UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VINÍCIUS MATTOS DE MELLO

PRODUÇÃO DE METANO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DUAS FASES DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO BIOMASSA

Rio de Janeiro
2020

Vinícius Mattos de Mello

PRODUÇÃO DE METANO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DUAS FASES DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO BIOMASSA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientadora:
Magali Christe Cammarota, D.Sc.

Rio de Janeiro
2020

Vinícius Mattos de Mello

PRODUÇÃO DE METANO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DUAS FASES DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO BIOMASSA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 06 de março de 2020.

Magali Christe Cammarota, D.Sc., UFRJ (Orientadora)

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc., UFRJ

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por toda a graça e oportunidades concedidas ao longo de minha trajetória de vida. O caminho para chegar até aqui não foi fácil, muitas adversidades apareceram, mas o Senhor me concedeu forças e colocou as pessoas certas em minha vida que tornaram tudo que conquistei possível.

Não tenho palavras para descrever a importância dos meus pais Cerminiano Sebastião Arêas de Mello e Maria Lídia Mattos de Mello em tudo que conquistei. Todo sacrifício que fizeram, podem ter certeza que não foi em vão. Minha dívida com vocês será eterna. Todas as palavras de conforto, cobranças (necessárias) e apoio em todos os sentidos foram fundamentais para forjar meu caráter e a pessoa que me tornei. Sair de casa ainda com 18 anos para vir morar sozinho no Rio de Janeiro foi duro, mas necessário para continuar a trilhar meu caminho. Vocês estavam certos... e o aprendizado ao longo desses anos foi enorme.

À minha irmã Monique Mello, meu muito obrigado por ter sido tão companheira e ter me aturado e dado suporte, mesmo quando meu humor não era dos melhores. Sem contar que ser cobaia de uma irmã confeiteira de mão cheia é o melhor cargo do mundo!

E o que falar da minha orientadora, Magali Cammarota. Primeiramente me acolheu no laboratório em 2015 num dos momentos mais difíceis da minha vida e me deu a oportunidade de participar em vários projetos e prestações de serviço que foram fundamentais para adquirir o pensamento crítico e científico que tenho hoje. Sua visão analítica, seu caráter e justiça com que trata as pessoas são ímpares, Magali, e um padrão a ser seguido. Meu muito obrigado por todos os conselhos e ajudas que me deu nesses últimos cinco anos. Sem sua capacidade de destrinchar os resultados dos experimentos de maneira crítica não conseguiria ter finalizado esta dissertação.

Agradeço também a todos os meus professores da Escola de Química, que foram fundamentais na minha formação desde a graduação até as disciplinas do mestrado.

À Fernanda Romano, minha psicóloga, meu muito obrigado por todas as conversas e por saber sempre me dar o foco e a calma que precisei para conduzir minha pesquisa.

À Caroline Lisboa, meu agradecimento mais que especial por ter tornado meus dias mais leves. Muito obrigado pelas conversas, passeios, apoio e compreensão principalmente nos dias mais difíceis em que não pude estar presente.

Um agradecimento especial à Tayane Miranda e à Verônica Marinho do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA), por todo suporte que me deram ensinando todas as técnicas analíticas que precisei utilizar e auxiliando no que precisasse desde o momento que cheguei no laboratório. Verônica, sou muito grato a você por toda ajuda que me deu e por sempre emprestar alguma bibliografia do seu acervo que precisasse.

Ao Eduardo Ferreira, Leandro Miranda, Franknairy Gomes e Juliana Lemos meu muito obrigado pela ajuda nos experimentos e principalmente pelas conversas, cafés da tarde e almoços divertidos juntamente da Verônica e da Helena Oliveira. Os dias no LTA sem todos vocês não teriam graça e seriam maçantes.

À professora Melissa Gutarra, à Victória Silva, à Anna Cristina Lima e à Priscilla Bedor do Laboratório de Microbiologia industrial pela disponibilidade constante em emprestar algum reagente ou EPI.

Ao João Luiz Reis e ao Ronaldo Barbosa da empresa Guanabara Engenharia Ambiental agradeço pela troca de experiências durante as prestações de serviço e pelas conversas sempre aprazíveis durante os almoços.

Ao Jair Ferreira Júnior da empresa GCT Bio por todo auxilio e prestatividade em esclarecer dúvidas a respeito do funcionamento do respirômetro e na solução de pequenos problemas que ocorreram durante o período da Dissertação.

Por fim, agradeço à Agência Nacional de Eletricidade (ANEEL) e ao Centro de Pesquisa Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES / PETROBRAS) pela bolsa e recursos concedidos para desenvolvimento do projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DE BIOMASSAS E RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS" segundo o Termo de Cooperação Nº 5850.0103844.17.9.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

(Henry Ford)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

Resumo

MELLO, Vinícius Mattos de. **Produção de metano e efeitos inibitórios de furfural e ácidos graxos voláteis na digestão anaeróbia em duas fases de hidrolisado sintético de sorgo biomassa.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, M.Sc.). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A produção de biogás rico em metano a partir da digestão anaeróbia (DA) de hidrolisados de biomassa vegetal tem enorme potencial. No entanto, tais hidrolisados podem conter compostos furânicos que reduzem o rendimento de metano e seus efeitos e níveis de inibição precisam ser estudados. Neste trabalho a DA em dois estágios de hidrolisado sintético contendo xilose como fonte de carbono, utilizando lodo anaeróbio da indústria cervejeira adaptado como inóculo, foi avaliada em bateladas sequenciais sob condição mesofílica. Avaliou-se também os efeitos do furfural sobre os lodos anaeróbios adaptados nos estágios acidogênico (EA) e metanogênico (EM). Ao longo das bateladas sequenciais do EA, houve uma redução acentuada na produção de ácidos orgânicos devido ao efeito inibitório cumulativo dos próprios ácidos. O EM se adaptou bem às bateladas sequenciais, com remoção de DQO atingindo 97% e rendimento de biogás de 513 NmL/g $DQO_{adicionada}$, provando que a xilose das frações de hemicelulose pode ser metabolizada na DA em dois estágios. Na avaliação dos efeitos do furfural no EA, foi obtida redução de 61% na produção de ácidos graxos voláteis (em relação ao Controle) com razão substrato/inóculo (S_0/X_0) de 1 e 4, e 4 g/L de furfural. Reduções muito menores (26 a 38%) foram encontradas em 0,5 g/L furfural, independentemente da razão S_0/X_0. No EM, a xilose foi totalmente consumida e o rendimento de metano pouco afetado até 4 g/L de furfural. Na condição com 4 g/L de furfural, o lodo metanogênico adaptado apresentou rendimento de metano similar ao seu respectivo controle, enquanto um lodo menos adaptado apresentou redução de mais de quatro vezes quando comparado ao seu controle, comprovando que a etapa de adaptação torna os microrganismos mais resistentes à inibição pelo furfural.

Palavras-chave: xilose; digestão anaeróbia em dois estágios; furfural; inibição; acidogênese; metanogênese.

