento ácido). Contudo, os picos das amostras tratadas são mais intensos quando comparado aos picos das fibras *in natura*.

**Figura 52.** Difratoogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado.



Os índices de cristalinidade (IC) das fibras, calculado de acordo com a eq. 35/ item 4.6 estão dispostos na Tabela 21.

O BB apresentou menor cristalinidade que as amostras pré-tratadas, com índices de cristalinidade (IC) de 48 %. Os maiores índices foram das amostras 14 (RSL= 5,25, T=160°C e t=90 min), 17(RSL= 5,25, T=180°C e t=55 min), 9 (RSL= 7,5, T=150°C e t=55 min), 16 (RSL= 9,75, T=180°C e t=55 min), 10 (RSL= 7,5, T=150°C e t=55 min), 12(RSL= 7,5, T=150°C e t=55 min), na qual se reforça as imagens de MEV e dos teores de lignina.

**Tabela 21.** Índice de Cristalinidade (IC)

<b>Amostra</b>	<b>IC (%)</b>
<b>BB</b>	48
<b>1</b>	64
<b>2</b>	65
<b>3</b>	60
<b>4</b>	58
<b>5</b>	57
<b>6</b>	64
<b>7</b>	64
<b>8</b>	61
<b>9</b>	66
<b>10</b>	65
<b>11</b>	59
<b>12</b>	65
<b>13</b>	61
<b>14</b>	70
<b>15</b>	61
<b>16</b>	66
<b>17</b>	67

**Fonte:** Autora

Os resultados de rendimento foram analisados por ANOVA (Tabela 22) sendo possível a construção de um diagrama de Pareto (Figura 53) para observar os efeitos significativos, do ponto de vista estatístico, das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) sobre a variável dependente (índice de cristalinidade).

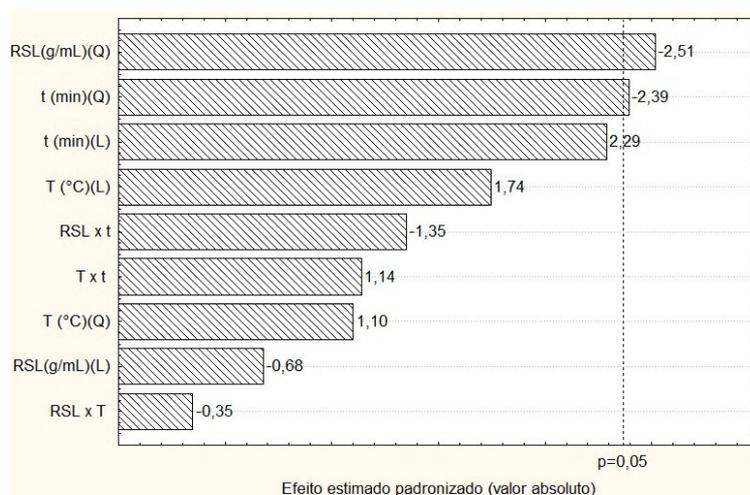
O IC foi aumentado, como era esperado, após os materiais terem sido pré-tratados e o aumento está relacionado ao aumento na severidade do pré-tratamento (ASADA *et al.*, 2015). O pré-tratamento ácido da biomassa remove a parte amorfa da biomassa (como lignina, hemiceluloses, extrativos e outros) e deixa o material pré-tratado enriquecido com celulose (BRIENZO *et al.*, 2017). As condições mais severas de pré-tratamento poderiam atacar o componente de celulose mais provavelmente a fração amorfa, gerando celulose residual que é ainda mais cristalina (BRIENZO *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2011). Esta celulose residual pode ser mais resistente à ação da enzima devido à propriedade de cristalinidade resultante do pré-tratamento de alta severidade (BRIENZO *et al.*, 2017).

**Tabela 22.** Análise de variância (ANOVA) para índice de cristalinidade.

ANOVA - Índice de Cristalinidade					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
RSL(g/mL)	2,87	1	2,87	0,46	0,52
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	39,58	1	39,58	6,33	0,04
T (°C)	19,05	1	19,05	3,04	0,12
T (°C) <sup>2</sup>	7,57	1	7,58	1,21	0,31
t (min)	32,71	1	32,71	5,23	0,06
t (min) <sup>2</sup>	35,79	1	35,79	5,72	0,05
RSL x T	0,76	1	0,76	0,12	0,74
RSL x t	11,41	1	11,41	1,82	0,22
T x t	8,12	1	8,12	1,30	0,30
Erro	43,80	7	6,256		
Total	194,44	16			

Fonte: Autora

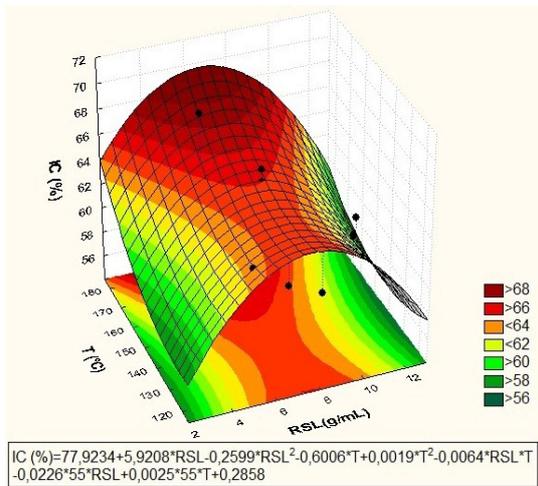
**Figura 53.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (*RSL*, *T* e *t*) em relação ao índice de cristalinidade.



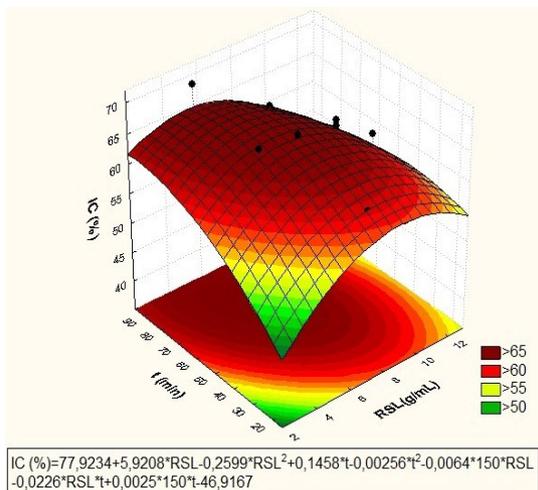
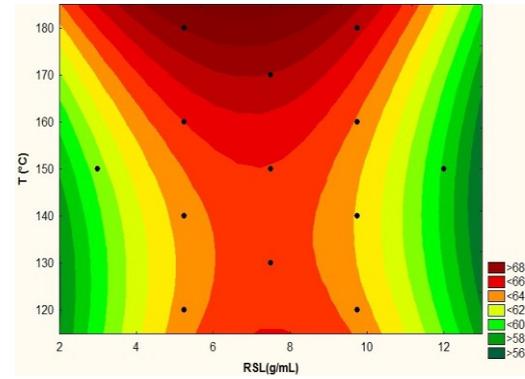
Fonte: Autora

O diagrama de Pareto mostra que as variáveis *RSL* e *t*, em efeito ao quadrado, possuem efeitos significativos negativos sobre a variável dependente índice de cristalinidade, o que é confirmado pelos *p*-valores inferiores a 0,05 na análise de variância realizada (Tabela 22).

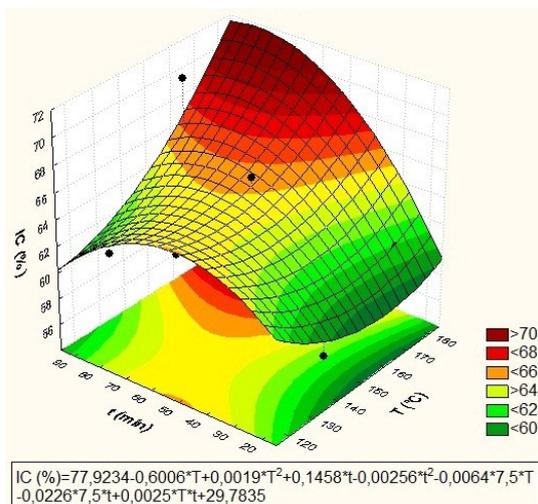
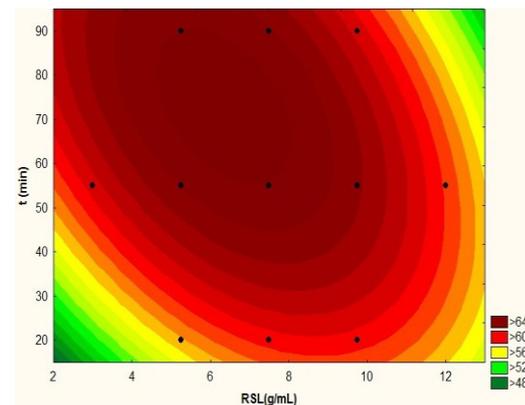
**Figura 54.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com índice de cristalinidade (%).



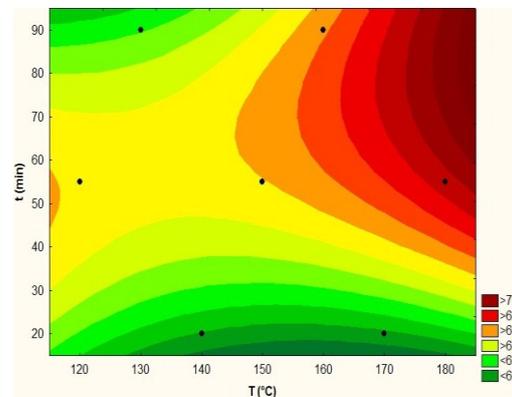
Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t



Fonte: Autora

As superfícies de resposta e de contorno para as variáveis dependentes do IC são apresentadas na Figura 54. Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático). As superfícies de resposta são úteis na visualização gráfica das respostas obtidas, ajudando a entender como essas respostas se comportam em relação às variáveis independentes.

Diante dos resultados experimentais obtidos e da avaliação combinada das variáveis, podemos dizer que a interação RSL e T exerceram alto índice de cristalinidade na faixa de 5,25 e 9,75 (g/mL) e temperaturas altas (acima de 150°C); em relação RSL e t, foram na região de 5,25 e 9,75 (g/mL) e tempo variável e quanto a T e t, temperaturas maiores (acima de 160°C) e tempos superiores a 55 min resultaram índices elevados.

#### **7.4 Hidrólise enzimática**

A superfície dos materiais lignocelulósicos também afeta a hidrólise enzimática porque a estrutura da celulose é incrustada por lignina, o que impede o acesso de celulasas a celulose e está envolta pela hemicelulose. Portanto, a hidrólise enzimática de hemicelulose é essencial, também, para os rendimentos mais elevados de hidrólise da celulose (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Partindo desse pressuposto, utilizou-se complexo enzimático de celulasas e hemicelulasas, Cellic® CTec 3.

Um dos principais fatores que influenciam no rendimento e taxa inicial da hidrólise enzimática é a concentração do substrato (celulose e/ou hemiceluloses) em solução. Alta concentração de substrato pode causar inibição que reduz substancialmente a taxa de hidrólise. A extensão da inibição depende da razão entre a enzima total e o substrato total. Problemas na mistura e transferência de massa também podem estar associados à alta concentração de substrato. Obviamente, a aplicação de mais celulase, até certo nível, aumenta a taxa e o rendimento da hidrólise. No entanto, o aumento no nível de celulase aumentaria significativamente o custo do processo (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

A Tabela 23 apresenta a perda de massa e a concentração de açúcares redutores totais (ART) obtida para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e das amostras pré-tratadas, em base seca, após a hidrólise enzimática.

**Tabela 23.** Concentração de açúcares redutores totais (ART) e perda de massa (PM)

Amostra	ART (g/L)	PM (%)
<b>Bruto</b>	25,86	12,93
<b>1</b>	10,70	6,09
<b>2</b>	171,45	16,93
<b>3</b>	68,95	7,54
<b>4</b>	35,19	3,46
<b>5</b>	58,15	5,84
<b>6</b>	99,10	40,91
<b>7</b>	76,59	22,33
<b>8</b>	164,73	22,72
<b>9</b>	184,79	23,09
<b>10</b>	52,73	18,29
<b>11</b>	103,99	17,27
<b>12</b>	29,35	16,94
<b>13</b>	89,08	27,10
<b>14</b>	36,11	55,69
<b>15</b>	45,10	9,50
<b>16</b>	60,13	62,66
<b>17</b>	74,94	88,77

Fonte: Autora

A concentração de ART para a biomassa sem tratamento, base seca, atingiu o máximo de 25,86 g.L<sup>-1</sup> após 72 h de hidrólise, enquanto que para as amostras 9, 2, 8 e 11 foram de 184,79 g.L<sup>-1</sup>, 171,45 g.L<sup>-1</sup>, 164,73 g.L<sup>-1</sup> e 103,99 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A amostra 2 apresentou maior concentração de celulose (~52%) e baixa concentração de inibidores (principalmente FF) no pré-tratamento em questão, tornando assim as cadeias de celulose mais acessíveis ao ataque enzimático, resultando em alta concentração de ART (conversão de eficiência de 84,92%).

A amostra 1 exibiu concentração inferior em relação ao BB e às demais amostras, possivelmente devido ao baixo teor de celulose e presença de lignina (~11% de deslignificação).

Em altas temperaturas, os produtos de hidrólise, glicose solúvel e oligossacarídeos parcialmente solúveis, degradam para formar subprodutos, os quais são insolúveis em meio ácido. Se a glicose e os oligossacarídeos não são removidos rapidamente, esses subprodutos são formados e acumulam-se no meio reacional. Essa deposição de substâncias insolúveis sob a celulose é um fator complicador da medida de perda de massa (GURGEL, 2010).

