## UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

# CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

INSTITUTO DE QUÍMICA

MARINA CRISTINA TOMASINI

PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

> Rio de Janeiro 2020

## MARINA CRISTINA TOMASINI

# PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência (Bioquímica).

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Rio de Janeiro 2020

CT655p	Cristina Tomasini, Marina Produção Sequencial De Hidrogênio E Metano Via Digestão Anaeróbia A Partir Da Fração Hemicelulósica Da Palha De Cana-De-Açúcar / Marina Cristina Tomasini Rio de Janeiro, 2020. 109 f.
	Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2020.
	<ol> <li>Hidrogênio. 2. Metano. 3. Hemicelulose. 4.</li> <li>Palha de cana-de-açúcar. 5. Digestão anaeróbia. I.</li> <li>Santana Ferreira-Leitão, Viridiana, orient. II.</li> <li>Título.</li> </ol>

## MARINA CRISTINA TOMASINI

## PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência (Bioquímica).

Rio de Janeiro, 21 de agosto de 2020.

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

Fábio César Souza Nogueira, D.Sc., UFRJ

Magali Christe Cammarota, D.Sc., UFRJ

Marcelo Zaiat, D.Sc., USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Zélia e José por sempre acreditarem no meu propósito e confiarem nos meus passos, vocês são a minha fortaleza. Ao meu irmão Luis Paulo pela proteção, apoio e cumplicidade de hoje e sempre. Ao Marcelus, pelo companheirismo, apoio e incentivo a constante busca pelo conhecimento. Vocês tornaram possível a realização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão pela oportunidade, por ouvir minha história e acreditar no meu trabalho. Admiro imensamente seu profissionalismo, mentoria e a mulher que é. Serei eternamente grata por aquele encontro no corredor do Instituto de Química, por tudo que vem me ensinando e por permitir que aquele brilho nos olhos se tornasse realidade.

À Profa. Dra. Ayla Sant'Ana da Silva, pelos ensinamentos, incentivos e contribuições ao trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de caminhada científica, Ingrid Miguez, Roberta Espinheira, Raquel Lopez e Stella Buback por todas conversas, ensinamentos, risadas, incentivos e união para fazermos sempre o melhor trabalho. À Mariana Faber, por compartilhar seu conhecimento, por toda ajuda no projeto e por me apresentar caminhos cruciais para meu crescimento pessoal e profissional. À Carolina Lazaro, por todo companheirismo, amizade e disposição de acordar cedo para me ajudar a completar uma cinética.

Ao Bruno Coelho, Álvaro Monteiro, Gabriel Martins, Ricardo de Santana por toda ajuda, solidariedade e troca de conhecimento. Ao Ronaldo Rodrigues pelas conversas e por aumentar minha bagagem de bandas progressivas.

Aos demais integrantes LABIC/INT, Rayssa Valviesse, Mariana Mattos, Veronica Lopes, Felipe Rafael Amaral, Carinne Borges, Morgana, Daniel Fashuen, Paulo Vitor Salles, Ramon Pontes, Roberta Fernandes, Davi Marconi, Nadinne Medeiros, Pedro Martins, Ingrid Venturelli, Pérola Lana Meireles, Carolina Guimarães, Ana Beatriz Rusenhack pela companhia do dia-adia e por ajudar a compor um grupo de bom trabalho. À Candida, responsável pela manutenção da limpeza do laboratório que permite que o ambiente esteja sempre agradável para desempenhar nossos trabalhos. Juntos vamos mais longe.

Aos meus amigos da COPPE (UFRJ) Nathalia Busato, Marcos Vinícius Giro, Evelyn Antunes por tudo que me ensinaram, por me acolherem e me apoiarem. Ao Cristiano Salah Mussoi, por sempre estar disposto a me ajudar com seu amplo conhecimento em exatas, e com muito bom humor. Todo o meu agradecimento a vocês por ajudarem que eu continuasse nesta caminhada.

Ao professor Rodrigo Volcan (IQ/UFRJ) pela atitude e palavras de incentivo a continuar na vida acadêmica.

À professora Lúcia Paiva e Cristiane Dinis Ano Bom (IQ/UFRJ) pelo carinho e mentoria na capacitação didática.

Às minhas queridas amigas cariocas Mariana Faria e Samanta Toledo pelas boas risadas, companheirismo, incentivo e todo o carinho.

Aos meus amigos da graduação Priscila Costa Freitas, Isaura Borges da Silva, Pedro Henrique Guedes, Mariane Rabelo, Ana Carolina Costa, Flavia Costa por todo apoio e pela continuidade dos encontros mesmo a distância para continuarmos a discutir ciência.

Aos meus grandes amigos de Batatais – SP, Lilian Flávia Correa, Camila Dal Picolo, Natalia Cattin, Luiz Thomas Nunes, Raul Fernando de Melo Rocha, Raissa Linares de Rocha de Melo Rocha, Raoni, Gabriel de Oliveira Calegaro (Dois) e Flávia Castro Contadini por todo apoio, e por sempre moverem mundos e fundos para estarem presentes nos poucos momentos que volto para a terrinha. Sou muito grata por ter vocês na minha vida.

À minha família Tomasini, por serem esse exemplo de amor e união que foram imprescindíveis para meu desenvolvimento profissional e como ser humano.

À minha mãe Zélia Saltarelli, ao meu pai José Tomasini e ao meu irmão Luis Paulo Tomasini por serem minha base, meu porto seguro e me apoiarem nas minhas decisões. Vocês são fundamentais para o meu crescimento profissional e amadurecimento pessoal. Ao Nilton Velho Cristo e Amanda Thomé Cavallini por fazer parte desta corrente.

Ao meu marido Marcelus Soares da Silva por todo companheirismo e apoio. Todo conhecimento adquirido ao seu lado me alavancou e sou muito grata de estar ao lado de uma pessoa que compartilha dos mesmos propósitos de vida que eu.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

### RESUMO

Tomasini, Marina Cristina. PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Rio de Janeiro, 2020. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A economia brasileira está muito pautada na agroindústria e a cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de enorme importância para o setor, no qual o país se posiciona como o maior produtor mundial. Parte dos resíduos gerados na colheita e no processamento da cana-de-açúcar - o bagaço e a palha – é reutilizado pela indústria sucroalcooleira, sendo o bagaço e parte da palha destinados para a produção de etanol 2G e cogeração de energia. Estas abordagens propiciam um aproveitamento parcial do potencial energético destes resíduos. A palha de cana é um resíduo lignocelulósico composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose é majoritariamente composta de pentoses, também chamada de fração C5, podendo ser disponibilizada para o meio através de pré-tratamento ácido ou térmico. A fração C5 vem sendo explorada como matéria-prima em diferentes bioprocessos. Neste trabalho, o hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido foi utilizado na digestão anaeróbia e, através da segregação das fases fermentativa e metanogênica, foi possível produzir biologicamente gases como o hidrogênio e o metano de maneira sequencial. Três concentrações iniciais de carboidratos (9, 30 e 48 mmol/L) foram avaliadas na produção de H<sub>2</sub> durante 54 h de fermentação em 35 °C. O maior rendimento foi 1,75 mol H2/mol carboidratos (2,04 mol H2/mol pentoses) em 36 h com concentração inicial 30 mmol/L e eficiência de 61% no processo de conversão de pentoses a H<sub>2</sub>, sendo a condição escolhida para a produção sequencial de metano. O sistema com concentração inicial de 9 mmol/L apresentou o rendimento máximo em 18 h de processo (1,28 mol H2/ mol carboidratos) e o meio com 48 mmol/L de carboidratos em 48 h de fermentação (1,48 mol H2/mol carboidratos). Adicionalmente, foi avaliada uma fermentação em condição termofílica (50 °C) com concentração inicial de 9 mmol/L de carboidratos utilizando lodo in natura, que apresentou aumento de aproximadamente 25% no rendimento comparado à produção mesofílica em 24 h com lodo pré-tratado, resultando em 1,51 mol H2/ mol carboidratos. A produção de metano via digestão anaeróbia em único estágio apresentou rendimento de 209,8 mL <sub>CH4</sub>/g <sub>DO0</sub>, produzindo 6,45 kJ/g<sub>DO0</sub> de energia e redução de 88% da DQO. Enquanto a produção sequencial apresentou 110,6 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DOO</sub> com adicionais 117,3 mL<sub>H2</sub>/g<sub>DOO</sub> e 6,62 kJ/g<sub>DQO</sub> de energia produzida. A redução da DQO deste sistema foi de 91%. Ensaios comparativos com um meio mimetizado demonstraram que compostos provenientes da hidrólise da biomassa, como HMF e furfural nas concentrações estudadas, não foram os responsáveis pela diminuição do rendimento na produção de H<sub>2</sub>, no entanto, exerce influência negativa na fase adaptativa das arqueia metanogênicas. Sendo assim, a utilização da fração C5 para produção sequencial é promissora, visto que dois gases energéticos são gerados, com recuperação energética da fase fermentativa e maior redução da matéria orgânica do sistema comparado à produção em um único estágio, e por apresentar alternativas de maior aproveitamento desta biomassa, assim como na integração desta fração hemicelulósica no contexto da biorrefinaria.

Palavras-chave: hidrogênio, metano, hemicelulose, palha de cana-de-açúcar, digestão anaeróbia

### ABSTRACT

Tomasini, Marina Cristina. PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Rio de Janeiro, 2020. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The Brazilian economy is largely based on agro-industry, and the country is the largest world producer of sugarcane. Residues generated after the harvest and processing of this crop, such as bagasse and straw, are partially reused by the sugar and alcohol industry, where it can be destined to 2G ethanol production and energy cogeneration. However, these approaches provide partial use of the energy potential of these wastes. Sugarcane straw is a lignocellulosic biomass composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Hemicellulose is mostly composed of pentoses, also known as C5 fraction, and may be released to the medium through acid or thermal pretreatment. C5 fraction has been exploited as a raw material in different bioprocesses. In this study, hemicellulosic hydrolyzate generated from the acid pretreatment was used in anaerobic digestion and, through the segregation of the fermentative and methanogenic phases. Hydrogen and methane were sequentially produced. Three initial carbohydrates concentrations (9, 30 and 48 mmol / L) were evaluated for H<sub>2</sub> production during 54 h of fermentation at 35 °C. The highest yield was 1.75 mol<sub>H2</sub>/mol<sub>carbohydrates</sub> (2.04 mol<sub>H2</sub>/mol<sub>pentoses</sub>) at 36 h with an initial concentration of 30 mmol/L. The efficiency in conversion process of pentoses to H<sub>2</sub> was 61%, and it was chosen as the best condition for sequential methane production. System with an initial concentration of 9 mmol/L showed the maximum yield at 18 h (1.28 mol<sub>H2</sub>/mol<sub>carbohydrates</sub>) and the initial carbohydrates concentration of 48 mmol/L lead to the highest yield at 48 h of fermentation (1.48 mol<sub>H2</sub>/mol<sub>carbohydrates</sub>). Furthermore, a fermentation at thermophilic condition (50 °C) using an initial carbohydrate concentration of 9 mmol/L using in natura sludge was evaluated, which showed 25% of yield improvement when compared to mesophilic production in 24 h using pretreated sludge, resulting in 1.51 mol H2/mol<sub>carbohydrates</sub>. The methane production via anaerobic digestion in a single-stage showed a yield of 209.8 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>COD</sub>, producing 6.45 kJ/g<sub>DOO</sub> of energy and 88% of COD reduction. Sequential production showed 110.6 mLCH4 / gDQO of yield with additional 117.3  $mL_{H2}/g_{DQO}$  and 6.62 kJ/g<sub>DOO</sub> of energy produced. The COD reduction in this system was 91%. Comparative essays with a standard medium, composed of only sugars, showed that HMF and furfural stemming from the hydrolysis of biomass were not responsible for the decrease of  $H_2$  production, however but these compounds have a negative influence on the adaptive phase of methanogenic archeas. Therefore, the use of C5 fraction for the sequential generation of H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> is promising, since two energy gases are generated, with energy recovery from the fermentative phase, greater reduction of organic matter compared to single-stage anaerobic digestion, representing an alternative of a better use of this biomass, as well as in the integration of this hemicellulosic fraction in the biorefinery context.

Key-words: hydrogen, methane, hemicellulose, sugarcane straw, anaerobic digestion

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oferta energética no Brasil em 2018
Figura 2. Participação da biomassa de cana na geração de energia elétrica
Figura 3. Estrutura da biomassa lignocelulósica, destacando o tecido vegetal de
monocotiledônea e a parede celular secundária do vegetal composta por celulose, hemicelulose
e lignina
Figura 4. Representação dos tipos de hemicelulose encontradas nas estruturas lignocelulósicas.
As estruturas hemicelulósicas são variáveis de acordo com a origem vegetal. "Ac" aos grupos
acetil, o termo "Fer" representa a esterificação com o ácido ferúlico, característico de xilanas
de monocotiledôneas e "OMe" corresponde a 4-O-metilglucuronosil
Figura 5. Estrutura da xilana do bagaço (A) e palha (B) de cana-de-açúcar.
Glucuronoarabinoxilana com unidades de ácido glucurônico (Xil-3Ac-2GlcA) ligado em O-2;
arabinose (Xil -3Ara) ligados em O-3 e grupamentos acetil ligados em O-3 (Xil-3Ac); O-2 (Xil-
2Ac) e em O-2 e O-3 (Xil-2Ac-3Ac) no polímero de xilose
Figura 6.Mecanismo de hidrólise ácida
Figura 7. Esquema representativo dos carboidratos solubilizados e compostos que podem ser
formados no pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica
Figura 8. Rota metabólica de um consórcio microbiano durante fermentação de substratos da
fração hemicelulósica Enzimas: (1) Hexocinase; (2) Glicose-6-fosfato isomerase; (3) Frutose
bifosfatase; (4) Aldolase; (5) Piruvato-ferrodoxina oxidorredutase; (6) Hidrogenase; (7)
NADH-ferrodoxina oxidorredutase; (8) NADPH-ferrodoxina oxidorredutase; (9)
Fosfotranscetilase quinase; (10) Acetato liase; (11) Fosfotransbutilase quinase; (12) Butirato
quinase; (13) Xilose isomerase; (14) Xiluloquinase; (15) L-arabinose isomerase; (16) L-
ribulose-5-fosfato; (17) L-ribulose-fosfato-4-epimerase; (18) Acetaldeído desidrogenase; (19)
Etanol desidrogenase; (20) $\beta$ -hidroximetilglutaril-CoA liase; (21) Acetato descarboxilase; (22)
Butiraldeído desidrogenase; (23) Butanol desidrogenase; (24) Acetato-formiato-liase; (25)
Formato-hidrogenase-liase; (26) Lactato desidrogenase
Figura 9. Poder calorífico dos compostos comumente utilizados como combustível
Figura 10. Representação esquemática das etapas da digestão anaeróbia
Figura 11. Esquema representativo da conversão da fração hemicelulósica em hidrogênio e
metano de maneira sequencial utilizando como inóculo o lodo de estação de tratamento de
esgoto
Figura 12. Diagrama de blocos simplificado das etapas dos experimentos do estudo

Figura 13. Composição química do lote único de palha de cana-de-açúcar gentilmente fornecida pela empresa Raízen e caracterizada conforme os protocolos "Determination of Extractives in Biomass" (SLUITER et al., 2005) e "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Figura 14. Cinética de consumo de substrato e rendimento de produção de H2 ao longo de 54 h de fermentação utilizando as concentrações de 9 mmol/L (A), 30 mmol/L (B), 48 mmol/L (C). Figura 15. Produção e consumo de metabólitos solúveis na produção de H2 ao longo de 54 h de fermentação no sistema 1 (A) e (D), sistema 2 (B) e (E), sistema 3 (C) e (F).....71 Figura 16. Cinética da produção experimental de hidrogênio em comparação a produção teórica descrita pela equação de Gompertz.....76 Figura 17. Produção de H<sub>2</sub> a 50 °C e 35 °C, com concentração inicial de carboidratos 9 mmol/L, pH 5,5 em 24 h de fermentação representado em volume específico de H<sub>2</sub>(A), rendimento em Figura 18. Produção de CH<sub>4</sub> sequencial com consumo e produção de metabólitos associados ao processo de digestão anaeróbia (A). Aumento do rendimento em CH<sub>4</sub> associado à diminuição Figura 19. Cinética da produção experimental de biometano e da produção teórica descrita pela Figura 20. Produção de CH<sub>4</sub> em um único estágio com consumo dos substratos e produção de metabólitos associados à digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico (A) ou do meio mimetizado (C). Aumento do rendimento concomitante a diminuição da DQO medida e Figura 21. Cinética da produção experimental de biometano e da produção teórica descrita pela equação de Gompertz a partir do hidrolisado hemicelulósico (HH) e pelo meio mimetizado Figura 22. Balanço energético das produções de metano em sistemas de dois estágios (energia gerada a partir H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> produzidos durante a fase fermentativa e metanogênica, respectivamente) e estimativa da energia gerada na combustão de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> gerados a partir da digestão anaeróbia em duas etapas de 1 e 10<sup>4</sup> litros do hidrolisado hemicelulósico (DQO 85,12 

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de H2 x aumento da concentração de açúcar.33
Tabela 2. Levantamento bibliográfico dos processos de digestão anaeróbia em único estágio
utilizando resíduos agroindustriais
Tabela 3. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar obtido após
pré-tratamento com ácido diluído (H2SO <sub>4 =</sub> 1,6% (m/m)) na proporção 1:4 (palha:ácido); 130°C
por 30 min)
Tabela 4. Avaliação comparativa da produção de H2 utilizando hidrolisado hemicelulósico
obtido através do pré-tratamento com ácido diluído e meio mimetizado em três concentrações
diferentes de carboidratos iniciais durante 24 h em 35 °C
Tabela 5. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção
de H <sub>2</sub> estimados pela equação de Gompertz75
Tabela 6. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos, rendimento, pH, consumo de substrato,
produtividade e eficiência do sistema 1 em 18 h, sistema 2 em 36 h e do sistema 3 em 48 h de
fermentação na condição mesofílica (35 °C) com pH inicial de 5,5
Tabela 7. Comparativo dos rendimentos de H2 obtidos a partir de frações hemicelulósicas ou
xilose padrão de diferentes biomassas e inóculos
Tabela 8. Compilações das condições iniciais aplicadas para a produção sequencial de $H_2$ e $CH_4$
de maneira sequencial e seus respectivos rendimentos
Tabela 9. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção
de CH <sub>4</sub> sequencial estimados pela equação de Gompertz
Tabela 10. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção
de CH4 em um único estágio estimados pela equação de Gompertz
Tabela 11. Resumo das condições iniciais nas produções de CH4 em um único estágio a partir
do hidrolisado hemicelulósico e meio mimetizado e seus respectivos rendimentos em grama de
DQO ou mol de carboidratos, volumes de produção e produtividades
Tabela 12. Estudos comparativos com processos de digestão anaeróbia em dois estágios ou
estágio único utilizando resíduos agroindustriais95

# LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
DQO	Demanda química de Oxigênio
EPH	Efluente da produção de H <sub>2</sub>
HPLW	Hydrogen production liquid waste
HMF	Hidroximetilfurfural
Etanol 2G	Etanol de segunda geração
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FCEV	Fuel cell electric vehicle
FHL	Complexo formiato-hidrogenase-liase
IR	Detector de índice de refração
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
S1	Sistema 1, concentração inicial de carboidratos de 9 mmol/L
S2	Sistema 2, concentração inicial de carboidratos de 30 mmol/L
<b>S</b> 3	Sistema 3, concentração inicial de carboidratos de 48 mmol/L
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TCD	Detector de condutividade térmica
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Detector UV visível

1. INTRODUÇÃO	
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Contexto energético Brasileiro	19
3.2. Biomassa lignocelulósica	
3.2.1 Fração hemicelulósica proveniente da etapa de pré-tratamento da lignocelulósica	ı biomassa 25
3.3. Hidrogênio	
3.3.2. Rotas metabólicas envolvidas na produção de H <sub>2</sub>	
3.4. O biogás e o biometano	
3.5. Digestão anaeróbia	
3.7. Digestão anaeróbia em dois estágios: Produção sequencial de hidrogênio e me	tano 44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Caracterização química da palha de cana-de-açúcar in natura	
4.1.1. Determinação dos extrativos na biomassa	
4.1.2. Determinação da lignina e carboidratos estruturais	
4.1.2.1 Hidrólise ácida e carboidratos estruturais	
4.1.2.2. Determinação da lignina solúvel em ácido	50
4.1.2.3. Determinação da lignina e cinzas insolúveis em ácido	50
4.2. Pré-tratamento ácido da biomassa	50
4.3. Caracterização por CLAE dos componentes da biomassa e do hidrolisado hen	nicelulósico
4.3.1. Condições cromatográficas	
4.4. Origem e pré-tratamento do inóculo	
4.5. Produção de H <sub>2</sub>	
4.5.1 Avaliação da produção de H <sub>2</sub> a partir do hidrolisado hemicelulósico e meio	<i>mimetizado</i> 52
4.5.2. Cinética de produção de H <sub>2</sub>	53
4.5.3 Avaliação da produção de H <sub>2</sub> com aumento de temperatura	54
4.6. Produção de CH <sub>4</sub>	54
4.6.1. Produção de CH4 sequencial	54
4.6.2. Produção de metano em um único estágio	55

# SUMÁRIO

4.6.3. Estimativa da energia produzida na digestão anaeróbia	55
4.7. Análise por CLAE dos meios de produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub>	56
4.7.1. Condições cromatográficas	56
4.8. Análise por Cromatografia Gasosa (CG) da produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub>	57
4.8.1 Condições cromatográficas	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Caracterização da biomassa	58
5.2. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico	60
5.3 Produção de H <sub>2</sub>	63
5.3.1 Avaliação comparativa da produção de H2 a partir do hidrolisado hemicelul mimetizado	lósico e meio 63
5.3.2 Cinética de produção de H <sub>2</sub>	66
5.3.3 Equação de Gompertz	75
5.4. Escolha do EPH para a produção sequencial de metano	81
5.5. Avaliação da produção H <sub>2</sub> com aumento de temperatura	
5.6. Produção de CH <sub>4</sub>	85
5.6.1. Produção sequencial de CH4 (Produção em dois estágios)	85
5.6.2. Produção de metano em único estágio	89
5.3.6. Avaliação da energia produzida na digestão anaeróbia e balanço energé tratamento da palha	ético do pré- 96
6. CONCLUSÕES	97
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

## 1. INTRODUÇÃO

A economia brasileira está fortemente vinculada ao setor agrícola e o país ocupa a posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o setor sucroalcooleiro responsável por 2% do PIB brasileiro (FINGUERUT, 2019; UNICA, 2018). Considerando a safra de 2019/20, serão produzidos mais de 642 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONAB, 2019). Deste montante, é contabilizado a geração de aproximadamente 91 milhões de toneladas de palha referente à colheita da cana-de-açúcar para geração de açúcar e etanol (OKUNO, 2017).

Conforme descrito na lei n° 5990/2011 de eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar, deve-se aumentar a implementação de colheita mecanizada nas lavouras. Isto promove a redução das emissões dos gases de efeito estufa e promove benefícios na conservação do solo (CARVALHO *et al.*, 2017b; MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014). Atualmente, aproximadamente 50% da palha deve permanecer no campo para promover o manejo hídrico e a fertilidade do solo. Cerca de 10% do excedente é misturado com bagaço de cana e destinado à queima em caldeira para geração de eletricidade. No entanto, esta prática garante o aproveitamento de apenas 15% do potencial da biomassa (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010; SUCRE, 2017; ÚNICA, 2019)

Apesar da utilização da palha como complemento do bagaço na cogeração de energia, existem obstáculos quanto ao seu uso, sendo relacionados ao custo de recolhimento, captação e ao transporte da biomassa. Outro aspecto também relevante está associado às impurezas desta biomassa, por promover um aumento de incrustações nas caldeiras (BONOMI *et al.*, 2016; SUCRE, 2017). Portanto grandes quantidades desta biomassa ainda são acumuladas no meio ambiente tornando-se um passivo ambiental.

Outras abordagens associadas à geração de bioprodutos, a partir da biomassa, têm surgido como alternativa para superar essas adversidades. A palha de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico constituído de três frações principais: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose, fração predominante que contempla 29-44% da estrutura, já vem sendo explorada no contexto da biorrefinaria para a produção de etanol de segunda geração. A lignina (19–34%), fração que confere a rigidez da estrutura e formada predominantemente por compostos fenólicos

é utilizada na cogeração de energia e produção de resinas (BOTTCHER *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2019).

O segundo maior constituinte da estrutura, a hemicelulose (23-31%), é um polímero heterogêneo ramificado, composto majoritariamente de pentoses. Esta fração, se submetida a um pré-tratamento ácido permite que os carboidratos sejam disponibilizados em sua forma monomérica para o meio líquido (DA SILVA *et al.*, 2013a; MORO *et al.*, 2017). Esses açúcares são considerados de baixa fermentabilidade pelas cepas microbianas convencionais da indústria de etanol, *Saccharomiyces cerevisae* (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2017). A utilização da fração C5 na geração de etanol necessitaria de leveduras geneticamente modificadas ou o desenvolvimento desta produção através de microrganismos fermentadores de pentoses, não sendo competitivamente atraente comparado ao uso da celulose (DE SÁ *et al.*, 2013, 2020), muito menos quando comparado ao processo convencional utilizando sacarose (primeira geração). No entanto, a hemicelulose pode ser empregada como matéria-prima em diferentes bioprocessos como a produção de hidrogênio e metano por digestão anaeróbia (BAÊTA et al., 2016b; DE SÁ et al., 2013; DE SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2018).