Abstract

MELLO, Vinícius Mattos de. **Methane production and inhibitory effects of furfural and volatile fatty acids on synthetic biomass sorghum hydrolysate two-phase anaerobic digestion**. Dissertation (Master of Science in Engineering of Chemical and Biochemical Processes, M.Sc.). School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The production of biogas rich in methane from vegetable biomass hydrolysates anaerobic digestion presents great potential. However, such hydrolysates may contain furanic compounds that reduce methane yield and their effects and levels of inhibition need then to be studied. In this work, two-stage anaerobic digestion (TSAD) of synthetic hydrolysate containing xylose as carbon source and using adapted brewery industry anaerobic sludge as inoculum was evaluated in sequential batches under mesophilic condition. Furfural effects on anaerobic sludge adapted in acidogenic and methanogenic stages were also evaluated. Along the sequential batches of acidogenic stage there was a marked reduction in organic acids production due to the cumulative inhibitory effect of the acids themselves. The methanogenic stage adapted well to sequential batches, with COD removal reaching 97% and biogas yield of 513 NmL/g $SCOD_{added}$, proving that xylose from hemicellulose fractions can be metabolized in two-stage anaerobic digestion. In the evaluation of furfural effects in acidogenic stage, 61% reduction in volatile fatty acids production (in relation to the Control) was obtained with substrate/inoculum ratio (S_0/X_0) of 1 and 4, in addition to 4 g/L of furfural. Much smaller reductions (26 to 38%) were found with 0.5 g/L furfural, regardless S_0/X_0 ratio. In methanogenic stage, xylose was totally consumed and the methane yield was little affected up to 4 g/L of furfural, with a reduction of up to 23% compared to the Control. Regarding the condition with 4 g/L of furfural, the adapted methanogenic sludge had methane yield almost equal to its respective control, while a less adapted sludge showed a reduction of more than four times when compared to its control, proving that the adaptation stage makes microorganisms more resistant to furfural inhibition.

Keywords: xylose; two-stage anaerobic digestion; furfural; inhibition; acidogenesis; methanogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1 - a) Matriz energética mundial 2016; (b) Matriz energética brasileira 2017 23
Figura 2.2 - Capacidade instalada de geração de energia elétrica a partir de biogás 25
Figura 2.3 - Estrutura simplificada da matriz lignocelulósica 29
Figura 2.4 - Estrutura da fração celulósica 30
Figura 2.5 - Estrutura típica da hemicelulose 31
Figura 2.6 - Álcoois aromáticos precursores da lignina 32
Figura 2.7 - Esquema do pré-tratamento da microfibrila de material lignocelulósico 33
Figura 2.8 - Rotas metabólicas e grupos microbianos na digestão anaeróbia 39
Figura 2.9 - Sequência simplificada da digestão anaeróbia em dois estágios 46
Figura 2.10 - Produção de furfural a partir de xilose via β-eliminação.....48

Capítulo 3

Figura 3.1 - Diagrama de blocos simplificado das etapas de experimentos do estudo 53
Figura 3.2 - Reatores para adaptação do lodo à digestão anaeróbia em duas fases 58
Figura 3.3 - Experimento para avaliação dos efeitos inibitórios do furfural 62
Figura 3.4 - Concentração de ART medida x concentração de furfural.....82

Capítulo 4

Figura 4.1 – Produção de AGV durante adaptação do lodo no estágio acidogênico 84
Figura 4 2 - Produção de biogás durante a adaptação do lodo no estágio metanogênico 87
Figura 4.3 – (a) pH; (b) Concentração de AGV; (c) Produção de AGV; (d) Remoção de DQO na operação do reator acidogênico 90
Figura 4.4 – Correlação entre volume de biogás produzido e AGV alimentados no reator metanogênico. 93
Figura 4.5 – Ajuste da produção normalizada de biogás na digestão anaeróbia em dois estágios ao modelo de Gompertz.....94

Figura 4.6 – Consumo de ART e produção de AGV para S_0/X_0: 0,5 (a), 1,0 (b) e 4,0 (c) 97
Figura 4.7 – Correlação entre a redução no consumo de xilose e a razão Furfural/X_0 100
Figura 4.8 – Correlação entre a produção normalizada de AGV e a razão F/X_0 101
Figura 4.9 - Produção de AGV em função da relação S_0/X_0 101
Figura 4.10 – Produção normalizada de CH_4 da segunda batelada de testes de inibição do estágio metanogênico 106
Figura 4.11 – Resultados da terceira e quarta bateladas do teste de inibição do estágio metanogênico 108
Figura 4.12 – Produção normalizada de CH_4 da terceira batelada de testes de inibição do estágio metanogênico 111
Figura 4.13 – Produção normalizada de CH_4 da quarta batelada de testes de inibição do estágio metanogênico 111
Figura 4.14 – Fluxograma com a sequência de experimentos e os principais resultados 114

LISTA DE QUADROS

Capítulo 2

Quadro 2.1 - Efeitos do pré-tratamento de biomassas na produção de metano 36
Quadro 2.2 - Composição de hidrolisados de sorgo 37
Quadro 2.3 - Comparação entre processos de digestão anaeróbia em estágio simples e dois estágios 47

Capítulo 3

Quadro 3.1 - Equipamentos Utilizados nos Experimentos 54
Quadro 3.2 - Origem e Grau de Pureza dos Reagentes e Produtos Utilizados 55
Quadro 3.3 - Logística de alimentação para adaptação do lodo no estágio metanogênico.....59
Quadro 3 4 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 0,5) 64
Quadro 3.5 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 1,0) 65
Quadro 3.6 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 4,0) 66
Quadro 3.7 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 0,5).....67
Quadro 3.8 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 1,0).....68
Quadro 3.9 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 4,0).....69
Quadro 3.10 - Substrato e inóculo utilizados no teste de inibição da acidogênese..70
Quadro 3.11 – Experimentos para avaliação da inibição do estágio metanogênico .72
Quadro 3.12 - Preparo das soluções da primeira batelada do teste de inibição da metanogênese.....73
Quadro 3.13 - Preparo das soluções da segunda batelada do teste de inibição da metanogênese.....74
Quadro 3.14 - Preparo das soluções da terceira batelada do teste de inibição da metanogênese.....75
Quadro 3.15 - Preparo das soluções da quarta batelada do teste de inibição da metanogênese.....76
Quadro 3.16 - Preparo da primeira batelada do teste de inibição da metanogênese77

Quadro 3.17 - Preparo da segunda batelada do teste de inibição da metanogênese 78
Quadro 3.18 - Preparo da terceira batelada do teste de inibição da metanogênese.79
Quadro 3.19 - Preparo da quarta batelada do teste de inibição da metanogênese ..80
Quadro 3 20 - Parâmetros analisados e metodologias utilizadas nos experimentos 81