As grandes perdas de massa - amostra 17= 88,77 %, amostra 16= 62,66% e amostra 14= 55,69% - podem ser atribuídas à severidade do pré-tratamento, sendo que as temperaturas utilizadas foram superiores a 160°C, tempos de retenção acima de 55 min e nos valores de 5,25 e 9,75 g/mL na RSL.

Gehlen (2013) em seu estudo com hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl do bagaço de cana-de-açúcar, obteve-se 9,37 g/L de açúcar redutor do bagaço bruto e alcançou-se valores elevados de conversão de açúcares redutores, apresentando um valor médio 89,77% ± 5,56%.

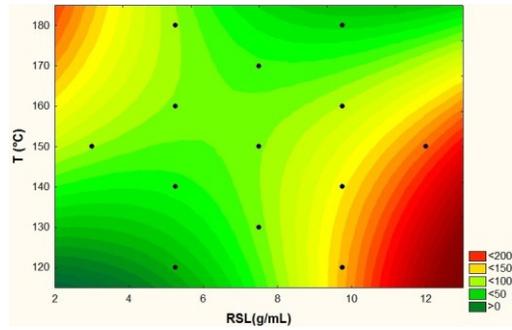
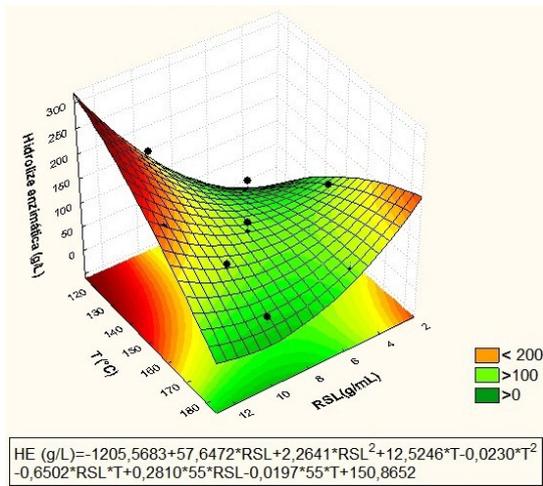
As superfícies de resposta e de contorno para as variáveis dependentes da ART são apresentadas na Figura 55. Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e demonstram que foram significativamente ótima em RSL acima de 7,5 g/mL, temperatura inferiores a 150°C e tempos de retenção, na faixa de 55 minutos.

Na literatura com estudos com ácidos, encontram-se resultados semelhantes somente em relação à variável temperatura. As maiores taxas de conversão em açúcares foram totalmente dependentes do tempo e temperatura, com concentração de ácido invariável, onde nos maiores tempos e maiores temperaturas houve a maior conversão em açúcares (GURGEL, 2010; GEHLEN, 2013). Bouchard *et al.* (1990) menciona, do mesmo modo, que o decréscimo do potencial gerador de glicose é mais pronunciado em altas temperaturas.

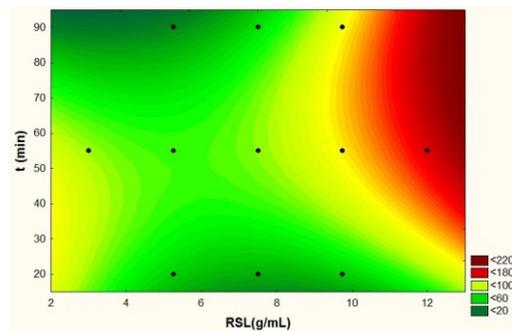
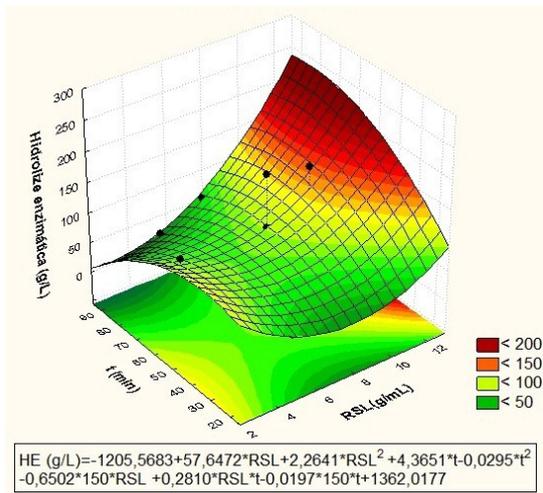
Outros trabalhos demonstram uma correlação direta entre a remoção de lignina e maior digestibilidade enzimática da celulose (KUMAR *et al.*, 2009; CARVALHEIRO *et al.*, 2008; TAHERZADEH, *et al.*, 2008; LIMA, 2018).

Os resultados de ART apontam melhoramento da digestibilidade enzimática da biomassa pré-tratada, ou seja, um aumento na acessibilidade das enzimas às fibras de celulose (valor máximo de ~185 g/L), em relação ao planejamento 1 (valor máximo ~28 g/L).

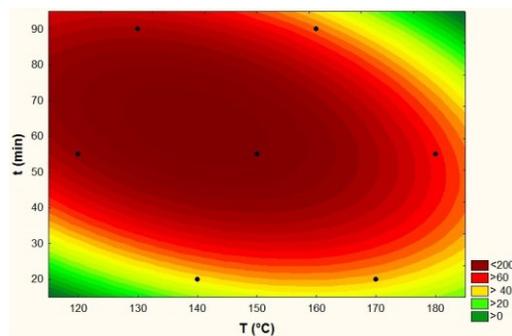
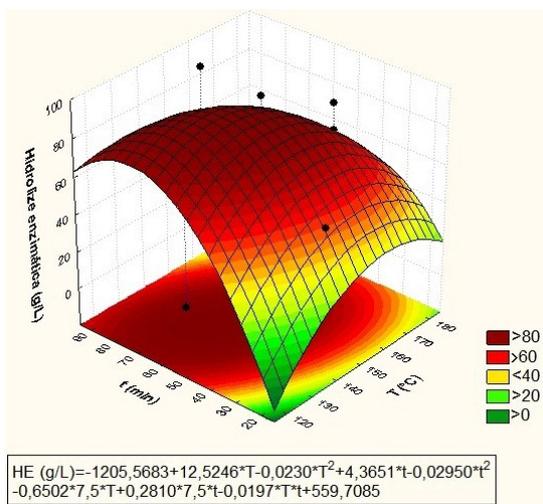
**Figura 55.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com ART (g/L).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Em vista disso, nos experimentos (Tabela 24) e as composições de açúcares (glicose, xilose e arabinose) (Figura 56), as concentrações da glicose alcançaram o máximo, 23,74 gL<sup>-1</sup>, para a amostra pré-tratada (14) com temperatura de 170°C, RSL 7,5 g.mL<sup>-1</sup> e tempo de reação de 20 min, enquanto a xilose atingiu o máximo, 5,23 gL<sup>-1</sup>, com a amostra (9) obtida na temperatura de 150°C, RSL 7,5 g.mL<sup>-1</sup> e 55 min. Pode-se afirmar que a amostra 14 apresentou alta concentração de glicose pela eficiência na deslignificação no pré-tratamento ácido (~41%) e amostra 9, apresentou-se elevado valor de celulose (~42%). O aumento da temperatura e juntamente com o tempo de contato favorecem as reações de hidrólise das hemiceluloses e solubilização da celulose aumentando a chance de geração de oligômeros solúveis no hidrolisado (Baeta, 2016).

**Tabela 24.** Concentração de glicose (g/L), xilose (g/L) e arabinose (g/L) e conversão enzimática da celulose (CC)

<b>Amostra</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Xilose (g/L)</b>	<b>Arabinose (g/L)</b>	<b>CC (%)</b>
<b>BB2</b>	12,9640	4,2761		28,50
<b>1</b>	4,4084	1,2374		15,84
<b>2</b>	9,8574	3,5796	0,0156	17,15
<b>3</b>	8,5060	2,4827	0,0261	17,25
<b>4</b>	6,5336	1,9749	0,0262	14,35
<b>5</b>	7,2045	1,9612	0,0439	18,03
<b>6</b>	14,3750	2,7043		35,74
<b>7</b>	20,2711	4,4053		45,33
<b>8</b>	18,4374	4,4843		41,47
<b>9</b>	19,9184	5,2331		43,06
<b>10</b>	16,0654	2,6450		36,81
<b>11</b>	16,1969	4,3103		39,68
<b>12</b>	15,1637	2,2656	0,0635	37,64
<b>13</b>	18,3358	2,6750		41,08
<b>14</b>	23,7452	3,6212		52,47
<b>15</b>	14,8012	3,8608		32,04
<b>16</b>	21,4779	1,6004		52,93
<b>17</b>	23,7013	0,2275		54,50

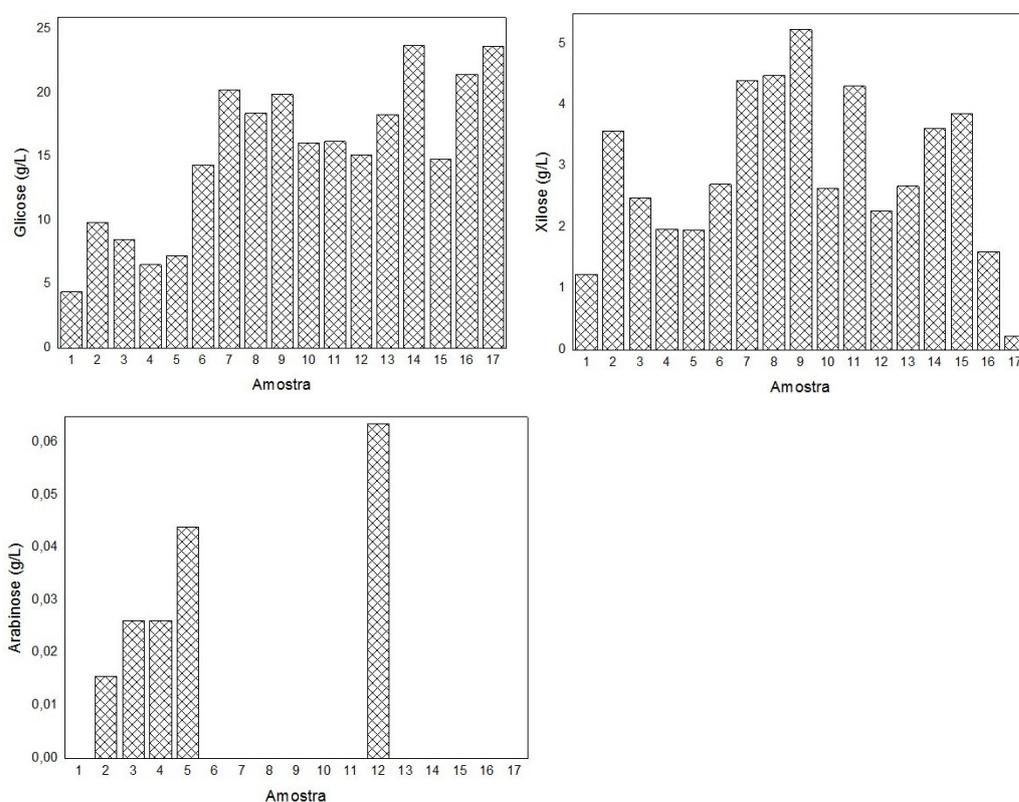
Fonte: Autora

A presença de arabinose foi detectada em algumas amostras em baixíssimas concentrações.

Como referenciado, por alguns autores, as hemiceluloses possuem alguns açúcares com grupos funcionais como o acetil, o que pode dificultar a ação tanto das hemicelulases (ZHANG *et al.*, 2011; BRIENZO *et al.*, 2017) quanto das enzimas

celulases (PAN *et al.*, 2006; BRIENZO *et al.*, 2017), na qual os grupos acetil nas hemiceluloses são clivados, formando ácido acético (SUN *et al.*, 2005). Conforme Costa *et al.* (2014) e Baêta *et al.* (2016), o ácido acético produzido pode agir como catalisador para as reações de hidrólise das hemiceluloses, contribuindo dessa forma para o aumento da liberação de açúcares, em alta temperaturas. As amostras 16, 13 e 14 apresentaram concentrações altas de ácido acético, assim como dos inibidores FF e HMF, mencionados no item 5.8.1. Os maiores índices da conversão enzimática (%) estiveram na faixa de 52,5 a 54,5 (amostras 17, 14 e 16).

**Figura 56.** Composição de açúcares das amostras pré-tratadas



Fonte: Autora

Desse modo, podemos visualizar que as concentrações de glicose, xilose e arabinose estão entre 5,25 a 12 g/mL (RSL), 140 a 180°C (temperatura) e 55 e 90 min (tempo).

As variáveis temperatura e tempo (linear) e tempo (quadrático) (Tabela 25), foram significativas para a eficiência de HE ( $p$ -valor < 0,05). O diagrama de Pareto apresentado na Figura 57 confirma a influência significativa das variáveis de processo

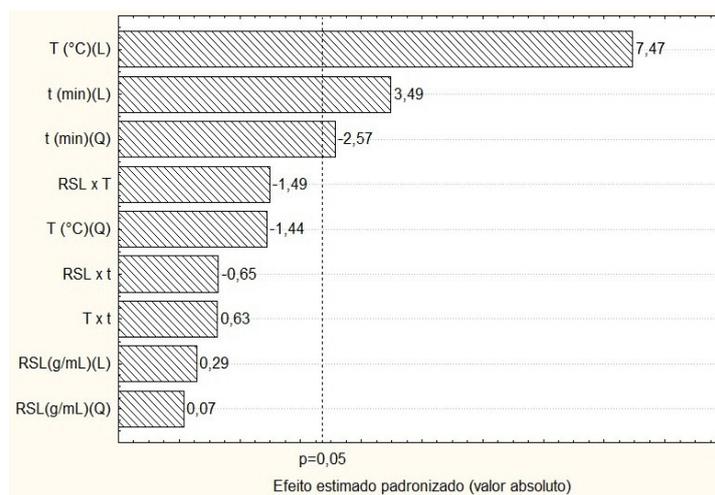
na eficiência de HE, sendo temperatura a mais significativa. Além disso, somente a variável tempo (quadrático) favorece a eficiências de HE (efeitos padronizados negativo) foi em seu nível inferior. As demais atuam na eficiência em nível superior (efeitos padronizados positivos).