O hidrogênio (H<sub>2</sub>) é comumente utilizado na indústria para a produção de amônia, no refino de petróleo e na produção de metanol (RAMACHANDRAN; MENON, 1998; SHARMA; GHOSHAL, 2015). Tem sido considerado o combustível do futuro, devido à sua alta densidade energética (141,9 MJ/kg) e por gerar apenas água na sua combustão (YANG; WANG, 2018). Assim como o H<sub>2</sub>, o metano (CH<sub>4</sub>) pode ser utilizado como combustível veicular, além disso, como gás de cozinha, energia térmica e energia elétrica (BAENA-MORENO *et al.*, 2019).

Dentre as diversas maneiras de produzir estes gases, a digestão anaeróbia é uma abordagem promissora em função do consórcio microbiano que promove a degradação dos compostos orgânicos com geração de metabólitos intermediários de interesse comercial (ácidos orgânicos), ser capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono como substrato e não necessita de condições assépticas para produção (ELBESHBISHY *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Entretanto, para a geração dos dois gases deve-se prever duas etapas distintas, uma para produção de H<sub>2</sub>, fase acidogênica, e outra para CH<sub>4</sub>, etapa metanogênica (YANG; WANG, 2018). Esta produção em dois estágios faz-se necessária para que o H<sub>2</sub> não seja utilizado como substrato pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas na etapa de produção de metano.

A produção sequencial é uma alternativa bastante atraente visto que separa a etapa rápida do processo, a fase hidrólise-acidogênese (fermentação), da etapa mais lenta, metanogênese, promovendo a redução do tempo de digestão quando comparado à produção de metano em único estágio. Além disso, há uma maior estabilização do processo de digestão anaeróbia como a fixação de dois diferentes pH ótimos, permite a regulação de sobrecargas orgânicas na etapa metanogênica e apresenta aumento do rendimento global do processo (CORONA; RAZO-FLORES, 2018; PARTHIBA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018a). Outra vantagem está relacionada à recuperação energética, visto que cerca de 10-20% da DQO total do sistema são utilizados para a produção de H<sub>2</sub>. A etapa sequencial promove a digestão dos compostos mais complexos para a geração de metano, cerca de 80%-90% da DQO do sistema (PARTHIBA *et al.*, 2018; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018).

Ainda existem desafios a serem superados neste processo, referentes às condições de operação objetivando o máximo de rendimento, entre eles: a carga orgânica, o tempo de retenção, a temperatura ideal para cada tipo de inóculo, o sistema operacional (batelada, semicontínuo ou contínuo), assim como a minimização dos efeitos inibitórios de compostos provenientes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

A geração de  $H_2$  e CH<sub>4</sub> em dois estágios a partir da fração hemicelulósica vem se mostrando uma abordagem promissora ao valorizá-la e integrá-la ao contexto da biorrefinaria, gerando dois gases altamente energéticos com versatilidade de aplicações e possibilitando a incorporação da fração C5 no ciclo de produção do etanol 2G. Além de uma solução para a palha de cana-de-açúcar que é um resíduo abundante, surge como alternativa complementar ou mais eficiente para geração de energia nas indústrias sucroalcooleiras, de maneira benéfica ao meio ambiente, vinculada ao tratamento de resíduos e efluentes e à geração de créditos de carbono. Assim, com aproveitamento efetivo de cada fração do material lignocelulósico, diante das suas características estruturais, viabiliza a descentralização da produção de energia e a diversificação da matriz energética brasileira.

#### 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de hidrogênio e metano de maneira sequencial via fermentação e digestão anaeróbia utilizando lodo de estação de

tratamento de esgoto como consórcio microbiano. A matéria-prima utilizada foi o hidrolisado da palha de cana-de-açúcar, obtido por tratamento ácido.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Obter da fração hemicelulósica a partir da palha *in natura* empregando pré-tratamento ácido;
- Avaliar a produção de H<sub>2</sub>, utilizando hidrolisado hemicelulósico ou meio mimetizado, em três diferentes concentrações iniciais de açúcares;
- Avaliar a influência da presença de HMF e furfural nos meios de produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>;
- Realizar a produção de H<sub>2</sub> em uma condição termofílica de 50 °C;
- Realizar a produção de CH<sub>4</sub> a partir do efluente da produção de H<sub>2</sub>;
- Avaliar a produção de CH<sub>4</sub> a partir do hidrolisado hemicelulósico em único estágio comparativamente à produção em meio mimetizado.

# 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Contexto energético Brasileiro

O Brasil possui uma ampla disponibilidade de recursos energéticos, detendo condições climáticas favoráveis e extensa disponibilidade de terra, os quais propiciam o aproveitamento das fontes renováveis. No entanto, o país se assemelha à conjuntura mundial onde grande parte da demanda energética nacional é suprida por fontes não renováveis de energia, tais como petróleo, gás natural e carvão.

Neste contexto, a matriz energética nacional é predominantemente de origem fóssil, destacando-se o petróleo como fonte primária mais importante representando 34% de toda energia ofertada em 2018 (Figura 1) e consequentemente a principal fonte de emissões de CO<sub>2</sub> (FERREIRA *et al.*, 2018). Apesar disto, segundo a Agência Internacional de Energia (*International Energy Agency* - AIE) o Brasil é o país com a matriz energética mais limpa do mundo (IEA, 2018).



Figura 1. Oferta energética no Brasil em 2018. Fonte: Elaboração própria a partir de (EPE, 2019).

O setor de transportes é o maior emissor de gases causadores do efeito estufa segundo o Observatório do Clima e Instituto de Energia e Meio Ambiente, sendo o setor rodoviário de passageiros individuais o predominante. Neste contexto, este setor apresenta a maior emissão de gases de efeito estufa por passageiro transportado comparado ao que poderia ser alcançado por meio do transporte coletivo (FERREIRA *et al.*, 2018). A mudança deste cenário vem sendo explorada com a adoção de biocombustíveis no setor de transporte.

A participação de fontes renováveis de energia na matriz veicular tem aumentado ao longo dos anos em função de políticas públicas como a adição de biocombustíveis aos derivados de petróleo. Atualmente, toda gasolina automotiva comercializada nos postos pode conter 20-27%<sup>1</sup> de etanol anidro e no caso do diesel, 12% de biodiesel deve ser incorporado no combustível (BRASIL,2011; EPE, 2018)

No ano de 2018 a oferta interna de energia proveniente de fontes renováveis representou 45% da matriz total. A variedade ofertada pelo Brasil compreende os biocombustíveis líquidos, principalmente o etanol e biodiesel, os biocombustíveis sólidos, sendo o bagaço de cana o que vem sendo aproveitado pela indústria sucroalcooleira, e os gasosos, como o biogás, ainda incipiente no cenário energético brasileiro (EPE, 2019).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> A gasolina premium contém 25% de etanol anidro, conforme Portaria n° 75 do MAPA (MAPA, 2019)

Uma iniciativa de valorização do potencial nacional de fontes renováveis como a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), vinculada aos compromissos assumidos pelo Brasil na 21° Conferência das partes (COP21), impõe comprometimento nacional na diminuição de emissões dos gases do efeito estufa, incentivando o desenvolvimento de tecnologias voltadas à produção de biocombustíveis e à sua implementação.

Em relação à matriz elétrica, os recursos renováveis são majoritariamente utilizados como fonte energética, principalmente associados à participação das hidrelétricas na geração de energia elétrica (CUNHA *et al.*, 2016). No entanto, as recentes condições climáticas e hidrológicas desfavoráveis contribuíram com a diminuição dos reservatórios, e para suprir a demanda energética as termelétricas movidas a gás natural são incorporadas ao sistema de geração de energia.

Para a geração térmica, o uso da biomassa vem aumentando, apresentando um crescimento de 5% de 2017 para 2018, sendo o bagaço e a palha de cana as matérias-primas mais utilizadas (EPE, 2019). Fazendo um paralelo entre a participação sazonal desta biomassa com a escassez hídrica, há complementaridade de períodos, visto que há geração de bioeletricidade proveniente do bagaço e palha durante a safra, período concomitante ao da estiagem (Figura 2).



Figura 2. Participação da biomassa de cana na geração de energia elétrica. Fonte: (CCEE, 2019; EPE, 2019)

A geração a partir de outras biomassas representou 1,1% em 2018, estando o biogás presente nesta produção energética (EPE, 2019). Sua participação na oferta interna de energia vem aumentando e o setor sucroenergético pode contribuir na oferta de biogás através da digestão anaeróbia dos seus resíduos, visto que a queima não abrange toda a quantidade de

resíduos gerados, apresenta limitações relacionados às incrustações nas caldeiras e contempla apenas 15% do potencial energético da biomassa (SUCRE, 2017; ÚNICA 2019).

A exploração de resíduos lignocelulósicos para a fabricação de produtos renováveis como energia, combustíveis e produtos químicos é uma estratégia visto que não afeta na competitividade do setor alimentício e de combustíveis. Outra vantagem está em diminuir seu acúmulo no meio ambiente.

A utilização de fontes vegetais para produção de combustíveis, como o etanol, é reflexo da demanda, visto que entre 2000 a 2017 houve aumento de 58% (EPE, 2018). De acordo com a projeção de IRENA (*International Renewable Energy Agency*), até 2030 a energia renovável irá corresponder a 36% da matriz energética global, o dobro da projeção feita para 2010 (IRENA, 2014).

### 3.2. Biomassa lignocelulósica

A parede celular de uma biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose e lignina e constitui a estrutura de resíduos agroindustriais como palha de trigo, palha de arroz, sorgo, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

O componente mais abundante da estrutura lignocelulósica é a celulose, um homopolímero linear com unidades repetitivas de celobiose (dímeros de glicose), sendo o principal polissacarídeo estrutural das plantas (SANTOS *et al.*, 2012). As unidades de glicose unem-se por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 agrupando-se em microfibrilas insolúveis. Estas microfibrilas possuem regiões cristalinas, com ligações de hidrogênio inter e intra moleculares, e interações hidrofóbicas. Há também regiões amorfas, as quais possuem um arranjo molecular não ordenado, com menor densidade e com menor número de ligações de hidrogênio com moléculas vizinhas. A cristalinidade da celulose torna a maioria das ligações glicosídicas inacessíveis às celulases (JEOH *et al.*, 2017).

A celulose proveniente da biomassa da cana-de-açúcar é utilizada para a produção de etanol 2G em algumas indústrias do setor sucroalcooleiro. Considerando o teor médio de celulose na biomassa de 30%, e que nem todo resíduo gerado é utilizado nesta produção, o excedente tem sido alvo de estudos e discussões no setor sucroalcooleiro para a escolha da melhor estratégia de produção energética (AXELSSON *et al.*, 2017; FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2020). Grande parte das indústrias utiliza o excedente de bagaço e parte da palha recolhida do campo para a cogeração de energia. Este aproveitamento energético

da biomassa é parcial e o uso da palha nas caldeiras altera a sua dinâmica de operação, uma vez que não foram projetadas para queimar palha e essa biomassa contém impurezas como enxofre, potássio e cloro que promovem aumento de incrustações (MENANDRO *et al.*, 2017).

A hemicelulose, também conhecida como fração C5, é um heteropolímero ramificado, composto majoritariamente por pentoses ( $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico) (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A matriz hemicelulósica é complexa e será descrita no próximo tópico.

Atualmente a hemicelulose não faz parte do ciclo de produção do etanol 2G devido à necessidade de empregar-se *saccharomices cerevisae* geneticamente modificadas que convertam as pentoses no biocombustível ou de desenvolver a produção de etanol através de microrganismos fermentadores destes açúcares. Isto não a torna competitivamente atraente em relação ao uso da celulose. No entanto, a fração C5 pode ser utilizada como matéria-prima em diferentes bioprocessos e vem apresentando resultados promissores na produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> através da digestão anaeróbia (DE SÁ *et al.*, 2020; RASHAMA; IJOMA; MATAMBO, 2019; SÁ, 2015; SANTOS *et al.*, 2018b; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018; YANG; WANG, 2018).

A lignina é constituída de encadeamentos irregulares e randômicos de compostos fenólicos que se unem por ligações éter ou ester à hemicelulose e por conseguinte une-se à celulose por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas (XU *et al.*, 2019). A lignina é a maior reserva renovável de compostos aromáticos sendo composta de monômeros de fenilpropenos ou unidades monolignol, tais como o álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A sua estrutura contém vários grupos funcionais, sendo eles hidrolixa alifática, hidroxila fenólica e metoxila. Estes grupos se diversificam quanto à reatividade e às propriedades químicas da fração, sendo o grupo de hidroxila fenólica o principal determinante das características da lignina; a hidroxila alifática geralmente é a mais abundante. Vale ressaltar que a quantidade desses grupos hidroxila variam de acordo com a natureza da matéria-prima (CHIO; SAIN; QIN, 2019). É a lignina que confere à matriz lignocelulósica rigidez, impermeabilidade, resistência ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo (PONNUSAMY *et al.*, 2018). Adicionalmente, as propriedades estruturais da lignina vêm sendo exploradas para produção de fibras de carbono, produtos poliúteranos e resinas no contexto da biorrefinaria (PONNUSAMY *et al.*, 2018).



Figura 3. Estrutura da biomassa lignocelulósica, destacando o tecido vegetal de monocotiledônea e a parede celular secundária do vegetal composta por celulose, hemicelulose e lignina. Elaboração própria a partir de CHIO; SAIN; QIN, 2019, CARVALHO *et al.*, 2017 ELUMALAI *et al.*, 2017. Foto do tecido vegetal: Priscila Costa Freitas.

A complexa interação entre as três frações na parede celular é o principal desafio para o uso biotecnológico da lignocelulose. Vários tipos de pré-tratamento vêm sendo estudados a fim de promover a desestruturação dos diferentes tipos de material lignocelulósico, facilitando assim o acesso das frações a microorganismos e enzimas, a depender da fração que se deseja aproveitar. Pré-tratamento com ácido diluído e pré-tratamento hidrotérmico facilitam a solubilização da hemicelulose, tendo como resultado duas correntes: a líquida, composta pelo hidrolisado hemicelulósico; e a sólida, composta por celulose e lignina. A explosão a vapor também solubiliza a hemicelulose e resulta em uma celulose mais acessível à hidrólise enzimática.(ADARME *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2013a; MOUTTA *et al.*, 2012).

Os pré-tratamentos alcalino, com solventes orgânicos e com amônia são realizados para a remoção da lignina (BRIENZO *et al.*, 2016; PONNUSAMY *et al.*, 2018; SOARES et al., 2019a). No pré-tratamento com ozônio, a lignina é a fração mais suscetível à degradação, seguido pelas hemiceluloses e com pouca interferência nas celuloses (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A extração com líquidos iônicos promove uma dissolução da lignocelulose a uma estrutura com celulose amorfa comparado a biomassa não tratada. Estes são exemplos de pré-

tratamentos que diminuem a cristalinidade da celulose, consequentemente promovem uma maior área superfície para a atuação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática, e assim, liberando os monômeros de glicose para a fermentação (DA SILVA *et al.*, 2013a; MORO *et al.*, 2017).

Entre os pré-tratamentos físicos, o moinho de bolas e a extrusão são processos que diminuem consideravelmente a cristalinidade da celulose (DA SILVA et al., 2013a). Um prétratamento adequado deve contemplar, além de alta eficiência, a minimização da degradação do polímero de interesse e ser selecionado visando o processo geral de produção e destino (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2017).

3.2.1 Fração hemicelulósica proveniente da etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por unidades de glicose, manose e xilose, cuja configuração varia de acordo com a espécie vegetal. Existem variações no grupo das hemiceluloses, sendo elas as xiloglucanas, xilanas, mananas e glucumananas.

As xiloglucanas possuem cadeias repetitivas de glicose com suas cadeias laterais compostas de xilose. Os resíduos de xilose podem ser substituídos com  $\beta$ -galactose ou Larabinose. Em contrapartida, as xilanas não possuem repetições em sua estrutura e apresentam diversas variações; são compostas de cadeias lineares de xilose com substituições de resíduos glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil em ligações  $\alpha$ -  $(1\rightarrow 2)$ , sendo chamadas de glucuronoxilanas. Quando há resíduos de arabinose nas ramificações são denominadas como arabinoxilanas e glucuronoarabinoxilanas. Além disso, também são encontradas na natureza algumas substituições de arabinofuranosil em ligação éster com ácido ferúlico no 5-O, característica de xilanas de monocotiledôneas. A maioria das xilanas são acetiladas, em que os grupos acetil estão ligados em O-3 dos resíduos de xilose e em menor frequência em O-2. Outro grupo acetilado são as mananas, compostas inteiramente de manose em que as glucumananas e galactoglucomananas possuem manose e glicose em um padrão não repetitivo na estrutura, com substituições de  $\alpha$ -D-galactupiranosil em ligações  $\alpha$ -  $(1\rightarrow 6)$  (Figura 4) (CARVALHO *et al.*, 2017a; GÍRIO *et al.*, 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).



Figura 4. Representação dos tipos de hemicelulose encontradas nas estruturas lignocelulósicas. As estruturas hemicelulósicas são variáveis de acordo com a origem vegetal. "Ac" aos grupos acetil, o termo "Fer" representa a esterificação com o ácido ferúlico, característico de xilanas de monocotiledôneas e "OMe" corresponde a 4-O-metilglucuronosil. Adaptado de SCHELL; ULVSKOV, 2010.

As xilanas encontradas no bagaço e na palha de cana são consideradas L-arabino (4-Ometilglucurono)-D-xilana em que as unidades de glucurônico e a arabinose estão ligados em O-2 e O-3, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2017a; PENG *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2012). A fração hemicelulósica da palha possui um número maior de substituições de unidades de arabinose comparado ao bagaço e menor conteúdo acetil, encontrados na posição O-3, O-2 e O-2,3 no polímero de xilose como está demonstrado na figura 5.



Figura 5. Estrutura da xilana do bagaço (A) e palha (B) de cana-de-açúcar. Glucuronoarabinoxilana com unidades de ácido glucurônico (Xil-3Ac-2GlcA) ligado em O-2; arabinose (Xil -3Ara) ligados em O-3 e grupamentos acetil ligados em O-3 (Xil-3Ac); O-2 (Xil-2Ac) e em O-2 e O-3 (Xil-2Ac-3Ac) no polímero de xilose. Adaptado de CARVALHO *et al.*, 2017a

Há diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa para a solubilização da fração hemicelulósica. Dentre eles, o pré-tratamento hidrotérmico utiliza água no estado líquido sob elevadas temperaturas (160 a 240 °C) e não faz uso de agentes químicos e catalisadores (DA SILVA *et al.*, 2013a). A recuperação da hemicelulose é na faixa de 55-84%, sendo os carboidratos liberados também na forma oligomérica e há baixa formação de produtos inibitórios, dependendo da severidade do processo. Os oligômeros formados precisam ser hidrolisados e consequentemente retardam a produção de hidrogênio, ocasionando o aumento da fase adaptativa dos microrganismos (DE SÁ *et al.*, 2020).

O pré-tratamento com ácido diluído, método mais utilizado em larga escala visto que há consumo relativamente baixo de ácido, assim como propicia a liberação dos açúcares da hemicelulose na forma monomérica e pode atingir uma eficiência de aproximadamente 90% recuperação dos carboidratos da estrutura. Em contraponto, o tratamento ácido ocasiona problemas associados a corrosão dos equipamentos. Outra preocupação ligada a esta abordagem está diretamente ligada às questões ambientais. A concentração do ácido e a temperatura do pré-tratamento é de fundamental importância para um bom rendimento. Usualmente, a técnica emprega ácido sulfúrico ou ácido hidroclorídrico em uma faixa de

concentração de 1 a 5%, temperatura de aproximadamente 150 °C, com pressão de até 10 atm e com curta duração do processo, de 10 a 30 minutos (DA SILVA *et al.*, 2013a; MOUTTA *et al.*, 2013; RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

A hidrolise ácida é iniciada com a dissociação do ácido em solução e sua difusão através da matriz lignocelulósica úmida até alcançar as regiões reativas (figura 6). Em hemiceluloses acetiladas, há clivagem desses grupamentos pelos prótons em solução que ocasionam o aumento da acidez do meio. Os prótons são adicionados na ligação glicosídica entre os monômeros de açúcar. Esta protonação forma um ácido conjugado e em seguida a ligação C-O é rompida liberando uma unidade de açúcar e um carbocátion instável, sendo finalizado com a solvatação do carbocátion utilizando a água como solvente, liberando outra molécula de açúcar e regenerando o próton. Outro mecanismo proposto é através da protonação do oxigênio do anel que gera um intermediário cíclico e depende de mais energia para ocorrer (DA SILVA *et al.*, 2013a).



Figura 6. Mecanismo de hidrólise ácida. Fonte: DA SILVA et al., 2013

Este método solubiliza seletivamente a hemicelulose e gera uma fração sólida composta de celulose e lignina. Em condições severas de tratamento pode ocasionar a hidrólise da celulose e degradação dos açúcares, gerando compostos tóxicos, como o 5-hidroximetilfurfural e furfural. Em condições controladas, a geração destes compostos pode ser mais baixa (BAZETTO, 2018; MOUTTA *et al.*, 2013). É importante ressaltar a necessidade de se neutralizar o hidrolisado antes de utilizá-lo como matéria-prima para processos fermentativos

ou de digestão anaeróbia devido ao baixo pH do hidrolisado (pH  $\leq$  1), incompatível com as faixas de pH adequados ao desenvolvimento microbiano.

Os compostos furânicos, HMF e furfural interferem nos processos microbiológicos por serem tóxicos ao metabolismo dos microrganismos. O HMF é proveniente de uma degradação térmica da glicose. Nesta degradação, a glicose é desidratada primeiramente em HMF, podendo ser degradada a ácido levulínico e ácido fórmico. Em contrapartida, o furfural é exclusivamente gerado a partir das pentoses, xilose e arabinose, liberadas da fração hemicelulósica (figura 7). Por se tratarem de aldeídos, são moléculas de alta reatividade que propiciam a formação de espécies reativas de oxigênio. Assim, geram danos na membrana celular dos microrganismo, danos ao DNA, inibição do crescimento celular e interferem na atividade de várias enzimas da via glicolítica (MONLAU et al., 2014; RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014). O impacto destes compostos nos processos microbianos é função direta da sua concentração no meio. Os efeitos deletérios associados, principalmente ao crescimento, podem ser observados em diferentes microrganismos em concentrações próximas a 1g/L, podendo diminuir consideravelmente o rendimento e produtividade dos processos que utilizem hidrolisados lignocelulósicos (KUMAR et al., 2009; PANAGIOTOPOULOS et al., 2011; QUÉMÉNEUR et al., 2012). A detoxificação do hidrolisado hemicelulósico é um procedimento aplicado para a retirada de HMF e furfural, o qual inclui a evaporação, adsorção em carvão ativado, extração por solventes, tratamento alcalino ou enzimático (HU et al., 2018; MONLAU et al., 2014), porém esta etapa pode encarecer o processo como um todo e até inviabilizar o uso do hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima.

Dependendo da severidade do pré-tratamento empregado pode ser observada a formação de pseudo-lignina, um material aromático contendo grupos funcionais hidroxil e carbonil. Assemelha-se à lignina nativa porém não é proveniente da mesma, é formada via degradação dos carboidratos seguida da polimerização dos derivados do HMF e furfural, sendo estes o 1,2,4-benzenetriol e 3,8-dihidroxi-2-metilcromona, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2012; RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014; SANNIGRAHI *et al.*, 2011).



Figura 7. Esquema representativo dos carboidratos solubilizados e compostos que podem ser formados no pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica. Adaptado de (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

### 3.3. Hidrogênio

O hidrogênio possui formas diversificadas de aplicação e é considerado um potencial substituto aos combustíveis fósseis, devido à redução de carbono decorrente de sua combustão limpa ( $H_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$ ) e, de elevada densidade energética (141,9 MJ/Kg) (YANG; WANG, 2018).

É empregado no refino de petróleo, para fracionamento e hidrogenação simultânea de hidrocarbonetos gerando moléculas menores e com maior proporção H/C. Assim como é utilizado para hidrogenar compostos de enxofre e nitrogênio e removê-los na forma atômica (H e S) ou como amônia (NH<sub>3</sub>). O metanol é também um produto proveniente do processamento do H<sub>2</sub> com monóxido de carbono através de uma reação catalítica em alta temperatura e pressão. Em menor representatividade, pode ser utilizado no refino de metais como níquel, tungstênio, molibdênio, cobre, zinco, urânio e chumbo (RAMACHANDRAN; MENON, 1998; SHARMA; GHOSHAL, 2015).

Na indústria aeroespacial é utilizado como combustível, por ser um composto de baixa massa molecular, critério fundamental para aplicações espaciais. Neste contexto de aplicação, também pode ser utilizado em combustíveis de automóveis através de uma célula de combustível, porém por se tratar de uma tecnologia incipiente, a competitividade para o uso do hidrogênio como combustível veicular ainda é desvantajosa. No entanto, a implementação de uma célula de combustível que possa ser utilizada em carros elétricos, conhecida como célula de combustível de veículos elétricos (em inglês *Fuel cell eletric vehicles - FCEV*) pode propiciar o uso do H<sub>2</sub> em automóveis. Empresas como Toyota, Hyundai e Honda já produzem veículos de passeio com *FCEV*, assim como Audi e Mercedes-Benz, que estão no mesmo propósito (STAFFELL *et al.*, 2019). Ônibus movidos à célula a combustível tiveram uma implementação precoce no contexto mundial, sendo que 83 estão em operação na Europa, 44 na América do Norte, 300 na China e 100 foram desenvolvidos pela Toyota para as Olimpíadas em Tóquio, remarcada para 2021. Caminhões, motocicletas e trens também vêm sendo produzidos nos países desenvolvidos com esta tecnologia para serem abastecidos com hidrogênio (ALSTOM, 2016; EDIE, 2018; HART *et al.*, 2015; TOYOTA, 2016).