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Produção anual das principais monoculturas e seus resíduos lignocelulósicos no mundo 26
Tabela 2.2 - Série histórica de produção de insumos glicídicos no Brasil.....27
Tabela 2.3 - Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas em base seca .29
Tabela 2.4 - Concentrações inibitórias e estimuladoras de alguns elementos.....44

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Solução de micronutrientes utilizada para suplementação 57

Capitulo 4

Tabela 4.1 – Resultados da adaptação do lodo no estágio acidogênico.....84
Tabela 4.2- Resultados da adaptação do lodo no estágio metanogênico 86
Tabela 4.3 – Parâmetros de operação do reator acidogênico.....89
Tabela 4.4 – Parâmetros dos reatores acidogênico e metanogênico em sequência durante digestão em dois estágios.....92
Tabela 4.5 – Parâmetros ajustados ao modelo de Gompertz para a etapa metanogênica da digestão anaeróbia em duas fases 95
Tabela 4.6 – Parâmetros do teste de inibição da atividade acidogênica por furfural.99
Tabela 4.7 – Resultados da primeira e segunda bateladas do teste de inibição do estágio metanogênico 103
Tabela 4.8 - Parâmetros ajustados do modelo de Gompertz para as duas primeiras bateladas de teste de inibição do estágio metanogênico 104
Tabela 4.9 – Produção normalizada de CH_4 da primeira batelada de testes de inibição do estágio metanogênico 105
Tabela 4.10- Parâmetros ajustados do modelo de Gompertz para as duas últimas bateladas de teste de inibição do estágio metanogênico 110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[furfural]	Concentração de furfural
16S rRNA	RNA ribossomal 16S
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AMPTS	Sistema de Teste Automático de Potencial de Metano, do inglês *Automatic Methane Potential Test System*
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
ART	Açúcares Redutores Totais
BMP	Potencial Bioquímico de Metano, do inglês *Biochemical Methane Potential*
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão (Temperatura = 0ºC; pressão = 1 atm)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COP-21	21ª Conferência das Partes, do inglês *21thConference of the Parties*
CSTR	Reator-Tanque Agitado Contínuo, do inglês *Continuous Stirred-Tank Reactor*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO_s	Demanda Química de Oxigênio solúvel
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
F/X_0	Razão massa de Furfural/massa de Inóculo
GEE	Gases do Efeito Estufa
G_m	Potencial de produção específica de biogás/metano
GRG	Gradiente Reduzido Generalizado
HAc	Ácido Acético
HMF	Hidroximetilfurfural
IEA	Agência Internacional de Energia, do inglês *International Energy Agency*
kJ	Kilojoule (10^3. Joule)
L	Duração da fase de adaptação

MDL	Mecanismo de Desenvolvolvimento Limpo
meq	miliequivalente
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
NDC	Contribuição Nacionalmente Determinada, do inglês *Nationally Determined Contribution*
NmL	Normal mililitros (volume medido em mL a 1 atm e 0ºC)
PEB	Produção Específica de Biogás
PEM	Produção Específica de Metano
pH	Potencial Hidrogeniônico
R_m	Taxa máxima específica de produção de biogás/metano
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*
S_0/X_0	Razão Substrato/Inóculo
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
SVT	Sólidos Voláteis Totais
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente, do inglês *Upflow Anaerbic Sludge Blanket*
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
ΔG	Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 18

1.1 INTRODUÇÃO 18

1.2 OBJETIVOS 20

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22

2.1 MATRIZES ENERGÉTICAS: BRASIL E UM CONTEXTO GLOBAL 22

2.2 A PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS 25

2.3 A MATRIZ LIGNOCELULÓSICA 28

2.3.1 Celulose 30

2.3.2 Hemicelulose 31

2.3.3 Lignina 32

2.4 PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA USO NA DIGESTÃO ANAERÓBIA 33

2.5 DIGESTÃO ANAERÓBIA 37

2.5.1 Fatores que afetam a digestão anaeróbia 39

2.5.1.1 Efeitos da temperatura 40

2.5.1.2 Efeitos do pH, acidez e alcalinidade 41

2.5.1.3 Nutrientes 42

2.5.1.4 Compostos inibidores e tóxicos 43

2.6 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS 44

2.7 A FORMAÇÃO DO FURFURAL E SEUS EFEITOS INIBITÓRIOS 48

3 MATERIAIS E MÉTODOS 52

3.1 MATERIAIS 54

3.2 ADAPTAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO 56

3.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS 60

3.4 INIBIÇÃO POR FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO.....61

3.4.1 Inibição do estágio acidogênico pelo furfural 62

3.4.2 Inibição do lodo no estágio metanogênico por furfural e AGV 70

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS 81

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 83

4.1 ADAPTAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO 83

4.1.1 Adaptação do lodo no estágio acidogênico 83

4.1.2 Adaptação do lodo no estágio metanogênico 85

4.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO EM DOIS ESTÁGIOS 88

4.3 INIBIÇÃO POR FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO.....96

4.3.1 Inibição do lodo por furfural no estágio acidogênico 96

4.3.2 Inibição do estágio metanogênico pelo furfural 102

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 115

5.1 CONCLUSÕES.....115

5.2 SUGESTÕES 116

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial, de 7,7 bilhões de pessoas em 2019, alcance 8,5 bilhões em 2030 (UNITED NATIONS, 2019). As atuais taxas de crescimento populacional, aliadas a avanços econômicos e tecnológicos e ao aumento da atividade industrial, levam a uma demanda crescente por fontes de energia (LIN et al., 2019).

Além disso, a matriz energética mundial é majoritariamente calcada em fontes fósseis de energia (petróleo, gás natural e carvão mineral) findáveis e extremamente poluentes. A expansão de seu uso poderá conduzir à intensificação da emissão de Gases do Efeito Estufa (GEE) e a uma rápida deterioração da qualidade de vida nos ambientes urbanos. Cada vez mais se faz necessária a busca por fontes de energia renováveis e menos poluentes (RODIONOVA et al., 2017). Segundo Cayir e colaboradores (2018), em 2017, 20% da demanda global de energia era suprida por fontes renováveis de energia, com a expectativa de que esse valor chegue a 25% em 2020.

A introdução de biocombustíveis produzidos a partir de biomassas lignocelulósicas na matriz energética tem se tornado bastante atraente, dada sua composição e abundância (MONLAU et al., 2014). Um dos cultivares que tem se destacado nesse cenário é o sorgo, por ser bastante resistente à seca, ter um sistema de produção estabelecido, uma boa produtividade por área plantada e poder ser melhorado geneticamente (ROONEY et al., 2007; MATHUR et al. 2017). Como todas as biomassas vegetais, a do sorgo é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (RUAN et al., 2019).

Os biopolímeros supracitados formam uma matriz complexa rica em pentoses e hexoses. É justamente a complexidade dessa matriz que impede a fácil liberação dos carboidratos pela ação hidrolítica dos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia. A ligação entre esses compostos necessita ser rompida e estes convertidos a açúcares mais simples para possibilitar a produção de metano (CAMARGO et al., 2019).