**Tabela 25.** Análise de variância (ANOVA) para glicose.

ANOVA - Glicose					
Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
RSL(g/mL)	0,5506	1	0,5506	0,08257	0,782160
RSL(g/mL) <sup>2</sup>	0,0359	1	0,0359	0,00538	0,943594
T (°C)	372,2626	1	372,2626	55,82825	0,000141
T (°C) <sup>2</sup>	13,8716	1	13,8716	2,08032	0,192416
t (min)	81,0168	1	81,0168	12,15010	0,010188
t (min) <sup>2</sup>	44,1373	1	44,1373	6,61927	0,036857
RSL x T	14,7164	1	14,7164	2,20702	0,180968
RSL x t	2,7923	1	2,7923	0,41877	0,538188
T x t	2,6375	1	2,6375	0,39555	0,549362
Erro	46,6760	7	6,6680		
Total	584,4067	16			

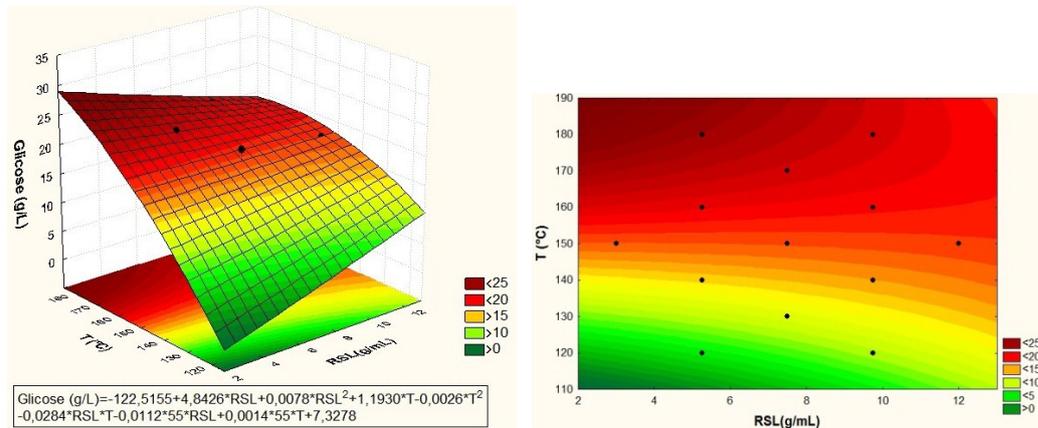
Fonte: Autora

**Figura 57.** Diagrama de Pareto para o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar considerando os efeitos padronizados das variáveis independentes (RSL, T e t) em relação à glicose.

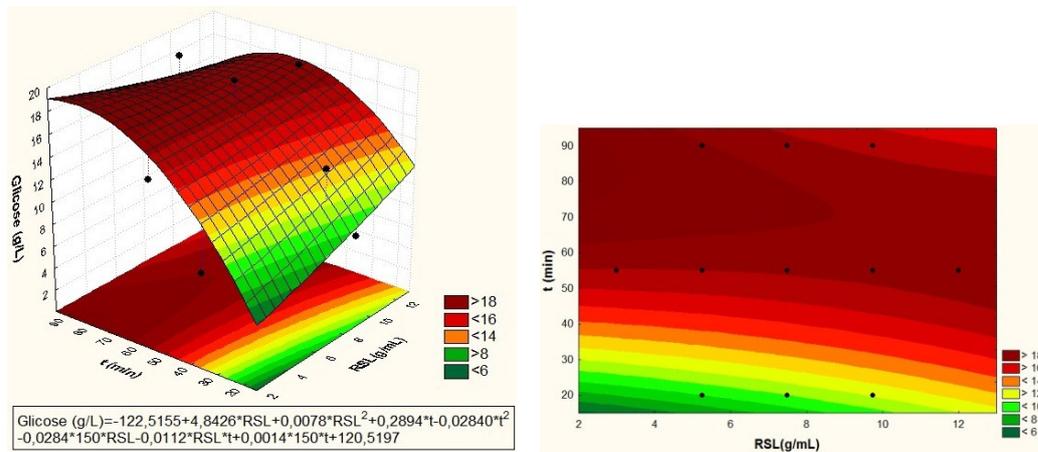


Fonte: Autora

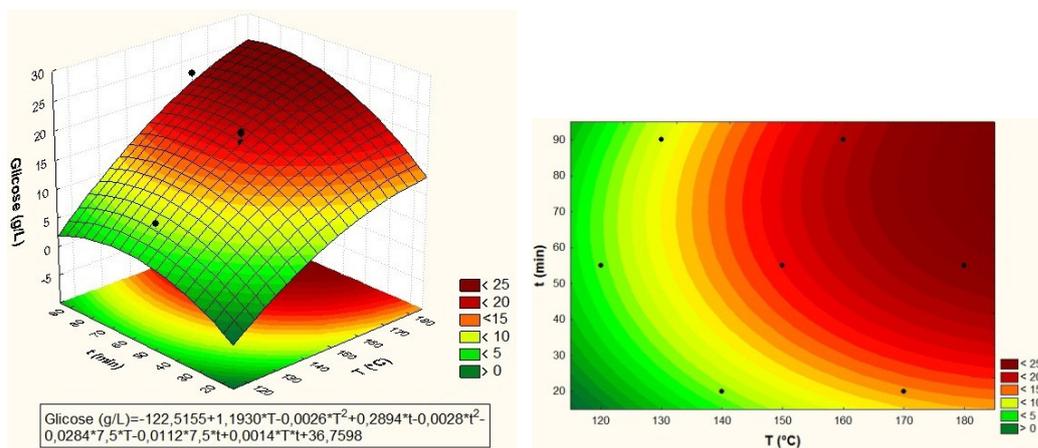
**Figura 58.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com glicose (g/L).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Verifica-se que as maiores conversões de glicose ocorrem em maior temperatura (acima de 160°C), tempos longos (55 e 90 min) e RSL não há influência. Este efeito de

maior conversão é predominante em amostras pré-tratadas em temperaturas mais altas, coincide com as condições de maior remoção de lignina, ou seja, os menores teores de lignina também foram obtidos em relação à temperatura.

As superfícies de resposta e de contorno para as variáveis dependentes da glicose e xilose são apresentadas nas Figuras 58 e 59. Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático).

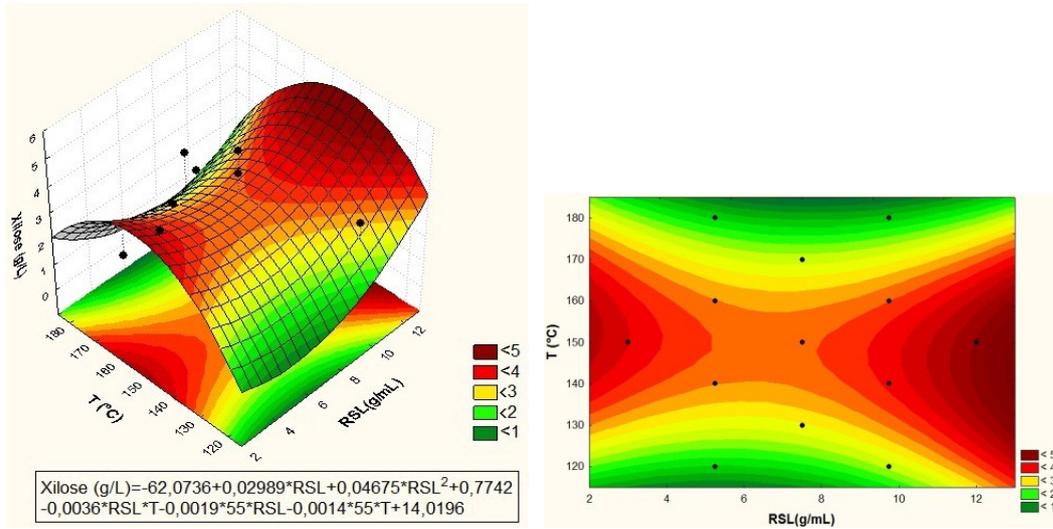
Segundo Baêta (2016), com tempos e temperaturas altas contribuem para aumento da solubilização da celulose, portanto, aumentando a liberação de açúcares C6 (glicose). Alcançou-se conversão média de 12,96% para BB e para os pontos centrais, 17,16% de glicose e a superfície de resposta (relação T x t) (figura 59) apresenta um comportamento de um plano ascendente buscando atingir o máximo de liberação de xilose nos tempos e temperaturas em pontos centrais. Para o BB e para os pontos centrais, conseguiu-se uma conversão média de 4,28 % e 27,06 % de xilose, respectivamente.

Finalmente, avaliando os dados para a conversão de xilose (figura 59), podemos verificar que as conversões mais altas ocorrem em temperatura de 150°C e em tempo de 55 min, Para RSL não tem influência. A xilose é derivada da fração de hemiceluloses, portanto, a produção de xilose é potencializada sob condições de maior preservação de hemiceluloses no bagaço pré-tratado.

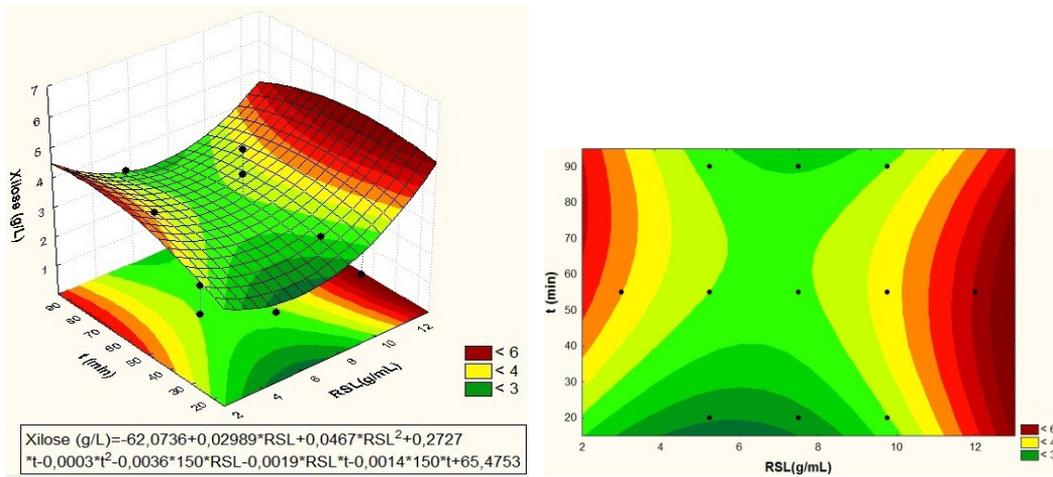
Comparando com a concentração de glicose, após o pré-tratamento e após a HE, para a amostra 14 houve um aumento de 37% e para a amostra 16 de 9,15 g/mL passou para 21,48 g/mL, aumento de aproximadamente 42%. Em relação à xilose, não houve uma melhoria significativa, onde a máxima conversão de xilose após o pré-tratamento foi de 24,70% e após a HE foi de 5,23%.

Poderia conseguir resultados melhores, visto que, de acordo com Gurgel (2010), ao contrario do que ocorrem na hidrólise ácida concentrada, na hidrólise ácida diluída as regiões cristalinas da celulose não são penetradas pela solução ácida e a hidrólise ocorre em fase heterogênea.

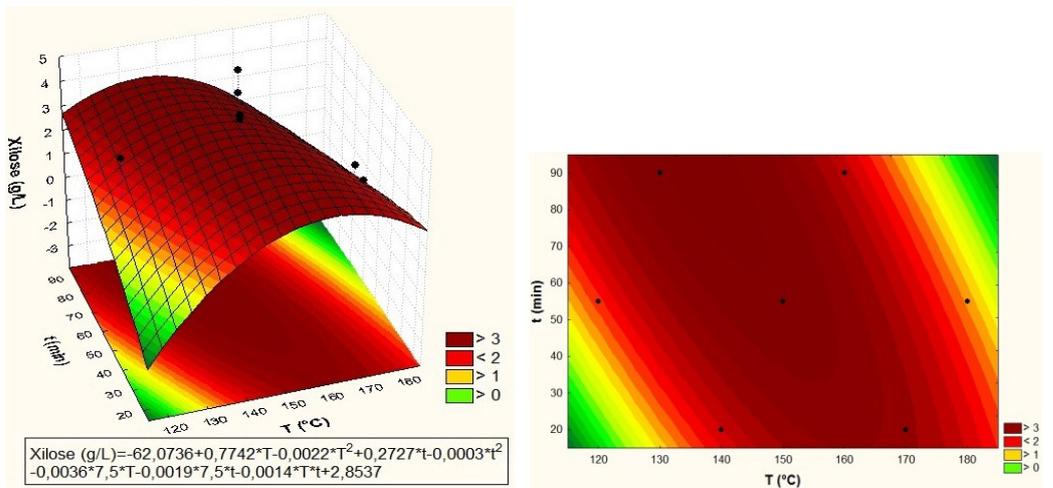
**Figura 59.** Superfícies de resposta e de contorno geradas, a partir do modelo quadrático, apresentando a relação da RSL, T e t com xilose (g/L).



Relação RSL x T



Relação RSL x t



Relação T x t

Fonte: Autora

Ao analisar os resultados após a conversão enzimática, percebe-se que os parâmetros utilizados no planejamento 2, em comparação ao planejamento 1, foram favoráveis em relação aos rendimentos máximos de glicose e xilose. A concentração de glicose passou de 2,26 g/L para 23,74 g/L e de xilose, passou 1,34 g/L para 5,23 g/L.