Os métodos termoquímicos (gaseificação, reforma a vapor e pirólise) convencionalmente utilizados para produção de H<sub>2</sub> apesar de produzirem grande quantidade do gás, envolvem alto consumo energético, com geração de subprodutos tóxicos poluidores do meio ambiente (LIU *et al.*, 2019; SHARMA; GHOSHAL, 2015). Neste contexto, a infraestrutura da produção deste gás pode ser dispendiosa economicamente e ambientalmente danosa. Desta forma, o desenvolvimento de processos sustentáveis para obtenção de H<sub>2</sub> é de extrema relevância no cenário atual, onde se busca a redução das emissões de carbono e o uso racional de matérias-primas renováveis e residuais.

### 3.3.1. Produção de H<sub>2</sub> via processo fermentativo

A produção biológica de  $H_2$  é um processo tecnologicamente promissor, visto que podem ser empregadas condições brandas, assim como uma ampla gama de matérias-primas renováveis, resultando no baixo consumo de energia, e um processo ambientalmente limpo (WANG; YIN, 2018). São possíveis matérias-primas os resíduos agroindustriais, urbanos, da indústria de alimentos, de estações de tratamento e efluentes orgânicos industriais.

Entre os diferentes processos biológicos, a produção via fermentação ocorre através da conversão de compostos orgânicos como carboidratos, lipídios ou aminoácidos em H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácidos orgânicos e álcoois por microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. Pode ser

realizada por culturas puras de microrganismos, em que há seleção e purificação de bactérias produtoras de H<sub>2</sub> ou por meio de culturas mistas, podendo ser provenientes de ambientes naturais. As bactérias fermentativas permitem uma produção de modo contínuo e ritmo sustentado, não havendo inibição pela ausência de iluminação como ocorre em microrganismos fotossintéticos (bactérias fotossintéticas, algas e protistas) (DING; YANG; HE, 2016; ELBESHBISHY *et al.*, 2017; YANG; WANG, 2018).

Há uma variedade de microrganismos que podem ser utilizados para geração de H<sub>2</sub>, sejam em condições mesofílicas ou termofílicas. Em condições mesofílicas destacam-se bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Bacillus*, *Caldicellulosiruptor*. As espécies pertencentes ao gênero *Clostridium* produzem H<sub>2</sub> em ambas as condições, mesofílica e termofílica (HASYIM *et al.*, 2011). Estes microrganismos são capazes de esporular, podendo resistir a ambientes inóspitos, causados por: produtos químicos tóxicos, pH externo, detergentes e calor. Bactérias dos gêneros *Thermoanaerobacter* e *Caldanaerobius* também são recorrentes nos estudos de produção de H<sub>2</sub> em condições termofílicas (DESSÌ *et al.*, 2018; NIZ *et al.*, 2019; O-THONG *et al.*, 2008).

Além da presença de compostos furânicos mencionados no tópico 3.2.1, a produção fermentativa de  $H_2$  por consórcio microbiano é dependente da população microbiana no inóculo, desta forma parâmetros como concentração de substrato, pH e temperatura de operação afetarão o metabolismo desta diversidade de bactérias, favorecendo ou não a produção de  $H_2$ .

Os carboidratos são consumidos pelos microrganismos como fonte de carbono e, os prótons  $H^+$  atuam como receptores de elétrons reduzindo os elétrons gerados na degradação do substrato. Consequentemente ocorre a geração  $H_2$ , fenômeno relacionado à manutenção do equilíbrio redox intracelular. Neste processo são gerados ácido acético e butírico juntamente com ATP (YANG; WANG, 2018).

Um meio com altas concentrações de substrato pode desfavorecer a produção de H<sub>2</sub> uma vez que os microrganismos podem ser inibidos pela alta concentração de ácidos acumulados no meio, pelo baixo pH intracelular ou pelo aumento da pressão parcial de H<sub>2</sub>. O ajuste da concentração de substrato deve ser avaliado de acordo com cada sistema, considerando a matéria-prima como fonte de substrato, analisando-se a carga orgânica por quantidade de microrganismos presente no inóculo para evitar a inibição por substrato e consequente inibição por produto (ELBESHBISHY *et al.*, 2017). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de estudos sobre a produção de H<sub>2</sub> com aumento da concentração de carboidratos simples, foco de interesse do trabalho.

Substrato	Conc. (g/L)	Inóculo	Rendimento (mol <sub>H2</sub> /mol substrato)	Referência
Sacarosa	5	T. thermosaccharolyticum	5,45	O-THONG et
Sacalose	50	PSU-2	0,87	al., 2008
Xilose	1		1,46	KONGJAN; MIN; ANGELIDAKI
711050	4	Cultura mista	0,45	2009
Xilose, glicose e	1		1,30	DE SÁ et al.,
arabinose	10	Lodo anaeróbio	0,68	2020
Xilose, glicose e	10		0,84	FANGKUM; REUNGSANG,
arabinose	44	Estrume de Cavalo	0,22	2010

Tabela 1. Produção de H<sub>2</sub> x aumento da concentração de açúcar.

Além da concentração inicial de substrato, o pH e a concentração de ácidos orgânicos no meio são parâmetros importantes para que se alcancem rendimentos satisfatórios de H<sub>2</sub>. Durante a produção de H<sub>2</sub>, há geração de ácidos, principalmente acético e butírico, que levam à redução do pH do meio. Quando o pH do meio é menor que o pKa dos ácidos acético (4,75) e butírico (4,8), estes se dissociam no interior da célula microbiana e o acúmulo de prótons no citoplasma ocasionam a acidificação intracelular, que pode causar a ativação de enzimas relacionadas à solventogênese, rota concorrente à de produção de H<sub>2</sub>. Os ânions promovem um aumento da osmolaridade no citoplasma e consequentemente aumento da pressão de turgor (pressão exercida na parede celular). Adicionalmente, há redução dos níveis de ATP intracelular com o bombeamento dos prótons para o meio extracelular. Neste sentido, a inibição por ácidos não dissociados está relacionado à inibição por substrato e mudanças de pH (DE SÁ *et al.*, 2020; ELBESHBISHY *et al.*, 2017; O-THONG *et al.*, 2008; SÁ, 2015).

A temperatura de operação do processo fermentativo pode alterar o metabolismo de diferentes microrganismos, influenciar na biodegradabilidade do substrato e na atividade das hidrogenases. O aumento de temperatura pode favorecer o acúmulo de H<sub>2</sub>, suprimindo os consumidores deste gás, como as arqueias metanogênicas e as bactérias homoacetogênicas. No entanto, em condições extremamente termofílicas (Temperaturas acima de 65 °C), foi observada, em um sistema utilizando lodo ativado como inóculo, a inibição dos organismos produtores de H<sub>2</sub> através da desnaturação das proteínas celulares, ou seja, inativação de enzimas essenciais para o crescimento celular (DESSÌ *et al.*, 2018). A faixa de temperatura usualmente

utilizada na acidogênese é de 30 a 60 °C, sendo descrito na literatura que as faixas de 37 a 40 °C e 50 a 60°C podem aumentar a produção de  $H_2$  sem danos ao crescimento celular (ELBESHBISHY *et al.*, 2017).

Entretanto, a eficiência dos processos é particular de cada sistema. O modo de operação, a concentração inicial de substrato, o tipo de substrato, e o tipo de inóculo utilizados irão influenciar a produção de H<sub>2</sub>.

### 3.3.2. Rotas metabólicas envolvidas na produção de H<sub>2</sub>

Existem diversos microrganismos capazes de converter uma grande variedade de carboidratos, lipídios e/ou proteínas em hidrogênio, CO<sub>2</sub> e outros compostos orgânicos como ácidos graxos voláteis e alcoóis (DING; YANG; HE, 2016). Os carboidratos geralmente são a fontes de carbono orgânico de fácil assimilação pelos microrganismos no processo fermentativo (ELBESHBISHY *et al.*, 2017).

Os produtos formados classificam a rota fermentativa das bactérias, podendo ser fermentação aceto-butírica (fermentação tipo saccharolítica clostridial) e fermentação acetomista (fermentação tipo enterobacterial) (MONTOYA, 2019). Entretanto, independentemente do tipo de fermentação, a primeira etapa é a conversão dos carboidratos em ácido pirúvico com formação de NADH na via glicolítica, como é demonstrado na equação 1:

$$C_6H_{12}O_6$$
 (glicose) + 2NAD<sup>+</sup>  $\rightarrow$  2 CH<sub>3</sub>COCOOH (ácido pirúvico) + 2 NADH + 2 H<sup>+</sup> (Eq. 1)

Na figura 8 estão representadas de forma esquematizada as reações metabólicas descritas acima, utilizando como substrato a glicose, xilose e arabinose, carboidratos presentes na fração hemicelulósica.



Figura 8. Rota metabólica de um consórcio microbiano durante fermentação de substratos da fração hemicelulósica (Elaboração própria a partir de DING; YANG; HE, 2016 e SÁ, 2015). Enzimas: (1) Hexocinase; (2) Glicose-6-fosfato isomerase; (3) Frutose bifosfatase; (4) Aldolase; (5) Piruvato-ferrodoxina oxidorredutase; (6) Hidrogenase; (7) NADH-ferrodoxina oxidorredutase; (8) NADPH-ferrodoxina oxidorredutase; (9) Fosfotranscetilase quinase; (10) Acetato liase; (11) Fosfotransbutilase quinase; (12) Butirato quinase; (13) Xilose isomerase; (14) Xiluloquinase; (15) L-arabinose isomerase; (16) L-ribulose-5-fosfato; (17) L-ribulose-fosfato-4-epimerase; (18) Acetaldeído desidrogenase; (19) Etanol desidrogenase; (20)  $\beta$ -hidroximetilglutaril-CoA liase; (21) Acetato descarboxilase; (22) Butiraldeído desidrogenase; (23) Butanol desidrogenase; (24) Acetato-formiato-liase; (25) Formato-hidrogenase-liase; (26) Lactato desidrogenase.
Na fermentação aceto-butírica os substratos são convertidos à gliceraldeído-3-fosfato e posteriormente em ácido pirúvico. A conversão da glicose é iniciada com uma fosforilação por uma molécula de ATP, dando origem a glicose-6-fosfato e em seguida convertida em sua forma isomérica, frutose-6-fosfato. Uma segunda fosforilação ocasiona a formação da frutose-1,6-bifosfato e esta é convertida em gliceroldeído-6-fosfato pela enzima aldolase (NELSON; COX, 2014). Os demais substratos também são convertidos à gliceraldeído-3-fosfato, porém serão metabolizados primeiramente na via das pentoses antes de integrar a via glicolítica.

A degradação da xilose por microrganismos procariotos ocorre através da via de isomerização e iniciando-se com a conversão de xilose a xilulose pela enzima xilose isomerase. Em seguida, a xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase. Este composto é metabolizado pela via das pentoses até entrar na via glicolítica (DE SÁ *et al.*, 2013; KARHUMAA; SANCHEZ; HAHN-HÄGERDAL, 2007).

Em relação à L-arabinose, as bactérias a convertem em L-ribulose pela ação da enzima L-arabinose isomerase, que posteriormente é fosforilada a L-ribulose-5-fosfato e novamente sofre a ação de uma isomerase, a enzima L-ribulose-fosfato 4-epimerase, sendo convertida em xilulose-5-fosfato e assim é integrada na via glicolítica (BETTIGA *et al.*, 2009; FREITAS, 2012). Nestes processos a energia é obtida na forma de ATP e são geradas moléculas de piruvato.

Os elétrons utilizados para a geração de H<sub>2</sub> são provenientes da oxidação do piruvato à acetil-CoA mediante a enzima Piruvato-ferrodoxina oxirredutase na presença da coenzima A (CoA), ferrodoxina reduzida (Fd<sub>red</sub>) e CO<sub>2</sub>. A fosforilação do acetil-CoA pode ser realizada através do sistema da fosfotranscetilase ou fosfotransbutilase em que há geração de ATP e dos ácidos acético e butírico, respectivamente. A ferrodoxina reduzida (Fd<sub>red</sub>) transfere elétrons para as hidrogenases durante a formação dos ácidos acético e butírico. Assim, as hidrogenases utilizam os prontons H<sup>+</sup> como aceptores finais de elétrons e ferrodoxina é re-oxidada liberando a molécula de H<sub>2</sub> (Equação 2) (DING; YANG; HE, 2016; MONTOYA, 2019; SÁ *et al.*, 2015).

$$2 H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$$
 (Eq. 2)

As equações abaixo apresentam a estequiometria da conversão de hexoses e pentoses para a geração de  $H_2$ , sendo estes os principais mecanismos descritos, acontecendo simultaneamente com a produção de ácidos acético e butírico (ABDUL *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2019). Hexoses:

$$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 4 H_2 + 2 CO_2$$
 (Eq. 3)

$$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2 CO_2$$
 (Eq. 4)

Pentoses:

$$C_5H_{10}O_5 + 1.67 H_2O \rightarrow 1.67 CH_3COOH + 3.33 H_2 + 1.67 CO_2$$
 (Eq. 5)

$$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0.83 \text{ CH}_3CH_2CH_2COOH + 1.67 \text{ H}_2 + 1.67 \text{ CO}_2$$
 (Eq. 6)

A via do ácido acético gera a maior quantidade de mols de H<sub>2</sub> utilizando de 1 mol de carboidrato (1 mol de hexose gera de 4 mols de H<sub>2</sub> e 1 mol de pentose gera 3,33 mols de H<sub>2</sub>). Isso ocorre em virtude da geração de ácido acético não envolver consumo adicional de NADH. Portanto, 4 e 3,33 mols são os máximos rendimentos de H<sub>2</sub> possíveis através da fermentação direta de hexoses e pentoses, respectivamente (DING; YANG; HE, 2016; THAUER *et al.*, 1977).

Bactérias formadoras de endoporos como *Clostridium sp, Bacillus sp e Ruminococcus* realizam a rota aceto-butírica. Em determinadas condições reacionais, os microrganismos do gênero Clostridium podem produzir acetona, butanol e etanol através da via de produção de solventes, conhecida como fermentação ABE ou solventogênica (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2007). Os Intermediários desta produção são o acetil-CoA e butiril-CoA (NAKAGAWA, 2017).

Para a produção de acetona o acetil-CoA é convertido a acetoacetil CoA e em seguida em acetoacetato gerando acetona pela enzima acetoacetato descarboxilase. Quanto ao etanol, o Acetil-CoA é reduzido pelas enzimas acetaldeído desidrogenase e etanol desidrogenase. Por fim, o n-butanol é gerado através da redução do butiril-CoA mediado pelas enzimas butiraldeído desidrogenase e butanol desidrogenase (LEE *et al.*, 2008).

Na fermentação entérica o piruvato é convertido em ácido fórmico e Acetil-CoA mediante a enzima acetato formiato liase. Em alguns microrganismos como *Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumonia, Rhodospirillum rubrume, Methanobacterium formicicum* e *Escherichia. coli*, em que utilizam o complexo formiato-hidrogenase-liase (complexo FHL) que contém classes de hidrogenases como [NiFe] hidrogenase ou [FeFe] hidrogenase para converter ácido fórmico em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Equação 7) (TEDSREE *et al.*, 2011; VARDAR-

SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008). Em fermentações realizadas por Enterobacter, pode haver redução do piruvato a ácido lático pela lactato desidrogenase não havendo produção de H<sub>2</sub>.

Ácido Fórmico: HCOOH  $\leftrightarrow$  CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> (Eq. 7)

O ácido propiônico é principalmente produzido pela via metabólica do ácido dicarboxílico, podendo também ser gerado pela via do ácido acrílico. Sua síntese geralmente é acompanhada pela formação de acetato e dióxido de carbono e com o consumo de H<sub>2</sub> (Equações 8 e 9 ) (CORAL *et al.*, 2008; DING; YANG; HE, 2016).

Hexoses:  $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$  (Eq. 8) Pentoses:  $C_5H_{10}O_5 + 1,67 H_2 \rightarrow 1,67 CH_3CH_2COOH + 1,67 H_2O$  (Eq. 9)

A produção fermentativa de H<sub>2</sub> pode ser realizada por culturas puras de microrganismos, em que há seleção e purificação de bactérias produtoras de H<sub>2</sub> ou por meio de culturas mistas, podendo ser provenientes de ambientes naturais. Quando esta produção é realizada por uma cultura mista de microrganismos há vantagens quanto a simplificação de controle e operação do processo por não necessitar de condições estéreis de substrato ou equipamento. Além disso, este tipo de inóculo é reconhecido como o mais apropriado quando matérias-primas residuais são utilizadas como fonte de substratos (AGLER *et al.*, 2011; CASTELLÓ *et al.*, 2020). Entretanto, por se tratar de um consórcio microbiano, além das bactérias produtoras de H<sub>2</sub> estão presentes os microrganismos que irão consumi-lo, característico da digestão anaeróbia (SCHNÜRER; JARVIS, 2018b).

## 3.4. O biogás e o biometano

O biogás é proveniente da degradação microbiológica da matéria orgânica em condições anaeróbias. É formado de uma mistura de gases, predominantemente de metano 55 – 80%, sendo a concentração variável de acordo com o composto orgânico utilizado na digestão, 20 a 45% de CO<sub>2</sub>, podendo ter em sua composição o H<sub>2</sub>, e H<sub>2</sub>S (ALI *et al.*, 2018). A produção de biogás é espontânea no meio ambiente onde a matéria orgânica é acumulada com pouco ou nenhum oxigênio.

Após a digestão anaeróbia o material residual, chamado de digestato, é rico em nutrientes e pode ser utilizado como biofertilizante no solo. Teoricamente e tecnicamente, qualquer resíduo orgânico, nisto inclui-se os resíduos agroindustriais, tem potencial para produção de biogás, e se apresenta como uma solução de gerenciamento dos resíduos no meio rural e urbano.

Em 1979 no Brasil, perante a crise do petróleo, foram implementados incentivos ao desenvolvimento e aproveitamento de novas fontes energéticas. (BARAT; NAZARETH, 1980). O Decreto n° 87.079 assinado em abril de 1982, descreve ações direcionadas à conservação de energia e substituição dos derivados de petróleo, sendo o biogás apontado como uma das alternativa de substituição. Foram instalados cerca de 3000 biodigestores através do Programa de Mobilização Energética (PME) mas a insuficiência de conhecimento e mão de obra especializada na área gerou problemas operacionais e a tecnologia foi abandonada (CIBiogás, 2019).

Foi somente a partir do século 21 que o biogás retomou sua participação nas discussões energéticas. Em virtude de sua produção ser de origem biológica e apresentar-se como alternativa de diminuição das emissões dos gases do efeito estufa, o desenvolvimento do mercado de créditos de carbono viabilizou recursos para instalações de biodigestores no Brasil. Atualmente contamos com 276 plantas de biogás em operação, utilizando os seguintes resíduos: sólido urbano, esgoto, suinocultura, agroindustriais e da indústria de alimentos. Aproximadamente 69% da energia produzida é destinada para a geração de eletricidade (CIBiogás, 2019).

Além da redução da geração dos gases do efeito estufa, o biogás promove a redução da emissão de particulados, é uma fonte de energia renovável intermitente e não apresenta riscos para a segurança alimentar, possibilita a geração distribuída e descentralizada alavancando o desenvolvimento regional e a produção concomitante de biofertilizantes (BATISTA *et al.*, 2018).

Este é o convencionalmente chamado biogás bruto. Quando este é purificado até que se atinja 96,5% de CH4 passa a ser denominado como biometano. Nesse caso, o gás apresentará melhores opções de utilização como a injeção na rede de gás natural e no mercado de gás comprimido (BATISTA *et al.*, 2018).

As técnicas de purificação do biogás a biometano aplicadas em escala comercial atualmente são as de adsorção por oscilação de pressão, lavagem com água, lavagem com produtos químicos, separação por membrana e separação criogênica (PRUSSI *et al.*, 2019).

O biometano apresenta-se como um substituto perfeito ao gás natural em todas as suas aplicações por apresentar propriedades semelhantes em composição e poder calorífico (ANP, 2019). O mercado mais propício para a inserção do biometano envolve as regiões nas quais a distribuição de gás natural é deficitária. No setor agrícola pode vir a substituir o diesel, principalmente nas máquinas e na região urbana em veículos particulares ou rodoviários que circulam nas regiões onde não há fornecimento via gasoduto. Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE), o biometano pode substituir metade do mercado do diesel até o ano de 2026 (EPE, 2019).



Figura 9. Poder calorífico dos compostos comumente utilizados como combustível. Elaboração própria a partir de THUNKLIN *et al.* 2018; WONG, WU & JUAN, 2014.

Levando-se em consideração a indústria sucroalcooleira, a produção de biometano poderia alimentar tratores, colheitadeiras e ser utilizado no transporte da cana-de-açúcar.

## 3.5. Digestão anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia é realizado por um consórcio de microrganismos que atua simultaneamente sobre a matéria orgânica, convertendo-a em moléculas menores, e tendo como produtos finais CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Com a liberação do carbono da fase líquida para a fase gasosa, há redução da carga orgânica do meio, e por isso a digestão anaeróbia é vastamente empregada em estações de tratamento de esgoto ou de efluentes. A presença de várias comunidades microbianas é fundamental para a digestão anaeróbia e estes microrganismos precisam trabalhar em conjunto. O consórcio microbiano varia conforme a fonte obtida, podendo ser natural como efluentes industriais, estrume de animais e lodo de estação de tratamento de esgoto (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a, 2010).

A digestão anaeróbia é dividida em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogêse (figura 10). Na primeira etapa, as bactérias e fungos anaeróbios produzem enzimas extracelulares hidrolíticas que degradam os materiais particulados complexos como os polissacarídeos em compostos solúveis mais simples que são permeáveis às membranas celulares dos microrganismos. Os microrganismos comumente encontrados em lodo anaeróbio que catalisam este tipo de reação são *Coprothermobacter, Clostridium e Bacillus* (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a; SOARES *et al.*, 2019b).

Na fase acidogênica estes produtos solúveis são metabolizados no interior das células microbianas sendo convertidos em ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. A hidrólise juntamente com a etapa acidogênica representam o processo fermentativo. Além do *Clostriudim*, podem ser encontrados no lodo durante a acidogênese microrganismos do gênero *Thermotoga, Caldanaerobacter, Carboxydothermus e Thermoanaerobacter* (PARK *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2019b).

As bactérias acetogênicas (*Moorella, Clostridium, Alkaliphillus, Caldanaerobacter, Thermoanabacter*) oxidam os produtos gerados na etapa anterior em ácido acético para servir de substrato às arquéias metanogênica. Na fase metanogênica, as arquéias convertem  $H_2$  e ácido acético em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Estes microrganismos podem ser classificados de acordo com a sua afinidade pelo substrato. As metanogênica acetoclásticas (*Methanosaeta, Methanosarcina*) consomem o ácido acético como substrato enquanto as metanogênica hidrogenotróficas (*Methanothermobacter, Methanoculleus, Methanosarcina, Methanoccocus, Methanocaldoccocus*) utilizam o  $H_2$  e CO<sub>2</sub> (SOARES *et al.*, 2019b). Quando há presença de nitrato e sulfato no meio, algumas espécies de bactérias redutoras de nitrato e sulfato utilizam

o H<sub>2</sub> para a síntese de amônia e sulfeto, respectivamente (CHERNICARO, 2007; SCHNÜRER; JARVIS, 2018).



Figura 10. Representação esquemática das etapas da digestão anaeróbia. Fonte: Elaboração própria a partir de: DE SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014

Para que haja acúmulo de H<sub>2</sub> na fase gasosa é necessário reduzir seu consumo pelas vias paralelas. Para evitar a metanogênese é realizado pré-tratamento no inóculo para que haja seleção dos microrganismos produtores de H<sub>2</sub> e diminuição da presença dos consumidores. Neste contexto, os pré-tratamentos que podem ser empregados no consócio microbiano são físicos, (ultrassonificação, irradiação ultravioleta, aeração, térmico, congelamento e descongelamento) ou químicos (ácido, alcalino, inibição química ou da atividade química) que fornecem condições hostis e favorece a diminuição destes microrganismos visto que não possuem capacidade esporulante e o meio é enriquecido com microrganismos produtores de H<sub>2</sub>, como as bactérias do gênero *Clostridium* (APPELS *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2019; DE SÁ *et al.*, 2011a).

#### 3.5. Produção direta de metano

Este processo também é conhecido como digestão anaeróbia em único estágio em que todos as etapas de decomposição microbiana, ou seja, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese ocorrem ao mesmo tempo e local. Neste caso, o lodo anaeróbio é utilizado em sua forma *in natura*, sem pré-tratamento do inóculo, visto que as arqueia metanogênicas é o grupo microbiano produtor de CH<sub>4</sub>.

No consórcio microbiano há microrganismos facultativos, porém a produção de metano deve ocorrer em ambientes totalmente anaeróbios devido à intolerância das metanogênicas ao oxigênio (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a).

As temperaturas geralmente usadas na digestão são mesofílicas (35°C a 42°C) ou termofílicas (50 °C a 55°C). É importante ressaltar que após a temperatura ser estabelecida, não deve haver variações maiores que 0,5 °C para que a produção seja satisfatória. As arqueias produtoras de metano são mais sensíveis às variações de temperatura comparado aos outros microrganismos fermentativos. Ou seja, se houver flutuações na temperatura, pode haver um acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois no sistema incapacitando as metanogênicas de digerílos totalmente (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a).