Vários pré-tratamentos da biomassa como a extração a frio com água após moagem, hidrólise alcalina e tratamento hidrotérmico (HERRERA et al., 2003; SENE et al., 2011; SEPULVEDA-HUERTA et al., 2006) têm sido empregados com esse propósito. O pré-tratamento hidrotérmico com ácido diluído tem ganhado destaque por conta de sua eficiência, menor custo operacional e rendimento elevado em termos de produção de açúcares simples para pronta fermentação (CAO et al., 2010; CHANG et al., 2011). Neste pré-tratamento a fração hemicelulósica é hidrolisada liberando principalmente xilose (SENE et al., 2011). Porém, por conta das condições de pressão e temperatura empregadas, parte da xilose é convertida em furfural por reação de desidratação (MATHEW et al., 2018). Este composto furânico é um conhecido inibidor microbiano cuja toxicidade está relacionada à hidrofobicidade inerente a sua estrutura química, que permite sua passagem através da membrana celular (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Porém, não é trivial se estabelecer com clareza os efeitos de compostos inibidores no processo de digestão anaeróbia, como os derivados furânicos presentes nos hidrolisados do pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas. A liberação de fontes de nutrientes durante o pré-tratamento podem atuar positivamente no processo de digestão, mascarando os efeitos inibitórios desses subprodutos (VIVEKANAND et al., 2012). Assim, estudos dos efeitos desses inibidores de forma isolada são fundamentais para elucidar seus efeitos individuais ou possíveis efeitos sinérgicos (PEKAROVÁ et al., 2017).

No contexto da busca por fontes alternativas de energia, diversos tipos de substrato têm sido estudados, inclusive os de origem lignocelulósica, comparando o potencial bioquímico de metano (BMP, do inglês *biochemical methane potential*) da digestão anaeróbia em estágio único com a realizada em dois estágios. A configuração em dois estágios tem apresentado maior BMP que a com um único estágio (PAKARINEN et al., 2009; ARREOLA-VARGAS et al., 2016). A separação dos estágios acidogênico e metanogênico em reatores distintos, proposta pela primeira vez por Pohland e Ghosh (1971), tem como objetivo produzir ácidos graxos voláteis (AGV) em condições de operação favoráveis à hidrólise e à acidogênese no primeiro reator e usar o produto deste primeiro estágio para alimentar um segundo estágio com condições operacionais favoráveis à acetogênese e metanogênese, produzindo metano e gás carbônico.

1.2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral a avaliação dos efeitos do furfural e dos AGV na digestão anaeróbia de hidrolisado sintético de sorgo em dois estágios utilizando lodo anaeróbio proveniente da indústria cervejeira adaptado sob condição mesofílica.

Para tanto, os objetivos específicos do estudo foram:

- Levantar parâmetros relativos ao consumo de substrato, produção de AGV (no estágio acidogênico) e produção de biogás/metano (no estágio metanogênico) na digestão anaeróbia em dois estágios com lodos adaptados à xilose, sem e com o inibidor furfural;

- Comparar efeitos do furfural sobre lodo misto (equivalente à digestão em único estágio) e lodo metanogênico (na digestão anaeróbia em dois estágios) empregando lodos adaptados e xilose e ácido acético como fonte de carbono;

- Comparar a degradação de xilose e diferentes concentrações de furfural na etapa metanogênica da digestão anaeróbia em dois estágios empregando lodo adaptado ou não.

A fim de atingir os objetivos propostos, as seguintes etapas foram realizadas:

a) Adaptação de lodo anaeróbio de indústria cervejeira à digestão anaeróbia de meio sintético contendo xilose como fonte de carbono por meio de alimentações com concentrações crescentes da pentose, utilizando a heurística de separação de estágios da digestão;

b) Avaliação da digestão anaeróbia do hidrolisado sintético com a separação em dois estágios distintos, em bateladas sequenciais, empregando lodo adaptado e meio sintético na maior concentração de xilose estudada;

c) Avaliação do estágio acidogênico da digestão anaeróbia com separação de estágios, em bateladas sequenciais, empregando lodo adaptado e meio sintético na maior concentração de xilose estudada, sob diferentes concentrações de furfural e relações S_0/X_0;

d) Avaliação do estágio metanogênico da digestão anaeróbia com separação de estágios, em bateladas sequenciais, empregando lodo adaptado e meio sintético contendo xilose e ácido acético, sob diferentes concentrações de furfural;

e) Avaliação do estágio metanogênico da digestão anaeróbia com separação de estágios, em bateladas sequenciais, empregando lodo não adaptado e adaptado, e meio sintético contendo xilose e diferentes concentrações de furfural.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

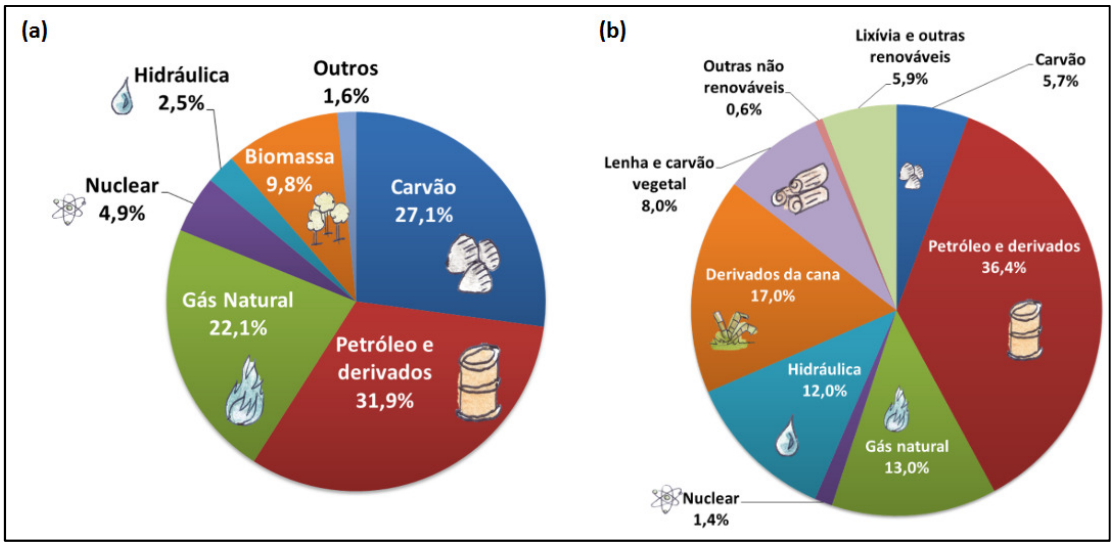
2.1 MATRIZES ENERGÉTICAS: BRASIL E UM CONTEXTO GLOBAL

Sabe-se que com os padrões atuais de crescimento populacional, aliados aos avanços econômicos e tecnológicos e a um aumento da atividade industrial, há uma demanda mundial crescente por fontes de energia que possam supri-los (LIN et al., 2019). Grande parte da matriz energética mundial é calcada em fontes não renováveis de energia, tais como o petróleo, gás natural, carvão mineral e energia nuclear.