Isso significa que os valores foram alcançados, em uma reação de etapa única, dentro dos limites do modelo experimental selecionado e as interações entre a concentração de ácido, tempo e temperatura (NEUREITER *et al.*, 2002), ocasionaram uma hidrólise satisfatória do BB pré-tratado em açúcares, sem a formação excessiva de produtos de degradação.

Assim sendo, o levantamento de algumas referências na literatura foi feito em analogia às formas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e resultados de açúcares, exibidos na tabela 26.

Os estudos, descritos na tabela 26, que aparecem rendimentos de glicose e/ou conversões enzimáticas superiores ao obtido nesse estudo, devem-se ao fato de: os pré-tratamentos foram com ácidos fortes e/ou em condições severas e a atividade da enzimática foi de 15 FPU ou superior.

Nesse contexto, os gastos com celulasas podem chegar até 18% dos custos de uma biorrefinaria (WINGREN *et al.*, 2003). No entanto, alguns autores, como Ertas *et al.* (2014) mencionam que valores reduzidos, como 4 a 5 FPU/g substrato, já contribuem para a economia da hidrólise de materiais lignocelulósicos via rota enzimática. O retorno financeiro, de acordo com Batalha *et al.* (2015) pode alcançar a ordem de 12% produzindo etanol 2G utilizando hidrólise enzimática (5 FPU/g) de bagaço de cana pré-tratado.

Está bem estabelecido que a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos utilizando enzimas depende em grande parte do custo da produção de celulasas (PANDEY *et al.*, 2000b), destaca-se que obteve valores aceitáveis de ART e de glicose e xilose, utilizando concentração inicial da enzima baixo (10 FPU/mL) em relação a valores encontrados na literatura, o que torna o processo de hidrólise por enzimas atraente. Destaca-se, também, o uso de pré-tratamento com ácido cítrico diluído, em condições não tão severas como descritas na literatura. Através da otimização dos resultados obtidos, partiu-se para digestão anaeróbia da amostra 2, da fração sólida (após a HE) e da fração líquida (após o pré-tratamento).

**Tabela 26.** Tabela de comparação de trabalhos utilizando hidrólise enzimática após o pré-tratamento

Autor	Tratamento	Enzima	Teor de Glicose / Conversão enzimática da celulose (CC)
Brienzo <i>et al.</i> (2017)	Bagaço de cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : baixa severidade (150°C, 0,96% m/m, por 15 min), severidade média (160°C, 0,96% m/m, 15 min) e alta gravidade (180°C, 0,5% m/m, por 15 min). As amostras também foram pré-tratadas a 200°C por 15 min sem adição de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Celulase Spezyme CP (Genencor-Danisco: 15 FPU/g de substrato, suplementado com 15 UI/g de substrato de β-glucosidase (Novozym 188 -Novozymes A/S)	Rendimento da glicose da hidrólise enzimática (%): entre 80 - 100% em alta severidade não ácida; 60 - 85% severidade alta, 60 - 65% severidade média e 55 - 65% severidade baixa
Santos (2013)	Palha de cana, pré-tratamento hidrotérmico em três níveis: temperatura (°C): 170, 190 e 210; tempo (min): 5, 10 e 15; relação palha/água (%): 10, 12,5 e 15 em 200 mL de água.	Celluclast 1.5 L, Novozymes. Na concentração 15 FPU/g	maior liberação de glicose (43,36 g/L) da hidrólise enzimática foi na condição de pré-tratamento hidrotérmico de 190°C por 18,41 minutos e relação palha/água de 1:12,5 %
Benjamin <i>et al.</i> (2013)	Pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluído a 180°C, 0,5% por 15 min.	Spezyme CP (Genencor-Danisco) (15 FPU/g) com concentração de proteína de 140 mg/mL (atividade de celulase de 65 FPU/ml) e Novozym 188 (Novozymes A/S) com concentração proteica de 95 mg/mL (atividade de -glucosidase de 700 IU / ml)	Rendimento combinado de açúcar: 27,3 a 55,2 g/100 g de matéria seca
Silva (2017)	Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico por explosão à vapor, sob condições : 180°C, 5 min, proporção de 1:20 (m/v) e pressão de 0,86 MPa	Cellic® CTec 3 (10 FPU/g substrato)	Máximo de concentração de ART de 7,96 gL <sup>-1</sup>
Ramos <i>et al.</i> (2015)	Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , sob condições experimentais com teor de sólidos de 20% (m/v) por 96 h, temperatura de 50°C, volume de reação de 100 mL	Cellic CTec2 (Novozymes®) (160 FPU/g)	Eficiência de hidrólise obtida de 92,5% (76,8 g/L de glicose)
Martín <i>et al.</i> (2007)	Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluído. RSL de 10g/g, temperatura de 205 e 215°C e com um tempo de residência de 5 e 10 min	Celluclast 2L e Novozym 188 (Novo Industri A/S).	A melhor conversibilidade enzimática obtida para o bagaço foi de, aproximadamente, 45g/100g, para as condições de 205°C e 10 min
Oliveira (2012)	Pré-tratamento por explosão a vapor da polpa de bagaço de cana, ~200°C por 7 min, variando 2 % teor de sólidos (% m/v) e teor de sólidos de 10 (% m/v).	15 FPU/g Celluclast 1.5L e 10 UI/g Novozym 188	CC para o material <i>in natura</i> : 15,0%; para 2%: 41,0% e para 10%: 34,7%.

Fonte: Autora

Sabendo que a fração da celulose permanece preferencialmente na fração sólida, tornando-se mais acessível às enzimas celulolíticas durante a hidrólise enzimática (GALBE e ZACCHI, 2010), aumentando a geração de açúcares C5-C6, contribuindo para a produção de biogás. Além do mais, alguns estudos mostram, que as arqueias metanogênicas podem ser severamente inibidas em ambientes com elevadas quantidades de furanos, prejudicando a etapa de metanogênese (BAÊTA, 2016, ABGOR *et al.*, 2011; CHIARAMONTI *et al.*, 2012). Partindo desse pressuposto, a amostra 2 (condição de pré-tratamento com menor severidade em relação à temperatura) apresentou maior teor de celulose (51,72%) na fração sólida, elevada concentração de xilose (20,44g/L) e de arabinose (5,38 g/L) na fração líquida, menor produção de inibidores e alta geração de açúcares redutores totais (ART) (171,45) após a HE.

Portanto, pode-se inferir que as condições de pré-tratamento com menor severidade, ainda que impliquem em menores teores de glicose nos hidrolisados e após a HE, devem ser as preferidas quando o objetivo é a produção de biogás, procurando o compromisso entre a economia, viabilidade e menor geração de resíduos (preocupação com meio ambiente).

#### **7.5 Determinação da demanda química de oxigênio – DQO**

A produção de biogás depende da concentração de DQO da amostra, ou seja, a concentração de DQO é uma medida analítica utilizada para quantificar os compostos orgânicos contidas na biomassa pré-tratada.

A amostra 2, fração líquida após o pré-tratamento e fração sólida, após a HE, resultaram DQO de 50,40 e 1,13 g O<sub>2</sub>/L, respectivamente.

#### **7.6 Determinação de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)**

Para avaliar o desempenho do processo da relação substrato/micro-organismo do inoculo anaeróbico, o SSV da amostra 2 (fração sólida) foi de 0,89 g/gamostra.

#### **7.7 Digestão anaeróbia de materiais lignocelulósicos (DA)**

O aproveitamento, tanto da fração líquida como da fração sólida da biomassa pré-tratada, permitiu a conversão dos monossacarídeos fermentescíveis (ex. xilose, glicose e arabinose) presentes no bagaço de cana e melhorias na geração de biogás do bagaço de cana.

## 7.8 Monitoramento do biogás

Conforme Bian *et al.* (2014), a hidrólise ácida leva à degradação parcial das hemiceluloses em polímeros solúveis de baixo peso molecular, oligossacarídeos e monossacarídeos. A proporção dos compostos solúveis depende das condições de operação. Temperatura, concentração de ácido e tempo de reação são os parâmetros mais importantes na hidrólise de hemiceluloses, uma vez que afetam a taxa de hidrólise e seletividade. E, particularmente para a hidrólise ácida, por realizar a quebra aleatória das ligações glicosídicas entre as unidades de xilose, pode ocorrer a liberação de grande quantidade de monômeros de xilose e a formação de subprodutos inibitórios como os furfurais (FF e HMF), além dos fragmentos de lignina, que permaneceram adsorvidos na superfície das fibras do bagaço de cana pré-tratado, contribuindo para as menores produção de biogás e maiores fases *lag* (fase inicial de adaptação) do bagaço pré-tratado (BIAN *et al.*, 2014; LIMA, 2018).

Como já explicitado, os produtos de degradação não apenas reduzem o rendimento dos monômeros de açúcar, mas também atuam como inibidores de fermentação (NEUREITER *et al.*, 2002).

Liew *et al.* (2012) justificam a aplicação de pré-tratamento uma vez que concluíram que existe uma relação inversamente proporcional entre o rendimento de biogás e concentração de lignina, e uma relação proporcional entre o rendimento de produção de biogás e a digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica.

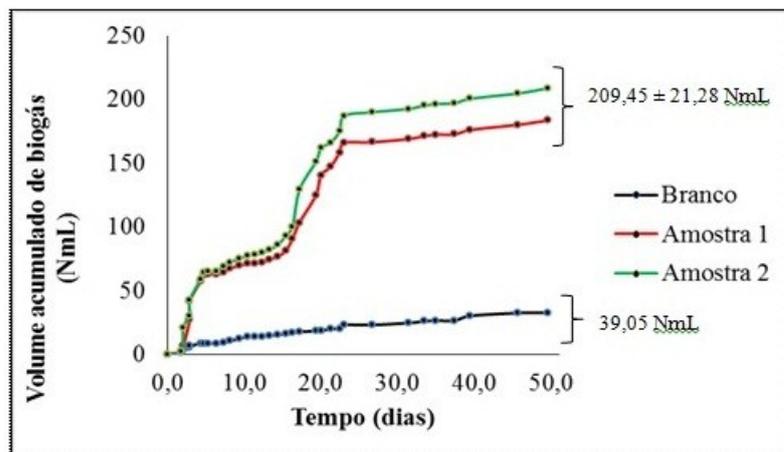
A seleção da amostra 2 (condição mais branda de pré-tratamento) para DA foi feita evitando a influência dos interferentes e visando produção de biogás desejável.

Todos os resultados da produção de biogás (volume acumulado de biogás e volume acumulado de biogás por DQO adicionada) dos ensaios de DA da fração líquida posterior ao pré-tratamento, é apresentado na figura 60 (a) e (b). Foi feita em duplicata (amostra 1 e 2).

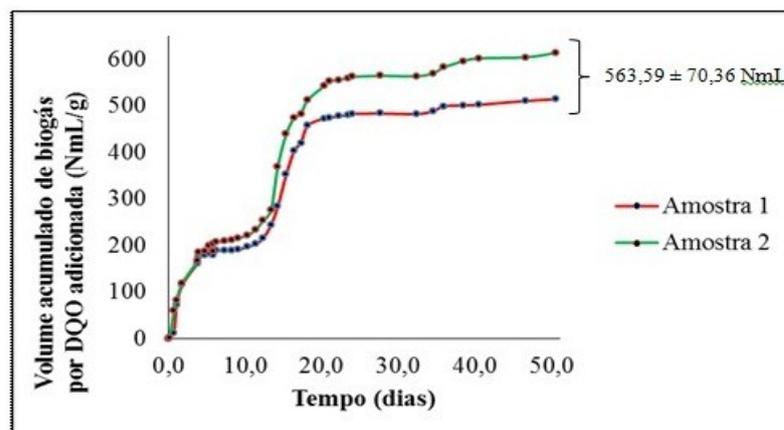
O comportamento da produção de biogás (figura 60 (a)) a partir do bagaço de cana com o inóculo fortificado com micro-organismos presentes no esgoto sanitário bruto exibe uma produção significativa nas primeiras horas, em média máxima de 209,45 NmL (amostra 2) em relação ao teste de controle (branco), uma máxima de 39,05 NmL.

**Figura 60.** Produção de biogás da fração líquida após o pré-tratamento da amostra 2, em relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) (a) e volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias) (b)

(a)



(b)



Fonte: Autora

Presença da fase *lag* pode ser evidenciada ao comparar o comportamento da produção de biogás a partir do bagaço bruto com aquela observada com o teste de controle. A presença de inibidores, lignina solúvel do pré-tratamento e a presença de oligossacarídeos (oriundos da degradação da hemicelulose) pode estar correlacionada com as fases *lag* observadas. Como esses oligossacarídeos são formados por fragmentos de xilana (foi evidenciado alta concentração de xilose na fração líquida), de elevada massa molar, sua biodegradabilidade é mais lenta (aumento do tempo de adaptação).

A maior produção de biogás alcançada (média máxima de 259,88 NmL/g) da amostra 2 (figura 60 (b)), foi depois do 13<sup>a</sup> dia, aumentando, gradativamente, até atingir

o volume máximo de 563,49 NmL/g, no 51<sup>a</sup> dia. Esses valores revelam superiores aos obtidos com o planejamento anterior, devido às quantidades consideráveis de açúcares na fração líquida.

Considerando a cinética microbiana, a presença dos açúcares C5 solúveis favorece a produção de acetato de forma direta pelos micro-organismos acidogênicos (não havendo dependência da hidrólise - etapa limitante), favorecendo a produção de biogás mais rapidamente (LIMA, 2018).

Na figura 61 (a) e (b) estão representados as curvas de produção experimental da geração de biogás (volume acumulado de biogás e volume acumulado de biogás por DQO adicionada) dos ensaios de DA da fração sólida após a HE. Foi feita em duplicata (amostra 1 e 2).

Da mesma maneira, a produção de biogás iniciou-se nas primeiras horas, sendo promissora (figura 61 (a)), atingindo uma média máxima de 449,41 NmL, ao passo que o teste de controle (branco) foi de máxima de 174,95 NmL.