Os processos termofílicos geralmente promovem a produção e a degradação dos substratos de maneira mais rápida quando comparado a condição mesofílica. Neste contexto, em altas temperaturas pode haver o aumento da disponibilidade de compostos orgânicos devido o aumento da solubilidade (HAMZAH *et al.*, 2019). Além disso, a digestão termofílica em altas temperaturas promove uma sanitização natural do meio, fato observado por Sahström (2003), a diminuição significativa da população de microrganismos patogênicos como a Salmonella. No entanto, esta condição pode ser mais suscetível a distúrbios visto que a temperatura ótima dos microrganismos é próxima a temperatura que muitos outros morrem ou tornam-se inativos. A produção em condição mesofílica proporciona uma grande diversidade de microrganismos, podendo ser um processo mais estável e mais adaptado a mudanças no meio (APPELS *et al.*, 2008; SCHNÜRER; JARVIS, 2018a).

As arqueias são muito sensíveis a alterações do pH, tendo sua faixa de pH ótimo entre 6,5 e 7,2. A redução de pH decorrente da produção de ácidos nas fases acidogênica e acetogênica é normalmente controlada pelas metanogênicas pela formação de  $CO_2$  na fase gasosa e bicabornato (HCO<sub>3</sub>) na fase líquida (APPELS *et al.*, 2008).

Resíduos agroindustriais são comumente utilizados para a produção de metano e a tabela 2 apresenta uma análise comparativa de estudos recentes de produção de CH<sub>4</sub> a partir de resíduos agroindustriais em condição mesofílica. De maneira geral, todo material orgânico pode ser digerido com exceção de materiais lenhosos estáveis dado que os microrganismos anaeróbios não degradam lignina. A produção de metano também pode ser realizada com lodo de estação de tratamento de esgoto, estrumes de animais, resíduos orgânicos domésticos (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010; FONOLL *et al.*, 2015; SHAMSUL *et al.*, 2017).

Biomassa	Matéria- prima	Inóculo	Tipo de processo	Estágio único CH4	Referência	
Bagaço de Cana	Residuo do pré- tratamento hidrotérmico	Lodo anaeróbio	Batelada	$358 \text{ mL/ } g_{DQO}$	BUITRÓN et al., 2019	
Palha de		Lodo			SANCHEZ-HERRERA et	
cana	Hemicelulose	anaeróbio	Batelada	316,12 mL/ g <sub>DQO</sub>	<i>al.</i> , 2018	
Palha de		Lodo			SANCHEZ-HERRERA et	
cana	Celulose	anaeróbio	Batelada	342,68 mL/g <sub>DQO</sub>	<i>al.</i> , 2018	
Palha de		Lodo				
cana	Palha de cana	anaeróbio	Batelada	231 mL/ g <sub>ssv</sub>	JANKE <i>et al.</i> , 2017	
Torta de	Torta de	Lodo				
filtro	filtro	anaeróbio	Batelada	231 mL/ g <sub>ssv</sub>	JANKE <i>et al.</i> , 2017	
Bagaço de		Lodo				
cana	Hemicelulose	anaeróbio	Batelada	270 mL / g <sub>DQO</sub>	RIBEIRO et al., 2017	
		Lodo				
Gramíneas	Gramíneas	anaeróbio	Batelada	161 mL/ g <sub>ssv</sub>	ZOU et al., 2018	
Bagaço de	Bagaço de	Lodo				
cana	cana	anaeróbio	Batelada	247,60 mL/ g <sub>ssv</sub>	ALI et al., 2018	
Bagaço de	Bagaço de	Lodo				
cana	cana	anaeróbio	Batelada	132 mL/ g <sub>ssv</sub>	ZOU et al., 2018	

Tabela 2. Levantamento bibliográfico dos processos de digestão anaeróbia em único estágio utilizando resíduos agroindustriais.

Em relação aos resíduos lignocelulósicos, quando o substrato para a geração de metano são carboidratos em sua conformação mono ou dissacarídica, a etapa fermentativa ocorre rapidamente. Porém, a degradação dos ácidos gerados nesta etapa não ocorre com a mesma rapidez como são formados, podendo gerar acúmulo no meio e promover problemas no processo devido à diminuição da alcalinidade. Entre as complicações geradas pelo baixo pH está a inibição da etapa fermentativa e acetogênese no qual os ácidos penetram a membrana dos microrganismos, dissociam-se e reduzem o pH intracelular.

# 3.7. Digestão anaeróbia em dois estágios: Produção sequencial de hidrogênio e metano

A utilização de uma cultura mista de microrganismos para produção de  $H_2$  é vantajosa em processo de larga escala, onde a digestão anaeróbia restrita a fase hidrólise-acidogênese (fermentação) gera vários metabólitos como ácidos orgânicos e álcoois de interesse comercial, subprodutos do metabolismo das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>. Este acúmulo de metabólitos configura um sistema de produção com baixa diminuição da demanda química de oxigênio (DQO) e recuperação energética.

Uma alternativa para recuperação energética e redução da DQO vem sendo explorada através do reciclo do efluente da produção de H<sub>2</sub> (EPH – Efluente da produção de H<sub>2</sub>, em inglês HPLW - Hydrogen Product Liquid Waste) em que este material é utilizado como matéria-prima com um inóculo *in natura* (sem pré-tratamento e com a presença das aqueias metanogênicas) para a produção de metano, segundo estágio da digestão anaeróbia (CHENG *et al.*, 2012), conforme ilustrado na figura 11. Esta produção é conhecida como digestão anaeróbia em dois estágios ou produção sequencial de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>.



Figura 11. Esquema representativo da conversão da fração hemicelulósica em hidrogênio e metano de maneira sequencial utilizando como inóculo o lodo de estação de tratamento de esgoto.

Estudos comparativos entre a produção direta e sequencial, como o de Santos e colaboradores (2018), demonstrou que a digestão anaeróbia em dois estágios apresentou maior rendimento, correspondendo a 248 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub> comparado a produção em único estágio, que apresentou rendimento de 91 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub>. Baeta e colaboradores (2016) também avaliaram as duas produções e verificaram que a digestão em dois estágios (rendimento de 340 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub>) é superior à produção direta (rendimento de 173 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub>). Isto é decorrente das condições otimizadas de cada etapa como o pH, razões balanceadas de C/N, e a quantidade de metabólitos solúveis, contendo sobrecargas orgânicas. A produção de metano torna-se mais rápida visto que os compostos complexos da matéria-prima já foram degradados na fase fermentativa, facilitando a ação das arquéias metanogênica (CORONA; RAZO-FLORES, 2018; PARTHIBA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018c).

Neste contexto, além da versatilidade de aplicações do hidrogênio e metano, a produção a partir de resíduos agroindustriais vem se mostrando uma abordagem promissora em que valoriza e integra-os ao contexto da biorrefinaria. Além de uma solução para a palha de canade-açúcar que é um resíduo abundante, a utilização da fração C5 surge como alternativa complementar a geração de energia nas indústrias sucroalcooleiras, incorporando-a na cadeia produtiva do etanol 2G. Neste estudo, a fração C5 foi utilizada para produção destes dois gases de maneira sequencial e comparou-se com a produção em um único estágio, buscando analisar a melhor abordagem e recuperação energética em escala de laboratório.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O diagrama de blocos apresentado na figura 12 descreve a sequência de etapas executadas no estudo. As amostras de palha de cana-de-açúcar foram cedidas pela Raízen. Na primeira etapa, amostras de palha foram moídas para a realização da caracterização química da biomassa *in natura* e pré-tratamento com ácido diluído. Nesta etapa do trabalho foi obtida a matéria-prima para a digestão anaeróbia. A produção de H<sub>2</sub> foi realizada na segunda etapa, em duas temperaturas. Os ensaios realizados em 35 °C ocorreram com três diferentes concentrações de carboidratos e teve como objetivo o entendimento do bioprocesso, bem como selecionar a melhor condição para a produção sequencial de metano. O outro estudo, em temperatura de 50 °C analisou a produção de H<sub>2</sub> com lodo *in natura* e lodo pré-tratado termicamente no intuito de avaliar a necessidade do pré-tratamento nesta condição, e comparando os rendimentos com a produção em meio mesofílico. Na terceira etapa, a produção de metano foi realizada de maneira sequencial utilizando o efluente da produção de H<sub>2</sub> (EPH), e de maneira direta, em um único estágio de digestão anaeróbia. O objetivo da digestão direta foi comparar com a produção em dois estágios e com a produção empregando um meio minetizado, composto apenas de açúcares padrão.



Figura 12. Diagrama de blocos simplificado das etapas dos experimentos do estudo

## 4.1. Caracterização química da palha de cana-de-açúcar in natura

A composição química da palha *in natura* foi determinada através do método de hidrólise ácida descrito pelo NREL (National Renewble Energy Laboratory) por Sluiter e colaboradores (SLUITER *et al.*, 2005, 2012). Foram determinadas as cinzas, extrativos, carboidratos estruturais, lignina solúvel e insolúvel.

#### 4.1.1. Determinação dos extrativos na biomassa

Cartuchos de celulose previamente submetidos à secanagem em estufa a 40°C para retirar a umidade, foram utilizados para a determinação dos extrativos. Estes foram pesados e cada cartucho recebeu 1g de amostra em massa seca e cada massa foi devidamente anotado. O experimento foi realizado em seis replicatas. Os cartuchos foram inseridos no sistema extrator soxhlet. A primeira extração foi realizada com 120 mL de água destilada durante 24 horas. A segunda extração ocorreu com 120 mL de etanol no período de 8 horas. Ao final da extração os cartuchos foram levados para secagem em estufa à 105°C *overnight*, consecutivamente pesados. Por diferença de massa inicial de amostra e da massa após a extração, obteve-se o teor de extrativos. Três replicatas foram secas em estufa à 40°C até apresentar umidade inferior à 10% para serem utilizadas na determinação do teor de carboidratos estruturais e lignina. A umidade da palha foi determinada utilizando uma balança Mettler Toledo HE53 Moisture Analyzer.

#### 4.1.2. Determinação da lignina e carboidratos estruturais

#### 4.1.2.1 Hidrólise ácida e carboidratos estruturais

Foram utilizados 0,3 gramas de palha livre de extrativos e adicionadas a um tubo de vidro resistente a pressão. O experimento foi realizado em triplicata. Foram adicionados a cada tubo 3 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (m/m) e em seguida a amostra foi homogeneizada sob agitação por uma hora em banho maria a 30°C. Após este período, foram adicionados 84 mL de água ultrapura nos tubos com o intuito de diluir o ácido sulfúrico a uma concentração

final de 4% (v/v). Os tubos foram autoclavados a pressão de 1 bar (121 °C) por uma hora. Simultaneamente, foi autoclavado um padrão de recuperação de açúcares (PRA) com concentração de açúcares estabelecidas, em triplicata e com a mesma concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> das amostras. O objetivo do uso do PRA foi avaliar o efeito da degradação dos açúcares das frações da estrutura lignocelulósica provocado pelo ácido ao longo do procedimento. Ao final, os tubos foram resfriados em banho de gelo e filtrados em cadinhos de Gooch com o auxílio de uma bomba à váculo. A fração sólida foi lavada com água destilada até esta água atingir o pH 6,5. Este material foi utilizado para a determinação do teor de lignina e cinzas insolúveis em ácido. A fração líquida proveniente da primeira filtração foi neutralizada com CaCO<sub>3</sub> até atingir o pH entre 5 e 6. Esta alíquota foi utilizada para determinação de concentração de açúcares em cromatografia líquida de alta eficiência, e analisado também por espectrofometria para a determinação da lignina solúvel.

#### 4.1.2.2. Determinação da lignina solúvel em ácido

Este procedimento foi realizado através da medida de absorbância no espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution com comprimento de onda de 240 nm. O hidrolisado da etapa 4.1.2.1 foi diluído até proporcionar a leitura entre as absorbâncias de 0,7 a 1,0.

## 4.1.2.3. Determinação da lignina e cinzas insolúveis em ácido

A biomassa insolúvel obtida na filtração em cadinho de Gooch foram submetidos a secagem em estufa à 105 °C, em seguida resfriados em dessecador e pesados. Posteriormente foram colocados em mufla à 575 °C para calcinação durante o período de 24 horas, e ao final foram igualmente resfriados e pesados. O teor de cinzas insolúveis foi determinado pela diferença entre a massa do cadinho pós estufa e pós mufla. O teor de lignina em ácido foi determinado pela diferença gravimétrica.

#### 4.2. Pré-tratamento ácido da biomassa

A palha de cana-de-açúcar foi gentilmente cedida pela empresa Raizen. O prétratamento foi realizado com ácido sulfúrico diluído a 1,6% (m/m) na proporção 1:4 (biomassa:ácido) (MOUTTA *et al.*, 2012; SP, 2009). Neste estudo, o ensaio foi realizado em frasco resistente a pressão de 1 L utilizando 40 g de massa seca de palha, 160 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e autoclavado à 130°C durante 30 minutos. Após o resfriamento, a amostra foi submetida a uma prensa manual e o líquido extraído foi neutralizado com NaOH 5 mol/L, caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e utilizado como matéria prima para a produção de hidrogênio e metano.

# 4.3. Caracterização por CLAE dos componentes da biomassa e do hidrolisado hemicelulósico

O cromatógrafo utilizado nesta etapa do trabalho foi o Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific). O ensaio de caracterização química da biomassa *in natura* com a análise dos carboidratos celobiose, glicose, xilose e arabinose, assim como a análise dos carboidratos do hidrolisado ácido hemicelulósico (glicose, xilose e arabinose) foram realizados utilizando uma coluna Aminex HPX – P (Bio-Rad, EUA), uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad, EUA) e um sistema de remoção de cinzas (*deashing system*, Bio-Rad, EUA). As análises foram realizadas em modo isocrático a 80 °C, utilizando como solução móvel água ultrapura no fluxo de 0,6 mL/min. Os carboidratos foram identificados através do detector de índice de refração (RID).

## 4.3.1. Condições cromatográficas

O hidrolisado hemicelulósico também foi analisado pela coluna Aminex HPX-87H a fim de mensurar a concentração dos carboidratos (glicose, xilose e arabinose), ácidos (acético, butírico, fórmico), HMF e furfural. A coluna foi acoplada a uma pré-coluna Carbo-H (Bio-Rad,USA), em um fluxo de 0,6 mL/min utilizando a fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol/L sob a temperatura de 55 °C. A identificação dos açúcares foi realizada utilizando-se detector de índice de refração (RID). Para a detecção dos ácidos, HMF e furfural utilizou-se o detetor UV-Vis com o comprimento de onda de 210 nm (DE SÁ *et al.*, 2011b).

Os resultados foram obtidos através do software Chromaleon (Thermo Scientific) ao comparar os cromatogramas das amostras com a curva analítica contendo faixas de concentrações dos compostos previamente conhecidos: 0,28 a 19,43 mmol/L de glicose, 0,33 a

23,31 mmol/L de xilose e arabinose, 0,18 a 2,92 mmol/L de celobiose, 0,83 a 58,28 mmol/L de ácido acético, 0,58 a 39,72 mmol/L de ácido butírico, 1,08 a 43,40 mmol/L de ácido fórmico, 0,05 a 3,33 mmol/L de HMF e 0,10 a 7,29 mmol/L de furfural,

#### 4.4. Origem e pré-tratamento do inóculo

Neste trabalho o lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto foi utilizado como inóculo. O material foi coletado do digestor anaeróbio de uma estação de tratamento da cidade do Rio de Janeiro e armazenado sobre refrigeração a 8 °C. A estimativa da presença microbiana foi realizada através da metodologia de sólidos suspensos voláteis (SSV) de acordo com as normas recomendadas na literatura (APHA, 1998).

Foi realizado um pré-tratamento térmico sob a 65 °C durante 30 minutos sob agitação a fim de promover a inibição dos microrganismos metanogênicos. Estes são responsáveis pelo consumo de H<sub>2</sub> para produção de metano durante a digestão anaeróbia. Este inóculo foi resfriado até atingir a temperatura de 35 °C e utilizado na produção de hidrogênio.

## 4.5. Produção de H<sub>2</sub>

4.5.1 Avaliação da produção de H<sub>2</sub> a partir do hidrolisado hemicelulósico e meio mimetizado

Estes experimentos foram realizados sob três concentrações iniciais de carboidratos distintas (9, 30, 48 mmol/L), empregando hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima ou meio mimetizado, composto de glicose, xilose e arabinose padrão, em 24 horas de fermentação. O ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a interferência dos compostos provenientes do pré-tratamento ácido da biomassa como o HMF e o furfural.

O meio reacional foi preparado seguindo parâmetros estabelecidos em trabalhos anteriores do Laboratório de Biocatálise (LABIC) do Instituto Nacional de Tecnologia, com algumas modificações (DE SÁ *et al.*, 2020; FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016; GARRITANO *et al.*, 2017). Deste modo, foi realizado em frasco de penicilina de 102 mL, sendo que o volume útil de 45 mL. O meio continha lodo anaeróbio previamente tratado termicamente (SSV de 10000 mg/L), hidrolisado hemicelulósico ou meio mimetizado,

tomando-se como referência três concentrações diferentes de carboidratos totais (9, 30 e 48 mmol/L).

Para o estudo com a fração C5, o pH da matéria-prima foi ajustado para 5 com NaOH 5 mol/L com o propósito de não comprometer a atividade dos microrganismos. Após a adição do hidrolisado, o meio teve o seu pH ajustado para 5,5 com HCl 10 mol/L e os frascos foram purgados com N<sub>2</sub> por 45 segundos com o objetivo de garantir um meio anaeróbio. Em seguida, foram incubados no shaker à 35 °C com rotação de 160 rpm durante 24 horas. Todos os ensaios foram realizados cinco replicatas.

Durante todo o estudo do mestrado, após a fermentação, o gás gerado foi analisado por cromatografia gasosa (CG). A fase líquida foi centrifugada e o sobrenadante coletado, sendo submetido à análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação dos metabólitos gerados e avaliação do consumo de carboidratos

## 4.5.2. Cinética de produção de H<sub>2</sub>

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito do aumento da concentração de substrato relacionando a produção acumulativa de H<sub>2</sub> com a produção/consumo dos ácidos acético, butírico, propiônico, fórmico e o etanol durante 54 horas de fermentação.

O ensaio foi conduzido da mesma maneira da sessão anterior (4.5.1), realizado em frasco de penicilina de 102 mL, com volume útil de 45 mL. O meio reacional foi composto de lodo anaeróbio previamente tratado termicamente (SSV de 10000 mg/L), e hidrolisado hemicelulósico nas concentrações de 9, 30 e 48 mmol/L de carboidratos totais. O pH do meio foi ajustado para 5,5 com HCl 10 mol/L e os frascos foram purgados com N<sub>2</sub>. Foram incubados no shaker à 35 °C com rotação de 160 rpm durante 54 horas, sendo retirados alíquotas nos tempos de 4, 8, 12, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48 e 54 horas.

As curvas de crescimento de  $H_2$  com tempo, obtidas experimentalmente, foram comparadas às curvas estimadas pela equação de Gompertz modificada (Equação 4.5)

$$H \notin = H_{\rho} x \exp \left\{-\exp \left[\frac{R_m xe}{H_{\rho}} (\lambda - 1) + 1\right]\right\}$$

Nesta equação, H(t) corresponde à produção de de H<sub>2</sub> (mol <sub>H2</sub>/mol <sub>carboidratos</sub>) durante o tempo de incubação (t), Hp corresponde ao potencial de produção de H<sub>2</sub> (mol <sub>H2</sub>/mol <sub>carboidratos</sub>), Rm corresponde a taxa máxima de produção de H<sub>2</sub> (mol <sub>H2</sub>/mol <sub>carboidratos</sub>/h) e  $\lambda$  é referente ao tempo de duração da fase adaptativa (fase lag) em horas.

#### 4.5.3 Avaliação da produção de H<sub>2</sub> com aumento de temperatura

Em todos os experimentos o meio reacional foi em frasco de penicilina contendo lodo anaeróbio (10000 mg/L de SSV) e hidrolisado hemicelulósico na concentração de 9 mmol/L em volume útil de 45 mL.

Os experimentos de produção de H<sub>2</sub> foram conduzidos comparativamente utilizando lodo *in natur*a e lodo pré-tratado termicamente (65 °C por 30 minutos) em temperatura de incubação de 50 °C. Estes dois experimentos foram efetuados para averiguar a necessidade de um pré-tratamento térmico do inóculo em uma fermentação termofílica. Portanto, o meio reacional foi composto de lodo anaeróbio e hidrolisado hemicelulósico, com pH de 5,5. Os frascos foram purgados com N<sub>2</sub> e inoculados no shaker à 50 °C sob agitação de 160 rpm por 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em cinco replicatas.

#### 4.6. Produção de CH<sub>4</sub>

#### 4.6.1. Produção de CH<sub>4</sub> sequencial

Nesta etapa do trabalho, utilizamos como matéria-prima o efluente da produção de hidrogênio (EPH) da sessão 4.5.2 que apresentou o melhor rendimento e produtividade do processo. O objetivo desta fase do trabalho é avaliar o potencial de produção de metano a partir do material residual da produção de H<sub>2</sub>.

A fase acidogênica promove acúmulo de ácidos orgânicos e solventes, conforme detalhado nas figuras 8 e 10. Os carboidratos, ácidos acético, butírico, propiônico, fórmico, etanol, HMF e furfural foram analisados e quantificados por CLAE. No entanto, foi mensurado a concentração de todos os compostos orgânicos que constituem as etapas do processo através do ensaio de demanda química de oxigênio (DQO) de acordo com a metodologia padrão APHA para análise de águas e efluentes (APHA, 2017; ZUCCARI; GRANER; LEOPOLDO, 2005).

A digestão anaeróbia foi realizada em frascos de penicilina de 102 mL com volume útil de 45 mL. O meio reacional foi composto de lodo anaeróbio *in natura* e EPH com a mesma relação DQO:SSV (0,77:1) inicial da melhor condição de produção de H<sub>2</sub>. O pH do sistema foi ajustado para 7,0 e os frascos foram purgados com N<sub>2</sub> a fim de garantir a anaerobiose. Assim, foram incubados em uma estufa à 35 °C durante 35 dias.

Amostras dos meios digeridos e do biogás foram coletados nos dias 4, 7, 10, 14, 21, 28 e 35. O biogás foi avaliado por micro-CG e a fração líquida foi centrifugada, o sobrenadante foi retirado, medido a DQO e o consumo dos substratos e formação de metabólitos por CLAE. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.6.2. Produção de metano em um único estágio

A produção direta de metano, ou seja, sem a separação das fases fermentativa e metanogênica foi também estudada para comparar a produção de biometano entre estágio único ou sequencial.

Este ensaio foi realizado utilizando o hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima, na mesma proporção DQO:SSV da produção em dois estágios. Além disso, buscou-se analisar os efeitos dos potenciais inibidores iniciais provenientes do hidrolisado hemicelulósico, HMF, furfural e ácido fórmico, na produção de CH<sub>4</sub>. Neste caso, utilizou-se um meio mimetizado constituído de glicose, xilose, arabinose padrão com a mesma concentração de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico (30 mmol/L) como abordagem comparativa entre os meios.

Ambos experimentos foram realizados em frasco de penicilina com o mesmo volume útil de 45 mL, contendo lodo anaeróbio in natura. O meio reacional contendo fração C5 possui proporção DQO:SSV inicial equivalente a produção em dois estágios (0,77:1). O pH dos meios foi ajustado para 7 e posteriormente os frascos foram purgados com N<sub>2</sub> por 45 segundos e incubados em estufa à 35 °C durante 35 dias. Amostras das frações líquidas e do biogás foram coletados nos dias 4, 7, 10, 14, 21, 28 e 35. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 4.6.3. Estimativa da energia produzida na digestão anaeróbia

A estimativa da quantidade de energia gerada (E+) foi calculada a partir da densidade relativa do H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (0,089 kg-H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>-H<sub>2</sub> e 0.72 kg-CH<sub>4</sub>/m<sup>3</sup>-CH<sub>4</sub>, respectivamente) e seus respectivos poder calorífico inferior (120 MJ/kg-H<sub>2</sub>, 50 MJ/kg-CH<sub>4</sub>) multiplicado pela produção de hidrogênio (Equação 4.6.1) e metano (Equação 4.6.2) (L-H<sub>2</sub>/L, L-CH<sub>4</sub>/L) (Equação 4.6.2) (BITTENCOURTA *et al.*, 2019; CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018).

E (+) H<sub>2</sub> = Produção H<sub>2</sub> \*  $[0.089 \text{ kg-H}_2/\text{m}^3-\text{H}_2 * 1\text{m}^3-\text{H}_2/1000 \text{ L-H}_2] * [120 \text{ MJ/kg-H}_2]$ 

(Eq. 4.6.1)

E (+) CH<sub>4</sub> = Produção CH<sub>4</sub> \*  $[0.72 \text{ kg-CH}_4/\text{m}^3\text{-}CH_4 * 1\text{m}^3\text{-}CH_4/1000 \text{ L-CH}_4] * [50 \text{ MJ/kg-CH}_4]$ (Eq. 4.6.2)

## 4.7. Análise por CLAE dos meios de produção de H2 e CH4

A análise dos carboidratos (glicose, xilose e arabinose), ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, butírico, fórmico e propiônico), etanol, hidroximetilfurfural (HMF), furfural presentes no meio fermentativo e digerido, foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo utilizado nesta etapa do trabalho foi o da Shimadzu (*Shimadzu Corporation*) com um detector UV-VIS (modelo SPD-10AV) conectado em série com um detector de índice de refração (modelo RID-10A). A obtenção e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Class VP 6.1 (*Shimadzu Corporation*).