Dados levantados pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2018) evidenciam esse cenário. Considerando que na Figura 2.1 o item assinalado como “outros” se refere a energia solar, eólica e geotérmica somados, verifica-se que em 2016 apenas 14% da demanda energética mundial foi suprida por fontes renováveis de energia. Comparando esse cenário ao brasileiro, se observa que, apesar da maior parte da matriz energética brasileira se basear em fontes não renováveis, verifica-se que a fração renovável responde por 43% da demanda total. Isso representa um valor três vezes maior que o verificado no contexto mundial, caracterizando nossa matriz como limpa.

Grande parte da demanda energética no Brasil e no mundo ainda é suprida por combustíveis de origem fóssil. Tais fontes são findáveis e extremamente poluentes. A expansão no seu uso poderá conduzir a uma perda de sustentabilidade do planeta de forma irreversível. Evidências locais, regionais e globais cada vez mais apontam nessa direção e para uma necessidade pungente em se buscar fontes de energia renováveis e menos poluentes (RODIONOVA et al., 2017).

Figura 2.1 - a) Matriz energética mundial 2016; (b) Matriz energética brasileira 2017



Fonte: adaptado de EPE (2018).

A transição para uma matriz energética cada vez mais sustentada por fontes renováveis de energia é um processo de transformação visando a uma economia de baixa emissão de carbono e, por conseguinte, com uma menor pegada ambiental. Assim, há um incremento na eficiência no uso das diferentes e novas formas de energia com emissão minorada dos Gases de Efeito Estufa (GEE) e redução no impacto ambiental (EPE, 2019a).

Nesse processo, o ritmo com que se modifica as matrizes energéticas primárias e finais é geograficamente distinto. Como já supracitado, a matriz energética brasileira apresenta um grau elevado de renovabilidade, tendo percentualmente o triplo de participação de fontes renováveis. A maior proporção de biocombustíveis em nossa matriz garante que durante esse processo transitório menos combustível fóssil seja utilizado (EPE, 2019b; IEA, 2019).

O uso acentuado de biocombustíveis no contexto nacional contribui com uma menor geração de poluentes atmosféricos, efluentes líquidos e resíduos sólidos quando comparados aos combustíveis fósseis. A queima destes emite contaminantes que causam impactos ambientais, a saber, o *smog* fotoquímico, a chuva ácida, e o aquecimento global. As fontes renováveis estão relacionadas, ainda, a uma menor emissão de alguns contaminantes locais como SO_x, CO, material particulado e hidrocarbonetos totais (EPE, 2019a).

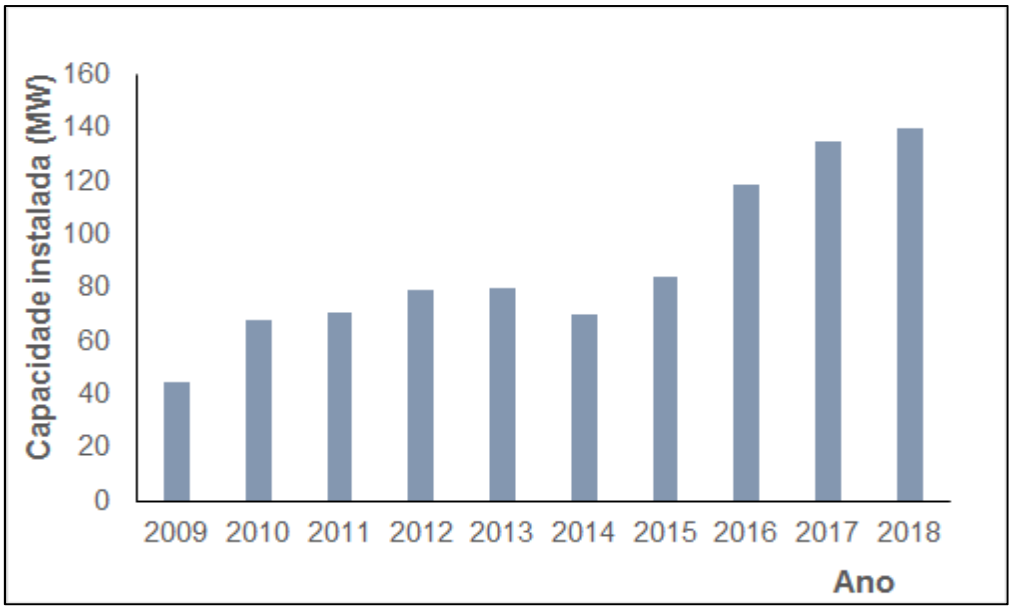
Sob uma ótica política, verifica-se que o Brasil se destaca nas discussões internacionais quando o assunto abrange questões relacionadas à sustentabilidade e às mudanças climáticas. O país foi signatário do Protocolo de Quioto em 1997, permitindo a sua participação no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL). Tal mecanismo era o único que permitia a participação de países em desenvolvimento em cooperação com países desenvolvidos buscando viabilizar o desenvolvimento sustentável dos membros signatários (MOREIRA & GIOMETTI, 2008)

Em dezembro de 2015, o Brasil se comprometeu com o Acordo de Paris, celebrado na 21ª Conferência das Partes (COP-21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, realizada naquela cidade. Tal acordo foi um marco em termos de articulação mundial para enfrentar as causas antrópicas das mudanças climáticas em escala global e promover a adaptação aos seus efeitos. Na ocasião, o Brasil apresentou sua Contribuição Nacionalmente Determinada (NDC) (MMA, 2017).

Em sua NDC, o Brasil se comprometeu a reduzir em 37% as emissões de GEE em 2025. Já em 2030, tal redução saltaria para 43%, tendo o ano de 2005 como referência. Embora a NDC do Brasil não estabeleça metas setoriais, em anexo ao compromisso brasileiro apresentado na COP-21 foram fornecidas informações adicionais acerca das medidas a serem adotadas para o cumprimento das metas. Destaca-se para o setor de energia a necessidade de se aumentar a participação de bioenergia sustentável na matriz energética brasileira para aproximadamente 18% até 2030, expandindo o consumo de biocombustíveis, aumentando a oferta de etanol, inclusive por meio do aumento da parcela de biocombustíveis de segunda geração, e aumentando a parcela de biodiesel na mistura do diesel (EPE, 2019a).

Nesse contexto de maior participação de biocombustíveis e, mais especificamente, do biogás na oferta interna de energia, pode-se verificar na Figura 2.2 que de 2009 a 2018 a capacidade instalada de produção de energia elétrica a partir de biogás apresentou tendência de alta, praticamente triplicando sua participação nesse período. Esse aumento, no entanto, ainda é modesto frente ao expressivo potencial de produção de energia a partir desse biocombustível, e pequeno em relação a outras fontes energéticas, visto que responde por aproximadamente 0,1% da capacidade instalada (EPE,2019a).