Em relação ao volume acumulado de biogás por grama de DQO adicionada (figura 61 (b)), a produção de biogás foi em escala gradativa, até o volume máximo de 57,78 NmL/g, em ciclo de 50 dias. Os resultados demonstram menores fases *lag* e efeitos positivos na produção de biogás.

A análise e adoção de parâmetros cinéticos (tempo, RSL, temperatura, inibidores, etc) (AMIM *et al.*, 2017) confirmam os benefícios para a implementação da DA que pode atribuir quando deseja-se aproveitar esses resíduos de elevada resistência, como o bagaço de cana, para a geração de biogás.

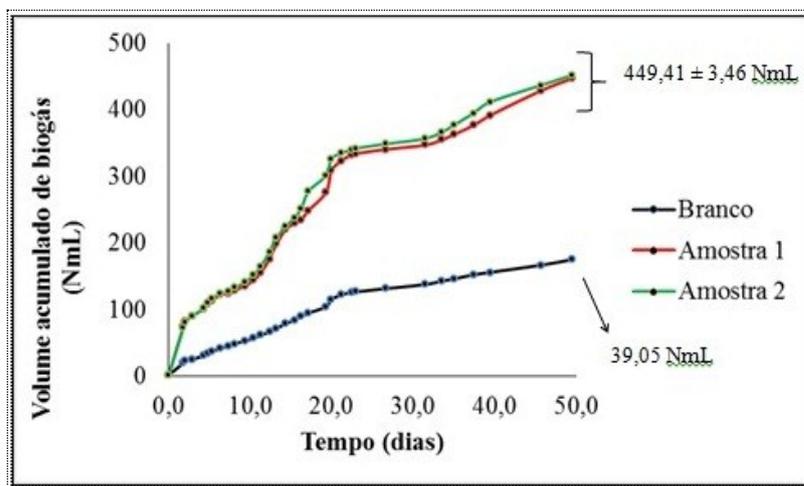
Resultados confirmam a hipótese de que as concentrações mais baixas de inibidores e lignina contribuem para aumentar a atividade metanogênica do substrato gerado pelo pré-tratamento (BÂETA, 2016, BÂETA *et al.*, 2016).

Ao avaliar a produção de biogás, tanto da fração líquida (hidrolisado após o pré-tratamento) quanto da fração sólida (após hidrólise enzimática), podemos destacar: no caso da fração líquida, constituída de açúcares como xilose e arabinose, que são facilmente fermentados pelas arqueas metanogênicas (LIMA, 2018), parece explicar a redução da produção de metano (máximo de 209,45 NmL), atrelada com fases *lag*. Na questão da fração sólida, houve crescente produção de biogás (máximo de 449,41 NmL), com tênue fase *lag*, devido a alto teor de celulose e de ART na amostra. A redução da fase *lag* é ressaltada na literatura como uma das principais vantagens quando

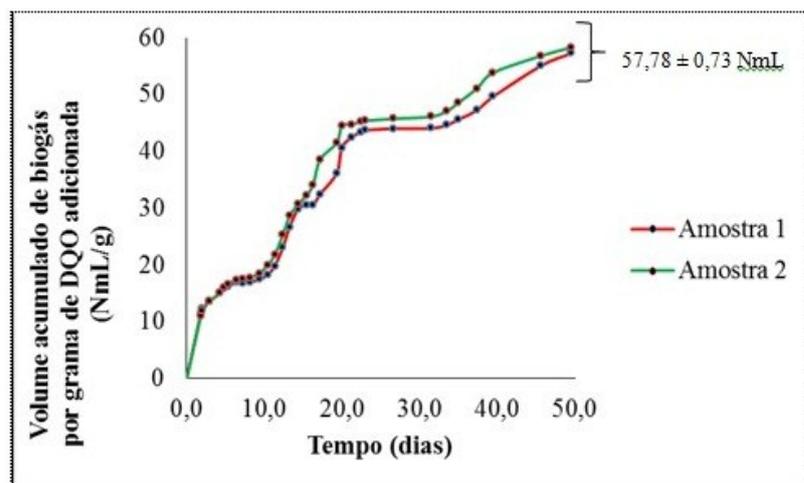
se almeja otimizar um processo de produção de biogás via digestão anaeróbia (LIMA, 2018). Além do mais, na fração sólida, apresentou valor inferior em relação ao volume por grama de DQO. Nos dois casos, ressaltam-se a conversão de altas taxas e produções de volume de biogás, comprovando a viabilidade do processo de pré-tratamento com ácido cítrico diluído.

**Figura 61.** Produção de biogás da fração sólida após o pré-tratamento da amostra 2, em relação ao volume acumulado de biogás x tempo (dias) e volume acumulado de biogás por DQO adicionada x tempo (dias)

(a)



(b)



Fonte: Autora

## 7.9 Determinação de Poder calorífico

Conhecido que o teor de combustibilidade de uma biomassa, expressa a partir da degradação térmica da mesma, o quanto da amostra possui composição química favorável à produção de energia (OLIVEIRA, 2014), e que a potencialidade energética varia entre as regiões e nas condições de cultivo, diminuindo ou aumentando devido ao seu teor de cinzas e umidade presente na biomassa. O PCS da biomassa diminui com o alto teor de cinzas e com o conteúdo de umidade (OLIVEIRA, 2014; PROTÁSIO *et al.*, 2011; LIZCANO, 2015). Lizcano (2015) e Meschede *et al.* (2012) relataram, também, que a estrutura da lignina pode influenciar a degradação térmica da biomassa, elevando o seu poder calorífico superior.

Pretendendo-se o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para o processo de combustão, os materiais foram avaliados quanto ao Poder Calorífico Superior (PCS) (Tabela 27), confirmam com os valores encontrados na literatura.

**Tabela 27.** Determinação do poder calorífico após a HE

<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Poder Calorífico (kcal/kg)</b>	<b>Poder Calorífico (MJ/kg)</b>	<b>Desvio padrão (kcal/kg)</b>
<b>BB (<i>in natura</i>)*</b>	9,49	3106	13,00	17
<b>BB</b>	12,93	3015	12,62	20
<b>2</b>	16,93	3294	13,79	49

\* cinzas do BB *in natura* de 0,41%

**Fonte:** Autora

O BB *in natura* apresenta valor de PCS superior ao BB (após HE), por ser uma amostra sem nenhum tipo de pré-tratamento, contém alto teor de lignina (~26,5%) e devido à valor baixo de umidade. Literatura traz, ainda que, teores de carbono, hidrogênio, oxigênio e cinzas estão correlacionados ao PCS, porém não se realizou essas análises.

Os resultados de PCS das amostras após a HE (amostras BB e 2) formam próximas ao BB *in natura*, sendo favorável para aproveitamento da biomassa para o processo de combustão.

A amostra 2 produziu em valor de PCS superior às demais amostras (BB *in natura* e BB após HE) provavelmente devido ao alto teor de lignina e/ou a combinação dos componentes: celulose, hemiceluloses e lignina.

Na comparação dos valores de poder calorífico com os disponíveis na literatura, para bagaço de cana (base seca), Arantes (2014), em seu estudo, obteve um valor PCS entre  $4483 \pm 16,82$  Kcal/Kg de bagaço de cana. Protásio *et al.* (2011) obtiveram valores poder calorífico superior de  $4511,8 \text{ kcal.kg}^{-1}$  ( $18,891 \text{ MJ.kg}^{-1}$ ) (teor médio de cinzas de 0,93%). A média geral observada para o PCS do bagaço, para os estudos de Lizcano (2015) foi  $18,16 \text{ MJ.kg}^{-1}$  (com teor de cinzas médio de 0,86 %).

## 7.10 Conclusões do Planejamento 2

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico diluído usando sistema pressurizado, em três condições distintas (RSL, T e t), mostrou-se, inicialmente, um método eficaz, sendo que para rendimento acima de 90 % ocorreram sob condições de baixas temperaturas (abaixo de  $150^{\circ}\text{C}$ ), RSL na faixa de 5,25 a 9,75 g/mL e com tempo indefinido.

À medida que se aumenta a temperatura (acima de  $150^{\circ}\text{C}$ ) e no intervalo de RSL de 5,25 a 9,75 g/mL, com tempo variável, aumentou-se a eficiência de deslignificação do processo de pré-tratamento. As amostras 15, 14, 10, 16, 6, 12, 9 apresentaram teores de lignina inferiores de 20 %. O mesmo se repete para o índice de cristalinidade e reforçados com as imagens obtidos por MEV. O teor de lignina de todas as amostras é bem inferior aquele encontrado no material de partida (BB).

Os maiores valores de celulose foram obtidos nas condições de RSL entre 5,25 e 7,5 g/mL (exceto para amostra 2), T abaixo de  $160^{\circ}\text{C}$  (exceto amostra 15) e t independentemente. Já para os maiores conteúdos de hemiceluloses, maior RSL (superior a 5,25 g/mL), T abaixo de  $150^{\circ}\text{C}$  (exceto amostra 15) e t inferiores a 55 min (exceto amostra 3). A amostra 2 mostrou-se teor de celulose superior às demais (51,72%) e conseqüentemente, menor hemiceluloses (0,10%).

O pré-tratamento com ácido cítrico diluído mostrou-se um efeito positivo na eficiência na remoção de mais hemiceluloses e/ou lignina, e a consequência foi a obtenção de um material mais acessível e rico em celulose (amostra 2) para enzimas celulolíticas na hidrólise enzimática.

Considerando tal situação, tornou-se importante a tentativa de maximizar a solubilização dos açúcares da biomassa pré-tratada buscando sua utilização no processo de DA. A DA criou uma possibilidade de geração de mais um vetor energético (biogás) utilizando uma parte da biomassa que até então poderia ser considerado um efluente

líquido gerado pelo pré-tratamento, além do resíduo sólido da HE. A aplicação de tal tecnologia na cadeia produtiva da biorrefinaria da cana-de-açúcar pode contribuir positivamente para sustentabilidade do processo.

O líquido pré-tratado conteve uma composição rico em:

- glicose (RSL de 5,25 e 9,75 g/L, temperatura de 160 e 180°C, tempo de 55 e 90 min), referentes às amostras 13, 14 e 16.

- xilose (RSL de 5,25 a 9,75 g/L, temperatura abaixo de 160°C, tempo de 55 e 90 min), referentes às amostras 14, 12 e 2.

- arabinose (RSL de 7,5 e 9,75 g/L, temperatura inferior a 150 °C, tempo de 55 e 90 min), referentes às amostras 2, 3 e 6.

Entretanto, as amostras 13, 14 e 16 exibiram índices representativos de interferentes como ácido fórmico, ácido acético, furfural e hidroximetifurfural.

Os sólidos residuais da hidrólise enzimática das amostras 14, 17 e 16 exibiram maiores valores de glicose e as amostras 9, 8 e 7, valores altos de xilose.

Portanto, pensando no contexto da biorrefinaria sustentável da cana-de-açúcar, cujo o ideal é o aproveitamento de cada parte da biomassa, como por exemplo, a geração de uma fração sólida residual ao pré-tratamento rica em celulose e a formação de um hidrolisado pré-tratado com características adequadas a serem utilizado em outros bioprocessos como a DA, tornou-se interessante uma avaliação mais criteriosa do efeito de cada um dos compostos presentes no hidrolisado e no resíduo sólido na produção de biogás e conseqüentemente, geração de energia. Partiu-se para DA da amostra 2 e o acompanhamento deste efeito foi avaliado por meio dos resultados de testes de biogás para cada fração (líquida e sólida). A utilização destas frações, proporcionou a geração de biogás nos valores médios de 209,45 NmL e 449,41 NmL, respectivamente.

As condições brandas de pré-tratamento tornou o processo geral mais atrativo energeticamente e economicamente atrelado à viabilidade.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Entende-se por biorrefinaria a integração de diferentes processos de conversão de biomassa para produção de distintos produtos, como combustíveis, produtos químicos e eletricidade e permite um alcance de maiores eficiências no curto e no longo

prazo, tanto do ponto de vista termodinâmico quanto do ponto de vista econômico e ambiental.

Os pré-tratamentos tornam-se uma importante etapa na biorrefinaria lignocelulósica, mesmo sabendo que seu uso acarreta custos ao aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Vale ressaltar que a biorrefinaria faz sentido se for empregada uma matéria-prima renovável, abundante, barata e específica, como a biomassa lignocelulósica que, ao contrário das diversas fontes fósseis, não é afetada pelas oscilações do mercado.

Dentro do contexto da biorrefinaria lignocelulósica, objetivo do estudo foi obter as condições otimizadas do processo de hidrólise enzimática para produção de açúcares fermentescíveis sem a geração de subprodutos indesejáveis para a produção de biogás.

O pré-tratamento com ácido cítrico diluído mostrou a viabilidade do processo, tanto do ponto de vista energético quanto do ponto de vista operacional, visto que maiores quantidades de bagaço de cana podem ser aproveitadas, aumentando a capacidade de uso para outras finalidades, seja para produção de biocombustíveis, produção de calor como aproveitamento de subprodutos.

Além disso, os planejamentos experimentais para o pré-tratamento por hidrólise ácida foram validados, o que possibilitou a obtenção de hidrolisados e resíduos sólidos 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.

Baseando-se nos dados obtidos durante o estudo, os processos de pré-tratamento foram conduzidos sob condições moderadas, de modo a promover simultaneamente elevada reatividade das fibras celulósicas e elevada recuperação de celulose, com mínima perda de açúcares, além da mínima geração de compostos inibidores das etapas subsequentes de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

O estudo foi efetivo por uma série de características:

a) Em relação ao pré-tratamento das amostras 6 e 2:

- produziu baixas quantidades de produtos resultantes da degradação do açúcar e da lignina. Teores de lignina na faixa de 22 % em ambas as amostras, comparáveis aos da literatura.