## 4.7.1. Condições cromatográficas

A análise dos efluentes da produção de  $H_2$  e dos meios digerido foram realizados utilizando a coluna Aminex HPX-87H acoplada a uma pré-coluna Carbo-H (Bio-Rad,USA) em um fluxo de 0,6 mL/min utilizando a fase móvel  $H_2SO_4$  0,05 mol/L sob a temperatura de 55 °C. A quantificação dos açúcares foi realizada utilizando-se detector de índice de refração (RID)

Para a quantificação dos ácidos, etanol, HMF e furfural utilizou-se o detetor UV-Vis com o comprimento de onda de 210 nm (DE SÁ *et al.*, 2011b).

Os resultados foram obtidos através do software Class VP 6.1 ao comparar os cromatogramas das amostras com a curva analítica contendo faixas de concentrações dos compostos previamente conhecidos: 0,28 a 19,43 mmol/L de glicose, 0,33 a 23,31 mmol/L de xilose e arabinose, 0,18 a 2,92 mmol/L de celobiose, 0,83 a 58,28 mmol/L de ácido acético, 0,58 a 39,72 mmol/L de ácido butírico, 1,08 a 43,40 mmol/L de ácido fórmico, 0,67 a 27 mmol/L de ácido propiônico, 1,03 a 65 mmol/L de etanol, 0,05 a 3,33 mmol/L de HMF e 0,10 a 7,29 mmol/L de furfural,

## 4.8. Análise por Cromatografia Gasosa (CG) da produção de H2 e CH4

A análise de biogás com relação a concentração de H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foi realizado por cromatografia gasosa. Neste trabalho foi utilizando o micro cromatógrafo a gás modelo 3000A da Agilent (*Agilent Techonologies*), equipado com dois canais e um detector de condutividade térmica (TCD). A obtenção e o tratamento dos dados foram controlados pelo software Cerity QA-QC (*Agilent Corporation*).

#### 4.8.1 Condições cromatográficas

As colunas utilizadas para análise do biogás foram: HP-PLOT U (3 m x 0,320 mm x 30  $\mu$ m) sob temperatura de 90 °C e HP-PLOT Molecular sieve 5V (10 m x 0,32 mm x 12  $\mu$ m) sob a temperatura de 100 °C. A temperatura do injetor foi de 90 °C e a temperatura de entrada da amostra foi de 110 °C. Hélio e nitrogênio foram utilizados como gases de arraste nas colunas HP- PLOT U e HP-PLOT Molecular sieve 5A, respectivamente.

A quantificação das amostras foi realizada através de uma curva analítica gerada com um controlador de vazão, misturando o gás de interesse  $H_2$ ,  $CH_4$  e  $CO_2$  com nitrogênio a fim de alcançar as porcentagens desejadas, sendo elas de 5 a 100%. A quantificação dos gases foi realizada com o auxílio da equação dos gases (Eq. 4.10) para a determinação do volume de  $H_2$ e  $CH_4$ .

$$V = P_T V_T / P_{atm} (\% \text{ gás de interesse})$$
(Eq. 4.8)

Sendo: P<sub>T</sub>: pressão total medida com um manômetro mais a pressão atmosférica, antes da retirada da amostra analisada no micro CG

V<sub>T</sub>: Volume Total subtraído o volume de trabalho Patm: pressão atmosférica

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Caracterização da biomassa

A caracterização da palha de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi realizada no intuito de investigar a composição do resíduo e o potencial de extração da hemicelulose para a produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. A palha de cana-de-açúcar pode apresentar teores variados de hemiceluloses entre 23–31%, de celulose entre 29-44% e de lignina entre 19-34%, de extrativos entre 8-22% e de cinzas entre 2-6% (DE SALES *et al.*, 2017; MENANDRO *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2015; MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014; MOUTTA *et al.*, 2013).

As variações de valores são referentes às diferentes condições de plantio, como fertilidade do solo, irrigação, condições climáticas na colheita, localização e ciclos de cultivo (ALI *et al.*, 2018; MENANDRO *et al.*, 2017; MORO *et al.*, 2017). Além disso, a palha consiste em topos verdes (pontas das plantas verdes) e folhas secas (folhas senescentes mais antigas) e a composição química da biomassa pode mudar de acordo com estas regiões físicas do vegetal (MENANDRO *et al.*, 2017).

Neste trabalho, a palha analisada apresentou  $23\% \pm 1,4$  de hemicelulose na composição estrutural,  $29\% \pm 1,9$  é de celulose,  $20\% \pm 0,79$  de lignina, os extrativos corresponderam 15%  $\pm 1,6$  e a cinzas à 8%  $\pm 0,5$ , conforme apresentado na figura 13.



Celulose Hemicelulose Lignina Extrativos Cinzas

Figura 13. Composição química do lote único de palha de cana-de-açúcar gentilmente fornecida pela empresa Raízen e caracterizada conforme os protocolos "Determination of Extractives in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2005) e "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2012).

As cinzas são a parte da biomassa remanescente da queima, referente a compostos inorgânicos (FERNANDES *et al.*, 2015). Estudos demonstram que entre os compostos e elementos encontrados nas cinzas da palha estão dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>), óxido de potássio (K<sub>2</sub>O), óxido de cálcio (CaO), cloro (Cl), enxofre (S) (MENANDRO *et al.*, 2017; VASSILEV *et al.*, 2010). Estes são disponibilizados através dos fertilizantes, podendo ser absorvidos pelas plantas durante seu crescimento, e/ou resultar em impurezas minerais. O silício (Si) é utilizado para promover fortalecimento da parece celular do caule e das folhas e pode aumentar a resistência da planta à pragas (FILGUEIRAS, 2007). A cana-de-açúcar acumula Si através do ácido monosilícico (H4SiO<sub>4</sub>) presente no solo, no qual é absorvido pela raiz e transportado através do xilema para o sistema de transpiração foliar. Contudo, aproximadamente 80% de todo Si absorvido pela cana está presente na palha (HAYNES, 2017; SANTOS, 2017).

Diferenças físico-químicas da palha quando comparada ao bagaço estão relacionadas ao teor e composição elementar das cinzas (JACOME, 2018). Um alto conteúdo de cinzas indica estes elementos como impurezas minerais e uma menor quantidade de matéria combustível, sendo reportado na literatura que acima de 7% comprometem a combustão integral ou em mistura com bagaço, prejudicando o poder calorífico, assim como resulta na formação de depósitos nas caldeiras durante a queima (JACOME, 2018; MENANDRO *et al.*, 2017;

VOIGTLANDER; SEYE, 2011). Neste contexto, a palha analisada possui alto teor de cinzas, ampliando a discussão de melhores e mais eficientes estratégias de obtenção de energia desta biomassa

Os demais resultados referentes à composição da palha estão condizentes com as faixas encontradas na literatura e o balanço de massa foi de 95%, valor considerado satisfatório considerando a complexidade da biomassa.

#### 5.2. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

O pré-tratamento com ácido diluído permite a liberação de monômeros de açúcar da estrutura lignocelulósica, principalmente derivados de hemicelulose, com eficiência de 70% a 90% de recuperação dos açúcares (DA SILVA *et al.*, 2013a; GÍRIO et al., 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Embora exista muita preocupação ambiental, o uso do ácido diluído em pré-tratamentos ainda tem sido muito utilizado industrialmente por ser realizado em baixas temperaturas comparado a outros processos, como a explosão a vapor e pré-tratamento hidrotérmico (GÍRIO *et al.*, 2010; MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014).

O fator de severidade combinada, desenvolvido por Chum *et al* (1990), foi utilizado para comparar a severidade de pré-tratamentos, considerando pH como um dos fatores. Foi desenvolvido com base no fator de severidade [ $R_0$ ] em que se refere ao efeito da temperatura do vapor e do tempo de permanência na temperatura, demonstrado na equação 5.1. Quanto maior esse fator, mais agressivo é o pré-tratamento (CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990; FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

 $Log R_0 = log [t exp [(T - 100)] / 14,75$  (Equação 5.1)

Onde:

T = temperatura em que foi realizado o pré-tratamento (  $^{\circ}C$  )

t = tempo de residência do material no reator (minutos)

Esta equação permite identificar o quão severo é o pré-tratamento, entretanto o pH é uma variável importante nesta análise, permitindo comparar diferentes pré-tratamentos. Utilizando os mesmos parâmetros de temperatura e tempo sem levar em consideração pH para comparar pré-tratamentos ácido e hidrotérmico por exemplo, ambos podem apresentar a mesma severidade. Assim sendo, esta variável foi adicionada à severidade do pré-tratamento, sendo denominada fator combinado de severidade (FCS), demonstrado na equação 5.2 (MORI, 2015; NICOLA, 2017).

$$FCS = \log (R_0) - pH_{(final)}$$
(Eq. 5.2)

Um pré-tratamento realizado com baixa severidade pode ser ineficiente na despolimerização das frações do material lignocelulósico, e um pré-tratamento de alta severidade pode levar a formação de compostos indesejáveis como HMF e Furfural.

Neste estudo, o FSC foi de 1,36. Apesar do pré-tratamento ácido ser mais severo quando comparado ao hidrotérmico, as condições utilizadas neste trabalho podem ser consideradas brandas (BAZETTO, 2018). De acordo com Kumar (2012), o FSC em torno de 1,94 é tido como de baixa severidade não havendo formação de pseudo-lignina. O mesmo autor observa a formação de pseudo-lignina em FSC de 3,5, no qual há a repolimerização de carboidratos e/ou compostos furânicos promovendo a formação de novas ligações carbono-carbono (C-C), gerando compostos aromáticos semelhantes à lignina nativa (BITTENCOURTA *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2012).

Com os resultados obtidos no presente estudo, a eficiência calculada para a solubilização da fração hemicelulósica foi de 79%. Os parâmetros referentes às características do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento são apresentados na tabela 3. A concentração de cada analito está apresentado em g/L e mmol/L para facilitar na compreensão dos próximos resultados visto que os rendimentos da fermentação estão apresentados em mol de H<sub>2</sub> por mol de carboidratos (tópico 5.3) pra serem comparativos com os valores encontrados na literatura.

Parâmetro	g/L	mmol/L
Glicose (g/L)	$8,\!22 ~\pm~ 0,\!16$	45,63
Xilose (g/L)	$33,76 ~\pm~ 0,18$	224,87
Arabinose (g/L)	$4,\!58~\pm~0,\!47$	30,51
Ácido acético (g/L)	$8,33~\pm~0,34$	138,72
Ácido fórmico (g/L)	$1,\!68~\pm~0,\!35$	36,5
HMF (g/L)	$0,65 \pm 0,01$	5,15
Furfural (g/L)	$0{,}68~\pm~0{,}06$	7,08
pH	1,15	
Eficiência (%)	79	

Tabela 3. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar obtido após pré-tratamento com ácido diluído (H2SO<sub>4 =</sub> 1,6% (m/m)) na proporção 1:4 (palha:ácido); 130°C por 30 min).

\*HMF: 5-hidroximethil-2-furaldehido

A xilose foi o principal produto obtido da hidrólise correspondendo a 33,76 g/L, representando 72% da quantidade total de açúcares que compõem o hidrolisado. Em menores concentrações são observados os demais carboidratos provenientes da hemicelulose, a glicose e arabinose apresentando 8,22 e 4,58 g/L, respectivamente. A maior concentração de xilose comparado a glicose, indica que a estrutura das hemiceluloses foi mais facilmente hidrolisada do que a celulose neste pré-tratamento, sendo esta última preservada nas condições utilizadas.

 $85117 \pm 4634$ 

A dissociação do ácido sulfúrico promove o aumento da concentração de íons hidrônio no meio (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>). Estes íons são os responsáveis por catalisar a reação de hidrólise nos grupos acetil da glucoarabinoxilana, resultando na liberação do ácido acético livre, segundo composto predominante no hidrolisado apresentando a concentração de 8,33 g/L (138,67 mmol/L) (CARVALHO *et al.*, 2017a; RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014). Adicionalmente, a diminuição do pH causada pelos ácidos sulfúrico e acético aceleram a reação de hidrólise nas ligações éter da xilana, levando a liberação dos carboidratos em sua conformação monomérica (BITTENCOURTA *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2013a).

Em altas concentrações no meio fermentativo, o ácido acético se comporta como um inibidor da produção de H<sub>2</sub>, podendo penetrar a membrana celular dos microrganismos provocando a diminuição do pH intracelular e dos níveis de ATP (ELBESHBISHY *et al.*, 2017). Os efeitos são principalmente observados na fase acidogênica. Contudo, o ácido acético é um metabólito intermediário da digestão anaeróbia, sendo reportado na literatura que por este motivo há uma tolerância ao ácido proveniente do hidrolisado hemicelulósico pelo consórcio microbiano (MONLAU *et al.*, 2014; SÁ, 2015; SILVA; FERREIRA-LEITAO; CAMMAROTA, 2019; WANG; WAN; WANG, 2008). A avaliação do efeito do ácido acético na produção de H<sub>2</sub> será discutido em detalhe a seguir no tópico 5.3.

O HMF é proveniente da degradação térmica da glicose. Nesta degradação, a glicose é desidratada primeiramente em HMF. Em contrapartida, o furfural é exclusivamente gerado através das pentoses, xilose e arabinose, liberadas da fração hemicelulósica (MONLAU *et al.*, 2014; RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014). Frações de ambos os compostos são convertidos em ácido fórmico (1,68 g/L) decorrente da alta temperatura do pré-tratamento.

Os furânicos são considerados compostos inibitórios da produção de  $H_2$  em concentrações variadas, em que é observado com significativo impacto acima de 1 g/L (QUÉMÉNEUR *et al.*, 2012). Estes causam deterioração da membrana celular do

microrganismo, induz danos do material genético e inativam várias enzimas da via glicolítica (ELBESHBISHY *et al.*, 2017; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Neste hidrolisado, as concentrações recuperadas de HMF e furfural foram de aproximadamente 0,65 g/L e 0,68 g/L, respectivamente 5 e 7 mmol/L. A formação destes compostos é baixa comparado aos trabalhos que utilizaram o pré-tratamento hidrotérmico no bagaço de cana-de-açúcar (BITTENCOURTA *et al.*, 2019; DE SÁ *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2017). Bittencourta e colaboradores em 2019, e também Ribeiro e colaboradores, em 2017 obtiveram a concentração de 11,92 g/L e 6,58 g/L de ácido fórmico, 1,33 g/L e 3,93 g/L de furfural, 0,58 e 7,82 g/L de HMF, respectivamente. Conforme mencionado anteriormente a concentração destes compostos está relacionada à severidade dos tratamentos. Os efeitos do furfural e HMF na produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> serão analisados nos tópicos 5.3 e 5.6.

Apesar das limitações que este método apresenta, o hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido vem sendo apresentado como uma matéria-prima promissora para produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (BARAKAT *et al.*, 2014; DE SÁ *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2018). Em concentrações bem estabelecidas, as pentoses e hexoses são de fácil assimilação pelos microrganismos para obtenção de energia e geração dos subprodutos, enquanto o ácido acético, pode ser convertido em metano pelas arqueias acetoclásticas (SANTOS *et al.*, 2018b; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018).

## 5.3 Produção de H<sub>2</sub>

5.3.1 Avaliação comparativa da produção de  $H_2$  a partir do hidrolisado hemicelulósico e meio mimetizado

Os primeiros ensaios para avaliação do potencial de produção do gás hidrogênio foram realizados em 24 horas em três concentrações iniciais distintas de carboidratos. Análises comparativas entre o hidrolisado hemicelulósico e o meio mimetizado foram feitas a fim de avaliar a interferência dos compostos furânicos, HMF e furfural provenientes do pré-tratamento da palha no processo fermentativo (Tabela 4).

Concentração inicial de carboidratos (mmol/L)	Concentração inicial de xilose (mmol/L)	Meio	Tempo (h)	Consumo de xilose (%)	Consumo de carboidratos (%)	Ácido acético (mmol/L)	Ácido butírico (mmol/L)	Rendimento (mol <sub>H2</sub> /mol <sub>xilose</sub> )	Rendimento (mol H2/mol carboidatos totais)
9	7 -	Hidrolisado Hemicelulósico	0	-		$5,\!64 \pm 0,\!4$	0	1,63 ± 0,08	1,13 ± 0,04
			24	100	100	$8,\!84\pm0,\!1$	$5,\!17\pm0,\!2$		
		Meio mimetizado	0	-		0	0	1,73 ± 0,1	1,17 ± 0,07
			24	100	100	$3,66 \pm 0,6$	$5{,}45\pm0{,}01$		
30	20	Hidrolisado Hemicelulósico	0	-		$11,\!49\pm1,\!7$	0	1,56 ± 0,13	1,13 ± 0,07
			24	55	65	$22,28 \pm 1,7$	$12,98 \pm 0,6$		
		Meio mimetizado	0	-		0	0	1,36 ± 0,1	1,10 ± 0,03
			24	57	67	$7,\!76\pm0,\!01$	6,13 ± 0,03		
48	36 -	Hidrolisado Hemicelulósico	0			$10,\!90\pm0,\!1$		0,79 ± 0,01	0,52 ± 0,01
			24	52	61	$23,\!77\pm1,\!7$	$11,7\pm0,01$		
		Meio mimetizado	0			0	0		
			24	50	60	$5,08 \pm 0,04$	$4,\!15\pm0,\!3$	$0,75 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$

Tabela 4. Avaliação comparativa da produção de  $H_2$  utilizando hidrolisado hemicelulósico obtido através do pré-tratamento com ácido diluído e meio mimetizado em três concentrações diferentes de carboidratos iniciais durante 24 h em 35 °C.

O uso dos carboidratos provenientes da fração C5 na fermentação, além de produzir os gases de síntese H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, gera como sub produtos da fermentação os ácidos acético e butírico (ELBESHBISHY *et al.*, 2017; OKOLIE *et al.*, 2020). Sendo assim, é caracterizada como uma fermentação do tipo acético-butírica (CORRALE *et al.*, 2015). As equações abaixo demonstram o rendimento máximo teórico da produção de H<sub>2</sub> a partir das duas vias metabólicas, utilizando a glicose e xilose como substrato (ABDUL *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018).

Pentoses: 
$$C_5H_{10}O_5 + 1.67 H_2O \rightarrow 1.67 CH_3COOH + 3.33 H_2 + 1.67 CO_2$$
 (1)

$$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0.83 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 1.67 \text{ H}_2 + 1.67 \text{ CO}_2$$
 (2)

Hexoses: 
$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$$
 (3)

$$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2 CO_2$$
(4)

As reações (1) e (3) são referentes à conversão de pentoses e hexoses, respectivamente, em  $H_2$  e ácido acético, enquanto as equações (2) e (4) representam a produção de H2 com a concomitante formação de ácido butírico.

É importante destacar que não houve produção de metano durante as 24 h do processo de fermentação, evidenciando um pré-tratamento satisfatório do lodo anaeróbico utilizado como inóculo.

Na comparação entre o meio contendo hidrolisado hemicelulósico, e o meio mimetizado com acúcares padrão, foi possível observar que não houve diferença estatística nos valores dos rendimentos com base na análise estatística t-student.

Em relação aos compostos furânicos, os impactos na produção e no rendimento de H<sub>2</sub> em culturas mistas são observados quando concentrações iguais ou acima de 1 g/L estão presentes na matéria-prima, apresentando diminuição de aproximadamente 69% do rendimento com furfural e de 76% para HMF (NASR *et al.*, 2014; QUÉMÉNEUR *et al.*, 2012).

Foi relatado que em situações onde estes compostos são adicionados de maneira combinada no meio, as concentrações mencionadas acima causam efeitos negativos na produção de H<sub>2</sub> mas não há a inibição total de produção, ou seja, para observar os efeitos inibitórios os compostos devem estar em maiores concentrações. Isto pode ser devido à presença de outros compostos endógenos provenientes do hidrolisado com potencial inibitório e exercerem um efeito sinérgico, diminuindo consideravelmente o valor limiar de inibição dos furânicos comparado a estes produtos separadamente (QUÉMÉNEUR *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Hu (2018) utilizando hidrolisado ácido da fração hemicelulósica, detofixificado com lacase ou NaBH<sub>4</sub>, foi observado que apesar de não inibir por completo, a produção de H<sub>2</sub> se desenvolveu de maneira lenta (HU *et al.*, 2018). Assim, as concentrações de HMF e furfural encontrados na fração C5 deste estudo, obtida após o pré-tratamento com ácido diluído, estiveram abaixo dos valores considerados inibitórios da fermentação (Tabela 3) e não foram os responsáveis pela diminuição do rendimento do processo. Portanto, sob esta condição de tratamento da biomassa (1,6% (m/m)) na proporção 1:4 (palha:ácido); 130°C por 30 min), a detofixificação do hidrolisado não se faz necessária.

Os ácidos acético e butírico também são descritos como limitantes do processo, principalmente em concentrações acima de 12 mM, no qual já é possível observar a diminuição do rendimento, enquanto a interrupção total da produção é observada com 300 mM (ELBESHBISHY *et al.*, 2017; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015; WANG; WAN; WANG, 2008). Neste estudo, S2 e S3 contém aproximadamente 11 mmol/L de ácido acético proveniente do hidrolisado e durante a fermentação de 24h foram produzidos adicionais 22 mmol/L de ácidos (acético e butírico). É relatado que nesta concentração já é possível observar efeitos da alteração do metabolismo microbiano onde há inibição por produto em que o H<sub>2</sub> e os ácidos são reutilizado para produzir acetona-butanol-etanol (MORAES *et al.*, 2019; PATAKOVA *et al.*, 2013).

A fim de avaliar a influência da concentração inicial de carboidratos, e consequente interferência do HMF e furfural, ácido acético e metabólitos produzidos, foi realizada uma cinética de produção de  $H_2$  que está detalhada no item 5.3.2.

## 5.3.2 Cinética de produção de H<sub>2</sub>

Diferentes concentrações de carboidratos totais no meio foram utilizadas para avaliar a produção de  $H_2$  com aumento de concentração de substrato, consequentemente avaliar a influência dos ácidos formados durante o processo fermentativo. Os meios foram classificados em três sistemas de acordo com suas concentrações: Sistema 1 (S1) = 9 mmol/L, Sistema 2 (S2) = 30 mmol/L e Sistema 3 (S3) = 48 mmol/L.

A figura 14 apresenta a cinética de consumo de carboidratos e rendimento de produção de H<sub>2</sub> do sistema 1 (Fig. 14 A), sistema 2 (Fig. 14 B) e sistema 3 (Fig. 14 C). Com o aumento da concentração de 9 para 30 mmol/L foi possível observar um aumento de aproximadamente 26% do rendimento no sistema 2. O rendimento máximo de S1 foi em 18h de fermentação (1,28

mol  $_{H2}$ / mol  $_{carboidratos}$ ) e em 36 h no S2 (1,75 mol  $_{H2}$ / mol  $_{carboidratos}$ ). S3 apresentou seu maior rendimento em 48 horas de fermentação, com 1,48 mol  $_{H2}$ / mol  $_{carboidratos}$ .





Figura 14. Cinética de consumo de substrato e rendimento de produção de H2 ao longo de 54 h de fermentação utilizando as concentrações de 9 mmol/L (A), 30 mmol/L (B), 48 mmol/L (C).

Apesar da xilose ser o carboidrato predominante no meio, a glicose é o primeiro açúcar a ser consumido pelos microrganismos. Em uma análise da expressão genética do metabolismo do microrganismo do gênero *Clostridium* durante a fermentação, em um meio contendo xilose e glicose foi observado, baseado nos dados do transcriptoma, que os genes responsáveis pela expressão de proteínas de transporte da xilose através da membrana apresentam nível baixo de transcrição. No entanto, os genes relacionados à expressão de enzimas de consumo de xilose, como a xilose isomerase e xilulose quinase apresentam maior nível de transcrição, porém ainda de maneira insuficiente para aumentar o consumo de xilose comparado ao da glicose (GRIMMLER *et al.*, 2010; NAKAGAWA, 2017). Quando a hexose é totalmente consumida, a transcrição destes genes aumentam (GRIMMLER *et al.*, 2010; OUNINE *et al.*, 1985). Portanto, trata-se de um mecanismo de repressão catabólica por glicose que retarda o consumo da xilose.

Além disso, um estudo realizado por Desai e Rao (2010) demonstra que algumas bactérias anaeróbias e facultativas tendem a utilizar preferencialmente a arabinose em um meio alimentado com misturas de pentoses (arabinose e xilose). Com arabinose no meio, há uma

alteração no metabolismo ocasionando uma repressão catabólica na assimilação da xilose. Isto explica o fato deste carboidrato ser o último a ser consumido nos sistemas (figura 14) (DESAI; RAO, 2010).

Neste mesmo contexto, nos sistemas S1 e S2 foi possível verificar o início da produção de H<sub>2</sub> em aproximadamente 8 h de fermentação, enquanto no sistema 3 se observou a produção em 10 h de processo. Apesar de S1 e S2 apresentarem uma fase adaptativa similar, a produção de H<sub>2</sub> em S2 é mais lenta. Provavelmente este fenômeno está relacionado ao consumo de glicose como fonte preferencial de carbono, visto que este encontra-se em baixas concentrações nos dois sistemas. Sendo assim, devido a maior concentração de açúcares totais em S2, a degradação de carboidratos foi mais lenta, principalmente a xilose. O mesmo pode ser observado em S3, porém este apresenta rendimento inferior aos demais sistemas, demonstrando que pequenos aumentos na concentração de substrato inicial impactam na eficiência dos microrganismos em degradá-los, implicando na diminuição do consumo de substrato e rendimento (DE SÁ *et al.*, 2020; JIANLONG; WEI, 2008). Entre os fatores que podem ser relacionados a este efeito inibitório estão o aumento da concentração de substrato e consequente aumento do acúmulo de ácidos orgânicos, assim como o aumento da osmolaridade das células no meio fermentativo (ELBESHBISHY *et al.*, 2017).