Figura 2.2 - Capacidade instalada de geração de energia elétrica a partir de biogás



Fonte: adaptado de EPE (2019b).

Em termos de legislação vale ressaltar a existência de política pública de fomento à geração distribuída, traduzida na forma da Resolução Normativa nº 482/2012 (ANEEL, 2012), que estabelece as condições para o acesso de microgeração e minigeração distribuída aos sistemas de distribuição de energia elétrica e o sistema de compensação de energia elétrica. Foi promulgada também a Resolução Normativa nº 687/2015 da ANEEL (ANEEL, 2015), que alterou alguns tópicos da resolução de 2012. Esse arcabouço legal foi fundamental para estimular a maior penetração desse biocombustível de origem renovável na geração de energia.

2.2 A PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O APROVEITAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

Segundo o Departamento das Nações Unidas de Bem Estar Econômico e Social, a população mundial, que era de 7,2 bilhões de pessoas em 2013, terá um acréscimo de aproximadamente um bilhão de habitantes nos próximos doze anos. O mesmo órgão projetou, também, que até 2050 o planeta será habitado por 9,6 bilhões de pessoas. Para acompanhar esse perfil de crescimento, estima-se que haverá uma necessidade de se incrementar a produção agrícola em 60% para atender à demanda crescente até 2050 (TYE et al., 2016).

Ray e colaboradores (2013) demonstraram que as quatro principais *commodities* utilizadas na alimentação humana (soja, milho, arroz e trigo) crescem a uma taxa anual entre 0,9 e 1,6%. A essa taxa, o incremento na produção desses cultivares estará entre 38% e 67% até 2050, o que pode não ser suficiente para atender à demanda global até lá.

Com esse cenário em mente, sabendo que também haverá uma maior demanda energética nesse mesmo período e levando em conta a urgência em se tornar a matriz energética mais limpa, verifica-se uma necessidade em se ampliar a produção de biocombustíveis, com um foco em combustíveis de segunda e terceira geração. Aproveitar a biomassa lignocelulósica residual da produção desses cultivares e daqueles não relacionados à alimentação humana, além dos resíduos alimentares, será fundamental para solucionar a dualidade de se usar terra para o plantio de alimento ou para prover fontes alternativas de energia.

Como se pode verificar na Tabela 2.1, de todos os cereais produzidos no mundo, o que mais se destaca é o milho, que responde por quase 38% do total. Outro dado a se destacar é o da produção de resíduos lignocelulósicos: 57% da produção total de cana de açúcar e cereais analisada se converte em resíduos lignocelulósicos.

Tabela 2.1 - Produção anual das principais monoculturas e seus resíduos lignocelulósicos no mundo

Monocultura cultivada	Produtividade anual (milhões de toneladas/ano)	Tipo de resíduo lignocelulósico	Produtividade anual das fibras lignocelulósicas (milhões de toneladas/ano)
Cevada	141,4	Palha da cevada	51,3
Milho	962,4	Sabugo/palha de milho	376,8
Aveia	22,9	Palha de aveia	10,4
Arroz	657,5	Palha de arroz	473,1
Sorgo	61,9	Palha de sorgo	12,0
Trigo	705,6	Palha de trigo	472,2
Cana-de-acúcar	1741,3	Bagaço de Cana	1044,8
Total produzido	**4293**	**Total de resíduo**	**2440,6**

Fonte: Adaptado de TYE et al. (2016).

Isso representa um grande potencial de aproveitamento na produção de biocombustíveis de segunda geração. Por conseguinte, pode acarretar a redução da emissão dos GEE, o melhor aproveitamento econômico das biomassas com uma expansão na contribuição em relação à matriz energética, sem a necessidade de expansão da área plantada e uma correta destinação final dos resíduos sólidos (WYMAN, 2003).

Analisando-se os dados da Tabela 2.2, observa-se que o Brasil tem a cana-de-açúcar como a maior fonte de insumos glicídicos. Tal perfil de predominância se assemelha ao verificado no panorama mundial. O país é líder na produção desse insumo, respondendo por quase um terço de sua produção. Considerando que a proporção de geração de resíduos lignocelulósicos de cada insumo em relação à sua respectiva produção se mantenha constante, verifica-se que na safra 2017/2018 o Brasil pode ter gerado aproximadamente 416 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos.

Tabela 2.2 - Série histórica de produção de insumos glicídicos no Brasil

Ano Agrícola	Cana-de-açúcar (milhões t)	Milho (milhões t)	Trigo (milhões t)	Sorgo (milhões t)
2010/2011	623,91	57,41	5,79	2,31
2011/2012	560,95	72,98	4,38	2,22
2012/2013	588,92	81,51	5,53	2,1
2013/2014	658,82	80,05	5,97	1,89
2014/2015	634,77	84,67	5,53	2,05
2015/2016	665,59	66,53	6,73	1,03
2016/2017	657,18	97,84	4,26	1,86
2017/2018	633,26	80,71	5,43	2,14

Fonte: Adaptado de CONAB (2018).

Dentre os cultivares analisados no contexto nacional e global, o sorgo, apesar da menor participação na matriz de produção, tem chamado a atenção por conta de sua adaptabilidade a regiões tanto de clima mais ameno como de clima mais quente e árido. Com mais de 60 milhões de toneladas produzidas anualmente no mundo, o grão só se encontra atrás de arroz, milho, trigo e cevada (TYE et al., 2016).

Em torno de 30% da produção de sorgo está concentrada na América do Norte; o segundo continente que mais produz sorgo é a África, que responde por 23% da produção global. Neste, 72% da produção é destinada à alimentação humana, enquanto que naquele 86% correspondem à cultura forrageira destinada à alimentação animal (KIM & DALE, 2004).

O sorgo é uma planta bastante resistente a fatores bióticos e abióticos como infestação por insetos e solos com elevada alcalinidade. É também um cultivar com uma das melhores taxas de assimilação de carbono (50 $g.m^{-2}.dia^{-1}$), que se traduz na melhor taxa de captação e uso de CO_2, permitindo assim o rápido crescimento dessa planta e a remoção do gás da atmosfera (PRASAD et al., 2007).