- o líquido resultante do pré-tratamento possibilitou a digestão anaeróbia, sem a necessidade de uma desintoxicação prévia.
- resultou em uma elevada concentração de açúcares liberados na fração líquida (~5 g/L de glicose e ~20 g/L de xilose); valores próximo e/ou superiores ao encontrado na literatura .
- promoveu uma baixa demanda de energia, ou energia que possa ser recuperada e, outras etapas do processo. Aproveitamento, por exemplo o resíduo sólido da HE para a combustão. As amostras exibiram alto índice de PCS.
- requer menor investimento e custo operacional, devido ao baixo custo de reagentes químicos para o pré-tratamento, neutralização e subsequente condicionamento.
- aproveita-se de todas as frações (sólida e líquida) sem descarte e/ou recuperação.
- produção mínima ou quase nula de resíduos.
- reações rápidas e/ou reagentes químicos não corrosivos para minimizar o custo do reator de pré-tratamento. O uso de temperaturas relativamente baixas, tempos de reação mínima e concentração da solução ácida baixas, auxilia na economia do processo.
- a adequação do hidrolisado no preparo das subseqüentes etapas biológicas não formou produtos que demandem desafios de processamentos ou eliminação de resíduos.
- foi feito em escala laboratorial, porém favorável para escala industrial. O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processamento para a produção de açúcares a partir de biomassa. Assim, o desempenho de uma técnica de pré-tratamento deve ser avaliado em função de sua influência sobre os custos associados às etapas precedentes e subseqüentes, bem como sobre os custos operacionais, de matéria-prima e de capital, do próprio pré-tratamento. Desse modo, o pré-tratamento propriamente dito deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade (garantindo acessibilidade da celulose aos agentes hidrolíticos), simplicidade operacional, segurança e higiene industrial e atributos ambientais, ao mesmo tempo que exige um reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades.

b) Em relação à hidrólise enzimática das amostras 6 e 2:

- resultou em uma elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática. Valores de ART superiores ao encontrado na literatura, na qual o ART da amostra 6 foi de ~28 g/L e da amostra 2 foi de ~171 g/L.

- houve a adequação do resíduo sólido das subseqüentes etapas biológicas sem eliminação, podendo ser utilizados como calor secundário (PCS). Ambas as amostras apresentaram alto PCS.

- carga baixa de enzima deve ser adequada para se atingir digestibilidade superior a 90% da celulose pré-tratada em menos de 5 dias, e preferivelmente em 3 dias.

c) Em relação à digestão anaeróbia e produção de biogás das amostras 6 e 2:

- obteve significativa produção de biogás tanto na fração sólida após hidrólise enzimática (amostra 2 = 449,41NmL) como da fração líquida após pré-tratamento (amostra 6 = 55,14 NmL, amostra 2 = 209,45 NmL).

- viável para escala industrial apesar de feito em escala laboratorial. Os resultados apresentados comprovaram a liberação e consumos de açúcares, o que é altamente relevante, pois mostra que os micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia foram capazes de assimilar açúcares C5 com elevada eficiência. Desta forma, a formação de biogás obtidos na digestão anaeróbia poderia aumentar a viabilidade econômica do processo de produção de etanol 1G integrado ao processo de produção de etanol 2G, comprovando, assim a hipótese de um conceito de biorrefinaria de segunda geração.

A ferramenta estatística de direcionamento foi capaz de gerar as condições desejáveis para pré-tratamento, bem como a composição química esperada para o hidrolisado e para o sólido. Os testes permitiram dar suporte à avaliação na produção de biogás.

Finalizando, dentro do propósito do planejamento de experimentos, que era avaliar, em primeiro momento, a influencia dos parâmetros como concentração de ácido e tempo (pressão ambiente) e em segundo momento, a RSL, temperatura e tempo (sob pressão), sobre o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido cítrico diluído, atendeu aos seguintes requisitos de suma importância: (a) aumentou a produção de reativos que favoreçam o ataque enzimático das fibras celulósicas, (b) evitou a destruição de celulose, (c) evitou a formação de possíveis inibidores de enzimas hidrolíticas e micro-organismos da fermentação, (d) minimizou a demanda de energia, (e) reduziu o custo relacionado com pré-tratamento físico das matérias-primas, (f) reduziu custo de investimento relacionado com os reatores químicos, (g), produziu menos resíduos e (h) reduziu o consumo de produtos químicos e, quando não possível, utilizar os mais baratos. Do mesmo modo, atendeu ao propósito do sucesso do pré-tratamento, uso reduzido de enzimas (8,5 e 10 FPU) para conversão enzimática de

celulose, fundamentais para a obtenção de teores elevados de açúcares fermentescíveis, originando resultados promissores na produção de biogás.

Esse estudo possibilitou a validação da ação de um ácido diluído, já que não há trabalhos desenvolvidos com pré-tratamento com ácido cítrico diluído, desde o pré-tratamento até a produção de biogás, já que não há trabalhos desenvolvidos nessa área. As informações geradas serão úteis para orientar novas condições experimentais, buscando novas formas para um processo econômico (em virtude do consumo de energia e de insumos), bem como da produtividade com alta rentabilidade e ambientalmente viável.

## 9 REFERÊNCIAS

ABOUD-ZEID, A.; ASHY, M. A. Production of citric acid: A review. **Agricultural Wastes**, v.9, p.51-76, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(84\)90075-1](https://doi.org/10.1016/0141-4607(84)90075-1)

ADANI, F.; SCHIEVANO, A.; CARDINALE, G.; D'IMPORZANO, G.; TAMBONE, F. Nanoscale structure of the cell wall protecting cellulose from enzyme attack. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 3, p.1107–1113, 2011. DOI: 10.1021/es1020263

ADARME, O. F. H.; BAËTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. **Industrial Crops & Products**, 109, 288–299, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.040>

AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309–318, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00106-1)

AMIM, F.R.; KHALID, H.; ZHANG, H.; RAHMAN, S.U.; ZHANG, R.; LIU, G.; CHEN, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Express**, v.7, p.1-12, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0375-4

ANTONI, D.; ZVERLOV, V.V.; SCHWARZ, W.H. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n1, p.23-35, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1163-x

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V.; SKIADAS, I.V.; ANGELOPOULOS, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass.

**Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 110-9, 2008.  
DOI:10.1016/j.biortech.2006.11.048

APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, 2005.

APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008. DOI: 10.1016/j.pecs.2008.06.002

ARAGONESE, A.R; CAMPOS, A.T; ZACARKIM, C.E; MATSUO, M.S; CUNHA, F. Eficiência energética de sistema de produção de suínos com tratamento dos resíduos em biodigestor. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p.745–750, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662006000300030>

ARANTES, D.C. **Bagaço de cana-de-açúcar: análise térmica e energética de biomassa**. 2014. 90f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2014.

ASADA, C.; SASAKI, C.; HIRANO, T.; NAKAMURA, Y. Chemical characteristics and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass treated using high-temperature saturated steam: comparison of softwood and hardwood. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 245-250, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.005>

BAÊTA, B.E.L. **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**. 2016. 159f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2016.

BAÊTA, B.E.L.; LIMA, D.R.S.; ADARME, O.F.H.; GURGEL, L.V.A.; AQUINO, S.F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v.200, p.137–146, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>

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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00070-5)

BATALHA, L.A.R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; COLODETTE, J.L.; GOMES, F.J.B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v.180, p.97–105, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060>

BELGACEM, M.N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1<sup>st</sup> ed., Amsterdam:Elsevier, 2008.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J.F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v.51, p.7-18, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.067>

BEZERRA, T.L.; RAGAUSKAS, A.J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.10, n.5, p. 634-647, 2016. DOI: 10.1002/bbb.1662

BIAN, J.; PENG, P.; PENG, F.; XIAO, X.; XU, F.; SUN, R. Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. **Food Chemistry**, v. 156, p. 7–13, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.112>

BISWAS, R.; UELLENDAHL, H.; AHRING, B.K. Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biomass and bioenergy**, v.61, p.104–113, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.027>

BONOMI, A. Workshop hidrólise de materiais lignocelulósicos. *In*: Cortez (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 679-695.

BORYSIK, S.; GARBARCZYK, J. Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibres after mercerisation. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 11, n. 5, p. 104-106, 2003. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/279898376\\_Applying\\_the\\_WAXS\\_method\\_to\\_estimate\\_the\\_supermolecular\\_structure\\_of\\_cellulose\\_fibres\\_after\\_mercerisation](https://www.researchgate.net/publication/279898376_Applying_the_WAXS_method_to_estimate_the_supermolecular_structure_of_cellulose_fibres_after_mercerisation). Acesso em: 03/2018.

BOUCHARD, J.; ABATZOGLOU, N.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. Characterization of depolymerized cellulosic residues. Part1: Residues obtained by hydrolysis processes. **Wood Science Technology**, v.24, n.2, p.159-169, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00353250>

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus spp.* para a produção de bioetanol**. 2010. 154 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

BRANDÃO, E.A.F. A geoeconomia do etanol: as condicionantes e as oportunidades para a consolidação de um mercado global. **Relações Internacionais**, v.13, n.2, p.37-50, 2015. DOI: 10.5102/uri.v13i2.3570

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v.104, p.271-280, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.037>

BROWN, D.; SHI, J.; LI, Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. **Bioresource Technology**, v.124, p.379–386, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.051>

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York/London/Sydney: Interscience Publishers, 1967. v. II.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. Disponível: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfuLUAD/as-rotas-etanol-celulosico-no-brasil>. Acesso em: 01/2018.

BUDDADEE, B.; WIROJANAGUD, W.; WATTS, D.J.; PITAKASO, R. The development of multi-objective optimization model for excess bagasse utilization: A case study for Thailand. **Environmental Impact Assessment Review**, v.28, p.380–391, 2008. DOI:10.1016/j.eiar.2007.08.005

BUSTOS, G.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Modeling of the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse with Hydrochloric Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.104, p. 51-68, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:104:1:51>

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1 – 15, 2012. DOI: 10.1155/2012/989572

CANILHA, L.; SANTOS, V.; ROCHA, G.; ALMEIDA E SILVA, J.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.; FELIPE, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, p.1467–1475, 2011. DOI:10.1007/s10295-010-0931-2

CARASCHI, J.C.; FILHO, S.P.C.; CURVELO, A.A.S. Preparação e Caracterização de Polpas para Dissolução Obtidas a Partir de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.6, n.3, p. 24-29, 1996. Disponível em: <http://s3.amazonaws.com/host-article-assets/polimeros/5883713e7f8c9d0a0c8b47d6/fulltext.pdf>. Acesso em: 11/2014.

CARGILL. Ficha de Informação e Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). **Ácido cítrico**. Abril/2011.

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. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/2429>

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. JR. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>

CHEMMÉS, C.S.; SILVA, F.C.; SOUZA, L.S.; Jr. AZEVEDO, R.A.; CAMPOS, L.M.A. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. **Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, v.12, p.58-72, 2013. Disponível em: <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sep>. Acesso: 01/2018.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, n.1-2, p.56-64, 2001. DOI: 10.1007/s002530100747

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.25-35, 2012. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.04.020

CHONG, M-L.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSANA, M. A. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.3277-3287, 2009. DOI:10.1016/j.ijhydene.2009.02.010

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v.11, n.22, p.1-9, 2017. DOI: 10.1186/s13065-017-0251-y

CIRNE, D.G.; LEHTOMÄKI, A.; BJÖRNSSON, L.; BLACKALL, L.L. 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. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03270.x

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.5 - Safra 2018/19, n. 2. Segundo levantamento, agosto de 2018a.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.5 - Safra 2018/19, n. 3. Terceiro levantamento, dezembro de 2018b.

CORNO, L.; PILU, R.; TAMBONE, F.; SCAGLIA, B.; ADANI, F. New energy crop giant cane (*Arundo donax* L.) can substitute traditional energy crops increasing biogas yield and reducing costs. **Bioresource Technology**, v.191, p.197-204, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.015>

CORRALES, R.C.N.R.; MENDES, F.M.T.; PERRONE, C.C.; SANT'ANNA, C.; SOUZA, W.; ABUD, Y.; BON, E.P.S.; FERREIRA-LEITÃO, V. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. **Biotechnology**

for **Biofuels**, v.5, n.36, p.1-8, 2012. Disponível em:  
<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/36>. Acesso em: 01/2018.

COSTA, A.G.; PINHEIRO, F.G.C.; PINHEIRO, G.C.; DOS SANTOS, A.B.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, n.194, p.36-51, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/dae.2014.003>

CRUZ, S.; DIEN, B.; NICHOLS, N.; SAHA, B.; COTTA, M. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v.39, p.439–447, 2012. DOI 10.1007/s10295-011-1051-3

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.37, n.9, p. 937-941, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00301-6)

DEL RÍO, J.C.; RENCORET, J.; PRINSEN, P.; MARTÍNEZ, A.T.; RALPH, J.; GUTIÉRREZ, A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.23, p.5922-5935, 2012. DOI: [dx.doi.org/10.1021/jf301002n](http://dx.doi.org/10.1021/jf301002n)

DERERIE, D.Y.; TROBRO, S.; MOMENI, M.H.; HANSSON, H.; BLOMQUIST, J.; PASSOTH, V.; SCHNÜRER, A.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J. Improved bio-energy yields via sequential ethanol fermentation and biogas digestion of steam exploded oat straw. **Bioresource Technology**, v.102, p.4449–4455, 2011. DOI:10.1016/j.biortech.2010.12.096

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogás from waste and renewable resources: an introduction**. 2<sup>nd</sup> Ed., Weinheim: WILEY-VCH, 2011.

DINIZ, D.S. **Produção de álcool etílico utilizando como matérias primas resíduos florestais e agrícolas**. 2008. 231f. Tese (Doutorado) - Universidade Nova de Lisboa. 2008.