A figura 15 mostra o consumo e produção de metabólitos solúveis em relação a concentração de hidrogênio no sistema 1 (Fig. 15 A), sistema 2 (Fig 15 B) e sistema 3 (Fig 15 C). O comportamento dos compostos furânicos foi apresentado em gráficos separados devido à baixa concentração desses compostos nestes sistemas, Sistema 1 (Fig. 15 D), Sistema 2 (Fig. 15 E) e sistema 3 (Fig. 15 F).





Figura 15. Produção e consumo de metabólitos solúveis na produção de H2 ao longo de 54 h de fermentação no sistema 1 (A) e (D), sistema 2 (B) e (E), sistema 3 (C) e (F).



As análises do EPH (efluente da produção de H<sub>2</sub>) demonstraram que os principais metabólitos produzidos pelo consórcio microbiano foram os ácidos acético, butírico e etanol. Estes encontram-se acumulados no meio devido à ausência das arquéias metanogênica. Como esperado, com o aumento da concentração de substrato há o aumento da concentração dos metabólitos solúveis, como já foi descrito em trabalhos na literatura (DE SÁ *et al.*, 2020; JIANLONG; WEI, 2008; YANG; WANG, 2019).

Com a menor concentração de substrato em S1, a produção de hidrogênio atingiu o ponto máximo em 18 h. Após este mesmo tempo já é observado o esgotamento de substrato assim como o consumo de H<sub>2</sub> acompanhado com a produção de ácido acético. Este comportamento é descrito pela via metabólica Wood-Ljungdahl, em que há consumo de H<sub>2</sub> como doador de elétrons pela população microbiana homoacetogênica a produção de ácido acético acético (Equação 5.3) (DRAKE, 1994; RAGSDALE; PIERCE, 2008).

$$4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O}$$
 (Eq. 5.3)
É conhecido que a maioria dos microrganismos homoacetogênicos no sistema fermentativo pertence ao gênero *Clostridium* e como são formadores de esporos, não são eliminados durante o pré-tratamento podendo ser reativados quando as condições forem reestabelecidas. O controle da homoacetogênese é fundamental para a produção de H<sub>2</sub> e o grande desafio que vem sendo foco de estudos. Sem métodos integralmente eficientes na inibição das homoacetogênicas, o controle de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> é considerado como a alternativa mais adequada (CASTELLÓ *et al.*, 2020; SAADY, 2013).

O ácido acético, assim como o ácido butírico, em suas formas não dissociadas e em baixo pH podem penetrar a membrana celular do microrganismo, dissociar-se e diminuir pH interno da célula. Os ânions promovem aumento da osmolaridade do citoplasma, assim como a pressão de turgor no interior da célula e os prótons diminuem o pH intracelular, ao passo que isto pode implicar na ativação de enzimas essenciais da solventogênese. Estes efeitos são prejudiciais para o metabolismo e crescimento microbiano e são potencialmente inibidores da produção de H<sub>2</sub> (ELBESHBISHY *et al.*, 2017). Em todos os sistemas deste estudo há presença inicial de ácido acético proveniente do hidrolisado hemicelulósico. Os sistemas S2 e S3 iniciam em concentração de ácido acético em torno de 11 mmol/L. Em S2 é observado consumo de H<sub>2</sub> e  $CO_2$  após 36 horas de fermentação enquanto em S3 ocorre em 48 h.

É relatado que na concentração de 11,8 mmol/L de ácido acético há efeito inibitório na fermentação e concentração de 19 mmol/L de acético e butírico, além de inibição há também a alteração da via metabólica para a solventogênese (GINKEL; LOGAN, 2005; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

Apesar de ser encontrado na literatura atividade solventogênica a partir de 19 mmol/L de ácidos, o etanol é detectado nos três sistemas (S1, S2 e S3) quando a produção destes ácidos atinge a concentração mínima de aproximadamente 5 mmol/L e o meio já contém ácido acético proveniente do hidrolisado. Como isto é observado em todos os sistemas, independente da concentração inicial de ácido acético, pode indicar que os ácidos produzidos pelas bactérias sejam mais prejudiciais à produção de H<sub>2</sub> do que os derivados de fontes externas, como o da fração C5. Como mencionado anteriormente, com o aumento da concentração inicial de carboidratos há o consequente acúmulo de ácidos orgânicos e diminuição da taxa de degradação dos açúcares. Considerando os efeitos dos ácidos orgânicos sobre o sistema de produção de H<sub>2</sub>, foi avaliado por Sá e colaboradores (2015) o aumento da concentração de substrato em meios contendo ácido acético e ácido butírico em concentrações conhecidas em meio tamponado comparativamente a um meio não tamponado. Neste conjunto de experimentos foi constatado

que a utilização de tampão para controle do pH não favorece o consumo de substrato e a produção de H<sub>2</sub>. Portanto, a concentração de ácidos gerados não dissociados em meio com baixo pH não é o único fator que associado a diminuição da produção de hidrogênio. O aumento da concentração de substrato e a concentração de ácidos no meio podem aumentar a osmolaridade do sistema interferindo no metabolismo dos microrganismos, inibindo o crescimento microbiano e podendo provocar a desestruturação da célula (ELBESHBISHY et al., 2017; SÁ, 2015). Este fenômeno poder ser relacionado ao fato de não haver consumo total de carboidratos em S3 e por ser o sistema com maior concentração de carboidratos inicial. Os ácidos além de contribuírem para o aumento da osmolaridade, podem deslocar o equilíbrio da reação no sentido oposto ao desejado por serem os principais metabólitos solúveis.

A produção de etanol ocorre através de uma inibição por produto, provocada pelos ácidos gerados e/ou pelo próprio H<sub>2</sub>, em que a elevada pressão parcial do H<sub>2</sub> pode causar alteração da via metabólica para a produção de solventes (Equação 5.3.2). O processo biológico para a produção de etanol ocorre pela fermentação acetona-butanol-etanol (ABE) realizada por microrganismos do gênero *Clostridium* onde o H<sub>2</sub> é consumido para reduzir a molécula de NAD<sup>+</sup> quando não há mais formação de próton H<sup>+</sup> proveniente da degradação dos açúcares para equilibrar o poder de redução intracelular. Assim, esses compostos são formados utilizando o NADH como carreador de elétrons pelas enzimas acetaldeído desidrogenase e etanol desidrogenase para a formação de etanol (ELBESHBISHY *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2019; YANG; WANG, 2018).

CH<sub>3</sub>COOH (ácido acético) + 2 H<sub>2</sub> 
$$\rightarrow$$
 C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O + H<sub>2</sub>O Eq. 5.3.2

A solventogênese do etanol também ocorre pela degradação anaeróbia da xilose, conforme apresentado na equação 5.3.3 (MOCKAITIS *et al.*, 2020).

$$3 C_5 H_{10} O_5 \text{ (xilose)} + 5 C_2 H_6 O \rightarrow 5 CO_2$$
 Eq. 5.3.3

Além disso, um estudo realizado por Mockaitis (2020) avaliou diferentes prétratamentos do inóculo para produção de H<sub>2</sub> utilizando xilose como substrato. O pré-tratamento térmico do inóculo apresenta maior produção de etanol comparado ao pré-tratamentos ácido. É provável que o pré-tratamento térmico proporcione melhores condições de sobrevivência de microrganismos da fermentação ABE. Portanto, a alta produção de etanol nos sistemas deste presente estudo (S1 = 19,26 ± 0,81 mmol/L; S2 = 63 ± 1,34 mmol/L; S3 = 63,34 ± 0,40 mmol/L) pode ser relacionada à mudança de metabolismo para a solventogênese decorrente da concentração de  $H_2$ , carboidratos, ácidos gerados e pH, assim como pela seleção dos microrganismos no pré-tratamento do inóculo.

Presente desde o início do processo, o ácido propiônico pode ser proveniente da degradação de compostos orgânicos complexos do lodo anaeróbio. A pequena produção observada em S1 era esperada já que este composto é um intermediário comum do metabolismo de açúcares quando há acúmulo de hidrogênio no meio (SPEECE, 1983). O seu consumo observado no sistema S2 é relacionado à oxidação anaeróbia para geração de H<sub>2</sub> e acetado (APPELS *et al.*, 2008).

Proveniente da matéria-prima, o ácido fórmico também pode ser aproveitado como fonte de carbono por bactérias anaeróbias para produção de H2 (PANAGIOTOPOULOS et al., 2011). A reação de conversão do ácido fórmico à hidrogênio é realizada pelo complexo FHL e a sua biossíntese é dependente da concentração deste ácido na célula (ROSSMANN; SAWERS; BOCK, 1991). Para que este composto seja utilizado como substrato pelos microrganismos, deve estar presente no meio em concentrações em torno de 25 mmol/L (YOSHIDA et al., 2005). Neste estudo, a concentração de ácido fórmico ficou constante nos sistemas S1 e S2, durante as 54 horas de fermentação. Assim sendo, o ácido não foi consumo significativo, ou seja, o ácido não foi consumido como fonte de carbono pelos microrganismos visto que haveria gasto energético da célula para síntese das enzimas do complexo. Embora os compostos HMF e furfural tenham sido descritos como potenciais inibidores dos microrganismos produtores de H<sub>2</sub>, estes compostos foram totalmente consumidos em S1 (0,31  $\pm$  0,01 mmol/L) e S2 (0,66  $\pm$  0,06 mmol/L), não apresentaram impactos negativos a produção de H<sub>2</sub>. Em S3 a concentração final de furfural em 54h de fermentação  $(0.94 \pm 0.08 \text{ mmol/L})$  é estatisticamente igual a inicial  $(0.91 \pm 0.2 \text{ mmol/L})$ . É descrito na literatura que algumas espécies de bactérias gram-negativas possuem a capacidade de evitar e reparar os danos causados pelo HMF e furfural. Adicionalmente, é reportado na literatura que microrganismos como a *Escherichia coli* que estão presentes no lodo de esgoto, podem degradar os compostos furânicos e utilizá-los como fonte de carbono durante a fase de crescimento. (SÁ, 2015; ZHANG; HAN; EZEJI, 2012). Há também microrganismos produtores de H<sub>2</sub> como Thermo desulfovibrio sp, presente em consócio microbianos que degradam estes compostos tóxicos (KONGJAN et al., 2010). Estes estudos mostram a capacidade dos microrganismos de assimilarem estes compostos. Em S3 não houve consumo total dos compostos furânicos, podendo ser relacionado a um efeito de repressão catabólica gerado pela concentração de carboidratos deste sistema.

#### 5.3.3 Equação de Gompertz

O potencial de produção de H<sub>2</sub> (H<sub>p</sub>), a taxa de produção de H<sub>2</sub> (R<sub>m</sub>) e o período de fase adaptativa (fase lag) ( $\lambda$ ) podem ser estimados através da equação de Gompertz modificada<sup>2</sup> (BARRERA-QUINTERO *et al.*, 2017). A tabela 5 apresenta os valores de H<sub>p</sub>, R<sub>m</sub> e  $\lambda$  para cada sistema.

Sistema	Hp (mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidrato</sub> )	Rm (mol <sub>H2</sub> /mol <sub>carboidrato</sub> /h)	$\lambda$ (h)	R <sup>2</sup>
1	1,26	0,16	6	0,84
2	1,61	0,08	6	0,96
3	1,23	0,07	10	0,96

Tabela 5. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção de H<sub>2</sub> estimados pela equação de Gompertz

Este modelo matemático descreve o comportamento da produção acumulada de hidrogênio relacionada à uma cultura microbiana pura, ou seja, não leva em consideração como fator de diminuição do rendimento o consumo dos metabólitos no meio devido à presença de microrganismos consumidores de H<sub>2</sub>.

Neste estudo, o modelo modificado de Gompertz foi eficiente na predição do tempo de fase adaptativa e na curva de crescimento sigmoidal, podendo ser observado na figura 16. Contudo, em um meio complexo contendo hidrolisado hemicelulósico e lodo anaeróbio, há diversos fatores que influenciam a produção de hidrogênio acarretando diferenças entre os dados estimados e os dados coletados nos experimentos, principalmente no que se relaciona à presença de microrganismos consumidores de H<sub>2</sub>, considerando a cultura mista utilizada.

No entanto, os sistemas 2 e 3 apresentaram os melhores ajustes ao modelo com  $R^2 = 0,96$ , indicando que o máximo rendimento em mol de H<sub>2</sub> por mol de carboidratos em S2 seria 1,61 e em S3 de 1,23, nas melhores condições. Sendo assim, podemos afirmar que a produção de H<sub>2</sub> com uma concentração de 30 mmol/L de carboidratos iniciais em 36 h de fermentação, e

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Equação de Gompertz modificada  $H(t) = Hp. exp \{-exp [Rm. e/Hp]. (\lambda - t) + 1]\}$ , onde Hp = potencial de produção de H2 (mol H2/mol carboidratos); Rm = taxa de produção de H2 (mol H2/mol carboidrtos/h) e  $\lambda$  = período da fase lag (h)

de 48 mmol/L em 48 h de fermentação, utilizando uma cultura mista de microrganismo apresentam maiores rendimentos comparados ao estimado.



Figura 16. Cinética da produção experimental de hidrogênio em comparação a produção teórica descrita pela equação de Gompertz.

A estabilização da curva no modelo teórico é decorrente a produção de  $H_2$  em um meio ausente de bactérias consumidoras de  $H_2$ . No modelo experimental, o consumo de  $H_2$  e inibição do processo fermentativo pode ser relacionada a vários fatores como o meio complexo com consumidores do gás, inibições como por substrato, por produto, por compostos furânicos ou por aumento da osmolaridade do meio. Neste contexto, S1 em 18h há a máxima produção de  $H_2$ , seguida do consumo. Pode-se atribuir à baixa produção de  $H_2$  (305,60 mL/L) e rendimento (1,28 mol  $_{H2}$ /mol<sub>carboidratos</sub>) à menor concentração inicial de substrato (9 mmol/L) e pelos efeitos gerados pela produção de ácidos orgânicos. No sistema 3 observa-se os maiores efeitos inibitórios, onde há maior concentração de carboidratos iniciais (48 mmol/L), apresentando comportamento de inibição por substrato ao passo que não há assimilação total dos açúcares em 54 h de fermentação. Além disso, considera-se a inibição por produto, visto que este sistema teve as maiores produções de ácidos acético e butírico ao final do processo fermentativo (20,46 mmol/L e 21,76 mmol/L, respectivamente). Apesar de S2 também apresentar inibição, foi o sistema com melhor desempenho na produção de  $H_2$ , atingindo o máximo de 1363 mL/L de  $H_2$ e rendimento de 1,75 mol <sub>H2</sub>/mol <sub>carboidratos</sub> em 36 h de fermentação. O resumo da produção de hidrogênio, ácidos orgânicos, rendimento, pH, consumo de substrato, produtividade e eficiência no tempo ótimo de cada sistema está descrito na tabela 6. A eficiência foi calculada com base no rendimento experimental em pentoses, por serem os carboidratos predominante nos meios, dividido pelo rendimento teórico em  $H_2$  pela via do ácido acético<sup>3</sup>. Apesar da fase adaptativa de S3 ser mais longa que a de S1, a sua produtividade é maior. Isto é consequência da maior produção, em volume de  $H_2$  no S3 em 48h de fermentação.

Conforme discutido anteriormente e apresentado na tabela 6, conclui-se que o S2 em 36 h de fermentação foi a melhor condição utilizada para a produção de H<sub>2</sub> neste estudo, que apresentou eficiência de 61%. Esta afirmação é associada a análise de diferentes parâmetros em conjunto como o consumo de substrato, produção de H<sub>2</sub>, rendimento e produtividade. No entanto, o máximo teórico é de 3,33 mols de H<sub>2</sub> por mol de pentose. Uma estratégia que pode ser adotada para melhorar o rendimento e estabilizar a produção é a diminuição da pressão parcial de H<sub>2</sub> através do aumento do volume de *headspeace*. Além disso, a remoção de H<sub>2</sub> do meio durante a fermentação vem apresentando impactos positivos no rendimento (JUNIOR *et al.*, 2020). Assim, podendo diminuir os efeitos gerados pela inibição por produto (H<sub>2</sub>). Quanto a inibição causada pela concentração de substrato, que é o rápido acúmulo de ácidos orgânicos e aumento da osmolaridade, os processos de modo contínuo que podem diminuir os efeitos prejudiciais na produção de H<sub>2</sub>, permitindo um maior controle das operações e pode evitar acúmulo de ácidos.

A tabela 7 apresenta um comparativo entre estudos em produção de H<sub>2</sub> utilizando frações hemicelulósicas de diferentes resíduos agroindustriais. Foi também avaliado comparativamente a produção com xilose padrão e com diferentes inóculos, incluindo-se culturas puras de *Clostridium*. Os parâmetros como a concentração inicial de carboidratos, produção e rendimento foram analisados em conjunto e assim foi possível observar que os rendimentos e produção obtidos neste trabalho em alguns casos são superiores aos encontrados na literatura.

Alguns estudos da literatura apresentaram rendimentos próximos ao obtido neste estudo, no entanto, a produção de H<sub>2</sub> é inferior (DE SÁ *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2019b). Isto é decorrente da baixa concentração inicial de carboidratos. Quando comparado à concentração de carboidratos equivalente, os resultados obtidos neste estudo são superiores, inclusive

 $<sup>^{3}</sup>$  C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> + 1.67 H2O  $\rightarrow$  1.67 CH<sub>3</sub>COOH + 3.33 H<sub>2</sub> + 1.67 CO<sub>2</sub>

comparado à produção com cultura pura de microrganismos (ABDUL *et al.*, 2013); mostrando assim que as condições experimentais deste estudo tornaram o meio mais propício à produção de H<sub>2</sub>.

Assim, por meio dos resultados obtidos neste trabalho é possível observar o grande potencial da utilização da fração hemicelulósica e o uso favorável de culturas mistas de microrganismos para a produção de  $H_2$  via fermentação. Esta é uma abordagem promissora por valorizar a fração C5 e que possibilita integrá-la ao contexto da biorrefinaria.

No tópico a seguir (5.4), será discutido os critérios avaliados para escolha do EPH que foi utilizado como matéria-prima para produção de metano em dois estágios.

Sistema	Pentoses (mmol/L)	Carboidratos totais (mmol/L)	Tempo (h)	pH final	Consumo Subst. (%)	Final ácido acético (mmol/L)	Ácido acético produzido (mmol/L)	Ácido butírico (mmol/L)*	Etanol (mmol/L)	Produção de H <sub>2</sub> (mmol)	Produção de H <sub>2</sub> (mL/L)	Rendimento (mol <sub>H2</sub> /mol <sub>pentoses</sub> )	Rendimento (mol <sub>H2</sub> /mol <sub>carboidratos</sub> )	Produtividade (mL <sub>H2</sub> /L.h)	Eficiência (%)
S1	8	9	18	5,3	99	$9{,}93 \pm 1{,}1$	$4{,}29\pm0{,}8$	$6{,}39\pm0{,}4$	$16{,}45\pm0{,}8$	$0{,}54\pm0{,}01$	$305 \pm 3,3$	$1{,}50\pm0{,}02$	$1{,}28\pm0{,}01$	16,98	45
S2	26	30	36	4,7	98	$18{,}56 \pm 1{,}1$	$7{,}09 \pm 1{,}4$	$17,\!17\pm0,\!8$	$58,\!18\pm3,\!2$	$2{,}39\pm0{,}1$	$1363 \pm 33{,}5$	$2{,}04\pm0{,}12$	$1{,}75\pm0{,}08$	37,86	61
<b>S</b> 3	44	48	48	4,6	78	$31,36 \pm 0,7$	$20,46 \pm 0,4$	$21,17 \pm 0,02$	$59,20 \pm 4,8$	$3,09 \pm 0,02$	$1788 \pm 13,3$	$1,56 \pm 0,01$	$1,\!48 \pm 0,\!01$	37,26	44

Tabela 6. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos, rendimento, pH, consumo de substrato, produtividade e eficiência do sistema 1 em 18 h, sistema 2 em 36 h e do sistema 3 em 48 h de fermentação na condição mesofílica (35 °C) com pH inicial de 5,5.

\*Concentração de ácido butírico no final do processo fermentativo de cada sistema. Este ácido não é detectado no início da fermentação por não ser proveniente do pré-tratamento biomassa.

Tabela 7. Comparativo dos rendimentos de H<sub>2</sub> obtidos a partir de frações hemicelulósicas ou xilose padrão de diferentes biomassas e inóculos.

Biomassa	Matéria-prima	Carboidratos iniciais (mmol/L)	Inóculo	Modo de operação	Produção (mL <sub>H2</sub> /L)	Rendimento	Referência
Bagaço de cana	Hemicelulose	9	Lodo anaeróbio	Batelada	352	1,30 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidratos</sub>	DE SÁ et al., 2020
Bagaço de cana	Celulose + Hemicelulose + Extrato de levedura	7	Lodo anaeróbio	Batelada	472	1,44 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidratos</sub>	SOARES <i>et al.</i> , 2019b
Bagaço de cana	Hemicelulose	60	Lodo anaeróbio	Batelada	2170	1,59 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidratos</sub>	THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018
Bagaço de cana	Hemicelulose	71	Estrume de elefante	Batelada	1216	0,84 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidratos</sub>	FANGKUM; REUNGSANG, 2010

Palha de cana	Hemicelulose	30	Lodo anaeróbio	Batelada	1363	2,04 mol H2/ mol pentoses	Neste estudo
Xilose padrão	Xilose	63	Lodo anaeróbio	Batelada	358	0,93 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>xilose</sub>	SILVA; FERREIRA- LEITAO; CAMMAROTA, 2019
Cacho de palma sem o fruto	Pentoses	29	Clostridium butyricum KBH1	Batelada	943	1,24 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>pentoses</sub>	ABDUL <i>et al.</i> , 2013
Palha de cana	Hemicelulose	30	Lodo anaeróbio	Batelada	1363	1,75 mol <sub>H2</sub> / mol <sub>carboidratos</sub>	Neste estudo
Casca de caju	Hemicelulose	108	Clostridium roseum ATCC 17797	Batelada	126	$\begin{array}{c} 0,1 \ mol \ _{H2} / \\ mol \ _{carboidratos} \end{array}$	SILVA et al., 2018

#### 5.4. Escolha do EPH para a produção sequencial de metano

A seleção do EPH a ser utilizado como matéria-prima para a produção sequencial de metano foi baseado nos parâmetros de rendimento, produção de H<sub>2</sub>, produtividade, concentração de ácidos acético e butírico solúveis no meio e eficiência.

Como demonstrado na tabela 6 e discutido no tópico anterior (5.3.3), o sistema que apresentou o melhor resultado de produção de H<sub>2</sub> foi o Sistema 2. Nesta etapa, a redução da demanda química de oxigênio (DQO) foi de apenas 10%, de 7694 mg/L para 6928 mg/L, conforme esperado e de acordo com a literatura (ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; PARTHIBA *et al.*, 2018; THUNGKLIN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018). Isto é decorrente da alta produção de metabólitos solúveis e devido ao fato de que apenas o  $CO_2$  formado é responsável pela redução da DQO neste estágio de produção, conforme demonstrado nas principais reações que ocorreram na fermentação, baseado nos produtos solúveis medidos (figura 16).

Acidogênese Pentoses:  $C_5H_{10}O_5 + 1.67 H_2O \rightarrow 1.67 CH_3COOH (ácido acético) + 3.33 H_2 + 1.67 CO_2$  (1)  $C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0.83 CH_3CH_2CH_2COOH (ácido butírico) + 1.67 H_2 + 1.67 CO_2$  (2) Hexoses:  $C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH (ácido acético) + 4H_2 + 2 CO_2$  (3)  $C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH (ácido butírico) + 2H_2 + 2 CO_2$  (4) Homoacetogênese:  $4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COOH (ácido acético) + 2 H_2O$  (5) Solventogênese:

$$CH_{3}COOH \text{ (ácido acético)} + 2 H_{2} \rightarrow C_{2}H_{6}O + H_{2}O$$
(6)

Apesar da produção de H<sub>2</sub> do sistema 3 em 48 h ser superior (1788 mL/L) ao S2, há HMF e furfural no EPH ( $0,3 \pm 0,02 \text{ mmol/L} e 0,76 \pm 0,04 \text{ mmol/L}$ , respectivamente) compostos considerados tóxicos para os microrganismos metanogênicos (BAÊTA *et al.*, 2016a). Além disso, a concentração de 48 mmol/L de carboidratos iniciais é a concentração máxima que o sistema deste estudo suporta, baseado na manutenção SSV: concentração de carboidratos, além de não ter havido consumo total dos carboidratos. A medição do gás é feita de maneira manual e a elevada pressão no frasco ( $\geq 2,7$  atm) apresenta risco de acidentes por explosão. Como o prosseguimento deste trabalho necessita de uma produção de grande quantidade de EPH para a produção de metano sequencial, o sistema 3 não foi o escolhido (HOLLIGER *et al.*, 2016).

Portanto, levando em consideração os dados apresentados na tabela 6 e os aspectos discutidos nesta sessão, o EPH gerado na condição S2 em 36 h de fermentação foi o escolhido como matéria-prima para a etapa metanogênica de produção CH<sub>4</sub> em dois estágios.

### 5.5. Avaliação da produção H2 com aumento de temperatura

Este estudo foi realizado em paralelo aos ensaios anteriores onde buscou-se observar mudanças na produção de hidrogênio em uma condição termofílica de 50 °C. Os ensaios foram realizados com concentração inicial de carboidratos de 9 mmol/L em 24 horas de fermentação. A escolha da concentração de substrato inicial foi com o objetivo de não gerar uma alta pressão interna e evitar risco de estouro do frasco de penicilina. Os resultados obtidos foram analisados comparativamente à condição mesofílica (35°C) no mesmo tempo de fermentação e na mesma concentração inicial de carboidratos iniciais.