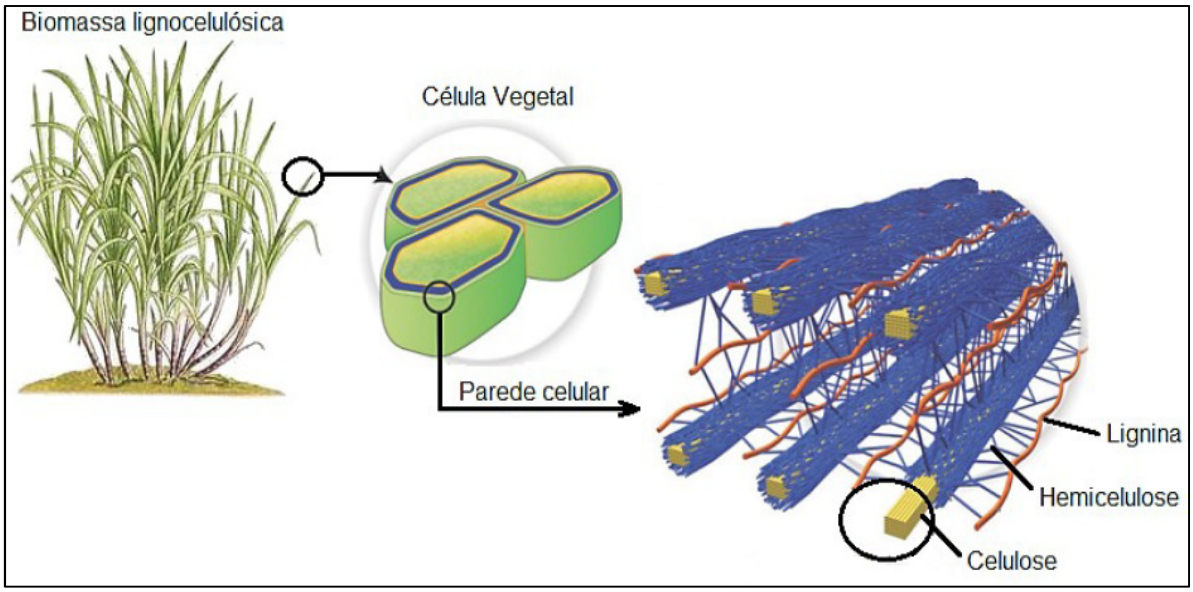
Além disso, requer para sua irrigação um terço da água em relação à cana-de-açúcar e 80 a 90% se comparado ao milho, o que ratifica sua condição de planta resistente à seca (ALMODARES & HADI, 2009; WU et al., 2010). Outra característica do sorgo é que requer apenas um terço da quantidade de fertilizante necessária para o plantio de cana-de-açúcar e o ciclo de sua safra dura de três a cinco meses, o que permite dois a três cultivos anuais ao invés de um único como se verifica para a cana (KIM & DAY, 2011).

Com toda essa conjuntura, explica-se o crescente interesse no plantio de sorgo e aproveitamento de sua biomassa lignocelulósica residual para produção de biocombustíveis.

2.3 A MATRIZ LIGNOCELULÓSICA

Durante o crescimento, as plantas formam suas paredes primária e secundária. A primária está relacionada à transdução de sinal e interação com células vizinhas. Tal porção contém um baixo teor de celulose e uma quantidade significativa de pectina (HERNÁNDEZ-BELTRÁN et al., 2019). Já a parede secundária é composta basicamente de lignocelulose, se estruturando de maneira simplificada, como demonstrado na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Estrutura simplificada da matriz lignocelulósica



Fonte: adaptado de SANTOS (2012).

As biomassas lignocelulósicas são compostas basicamente pelo biopolímero celulose e por duas outras macromoléculas: a hemicelulose e a lignina. A composição básica de alguns substratos lignocelulósicos se encontra resumida na Tabela 2.3. Como se pode verificar, dentre as biomassas residuais analisadas, a palha de sorgo é a que mais se destaca em termos de participação da porção hemicelulósica, o que se traduz em significativa participação de pentoses em sua composição.

Tabela 2.3 - Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas em base seca

Substrato lignocelulósico	Composição mássica % (em base seca)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Palha de milho	43,0	22,1	27,1
Eucalipto	52,1 ± 2,6	24,5 ± 1,1	25,2 ± 1,1
Palha de aveia	35,0	28,2	4,1
Palha de arroz	37,8 ± 0,2	29,6 ± 0,7	14,8 ± 0,4
Palha de sorgo	26,9 ± 1,2	32,6 ± 1,9	10,2 ± 1,8
Bagaço de cana-de-açúcar	46,1 ± 0,7	20,1 ± 0,9	20,3 ± 0,6
Palha de trigo	43,4	26,9	22,2

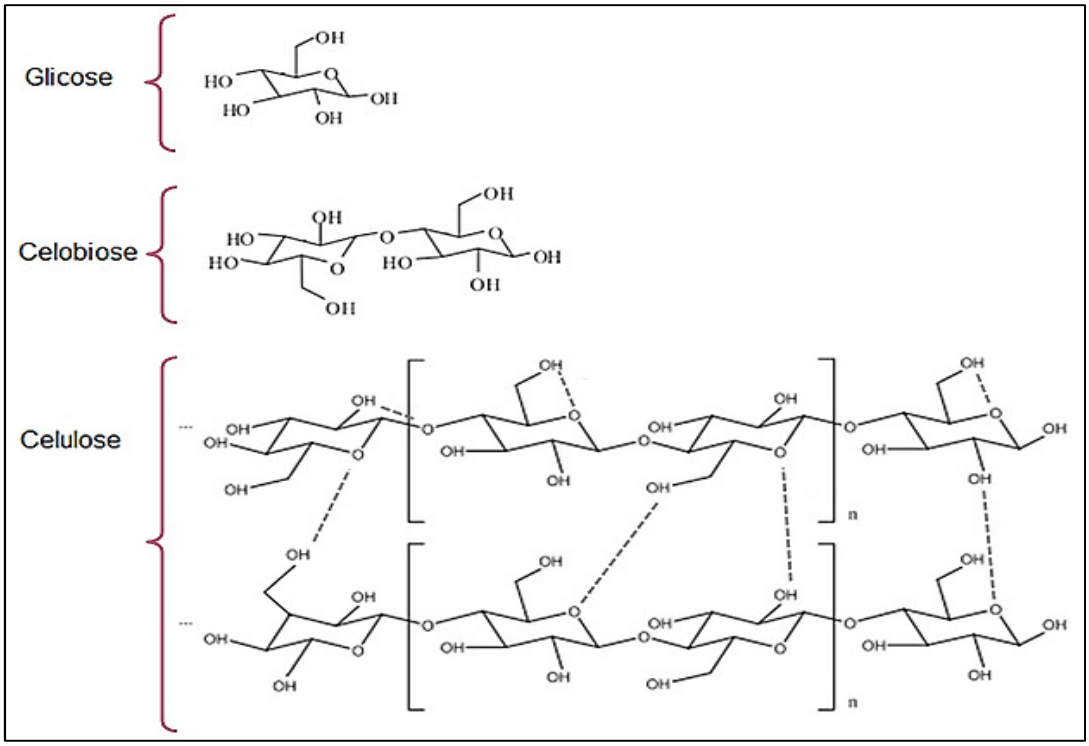
Fonte: adaptado de HERNÁNDEZ-BELTRÁN et al. (2019).

2.3.1 Celulose

A celulose é o constituinte principal da parede celular das células vegetais. É um homopolímero formado por unidades repetitivas de duas moléculas de glicose eterificadas e ligações glicosídicas do tipo β-1,4, conhecidas como celobiose.