DORAN, J.B.; ALDRICH, H.C.; INGRAM, L.O. Saccharification and Fermentation of Sugar Cane Bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2 Containing Chromosomally Integrated Genes Encoding the *Zymomonas mobilis* Ethanol Pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.2, p.240-247, 1994. DOI: 10.1002/bit.260440213

ERTAS, M.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.-M. Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v.152, p.259–266, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.026>

FANG, H.H.P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 31, n.6, p.683-692, 2006. DOI:10.1016/j.ijhydene.2005.07.005

FANG, Z.; SATO, T.; SMITH JR., R.L.; INOMATA, H.; ARAI, K.; KOZINSKI, J.A. Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3424-30, 2008. Doi:10.1016/j.biortech.2007.08.008

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**, n. 36, p. 8687-8696, 2011. DOI:10.1016/j.ijhydene.2010.05.119

FAQ Cellic® CTec3 - Novozymes. Disponível em: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/CTec3.pdf>. Acesso em: 10/2017.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin/New York: Water de Gruyter, 1989.

FERNANDES, B.S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F.R.; SAAVEDRA, N.K.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy Sustainable Development**, v.14, p.143-148, 2010. DOI:10.1016/j.esd.2010.03.004

FREITAS, W.L.C.; SAWAYA, J.V.Z.; GONÇALVES, B.C.M.; RODRIGUES, L.C.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café destoxificado com diferentes tipos de base. **Biochemistry and Biotechnology Reports** - Número Especial v.2, n.3, p.336-338, 2013. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/download/15837/12987>. Acesso em: 11/2014.

GALBE, M.; ZACCHI, G. **Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos**. In: Cortez (Ed.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade. – São Paulo: Blucher, 2010. p. 697-716.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v.74, p.78–88, 2006. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.02.005

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.144, p.396–400, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZALEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v.100, p.1608–1613, 2009. DOI:10.1016/j.biortech.2008.09.012

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.74, p.1101–1109, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199911\)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M)

GEHLEN, L. R. **Quantificação dos teores de conversão de fibras em açúcares redutores de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisados com catalisadores ácidos**. 2013. 50f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.

GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria. Party 5: Fermentation and Production**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.

GHOSE, T.K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, n.2, p.257-268, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GLASSER, W.G.; WRIGHT, R.S. Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n.3, p.219-235, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)10037-X](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)10037-X)

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1500-1503, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600026>

GRIMALDI, M. P. **Efeito dos pré-tratamentos químicos e físicos do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática**. 2013. 75f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P.V.F.; SANTOS, E.S.; FERNANDES, F.A.N.; MACEDO, G.R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.32, n.01, p.23-33, 2015. DOI: [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146](http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20150321s00003146)

GURGEL, L.V.A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. 315f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HÅSETH, J.K. **Decrystallization of lignocellulosic biomass using ionic liquids**. 2012. 85f. Thesis (Master in Science) - Department of Chemical Engineering, University of Science and Technology, Norway, 2012.

HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Lignin Structure, Properties, and Applications. **Advances in Polymer Science**, v.232, p.1–32, 2010. DOI: 10.1007/1220912

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10–8, 2009. DOI:10.1016/j.biortech.2008.05.027

HOFSETZ, K.; SILVA, M.A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and bioenergy**, v.46, p.564–573, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.038>

HUANG, Y.; QIN, X.; LUO, X. M.; NONG, Q.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; LV, F.; CHEN, Y.; YU, Z.; LIU, J.L.; FENG, J.X. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. **Biomass and bioenergy**, v.77, p.53–63, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.020>

IEA - International Energy Agency. Good Practice Guideline. **Bioenergy Project Development & Biomass Supply**. 2007. Disponível em: [www.iea.org](http://www.iea.org). Acesso em: 10/2017.

ISIKGOR, F.H.; BECER, C.R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. **Polymer Chemistry**, v.6, p.4497-4559, 2015. DOI: 10.1039/C5PY00263J

JALAK, J.; KURASIN, M.; TEUGJAS, H. Endo-exo Synergism in cellulose hydrolysis revisited. **The journal of biological chemistry**, v.278, p.28802–28815, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.381624

JARDIM, M.A.C. **Valorização Económica do Biogás: Geração Elétrica vs. Produção de Biometano para Injeção na Rede**. 2013. 133f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnico de Setúbal, Portugal, 2013.

JENSEN, P. D.; ASTALS, S.; LU, Y.; DEVADAS, M.; BATSTONE, D.J. Anaerobic codigestion of sewage sludge and glycerol, focusing on process kinetics, microbial dynamics and sludge dewaterability. **Water Research**, v.67, p.355-366, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.024>

JEON, T.; ISHIZAWA, C.I.; DAVIS, M.F.; HIMMEL, M.E.; ADNEY, W.S.; JOHNSON, D.K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, p.112–122, 2007. DOI: 10.1002/bit.21408

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.1, p.119-134, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/bbb.4>

KADAM, R.; PANWAR, N.L. Recent advancement in biogas enrichment and its applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.73, p.892–903, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.167>

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.2, p.137-45, 2004. DOI: 10.1007/s00253-003-1537-7

KNAPIK, H.G. **AULA PRÁTICA 4 – Série de sólidos**. TH758: Saneamento ambiental experimental. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, 2016. Disponível em: <https://document.onl/documents/aula-pratica-4-determinacao-de-coliformes-saneamento-ambiental-experimental.html>. Acesso em: 10/2018.

KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n.5, p.569-582, 2006. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015

KARAGÖZ, S.; BHASKAR, T.; MUTO, A.; SAKATA, Y.; UDDIN, A. Low-Temperature Hydrothermal Treatment of Biomass: Effect of Reaction Parameters on Products and Boiling Point Distributions. **Energy & Fuels**, v.18, p.234-241, 2004. DOI: 10.1021/ef030133g

KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, v.23, n.309, p. 1-21, 2018. DOI: 10.3390/molecules23020309

KIM, T.H.; KIM, J.S.; SUNWOO, C.; LEE, Y.Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v.90, n.1, p.39-47, 2003. DOI:10.1016/S0960-8524(03)00097-X

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Potencial inhibitors from wet oxydantion of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology and bioengineering**, v.81, p.738-747, 2003. DOI: 10.1002/bit.10523

KONDO, T. The Relationship between Intramolecular Hydrogen Bonds and Certain Physical Properties of Regioselectively Substituted Cellulose Derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.35, p.717-723, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(199703\)35:4<717::AID-POLB18>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(199703)35:4<717::AID-POLB18>3.0.CO;2-J)

KOTHARI, R.; PANDEY, A. K.; KUMAR, S.; TYAGI, V. V.; TYAGI, S. K. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 174 – 195, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>

KUHAR, S.; NAIR, L.M.; KUHAD, R.C. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, p.305-313, 2008. DOI: 10.1139/W08-003

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Researcher**, v.48, n.8. p.3713-3729, 2009. DOI: 10.1021/ie801542g

- LAL, R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. **Science**, v.304, p.1623-1627, 2004. DOI: 10.1126/science.1097396
- LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.O.; JÖNSSON, L.J. Influence of Lignocellulose-Derived Aromatic Compounds on Oxygen-Limited Growth and Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 617-632, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:617>
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass - characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1081-1099, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1081>
- 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.367-380, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00066-1)
- LEITÃO, R.C.; COSTA, A.G.; CASSALES, A.R.; ALEXANDRE, L.C.; PINHEIRO, F.G.C.; PINHEIRO, G.C.; VIANA, A.F.; SANTAELLA, S.T.; SANTOS, A.B.; ROSA, M.F. **Biodegradabilidade anaeróbica dos resíduos provenientes das cadeias produtivas dos biocombustíveis: bagaço de cana-de-açúcar**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.
- LEVIN, D.B.; ZHU, H.; BELAND, M.; CICEK, N.; HOLBEIN, B.E. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. **Bioresource Technology**, v.98, p.654–660, 2007. DOI:10.1016/j.biortech.2006.02.027
- LI, Y.; PARK, S.Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.821–826, 2011. DOI:10.1016/j.rser.2010.07.042
- LI, C.; TANJORE, D.; HE, W.; WONG, J.; GARDNER, J.L.; SALE, K.L.; SIMMONS, B.A.; SINGH, S. Scale-up and evaluation of high solid ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.154, p.1-13, 2013. Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/154>. Acesso em: 05/2016
- LIEW, L.N.; SHI, J.; LI, Y. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Biomass and bioenergy**, v.46, p.125–132, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.014>
- LIMA, D.M.F.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.9630-9635, 2012. DOI:10.1016/j.ijhydene.2012.03.097

LIMA, D.R.S. **Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar**. 2018. 275f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

LIN, C.Y.; LAY, C.H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora, **International Journal of Hydrogen Energy**, v.30, n.3, p.285–292, 2005. DOI:10.1016/j.ijhydene.2004.03.002

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, 2010. DOI:10.1016/j.biotechadv.2010.05.006

LIU, W.; CHEN, W.; HOU, Q.; ZHANG, J.; WANG, B. Surface lignin change pertaining to the integrated process of dilute acid pre-extraction and mechanical refining of poplar wood chips and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.228, p.125–132, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.063>

LIZCANO, J.V. **Poder calorífico, energia e cinzas de cana-de-açúcar irrigada por gotejamento, para diferentes variedades, lâminas e processos de maturação**. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis: volume 1 e 2**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZY, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization; Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology Reviews**, v.6, n.3, p.506–577, 2002. DOI: 10.1128/MMBR.66.4.739.2002

MADIGAN, M. T. **Brock Biology of microorganisms**. 14<sup>th</sup> Ed. Benjamin Cummings. San Francisco. 2015.

MALDONADE, I.R.; CARVALHO, P.G.B.; FERREIRA, N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Comunicado Técnico/Embrapa**, n.85, ISSN 1414.9850, 2013.

MALONEY, M.T.; CHAPMAN, T.W.; BAKER, A.J. Dilute acid hydrolysis of paper birch: kinetics studies of xylan and acetylgroup hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.3, p.355-361, 1985. DOI:10.1002/bit.260270321

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARABEZI, K. **Deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar: reações, isolamento e utilização de ligninas**. 2014. 240f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

MARTÍN, C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JÖNSSON, L. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel

ethanol production. **International Sugar Journal**, v.109, n.1267, p.33-39, 2007.  
Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073030488>. Acesso em: 02/2018.

MARTIN, M.; SVENSSON, N.; FONSECA, J.; EKLUND, M. Quantifying the environmental performance of integrated bioethanol and biogas production. **Renewable Energy**, v.61, p.109–116, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.09.058>

MARTÍNEZ, A.T.; RENCORET, J.; MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; IBARRA, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; DEL RÍO, J. Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D NMR study. **Phytochemistry**, v.69, n.16, p.2831–2843, 2008. DOI: [10.1016/j.phytochem.2008.09.005](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.09.005)

MATA-ALVAREZ, J.; MACE, S.; LABRES, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.3–16, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): Overview of biomass. **Bioresource Technology**, v.83, n.1, p.37–46, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00118-3)

MEIGHAN, B.N. **Fracionamento de bagaço de cana-de-açúcar por processo hidrotérmico e organossolve no contexto da biorrefinaria lignocelulósica**. 2016. 135f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

MEIGHAN, B.N.; LIMA, D.R.S.; CARDOSO, W.J.; BAÊTA, B.E.L.; ADARME, O.F.H.; SANTUCCI, B.S.S.; PIMENTA, M.T.B.; AQUINO, S.F.A.; GURGEL, L.V.A. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops & Products**, v.108, p.431–441, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.049>

MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D.; CARBONARI, C.A.; MORAES, C.P. Teores de lignin e cellulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores. **Planta Daninha**, v.30, n.1, p.121-127, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582012000100014>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959. DOI: [10.1021/ac60147a030](https://doi.org/10.1021/ac60147a030)

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p.77–93, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>

MOSIER, N.; WYMAN, C.E.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of

lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, n.6, p.673–686, 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025

MTUI, Y.S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.1398–415, 2009. Disponível em:

[http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1379943264\\_Mtui.pdf](http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1379943264_Mtui.pdf).

Acesso em: 01/2018.

NARTKER, S.; AMMERMAN, M.; AURANDT, J.; STOGSDIL, M.; HAYDEN, O.; ANTLE, C. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. **Bioresource Technology**, v.34, p.2567–2571, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.08.017>

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.49 -58, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:49>

NORMA TÉCNICA INTERNA SABESP. **Sólidos – método de ensaio**. Revisão 1 - NTS 013:1999.

NOVO, L.P.; GURGEL, L.V.A.; MARABEZEI, K.; CURVELO, A.A.S. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol-water mixtures to produce pulps for saccharification. **Bioresource Technology**, v.102, n.21, p.10040-10046, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.050

NOVO, L.P. **Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 139f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

NOVOZYMES. Novozymes Cellic® CTec3: secure your plant's lowest total cost. 2012. Disponível em:

[http://s3.amazonaws.com/zanran\\_storage/bioenergy.novozymes.com/ContentPages/2546502386.pdf](http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/bioenergy.novozymes.com/ContentPages/2546502386.pdf). Acesso em: 10/2017.

NREL. Laboratório de Energia Renovável. Estados Unidos. **Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol 2011**. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>. Acesso em: 01/2018.