A fim de avaliar a necessidade da etapa de pré-tratamento térmico do lodo (65 °C por 30 minutos), na fermentação termofílica, os ensaios foram realizados com lodo pré-tratado termicamente comparativamente a experimentos utilizando lodo *in natura*. O mesmo aplicouse para a condição mesofílica.

Conforme apresentado na figura 17, foi avaliado a produção de  $H_2$  (Fig. 17 A), rendimento em carboidratos totais (Fig. 17 B) e concentrações dos ácidos acético e butírico gerados nos sistemas (Fig. 17 C).



Figura 17. Produção de H<sub>2</sub> a 50 °C e 35 °C, com concentração inicial de carboidratos 9 mmol/L, pH 5,5 em 24 h de fermentação representado em volume específico de H<sub>2</sub>(A), rendimento em carboidratos totais (B) e produção de ácidos acético e butírico (C).

O ensaio utilizando lodo pré-tratado termicamente e realizado na condição termofílica apresentou maior rendimento e produção  $(1,83 \pm 0,2 \text{ mol}_{H2}/\text{mol}_{carboidratos} \text{ e } 509,55 \pm 27,30 \text{ mL/L})$ , aproximadamente 16% superior ao ensaio realizado com lodo *in natura* também na condição termofílica que apresentou rendimento de  $1,51 \pm 0,01 \text{ mol} \text{ H}_2$  por mol carboidratos e produção de 426,05 ± 1,66 mL/L. Visto que a diferença entre as produções é pequena, a exclusão da etapa de pré-tratamento do lodo pode ser considerada para realização de trabalhos futuros nesta condição de termofilia. Além disso, observou-se um rendimento 38% superior à condição mesofílica (1,13 mol H2/mol<sub>carboidratos</sub>), também realizada com lodo pré-tratado em 24 h de fermentação. Estes resultados mostram comparativamente um favorecimento da produção de H<sub>2</sub> em condições termofílicas nas condições empregada neste estudado.

Sabe-se que o lodo anaeróbio é composto de diversos microrganismos e nele estão incluídos os termo-tolerantes (HASYIM *et al.*, 2011). A maior produção de H<sub>2</sub> na temperatura

de 50 °C está relacionada à mudança da composição do meio, não sendo a condição favorável para a maioria dos consumidores de H<sub>2</sub> (DESSÌ *et al.*, 2018; HASYIM *et al.*, 2011). O processo termofílico geralmente possui maior taxa de degradação, aumentando a disponibilidade de certos compostos orgânicos, devido à solubilidade aumentada com o aumento da temperatura (SCHNÜRER; JARVIS, 2018b). Além disso, o gás é menos solúvel no meio nestas condições, diminuindo o H<sub>2</sub> dissolvido no meio, consequentemente reduzindo a homoacetogênese e proporcionando maior liberação na sua forma gasosa (CORONA; RAZO-FLORES, 2018; DAI *et al.*, 2019).

Em condições termofílicas a razão ácido acético/ácido butírico (Hac/Hbu) foi de 3,64 utilizando inóculo *in natura*. Enquanto na fermentação realizada a 35 °C utilizando lodo prétratado, a relação Hac/Hbu foi de 0,62. Portanto, houve uma mudança da principal rota metabólica adotada para a produção de H<sub>2</sub> na condição termofílica, sendo realizado preferencialmente pela via do ácido acético, rota em que apresenta maior rendimento de H<sub>2</sub>, 3,33 mol de H<sub>2</sub> por mol de pentose. Assim, nas condições estudadas, a opção de termofílica utilizando lodo pré-tratado a relação Hac/Hbu foi de 3,50 mostrando que esta condição de temperatura promove a predominância da via acética.

Em um estudo realizado por Toledo-Cervantes e colaboradores (2020), utilizando a vinhaça como matéria-prima para produção de H<sub>2</sub> verificou-se um aumento de 14% na produção em condição termofílica comparado à mesofílica (TOLEDO-CERVANTES *et al.*, 2020). Dessi *et al.* (2018) comparou estas condições utilizando xilose padrão como substrato e verificou um rendimento 17% superior em temperatura de 55 °C (DESSÌ *et al.*, 2018).

Neste estudo, o rendimento em pentoses na condição termofílica com lodo pré-tratado foi de 2,08 mol H<sub>2</sub> por mol de pentoses. Isto corresponde a 62% de eficiência na conversão das pentoses em H<sub>2</sub>. Conforme é relatado na literatura, o máximo rendimento obtido na produção de H<sub>2</sub> com uma cultura mista de microrganismos é de 70% do limite teórico (SAADY, 2013). Esta informação é condizente com os resultados apresentados nesta dissertação. Vale ressaltar a necessidade de um estudo cinético, além de outras concentrações iniciais para observar o comportamento da produção de H<sub>2</sub> nesta condição.

#### 5.6. Produção de CH4

#### 5.6.1. Produção sequencial de CH4 (Produção em dois estágios)

A separação das fases fermentativa e metanogênica é uma estratégia para aumentar a produção de biogás através da biomassa lignocelulósica, visto que a recuperação da energia e remoção da DQO na produção de H<sub>2</sub> é baixa. Para superar esta desvantagem a digestão anaeróbia em duas fases permite maximizar a recuperação de energia e a eficiência de remoção da DQO (CORONA; RAZO-FLORES, 2018; SANTOS *et al.*, 2018a). Outro aspecto positivo da segregação das etapas é possibilitar a redução no tempo total do processo, dado que no final da fermentação são gerados ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido acético, subproduto da degradação dos açúcares e substrato direto das arqueias metanogênicas acetoclásticas (APPELS *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2012). Adicionalmente, como observado no sistema 2, os compostos furânicos foram totalmente consumidos na fermentação, promovendo uma etapa de detoxificação para a metanogênese. Estes microrganismos são mais suscetíveis a distúrbios do sistema como oscilações de temperatura, pH, solubilização de O<sub>2</sub> no meio, o que indica maior suscetibilidade à presença de outros inibidores (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a).

A figura 18 apresenta a produção de CH<sub>4</sub> em função dos metabólitos solúveis (Fig. 18 A), assim como o rendimento do processo com a redução da DQO do sistema (Fig. 18 B).



-- DQO medido -- Rendimento CH<sub>4</sub>

Figura 18. Produção de CH<sub>4</sub> sequencial com consumo e produção de metabólitos associados ao processo de digestão anaeróbia (A). Aumento do rendimento em CH<sub>4</sub> associado à diminuição da DQO medida e estimada (B).

Os metabólitos solúveis produzidos na fermentação do hidrolisado hemicelulósico (ácidos butírico, fórmico, propiônico e o etanol) podem ser convertidos em CH<sub>4</sub> pelas arqueias metanogênica (CHENG *et al.*, 2012). Nos primeiros 4 dias de digestão anaeróbia é possível observar uma pequena produção de biometano, indicando que o principal destino destes metabólitos é para a formação de ácido acético pelos microrganismos acetogênicos. Não foi observado H<sub>2</sub>, possivelmente foi consumido juntamente com o parte do gás carbônico do sistema, visto que são os principais substratos para geração de metano (SCHNÜRER; JARVIS, 2018a). O grupo microbiano responsável por esta reação é o das metanogênicas hidrogenotróficas (CASTELLÓ *et al.*, 2020). Conforme demonstrado na equação 5.4, o metano é formado a partir da redução do gás carbônico, e o hidrogênio não foi observado nas análises por ter sido o doador de elétrons da reação.

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$
 (Eq. 5.4)

O consumo de ácido propiônico como fonte de carbono gera 7 mols de  $CH_4$  e 5 de  $CO_2$ para 4 mols de ácido consumido (Equação 5.5) (ZHAO *et al.*, 2010). Enquanto há a produção de biometano utilizando o etanol como substrato há consumo  $CO_2$  para geração de  $CH_4$  e ácido acético (Equação 5.6) (SAADY, 2013). Assim, de acordo com estas equações pode-se relacionar a concentração de  $CO_2$  no sistema não ser equivalente à de  $CH_4$  neste estudo (Figura 18 A).

$$4 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 7 \text{ CH}_4 + 5 \text{ CO}_2 \qquad (\text{Eq. 5.5})$$
$$2 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ CH}_3\text{COOH} \qquad (\text{Eq. 5.6})$$

Conforme apresentado na figura 18 B, a produção máxima de metano ocorreu no final da digestão anaeróbia, em 35 dias, sendo de 908,8  $\pm$  52,1 mL/L, apresentando o rendimento de 119,3  $\pm$  6,84 mL<sub>CH4</sub>/g <sub>DQ0</sub>. No 21° dia todos os metabólitos foram consumidos e a produção de metano apresentou 7% de diferença quando comparado aos dias subsequentes. Assim, a produção poderia ter sido finalizada em 21 dias de digestão. A concentração de etanol é oscilante, podendo ser devido a degradação dos demais compostos orgânicos presentes no meio (não quantificados) para sua formação. Neste contexto, se interrompêssemos a produção de CH<sub>4</sub> em 21 dias, a produção seria de 842,46  $\pm$  53,09 mL/L, com rendimento de 110,59  $\pm$  6,97 mL CH<sub>4</sub>/g DQO e redução da carga orgânica de aproximadamente 90%, em ambos os casos. Na

tabela 9 estão compilados os dados das produções e das condições iniciais de cada processo, assim como o volume gerado e rendimento referente ao processo sequencial.

Tabela 8.	Compilações	das condições	iniciais	aplicadas	para a	produção	sequencial	de H	$\mathbf{I}_2 \mathbf{e}$	$CH_4$	de
maneira s	sequencial e se	eus respectivos	rendim	entos.							

Produção	Matéria-prima	DQO inicial (g/L)	рН	Tempo	Produção (mL/L)	Rendimento (mL/g <sub>DQO</sub> )	Produtividade (mL/L.d)
$H_2$	Hidrolisado hemicelulósico	$7,7\pm0,06$	5,5	36 horas	$1363\pm33$	177,3 ± 6,8	37,86*
CH <sub>4</sub>	EPH	$7,6 \pm 0,1$	7	21 dias	842,5 ± 53	110,6 ± 6,8	40,12

\*Produtividade do H2 foi calculado em base de litros por hora (mL/L.d)

A estimativa da produção teórica de CH<sub>4</sub> foi calculada pela equação de Gompertz<sup>4</sup> em que determina o potencial de produção de CH<sub>4</sub> (H<sub>p</sub>), a taxa de produção de CH<sub>4</sub> (R<sub>m</sub>) e o período de fase adaptativa (fase lag) ( $\lambda$ ). Estes resultados são apresentados na tabela 8 e na figura 19.

Tabela 9. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção de CH<sub>4</sub> sequencial estimados pela equação de Gompertz

Produção	Matéria-prima	Hp (mL <sub>CH4</sub> / g <sub>DQO</sub> )	Rm (mL <sub>CH4</sub> / g <sub>DQO</sub> /d)	$\lambda \left( d \right)$	R <sup>2</sup>
Sequencial	EPH	114,14	14,67	4	0,99

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Equação de Gompertz modificada  $H(t) = Hp. exp \{-exp [Rm. e/Hp]. (\lambda - t) + 1]\}$ , onde Hp = potencial de produção de CH<sub>4</sub> (mL CH<sub>4</sub>/g DQO); Rm = taxa de produção de CH<sub>4</sub> (mL CH<sub>4</sub>/g DQO/d) e  $\lambda$  = período da fase lag (d)



Figura 19. Cinética da produção experimental de biometano e da produção teórica descrita pela equação de Gompertz a partir do EPH.

O modelo matemático apresentou coeficiente de determinação de 0,99, demonstrando um bom ajuste aos dados experimentais para produção sequencial de metano, sendo a predição para produção sequencial de 114,14 mL <sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub> e o valor experimental de 110,6 mL<sub>CH4</sub>/ g<sub>DQ0</sub>.

A seguir, no tópico 5.6.2 será avaliada a produção em único estágio comparativamente a produção sequencial com a mesma quantidade inicial de matéria orgânica. Adicionalmente, foi realizado a produção em único estágio com meio mimetizado para avaliar a influência dos compostos HMF e furfural a produção direta de metano.

### 5.6.2. Produção de metano em único estágio

A produção direta de metano está sendo apresentada na figura 20, onde pode verificar os perfis dos metabólitos intermediários na produção de CH<sub>4</sub> utilizando diretamente o hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima (Fig. 20 A) ou o meio mimetizado (Fig. 20 C). Além disso, pode-se observar também o decaimento da DQO em função do aumento do rendimento de CH<sub>4</sub> utilizando o hidrolisado (Fig 20 B) ou meio mimetizado (Fig 20 D).



Figura 20. Produção de  $CH_4$  em um único estágio com consumo dos substratos e produção de metabólitos associados à digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico (A) ou do meio mimetizado (C). Aumento do rendimento concomitante a diminuição da DQO medida e estimada (B) do hidrolisado hemicelulósico e do meio mimetizado (D).



Na figura 20 A, é possível observar o consumo total dos carboidratos nos primeiros 4 dias do processo e acúmulo de ácido orgânicos e etanol, acompanhado de baixa produção de metano. Este comportamento é característico da etapa fermentativa da digestão anaeróbia onde há conversão dos carboidratos em compostos orgânicos solúveis como ácidos, álcoois, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Neste período, a utilização de apenas carboidratos como substrato (figura 20 C), a produção de CH<sub>4</sub> foi 56,8% superior ao meio composto com ácidos orgânicos (figura 20 A), mesmo o ácido acético sendo o substrato direto das arqueias metanogênicas. A concentração de H<sub>2</sub> foi inferior ao limite de detecção, possivelmente foi consumido pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas para formar metano (Eq. 5.3) (SIRIWONGRUNGSON; ZENG; Ã, 2007).

A partir do quarto dia, o ácido acético representa 35% do total de metabólitos (Fig. 20 A), que corresponde a 21,76 mmol/L (1307 mg/L) de ácido produzido, e esta alta concentração é devido à conversão dos metabólitos solúveis pelas bactérias acetogênicas à ácido acético (APPELS *et al.*, 2008). A concentração total de ácidos orgânicos no sistema exerce atividade inibitória em concentrações acima de 4000 mg/L (SIEGERT; BANKS, 2005). Neste trabalho, os ácidos analisados foram ácido acético, ácido fórmico, ácido butírico, ácido propiônico e a concentração total destes foi maior em 14 dias de digestão anaeróbia ficando em torno de 3110 mg/L, não ultrapassando a quantidade mencionada.

Apesar disso, uma alta concentração de ácidos pode exercer influência no metabolismo das metanogênicas como foi observado na produção utilizando hidrolisado hemicelulósico que apresentou 32,36 mmol/L (2133 mg/L) de ácidos solúveis no meio em 10 dias de digestão. Este número corresponde a aproximadamente 40% a mais de ácidos quando comparado a produção utilizando meio mimetizado (19,60 mmol/L ou 1580 mg/L) no mesmo período. A utilização do hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima para a produção direta de metano ocasiona um rápido acúmulo de ácidos orgânicos visto que a etapa fermentativa ocorre rapidamente devido à disponibilidade de açúcares, substratos mais acessíveis. Conforme mencionado anteriormente, o pré-tratamento ácido promove a solubilização da fração hemicelulósica liberando seus açúcares na forma monomérica. Assim, o consumo destes ácidos pelos microrganismos metanogênicos não ocorre na mesma velocidade na são formados (SCHNÜRER; JARVIS, 2018b). O meio mimetizado também é composto de monômeros de açúcar, porém o meio real (figura 20 A) já contém ácido acético proveniente do hidrolisado (10,72  $\pm$  0,38 mmol/L ou 482 mg/L), e a produção inicial de CH<sub>4</sub> é mais lenta neste sistema comparado ao meio mimetizado, podendo ser relacionado a maior quantidade de conteúdo

orgânico neste sistema independentemente do acetato ser substrato direto das metanogênicas acetoclásticas.

Outro fator a ser destacado é a presença de HMF e furfural (0,46 mmol/L) e furfural (0,77 mmol/L) proveniente do hidrolisado hemicelulósico. Estes dois compostos não foram capazes de interferir na produção de H<sub>2</sub>, mas é possível observar efeitos sobre a produção de metano. Os resultados obtidos e alguns estudos anteriores relatados na literatura sugerem a interferência do HMF e do furfural na fase de crescimento dos microrganismos metanogênicos, visto que são menos tolerantes a estes compostos quando comparado aos organismos produtores de H<sub>2</sub>, portanto a fase inicial de produção é mais lenta em relação ao meio mimetizado. Ao final da digestão foram totalmente consumidos pela comunidade microbiana do lodo anaeróbio. É sabido que microrganismos como *Clostridium* spp. *e Lactobacil*lus spp. podem converter furfural em álcool furfurfico ou furanoico e utilizá-los como substrato para produção de metano (BUITRÓN *et al.*, 2019; SCHNÜRER; JARVIS, 2018a).

Após a segunda semana de digestão anaeróbia há um crescimento significativo da produção de CH<sub>4</sub> e consequentemente elevado consumo dos compostos solúveis representando claramente o início da metanogênese.

A produção máxima utilizando hidrolisado hemicelulósico em uma única etapa foi 1612,6  $\pm$  12,7 mL/L de CH<sub>4</sub>, com rendimento de 209,58  $\pm$  1,7 mL<sub>CH4/gDQO</sub> (60,18  $\pm$  15,2 mL<sub>CH4</sub>/mol<sub>carboidratos</sub>) e redução de 88% da DQO (figura 20 B). Enquanto no ensaio utilizando o meio mimetizado composto de padrão de açucares, o máximo de concentração obtida de CH<sub>4</sub> foi 811,42  $\pm$  47,2 mL/L, com rendimento de 213,45  $\pm$  12,4 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQO</sub> (31,93  $\pm$  1,9 mL<sub>CH4</sub>/mol<sub>carboidratos</sub>) e redução de 80% da DQO (figura 20 D). O meio mimetizado apresenta rendimento em DQO superior decorrente a menor quantidade de carga orgânica inicial deste sistema comparado ao hidrolisado hemicelulósico. Assim, o rendimento foi também calculado em base molar de carboidratos para serem comparativos. A diferença na produção entre os dois sistemas é decorrente ao ácido acético inicial no hidrolisado hemicelulósico, promovendo uma produção acumulada maior neste sistema comparado ao meio mimetizado.

A produção teórica em rendimento da produção de metano foi calculado pela equação de Gompertz<sup>5</sup> e pode ser observado na tabela 10 e na figura 21. A partir desta equação foi

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Equação de Gompertz modificada  $H(t) = Hp. exp \{-exp [Rm. e/Hp]. (\lambda - t) + 1]\}$ , onde Hp = potencial de produção de CH<sub>4</sub> (mL CH<sub>4</sub>/g DQO/d) e  $\lambda$  = período da fase lag (d)

estimado o potencial de produção de CH<sub>4</sub> (H<sub>p</sub>), a taxa de produção de CH<sub>4</sub> (R<sub>m</sub>) e o período de fase adaptativa (fase lag) ( $\lambda$ ).

Produção	Matéria-prima	Hp (mL CH4/ g DQO)	Rm (mL CH <sub>4</sub> / g DQO/d)	$\lambda \left( d \right)$	R <sup>2</sup>
Único estágio	Hidrolisado hemicelulósico (HH)	209,32	19,09	9	0,99
Único estágio	Meio mimetizado (MM)	265,38	11,25	8	0,96

Tabela 10. Potencial de produção (Hp), taxa de produção (Rm) e fase adaptativa ( $\lambda$ ) da produção de CH<sub>4</sub> em um único estágio estimados pela equação de Gompertz



Figura 21. Cinética da produção experimental de biometano e da produção teórica descrita pela equação de Gompertz a partir do hidrolisado hemicelulósico (HH) e pelo meio mimetizado (MM).

O modelo matemático teve um bom ajuste aos dados experimentais com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) iguais a 0,99 e 0,96 para a produção com hidrolisado e açúcares padrão, respectivamente. A equação de Gompertz é uma boa ferramenta de predição para a produção de CH<sub>4</sub>, visto que em ambos os experimentos (direto e sequencial) apresentou bom ajuste aos dados experimentais. Isto é consequência da digestão anaeróbia não ser um processo

intermitente como é o caso da fermentação com cultura mista de microrganismos onde há consumo do H<sub>2</sub> produzido, sendo a produção de metano um processo final.

A tabela 11 sumariza as condições empregadas para a produção de CH<sub>4</sub> em um único estágio com as duas matérias-primas e suas respectivas produções, rendimentos e produtividades.

Tabela 11. Resumo das condições iniciais nas produções de  $CH_4$  em um único estágio a partir do hidrolisado hemicelulósico e meio mimetizado e seus respectivos rendimentos em grama de DQO ou mol de carboidratos, volumes de produção e produtividades.

Produção	Matéria-prima	DQO inicial (g/L)	Produção (mL/L)	Rendimento (mL/g <sub>DQO</sub> )	Rendimento (mL/mol carboidratos)	Produtividade (mL/L.d)
CH <sub>4</sub>	Hidrolisado hemicelulósico	$7,7 \pm 0,6$	1612 ± 13	$209,79 \pm 1,4$	60,18 ± 15	46,11
	Meio mimetizado	3,8 ± 0,1	$811\pm47$	213,45 ± 12	31,93 ± 1,7	23,18

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que compostos provenientes do hidrolisado hemicelulósico, como o ácido fórmico, HMF e furfural podem interferir negativamente na eficiência, ao passo que o consumo total ocorre em 10 dias de processo seguido de produção exponencial de metano. No entanto, este estudo evidenciou o potencial de geração de CH<sub>4</sub> a partir da fração hemicelulósica obtida a partir do pré-tratamento com ácido diluído. Vale ressaltar que as condições utilizadas ainda não foram otimizadas, podendo construir futuras atividades dentro desta linha de pesquisa.

Na tabela 12 estão apresentados estudos comparativos de produção de metano de maneira direta e sequencial a partir de diferentes biomassas.

Biomassa	Biomagga Matéria- Inégula Tij		Tipo de	Estágio único	Tipo de	Dois es	stágios	Referências	
DIOIIIassa	prima	moculo	processo	CH <sub>4</sub>	processo	$\mathbf{H}_2$	CH <sub>4</sub>	Kelel elicias	
		Lodo						SANTOS et al.,	
Casca de café	Hemicelulose	anaeróbio	Batelada	91,1 mL/ g <sub>DQO</sub>	Batelada	55,8 mL / g <sub>DQO</sub>	284,3 mL/g <sub>DQO</sub>	2018b	
		Lodo							
Grãos	Vinhaça	anaeróbio	Batelada	$250 \text{ mL/ } g_{SSV}$	Batelada	14,8 mL/ g <sub>SSV</sub>	274 mL/ g <sub>ssv</sub>	FU et al., 2017	
	Soro de							ANTONOPOULOU	
Queijo	Queijo	Cultura mista	Contínuo	31,86 mL/ g <sub>DQO</sub>	Contínuo	4,21 mL/ g <sub>DQO</sub>	37,25 mL/ g <sub>DQO</sub>	et al., 2008	
Bagaço de cana	Hemicelulose	Lodo bruto	Batelada	173 mL/ g <sub>DQO</sub>	Batelada	43,80 mL/g <sub>TOC</sub>	340 mL/g <sub>DQO</sub>	BAÊTA et al., 2016a	
	Xilose Padrão								
	+ extrato de	Lodo							
-	levedura	anaeróbio		-	Batelada	179 mL/ g <sub>DQO</sub>	202,5 mL/g <sub>DQO</sub>	CHENG et al., 2012	
								THUNGKLIN;	
		Lodo						SITTIJUNDA;	
Bagaço de cana	Hemicelulose	anaeróbio		-	Batelada	3,33 mL/ g <sub>DQO</sub>	24,41 mL/g <sub>DQO</sub>	REUNGSANG, 2018	
	Bagaço	Lodo						CORONA; RAZO-	
Bagaço Sisal	hidrolisado	anaeróbio		-	Contínuo	124 mL/ g <sub>DQO</sub>	$320 \text{ mL/g}_{DQO}$	FLORES, 2018	
		Lodo			Semi-				
Cana de açúcar	Melaço	anaeróbio		-	contínuo	1,40 mL/ g <sub>ssv</sub>	17,7 mL/g <sub>ssv</sub>	PARK et al., 2010	
		Lodo +						ADARME et al.,	
Bagaço de cana	Hemicelulose	esterco		-	Batelada	170 mL / g <sub>DQO</sub>	246,44 mL/g <sub>DQO</sub>	2017	
								PEIXOTO et al.,	
Vinhaça	Vinhaça	Cultura mista		-	Batelada	$20,79 \text{ mL/g}_{DQO}$	$255 \text{ mL/g}_{DQO}$	2012	
		Lodo							
Palha de cana	Hemicelulose	anaeróbio	Batelada	209,8 mL/g <sub>DQO</sub>	Batelada	117,3 mL/ g <sub>DQO</sub>	110,6 mL/g <sub>DQO</sub>	Neste trabalho	

Tabela 12. Estudos comparativos com processos de digestão anaeróbia em dois estágios ou estágio único utilizando resíduos agroindustriais.

É possível observar que em todos os casos onde apresentam as duas formas de produções, que o rendimento da digestão em dois estágios é superior à realizada em estágio único. Apesar da produção sequencial deste presente estudo (110,6 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub>) apresentar rendimento inferior a produção sequencial (209,79 mL mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQ0</sub>), a produtividade da digestão anaeróbia em dois estágios (40,12) é numericamente próxima ao da digestão anaeróbia em um estágio (46,11). Isto é devido a menor fase adaptativa da produção sequencial (4 dias) quando comparado a produção direta (9 dias) e pela produção ser interrompida em 21 dias. Além disso, a produção sequencial apresentou 90% da redução de DQO do sistema. Vale ressaltar que digestão anaeróbia em único estágio produz metano por via acetogênica complementar à metanogênica, enquanto a sequencial é majoritariamente pela via metanogênica. Neste contexto, ao analisar estes fatores em conjunto, pode-se afirmar que a produção sequencial, apesar de não apresentar produção e rendimento análogos à digestão em estágio único é um processo promissor, com produtividade semelhante a produção direta e com eficiente remoção da DQO do sistema.

Além disso, a produção sequencial há como vantagem o controle de sobrecargas orgânicas e a utilização da matéria-prima livre de compostos tóxicos como o HMF e furfural, encurtando a fase adaptativa dos microrganismos de 9 dias na produção direta para 4 dias na produção sequencial (tabela 8 e tabela 10), proporcionando uma produção mais rápida com maior estabilidade do processo ao operar nas melhores faixas de pH dos microrganismos da etapa fermentativa e metanogênica.

5.3.6. Avaliação da energia produzida na digestão anaeróbia e balanço energético do pré-tratamento da palha

Na produção sequencial, a energia liberada pelo H<sub>2</sub> produzido corresponde a 1,88 kJ/g<sub>DQO</sub>, enquanto a energia liberada pelo metano corresponde a 4,73 kJ/g<sub>DQO</sub>. A energia global produzida na digestão em duas etapas é de 6,62 kJ/g<sub>DQO</sub>. Enquanto a produção em um único estágio, a energia produzida é de 6,45 kJ/g<sub>DQO</sub>. Isto demonstra que a produção sequencial possibilitou a recuperação de energia da etapa fermentativa para a produção de H<sub>2</sub>, sendo recuperados 0,17 kJ/g<sub>DQO</sub>

Através de uma estimativa levando em consideração apenas a energia de combustão do H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> a partir da digestão do hidrolisado hemicelulósico concentrado (DQO 85,12 g/L), é possível produzir 563 kJ/L<sub>hidrolisado</sub>. A cada grama de palha utilizada no pré-tratamento foi

obtido 1 mL de hidrolisado. Sabendo que em 1 hectare de cana-de-açúcar gera 10 toneladas em massa seca de palha, neste cenário haveria a geração de 0,157 MWh por tonelada, no qual 1 hectare seriam gerados 1,57 MWh. Baseado no consumo médio das residências brasileiras de 152 kWh/mês, a energia gerada a partir de 10<sup>4</sup> L de hidrolisado é suficiente para o consumo de uma casa por 10 meses (Figura 22).



Figura 22. Balanço energético das produções de metano em sistemas de dois estágios (energia gerada a partir  $H_2$  e  $CH_4$  produzidos durante a fase fermentativa e metanogênica, respectivamente) e estimativa da energia gerada na combustão de  $H_2$  e  $CH_4$  gerados a partir da digestão anaeróbia em duas etapas de 1 e  $10^4$  litros do hidrolisado hemicelulósico (DQO 85,12 g/L).

## 6. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram obtidas com as condições estudadas:

 ✓ O pré-tratamento ácido empregado no material lignocelulósico promoveu uma eficiência de 79% na remoção da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar;

- As concentrações de HMF e furfural do hidrolisado hemicelulósico não apresentaram interferência na produção de H<sub>2</sub>;
- O aumento da concentração inicial de carboidratos na produção de H<sub>2</sub> interfere na fase adaptativa dos microrganismos em função da maior concentração de açúcares de cada sistema;
- O pré-tratamento térmico do lodo foi eficiente na inibição das arqueias metanogênicas, o que permitiu a realização do processo em 2 estágios, a fermentação e digestão;
- ✓ A maior produção de H₂ ocorreu no sistema 2 (1,75 H₂/mol<sub>carboidratos</sub>; 2,04 mol<sub>H₂</sub>/mol<sub>pentoses</sub>; 1363 mL/L de H₂) com 61% de eficiência na produção;
- ✓ A produção de H₂ realizada em 50° C com lodo pré-tratado apresentou rendimento (1,83 mol H₂/mol carboidratos) próximo à fermentação também realizada em condição termofílica (50 °C) e utilizando lodo *in natura* (1,51 mol H₂/mol carboidratos), podendo esta etapa adicional de pré-tratamento do inóculo ser excluída do processo;
- ✓ A produção de H₂ realizada em 50° C com lodo *in natura* apresentou rendimento superior em 25% a produção em condição mesofílica (35 °C) com lodo pré-tratado;
- ✓ A produção CH₄ de maneira sequencial utilizando o material residual da produção de H₂ (EPH) foi satisfatória, apresentando remoção de 91% da DQO do sistema e rendimento de 110 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQO</sub>;
- ✓ O rendimento da digestão anaeróbia em único estágio é superior à de dois estágios para geração de CH₄ que apresentou rendimento de 209,79 mL<sub>CH4</sub>/g<sub>DQO;</sub>
- A produção de CH<sub>4</sub> em um único estágio utilizando a fração hemicelulósica, decorrente a presença inicial de ácido acético, apresentou produção de metano 50% superior (1612 mL/L) à produção no ensaio em meio mimetizado apenas com padrão de açúcares (811 mL/L);
- O hidrolisado hemicelulósico é uma matéria-prima adequada para a produção de H<sub>2</sub> e CH<sub>4;</sub>

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Mudança do meio reacional do frasco de penicilina para um biorreator para avaliar a produção de H₂ e CH₄;
- $\checkmark$  Realizar a produção de H<sub>2</sub> no sistema 2 em condição termofílica;

- Realizar um planejamento experimental com duas variáveis, concentração de substrato e temperatura, para avaliar a produção de H<sub>2</sub> em condição termofílica;
- ✓ Otimizar a produção de H<sub>2</sub>;
- ✓ Avaliar a produção de CH₄ com um meio mimetizado contendo glicose, xilose, arabinose e ácido acético.
- ✓ Otimizar a produção de CH<sub>4;</sub>
- ✓ Estudar meios de aproveitamento do digestato.

# 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL, P. M. et al. **Biohydrogen production from pentose-rich oil palm empty fruit bunch molasses: A first trial**. International Journal of Hydrogen Energy. **Anais**...22 Nov. 2013

ADARME, O. F. H. et al. Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 288–299, 15 Dec. 2017.

AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures : the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, 2011.

ALI, S. et al. Exploring lignocellulosic biomass for bio-methane potential by anaerobic digestion and its economic feasibility. **Energy and Environment**, v. 29, n. 5, p. 742–751, 1 Aug. 2018.

ANTONOPOULOU, G. et al. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. **Ind. Eng. Chem.**, v. 47, p. 5227–5233, 2008.

APHA, A. P. H. A. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. [s.l: s.n.]. v. 23

APPELS, L. et al. 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.

AXELSSON, L. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2017.

BAÊTA, B. E. L. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 436–446, 2016a.

BAÊTA, B. E. L. et al. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137–146, 1 Jan. 2016b.

BARAKAT, A. et al. Impact of xylan structure and lignin-xylan association on methane production from C5-sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 33–45, 2014.

BARAT, J.; NAZARETH, P. B. DE. **Transporte e energia no Brasil: as repercussões da crise do petróleo**: 14. Rio de Janeiro: [s.n.].

BARRERA-QUINTERO, V. et al. Gompertz Equation's First and Second Derivatives for Kinetics Analysis of Batch Dark Fermentation on Bio-Hydrogen Production. **European** Journal of Engineering Research and Science, v. 2, n. 11, p. 18, 2017.

BATISTA, G. et al. BIOGÁS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS : PANORAMA E PERSPECTIVAS BIOGAS FROM AGROINDUSTRIAL WASTES : PANORAMA AND PERSPECTIVES. **BNDES Setorial**, p. 221–276, 2018.

BAZETTO, M. C. Q. **PRÉ-TRATAMENTO DE BAIXA SEVERIDADE PARA PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE DUAS VARIEDADES DE CANA-ENERGIA**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2018.

BETTIGA, M. et al. Arabinose and xylose fermentation by recombinant Saccharomyces cerevisiae expressing a fungal pentose utilization pathway. v. 12, p. 1–12, 2009.

BITTENCOURTA, G. A. et al. Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 292, n. May, p. 121963, 2019.

BONOMI, A. et al. Documentação Do Modelo Metodologia Da Biorrefinaria Virtual De Cana-De-Açúcar (BVC) Relatório Nº Rlt-019. **Project BRA/10/G31 – PIMS 3515 Sugarcane**, v. Relatório, 2016.

BOTTCHER, A. et al. Lignification in sugarcane: Biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1539–1557, 2013.

BRIENZO, M. et al. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 305–313, 2016.

BUITRÓN, G. et al. Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. **Industrial Crops & Products**, v. 139, n. June, p. 111555, 2019.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. v. 67, n. November, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, D. M. DE et al. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223–234, 20 Jan. 2017a.

CARVALHO, J. L. N. et al. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 7, p. 1181–1195, 2017b.

CASTELLÓ, E. et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. November, 2020.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes : A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462–1476, 2012.

CHENG, J. et al. Sequential generation of hydrogen and methane from xylose by two-stage anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13323–13329, 2012.

CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization : A review of lignin depolymerization from various aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 232–249, 2019.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K. Organosolv Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Poplars. 2. Catalyst Effects and the Combined Severity Parameter. **Ind. Eng. Chem**, v. 29, n. 1987, p. 156–162, 1990.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Companhia Nacionla de Abastecimento**, v. 5, n. 4, p. 1–113, 2019.

CORAL, J. et al. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by Propionibacterium acidipropionici in Different Carbon Sources. p. 333–341, 2008.

CORONA, V. M.; RAZO-FLORES, E. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 334–341, 1 Feb. 2018.

CORRALE, L. C. et al. Bacterias anaerobias : processos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta Anaerobic bacteria : processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet. **Nova**, v. 13, n. 24, p. 55–81, 2015.

CUNHA, K. et al. Prioridades para a integração das fontes renováveis variáveis no sistema elétrico. p. 1–5, 2016.

DA SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, 2013a.

DA SILVA, A. S. A. et al. Continuous pretreatment of sugarcane bagasse at high loading in an ionic liquid using a twin-screw extruder. **Green Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 1991–2001, 2013b.

DAI, K. et al. Production of chemicals in thermophilic mixed culture fermentation: mechanism and strategy. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–30, 2019.

DE SÁ, L. R. V. et al. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 13, p. 7543–7549, 2011a.

DE SÁ, L. R. V. et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 23, p. 15177–15186, 2011b.

DE SÁ, L. R. V. et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.

DE SÁ, L. R. V. et al. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 40, p. 13888–13900, 2015.

DE SÁ, L. R. V. et al. Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. **Renewable Energy**, v. 146, p. 2408–2415, 2020.

DE SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA – ASPECTOS GERAIS E POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS. **Quimica Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

DE SALES, A. N. et al. Use of lignocellulose biomass for endoxylanase production by Streptomyces termitum. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 505–512, 2017.

DESAI, T. A.; RAO, C. V. Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in Escherichia coli. v. 76, n. 5, p. 1524–1532, 2010.

DESSÌ, P. et al. Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 11, p. 5473–5485, 2018.

DING, C.; YANG, K. L.; HE, J. Biological and fermentative production of hydrogen. In: **Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 303–333.

DRAKE, H. L. Acetogenesis, Acetogenic Bacteria, and the Acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" Pathway: Past and Cu rrent Perspectives. In: **Chapman & Hall**. [s.l: s.n.].

ELBESHBISHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656–668, 2017.

EPE, E. DE P. E. Cenários de oferta de etanol e demanda de ciclo otto 2018-2030. **NOTA TÉCNICA**, p. 41, 2018.

EPE, E. DE PESQUISA ENERGÉTICA. Análise de conjuntura dos biocombustíveis. [s.l: s.n.].

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on Clostridium beijerinckii growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1460–1469, 15 Aug. 2007.

FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016.

FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung : Effects of initial pH and substrate concentration.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, n. 14, p. 8687–8696, 2010.

FERNANDES, I. J. et al. Characterization of Rice Husk Industrial Waste Toward Its Use As Biomass. **6° Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**, v. 1, p. 1–9, 2015.

FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 2010.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO2as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–8, 2010.

FERREIRA-LEITÃO, V. S. et al. The protagonism of biocatalysis in green chemistry and its environmental benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, 2017.

FERREIRA, A. L. et al. EMISSÕES DOS SETORES DE ENERGIA, PROCESSOS INDUSTRIAIS E USO DE PRODUTOS. Instituto de Energia e Meio Ambiente - Documento de Análise, 2018.

FILGUEIRAS, O. Silício na agricultura. **PESQUISA FAPESP**, v. OUTUBRO DE, p. 72–74, 2007.

FINGUERUT, J. Cana de açúcar e a usina do futuro: uma perspectiva de risco de investimentos. [s.l: s.n.].

FONOLL, X. et al. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and fruit wastes: Evaluation of the transitory states when the co-substrate is changed. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 1268–1274, 2015.

FREITAS, B. C. B. DE. Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono. 2012.

FU, S. F. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

GARRITANO, A. DO N. et al. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolized palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 49, p. 29166–29174, 2017.

GINKEL, S. W. VAN; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. v. 39, p. 3819–3826, 2005.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GRIMMLER, C. et al. Transcriptional analysis of catabolite repression in Clostridium acetobutylicum growing on mixtures of d-glucose and d-xylose. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 315–323, Nov. 2010.

HAMZAH, M. A. F. et al. Investigation of temperature effect on start-up operation from anaerobic digestion of acidified palm oil mill effluent. **Energies**, v. 12, n. 13, 2019.

HART, D. et al. Scenarios for deployment of hydrogen in contributing to meeting carbon budgets and the 2050 target. n. October, 2015.

HASYIM, R. et al. Extreme-thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8727–8734, 2011.

HAYNES, R. J. Agriculture, Ecosystems and Environment The nature of biogenic Si and its potential role in Si supply in agricultural soils. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 245, n. March, p. 100–111, 2017.

HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water** Science and Technology, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 1 Dec. 2016.

HU, B. BIN et al. Enhanced biohydrogen production from dilute acid pretreated sugarcane bagasse by detoxification and fermentation strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 42, p. 19366–19374, 2018.

IEA, I. E. A. Renewables 2018 Analysis and forecast to 2023. Market report series, 2018.

IRENA. Global Bioenergy supply and demand projections. A working paper for REmap 2030. **GCB Bioenergy**, v. 5, n. September, p. 88, 2014.

JACOME, D. L. F. Avaliação das características físico-químicas das cinzas de bagaço e palha de cana-de-açúcar Avaliação das características físico-químicas das cinzas de bagaço e palha de cana-de-açúcar. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2018.

JANKE, L. et al. Optimization of semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane straw codigested with fi lter cake : E ff ects of macronutrients supplementation on conversion kinetics. **Bioresource Technology**, v. 245, n. June, p. 35–43, 2017.

JEOH, T. et al. Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis—A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1369–1385, 2017.

JIANLONG, W.; WEI, W. A. N. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 51, p. 1110–1117, 2008.

JUNIOR, A. D. N. F. et al. Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield Ant o. n. xxxx, 2020.

KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R. G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant Saccharomyces cerevisiae. v. 10, p. 1–10, 2007.

KONGJAN, P. et al. Biohydrogen Production From Wheat Straw Hydrolysate by Dark Fermentation Using Extreme Thermophilic Mixed Culture. v. 105, n. 5, p. 899–908, 2010.

KONGJAN, P.; MIN, B.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 °C) by mixed culture fermentation. **Water Research**, v. 43, n. 5, p. 1414–1424, 2009.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, R. et al. Carbohydrate Derived-Pseudo-Lignin Can Retard Cellulose Biological

Conversion. Biotechnology and Bioengineering, v. 110, n. 3, p. 737–753, 2012.

LEE, S. Y. et al. Fermentative Butanol Production by Clostridia. v. 101, n. 2, p. 209–228, 2008.

LIU, Y. et al. Recent developments of hydrogen production from sewage sludge by biological and thermochemical processInternational Journal of Hydrogen EnergyElsevier Ltd, , 26 Jul. 2019.

MENANDRO, L. M. S. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 488–504, 2017.

MENDES, F. M. T. et al. High Surface Area Activated Carbon from Sugar Cane Straw. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 3, p. 433–440, 2015.

MOCKAITIS, G. et al. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 2020.

MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.

MONTOYA, A. C. V. Avaliação das caraterísticas físico-químicas e microbiológicas da produção de hidrogênio e homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de café. [s.l.] Universidade de São Pauulo, 2019.

MORAES, B. DE S. et al. Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 594–601, 2019.

MORO, M. K. et al. Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 509–517, 2017.

MOUTTA, R. D. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. D. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93–100, 2014.

MOUTTA, R. DE O. et al. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. Journal of Microbial & Biochemical Technology, v. 01, n. S12, 2013.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical Optimization of Sugarcane Leaves Hydrolysis into Simple Sugars by Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Process. **Sugar Tech**, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2012.

NAKAGAWA, B. T. G. Análise do perfil transcricional de Clostridium saccharoperbutylacetonicum DSM14923 durante fermentação em hidrolisado lignocelulósico. [s.l.] Universidade de Campinas, 2017.

NASR, N. et al. Biohydrogen production from pretreated corn cobs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 35, p. 19921–19927, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípiod de Bioquímica de Lehninger**. 6° Edição ed. [s.l: s.n.].

NICOLA, D. Q. **PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA BIOMASSA PALHA MAIS BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**. [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2017.

NIZ, M. Y. K. et al. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876–22887, 2019.

O-THONG, S. et al. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 4, p. 1204–1214, Feb. 2008.

OKOLIE, J. A. et al. A review on subcritical and supercritical water gasification of biogenic, polymeric and petroleum wastes to hydrogen-rich synthesis gas. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. October 2019, p. 109546, 2020.

OKUNO, F. M. Recolhimento e qualidade da palha. [s.l: s.n.].

OUNINE, K. et al. Regulation and Butanol Inhibition of D-Xylose and D-Glucose Uptake in Clostridium acetobutylicumAPPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [s.l: s.n.].

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11204–11211, 2011.

PARK, M. J. et al. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. **Renewable Energy**, v. 35, n. 12, p. 6194–6202, 2010.

PARTHIBA, K. O. et al. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1025–1039, 2018.

PATAKOVA, P. et al. Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systemsBiotechnology Advances, Jan. 2013.

PEIXOTO, G. et al. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012.

PENG, F. et al. Comparative Study of Hemicelluloses Obtained by Graded Ethanol Precipitation from Sugarcane Bagasse. **Agricultural and Food Chememistry**, v. 57, p. 6305–6317, 2009.

PONNUSAMY, V. K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, 2018.

PRUSSI, M. et al. Review of technologies for biomethane production and assessment of Eu transport share in 2030. Journal of Cleaner Production, v. 222, p. 565–572, 10 Jun. 2019.

QUÉMÉNEUR, M. et al. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulosederived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 4, p. 3150–3159, 2012.

RAGSDALE, S. W.; PIERCE, E. Biochimica et Biophysica Acta Acetogenesis and the Wood – Ljungdahl pathway of CO 2 fi xation. v. 1784, p. 1873–1898, 2008.

RAMACHANDRAN, R.; MENON, R. K. An overview of industrial uses of hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, v. 23, n. 7, p. 593–598, 1998.

RASHAMA, C.; IJOMA, G.; MATAMBO, T. Biogas generation from by-products of edible oil processing: a review of opportunities, challenges and strategies. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 9, n. 4, p. 803–826, 2019.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 45–57, 2014.

RIBEIRO, F. R. et al. Anaerobic digestion of hemicellulose hydrolysate produced after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in UASB reactor. Science of the Total **Environment**, v. 584–585, p. 1108–1113, 15 Apr. 2017.

ROSSMANN, R.; SAWERS, G.; BOCK, A. Mechanism of regulation of the formatehydrogenlyase pathway by oxygen , nitrate , and pH : definition of the formate regulon. v. 5, 1991.

SÁ, L. R. V. DE. **Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia a partir de diferentes fontes de carbono e otimização a partir de pentoses**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation : Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1–20, 2013.

SANCHEZ-HERRERA, D. et al. BIOMETHANE POTENTIAL FROM SUGARCANE STRAW IN VERACRUZ ,. **Revista Mexicana de Ingeniería Química BIOMETHANE**, v. 17, p. 1105–1120, 2018.

SANNIGRAHI, P. et al. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, p. 1306–1310, 2011.

SANTOS, L. C. DOS et al. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, n. March, p. 601–612, 2018a.

SANTOS, L. C. DOS et al. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 601–612, 1 Sep. 2018b.

SANTOS, L. C. DOS et al. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee
husks. Bioresource Technology, v. 263, p. 601–612, 1 Sep. 2018c.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, G. A. **SILÍCIO NA PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR**. [s.l.] Universidade Federl de Uberlândia, 2017.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, 2010.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, A. Microbiology of the Biogas process. [s.l: s.n.].

SCHNÜRER, A.; JARVIS, Å. Microbiological Handbook for Biogas Plants Swedish. **Swedish Waste Management U2009:03**, v. Swedish Ga, p. 138, 2010.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, Å. Microbiology of the Biogas process. [s.l: s.n.].

SHAMSUL, N. S. et al. Optimization of bio-methanol production from goat manure in single stage bio-reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 14, p. 9031–9043, 6 Apr. 2017.

SHARMA, G. et al. Biomass as a sustainable resource for value-added modern materials: a review. p. 1–23, 2020.

SHARMA, S.; GHOSHAL, S. K. Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1151–1158, 2015.

SHI, J. et al. The structural changes of the bagasse hemicelluloses during the cooking process involving active oxygen and solid alkali. **Carbohydrate Research**, v. 359, p. 65–69, 2012.

SIEGERT, I.; BANKS, C. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. v. 40, p. 3412–3418, 2005.

SILVA, K. T. DA et al. Produção de Polibenzoxazina a Partir da Lignina do Bagaço da Produção de Polibenzoxazina a Partir da Lignina do Bagaço. 2019.

SILVA, F. G.; FERREIRA-LEITAO, V. S.; CAMMAROTA, M. C. Strategies for Increasing the Biohydrogen Yield in Anaerobic Fermentation of Xylose. **Environment and Natural Resources Research**, v. 9, n. 3, p. 32, 2019.

SILVA, J. S. et al. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal of Biotechnology**, v. 286, p. 71–78, 2018.

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

SIRIWONGRUNGSON, V.; ZENG, R. J.; Ã, I. A. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H 2 sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. v. 41, p. 4204–4210, 2007.

SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass. n. January, 2005.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. n. August, 2012.

SOARES, L. A. et al. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 7, p. 1899–1912, 2019a.

SOARES, L. A. et al. Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition. **Renewable Energy**, p. 852–861, 1 Sep. 2019b.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. v. 17, n. 9, 1983.

STAFFELL, I. et al. The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. **Energy** and **Environmental Science**, v. 12, n. 2, p. 463–491, 2019.

SUCRE, L. N. DE C. E T. DO B. (CTBE). Cartilha da Bioeletricidade. UNICA - União da Indústria Canavieira, p. 20, 2017.

SUCRE, P.; RENEWABLE, S. Apresentação em slides da palestra "Benefícios ambientais do uso da palha para geração ." 2017.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production : A Review. [s.l: s.n.].

TEDSREE, K. et al. Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 5, p. 302–307, 2011.

TEIXEIRA, R. S. et al. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. O34, 2014.

THAUER, R. K. et al. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. v. 41, n. 1, p. 100–180, 1977.

THUNGKLIN, P.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Sequential fermentation of hydrogen and methane from steam-exploded sugarcane bagasse hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 21, p. 9924–9934, 24 May 2018.

TOLEDO-CERVANTES, A. et al. Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. n. xxxx, 2020.

UNICA. Balanço de atividades - 2012/13 a 2018/19. [s.l: s.n.].

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 107–125, 2008.

VASSILEV, S. V et al. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 913–933, 2010.

VOIGTLANDER, T.; SEYE, O. Caracterização fisica termica de biomassa local. **Enepex**, 2011.

WANG, B.; WAN, W.; WANG, J. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 7013–7019, 2008.

WANG, H. et al. A review on bio-hydrogen production technologyInternational Journal of Energy ResearchJohn Wiley and Sons Ltd, , 1 Sep. 2018.

WANG, J.; YIN, Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstockRenewable and Sustainable Energy ReviewsElsevier Ltd, , 1 Sep. 2018.

WIERCKX, N. et al. Microbial degradation of furanic compounds: Biochemistry, genetics, and impact. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1095–1105, 2011.

XU, N. et al. Biomethane production from lignocellulose: Biomass recalcitrance and its impacts on anaerobic digestion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. AUG, 2019.

YANG, G.; WANG, J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A reviewRenewable and Sustainable Energy ReviewsElsevier Ltd, , 1 Nov. 2018.

YANG, G.; WANG, J. Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue: Effect of various substrate concentrations. **Fuel**, v. 237, n. August 2018, p. 1203–1208, 2019.

YOSHIDA, A. et al. Enhanced Hydrogen Production from Formic Acid by Formate Hydrogen Lyase-Overexpressing Escherichia coli Strains. v. 71, n. 11, p. 6762–6768, 2005.

ZHANG, Y.; HAN, B.; EZEJI, T. C. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 during butanol fermentation. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 345–351, 2012.

ZHAO, R. et al. Methane production from rice straw pretreated by a mixture of acetic-propionic acid. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 990–994, Feb. 2010.

ZOU, H. et al. Mesophilic anaerobic co-digestion of residual sludge with different lignocellulosic wastes in the batch digester. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 371–381, 1 Nov. 2018.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. R. Determinação Da Demanda Química De Oxigênio (Dqo) Em Águas E Efluentes Por Método Colorimétrico Alternativo. **Energ. Agric., Botucatu**, v. 20, n. 4, p. 69–82, 2005.