ODEGA, T.L.; PETRI, D.F. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

OH, K.-K.; KIM, S.-W.; JEONG, Y.-S.; HONG, S.-I. Bioconversion of cellulose into ethanol by nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.89, p.15-30, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:89:1:15>

OLIVEIRA, L.R.M. **Estudos de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose.** 2012. 109f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

OLIVEIRA, R.D. **Geração de energia elétrica a partir do biogás produzido pela fermentação anaeróbia de dejetos em abatedouros e as possibilidades no mercado de carbono.** 2009. 98f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

OLIVEIRA, S.F.A. **Avaliação energética da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes indústrias sucroenergéticas.** 2014. 80f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica - São José dos Campos, 2014.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J.A. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.321, n.1561, p.523-536, 1987. DOI: 10.1098/rsta.1987.0029

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic Approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.59, p.12-22, 2000. Disponível em: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/26557>. Acesso em: 02/2019.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p.1153-1169, 2000a. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69–80, 2000b. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHANB, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.153–162, 2000c. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00084-X)

PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J.N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, v.60, p.398-401, 2006. DOI: 10.1515/HF.2006.062

PAPA, G.; RODRIGUEZ, S.; GEORGE, A.; SCHIEVANO, A.; ORZI, V., SALE, K.L.; SINGH, S.; ADANI, F.; SIMMONS, B.A. Comparison of different pretreatments for the production of bioethanol and biomethane from corn stover and switchgrass. **Bioresource Technology**, v.183, p.101–110, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.121>

PASQUINI, D. **Polpação organossolve/dióxido de carbono supercrítico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2004. 180f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

PAVLOSTATHIS, S.G.; GIRALDO-GOMEZ E. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. **Critical Reviews in Environmental Control**. v.21, n.5-6, p.411-490, 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10643389109388424>

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, v.5, n.2, p.53-63, 2002. DOI: 10.1007/s10123-002-0062-3

PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P. 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. DOI: 10.1002/jctb.1765

PERRONE, O.M.; COLOMBARI, F.M.; ROSSI, J.S.; MORETTI, M.M.S.; BORDIGNON, S.E.; NUNES, C.C.C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, v.218, p.69-76, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.072>

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PRADO, M.A.C.; CAMPOS, C.M.M. Produção de biogás no tratamento dos efluentes líquidos do processamento de *coffea arabica l.* em reator anaeróbico UASB para o potencial aproveitamento na secagem do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p.938-947, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000300035>

PROBIOGÁS. **Biometano como combustível veicular**. Coletânea de publicações do PROBIOGÁS. Série Desenvolvimento do Mercado de Biogás. 1a Edição. Ministério das Cidades, Brasília, p.101, 2016.

PROTÁSIO, T.P.; BUFALINO, L.; TONOLI, G.H.D.; COUTO, A.M.; TRUGILHO, P.F.; GUIMARÃES JÚNIOR, M. Relação entre o poder calorífico superior e os componentes elementares e minerais da biomassa vegetal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, n.66, p.113-122, 2011. DOI: 10.4336/2011.pfb.31.66.113

PU, Y.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B.H.; RAGAUSKAS, A. J. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.1-13, 2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-15

- QIN, L.; LIU, Z-H.; LI, B-Z.; DALE, B.E.; YUAN, Y-J. Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids. **Bioresource Technology**, v.112, p.319–326, 2012. DOI:10.1016/j.biortech.2012.02.134
- QUINTERO-RAMIREZ, R. Hidrólise da biomassa lignocelulósica. *In*: Cortez (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 717-731.
- RABELO, S.C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 447f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- RABELO, S.C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v.102, n.17, p.7887-95, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.081
- RABELO, S. C.; ROSSEL, C. E. V.; ROCHA, G. J. M.; ZACCHI, G. Enhancement of the Enzymatic Digestibility of Sugarcane Bagasse by Steam Pretreatment Impregnated with Hydrogen Peroxide. **Biotechnology Progress**, v.8, n.5, p.1207–1217, 2012. DOI: 10.1002/btpr.1593
- RAHIKAINEN, J.; MIKANDER, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; LAPPAS, A.; VIKARI, L.; KRUIUS, K. Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood—Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.12, 2011. DOI: 10.1002/bit.23242
- RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, n.6, p.863-871, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>
- RAMOS, L.P.R.; SILVA, L.; BALLEM, A.C.; PITARELO, A.P.; CHIARELLO, L.M.; SILVEIRA, M.H.L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v.175, p.195–202, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087>
- RAPOSO, F.; FERNANDEZ-CEGRÍ, V.; DE LA RUBIA, M.A.; BORJA, R.; BÉLINE, F.; CAVINATO, C.; DEMIRER, G.; FERNÁNDEZ, B.; FERNÁNDEZ-POLANCO, M.; FRIGON, J.C.; GANESH, R.; KAPARAJU, P.; KOUBOVA, J.; MÉNDEZ, R.; MENIN, G.; PEENE, A.; SCHERER, P.; TORRIJOS, M.; UELLEND AHL, H.; WIERINCKM, I.; DE WILDE, V. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.86, n.8, p.1088–1098, 2011. DOI 10.1002/jctb.2622
- RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I.D.; MALIK, S.; KATALAMBULA, H. Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste

glycerin. **Bioresource Technology**, v.133, p.206–212, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.101>

RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D.; CLESCERI, L.C. **Methods for the Examination of Water and Wastewater**. United States: Pharmabooks Ed., 22<sup>nd</sup>, Part. 2000 PHYSICAL AND AGGREGATE PROPERTIES, 2012. Disponível em: [http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Inorganic\\_SM2540.pdf](http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Inorganic_SM2540.pdf). Acesso em: 29/10/2018.

ROCHA, G. J. M.; Nascimento, V. M.; Gonçalves, A. R.; Silva, V. F. N.; Martín, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v.64; p.52–58, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003>

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RODRIGUES, P.O. **Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. 2016. 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2016.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; TEODORO, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Improvement on Citric Acid Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC Mutant Using Citric Pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.158, p.72–87, 2009. DOI: 10.1007/s12010-008-8370-5

RODRIGUEZ, A.; MORAL, A.; SÁNCHEZ, R.; REQUEJO, A.; JIMÉNEZ, L. Influence of variables in the hydrothermal treatment of rice straw on the composition of the resulting fractions. **Bioresource Technology**, v.100, p.4863–4866, 2009. DOI:10.1016/j.biortech.2009.04.030

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.143–152, 2004. DOI:10.1016/S0260-8774(03)00080-3

ROLLIN, J.A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y-H.P. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, p.22-30, 2011. DOI: 10.1002/bit.22919

ROSSI, E. **Pré-tratamentos e digestão anaeróbia da palha de cana-de-açúcar**. 2015. 78f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2015.

SAEMAN, J.F. Kinetics of wood saccharification: Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. **Industrial Engineering Chemistry**, v.37, n.1, p.43-52, 1945. DOI: 10.1021/ie50421a009

SANCHEZ, E.M.S.; CAVANI, C.S.; LEAL, C.V.; SANCHEZ, C.G. Compósito de resina de poliéster insaturado com bagaço de cana-de-açúcar: influencia do tratamento das fibras nas propriedades. **Polímeros**, v.20, n.3, p.194-200, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000034>

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-95, 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2007.11.013

SANTOS, F.A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 94f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, n.5, p.1004-1010, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SANTOS, F.M.S.M.; SANTOS, F.A.C.M. O combustível “hidrogênio”. **Revista Millenium**, n. 31, 2005. Disponível em: <http://repositorio.ipv.pTon/handle/10400.19/435>. Acesso em: 02/2015.

SANTOS, L.C. **Produção de biogás (metano e hidrogênio) a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado no pré-tratamento oxidativo de cascas de café**. 2017. 137f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2017.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v.37, n.1, p.19-27, 2012. DOI:10.1016/j.renene.2011.06.045

SARROUH, B. F.; JOVER, J.; GONZÁLEZ, E. Estudio de la hidrólisis del bagazo con ácido sulfúrico concentrado utilizando dos variantes de una sola etapa y una sola etapa modificada para la obtencion de etanol y análisis técnico-econômico de dicho proceso. **Revista Ingeniería e Investigación**, v.25, n.3, p.34-38, 2005. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64325305>. Acesso em: 05/2019.

SATTLER, S.; FUNNELL-HARIS, D. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.1-8, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00070

SAXENA, R.C.; ADHIKARI, D.K.; GOYAL, H.B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p.167–178, 2009. DOI:10.1016/j.rser.2007.07.011

SCHIEVANO, A.; D’IMPORZANO, G.; ORZI, V.; COLOMBO, G.; MAGGIORE, T.; ADANI, F. Biogas from dedicated energy crops in Northern Italy: electric energy generation costs. **Global Change Biology Bioenergy**, v.7, p.899–908, 2015. DOI: 10.1111/gcbb.12186.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN JR., A.E.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v.29, n.10, p.786-794, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

SHEN, F.; HU, J.; ZHONG, Y.; LIU, M. L. Y.; SADDLER, J. N.; LIU, R. Ethanol production from steam-pretreated sweet sorghum bagasse with high substrate consistency enzymatic hydrolysis. **Biomass Bioenergy**, v.41, p.157–164, 2012. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.02.022

SHENG, C.; AZEVEDO, J.L.T. Estimating the higher heating value of biomass fuels from basic analysis data. **Biomass and Bioenergy**, v.28, n.5, p.499-507, 2005. DOI:10.1016/j.biombioe.2004.11.008

SHOW, P.L.; OLADELE, K.O.; SIEW, Q.Y.; ZAKRY, F.A.A.; LAN, J.C-W.; LING, T.C. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v.8, n.3, p.271-283, 2015. DOI: 10.1080/21553769.2015.1033653

SILVA, M.B.; MORAIS, A.S. Avaliação energética do bagaço de cana em diferentes níveis de umidade e graus de compactação. *In*: Encontro Nacional de Engenharia DE Produção, 28, 2008, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos... Disponível em: [http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2008\\_TN\\_STP\\_077\\_543\\_11289.pdf](http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2008_TN_STP_077_543_11289.pdf). Acesso em: 17/04/2019.

SILVA, T.A.L. **Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology Biofuel**, v.4, n.7, p.2-9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-7>

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; ADRIANE M.F. MILAGRES, A.M.F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v.102, p.399–402, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029>

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, V. **Chemical composition of wood and pulps: Basic constituents and their distribution**. In: Sjostrom, E.; Alén, R. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7_1)

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205–218, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00133-X)

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.141–149, 2006. Disponível em: <http://www.ftb.com.br/images/pdfarticles/2006/April-June/44-141.pdf>. Acesso em: 09/2017.

SPIRIDON, L.; POPA, V. I. Hemicelluloses: Major sources, properties and applications. In M. N. Belgacem, & A. Gandini (Eds.), **Monomers, polymers and composites from renewable resources**, cap13, p.289–304. UK: Oxford. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00013-2>

STERNAD, P.W. **Aproveitamento Sustentável de Biogás**. 2010. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BIOGAS\\_000gak8azwf02wx5ok04xjloyzsz76h4.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BIOGAS_000gak8azwf02wx5ok04xjloyzsz76h4.pdf). Acesso em: 03/2017.

SUN, X.F.; XU, F.; SUN, R.C.; GENG, Z.C.; FOWLER, P.; BAIRD, M.S. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p.15–26, 2005. DOI:10.1016/j.carbpol.2004.11.012

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Biosource Technology**, v.83, n.1, p.1-11, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v.2, n.4, p.707-738, 2007a. DOI: 10.15376/biores.2.4.707-738

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v.2, n.3, p.472-499, 2007b. Disponível em: [https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes\\_2\\_3\\_472\\_499\\_Taherzadeh\\_K\\_AcidHydrolysis\\_BioEthanol](https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_2_3_472_499_Taherzadeh_K_AcidHydrolysis_BioEthanol). Acesso em: 09/2018.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal Molecular Sciences**, v.9, p.1621-1651, 2008. DOI: 10.3390/ijms9091621

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, n. 5, p.315-330, 2004. DOI: 10.5433/1679-0359.2004v25n4p315

TENCA, A.; SCHIEVANO, A.; LONATI, S.; MALAGUTTI, L.; OBERTI, R.; ADANI, F. Looking for practical tools to achieve next-future applicability of dark fermentation to produce bio-hydrogen from organic materials in Continuously Stirred Tank Reactors. **Bioresource Technology**, v.102, p.7910–7916, 2011. DOI:10.1016/j.biortech.2011.05.088

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, v.199, p.2–12, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>

TURUMTAY, H. Cell wall engineering by heterologous expression of cell wall-degrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. **BioEnergy Research**, v.8, n.4, p.1574-1588, 2015. DOI: 10.1007/s12155-015-9624-z

UNE 77004. **Calidad del agua. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) - Método del dicromato**. España: AENOR, 2002. Disponível em: [https://www.en.aenor.com/\\_layouts/15/r.aspx?c=N0026986](https://www.en.aenor.com/_layouts/15/r.aspx?c=N0026986). Acesso em: 04/2019.

VALLEJOS, M.E.; FELISSIA, F.E.; CURVELO, A.A.S.; ZAMBON, M.D.; RAMOS, L.; AREA, M.C. Chemical and physico-chemical characterization of lignin obtained from ethanol-water fractionation of bagasse. **Bioresources**, v.6, n.2, p.1158–1171, 2011. DOI: 10.15376/biores.6.2.1158-1171

VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.74, p.175-178, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00107-8)

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Programme**, v.19, p.1109–1117, 2003. DOI: 10.1021/bp0340180

WOLF, L.D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.115, p.1-3, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:115:1-3:1115>

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p.421-450, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4155/bfs.11.116>

YOSHIDA, M.; LIU, Y.; UCHIDA, S.; KAWARADA, K.; UKAGAMI, Y.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; FUKUDA, K. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of miscanthus sinensis to monosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.72, n.3, p.805–810, 2008. DOI:10.1271/bbb.70689

YU, Q.; ZHUANG, X.; SHUANGLIANG, L V.; HE, M.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; QI, W.; WANG, Q.; WANG, W.; TAN, X. 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.592–598, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.099>

ZABED, H.; SAHU, J.N.; BOYCE, A.N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.66, p.751–774, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIIKAR, L. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant ree. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n.60, p.2-9, 2011. DOI: 10.1186/1754-6834-4-60.

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, 2008. DOI: 10.1007/s12010-007-8070-6

ZHANG, M.; Su, R.; Qi, W.; He, Z. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.5, p.1407–1414, 2010. DOI: 10.1007/s12010-009-8602-3

ZHANG, Y.H.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, n. 5, p.367–375, 2008. DOI: 10.1007/s10295-007-0293-6

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and bioengineering**, v.88, n.7, 2004. DOI: 10.1002/bit.20282

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.42, n.1, p.35–53, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2014.01.001>

ZHU, L., O'DWYER, J. P., CHANG, V. S., GRANDA, C. B., HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v.9, p.3817-3828, 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2007.07.033