Os dímeros que compõem esse biopolímero apresentam grupamentos hidroxila livres em sua composição, que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular (Figura 2.4). Estas são responsáveis pela formação da fibra vegetal, enquanto aquelas conferem resistência à celulose (SANTOS, 2012). A rigidez e a ordem que ambas ligações conferem à estrutura da celulose são responsáveis por criar regiões denominadas cristalinas. Tais regiões são responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose, o que se torna uma barreira para o aproveitamento biotecnológico dessa fração (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Figura 2.4 - Estrutura da fração celulósica



Fonte: adaptado de SUHAS et al. (2016).

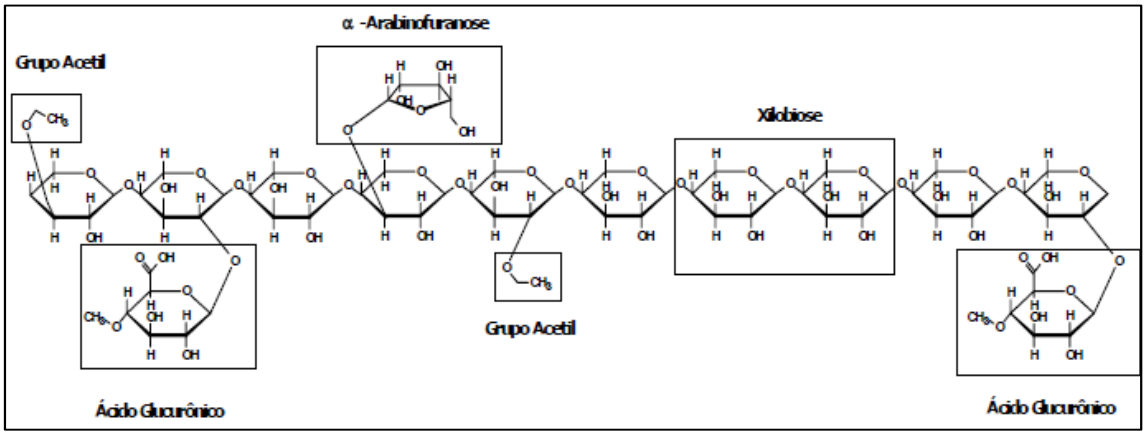
2.3.2 Hemicelulose

Depois da celulose, a hemicelulose é o polissacarídeo mais abundante no planeta. É uma macromolécula heterogênea, sem regiões cristalinas, devido ao seu grau de ramificação e pode ser constituída por pentoses (β-D-xilose, α-L-arabinose), hexoses (β-D-manose, β-D-glicose e α-D-galactose), além de ácidos urônicos (α-D-glucurônico, α-D-4-*O*-metil-galacturônico e α-D-galacturônico), conforme esquematizado na Figura 2.5. Podem estar presentes em sua composição a α-L-ramnose e α-L-fucose, porém em menores quantidades.

Os grupamentos glicídicos da hemicelulose podem ter grupos hidroxila substituídos por grupos acetil (GIRIO et al., 2010). É uma macromolécula mais hidrofílica que a celulose, sendo mais facilmente hidrolisada que esta.

As principais hemiceluloses existentes são as xilanas e as glucomananas. Em ambas, há uma cadeia principal que pode ser ramificada com diferentes monômeros. As xilanas estão em maior parte presentes na parede celular, constituindo cerca de 20-30% da biomassa das angiospermas; em algumas espécies de monocotiledôneas as xilanas podem configurar até 50% da estrutura da parede celular (EBRINGEROVÁ et al., 2005 *apud* GÍRIO et al., 2010).

Figura 2.5 - Estrutura típica da hemicelulose



Fonte: MUSSATO (2002)

As glucoxilanas são as principais hemiceluloses encontradas nas angiospermas, que também podem apresentar em sua estrutura porções de glucomananas. Neste grupo de vegetais, as glucoxilanas representam 15-30% da sua massa seca. Em relação a essas moléculas, aquelas que apresentam quaisquer dos ácidos urônicos

em sua estrutura são mais resistentes à hidrólise ácida se comparadas às que apresentam somente pentoses e hexoses (ÁLVAREZ et al., 2016).

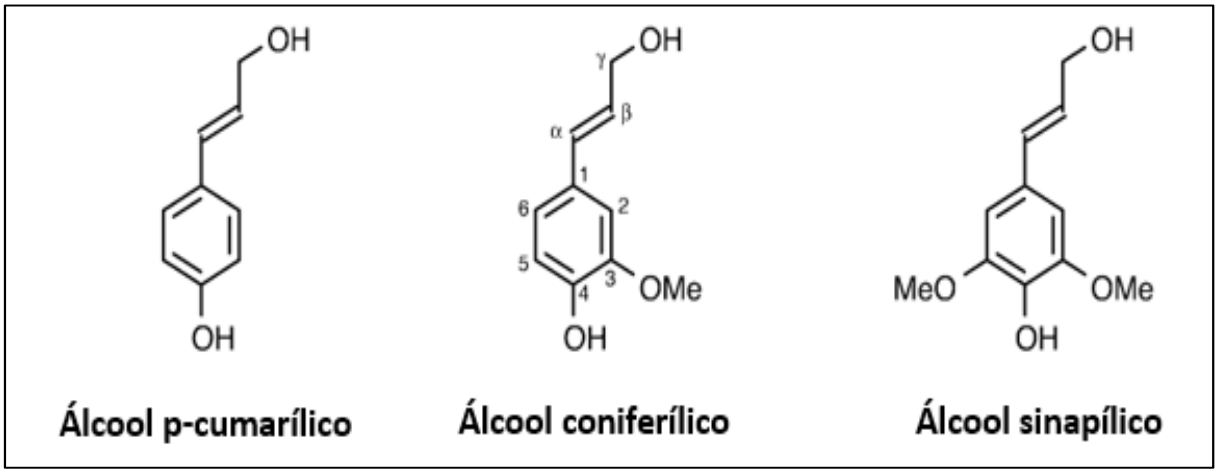
Tão significativa quanto as anteriores, são as galactoglucomananas, que são as principais hemiceluloses encontradas nas gimnospermas e representam cerca de 20-25% de sua massa seca. Estas biomoléculas apresentam como cadeia principal unidades lineares de β-D-glucopiranosil e β-D-manopiranosil, que podem ser parcialmente acetiladas e substituídas por unidades α-D-galactopiranosil ligadas à glicose e manose por ligações α-1,6 (GÍRIO et al., 2010).

2.3.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula que está presente em todas as gimnospermas e angiospermas. Confere rigidez à parede celular nos vegetais, sendo responsável pela resistência à dobra, ao impacto e à compressão, atuando como agente permanente de ligação entre as células.

Em termos de estrutura, é uma macromolécula complexa repleta de grupamentos aromáticos e apresenta comportamento hidrofóbico. É opticamente ativa, dotada de inúmeras ligações cruzadas e derivada da reação de polimerização desidrogenativa de três álcoois aromáticos: sinapílico, coniferílico e p-cumárilico (Figura 2.6) (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Figura 2.6 - Álcoois aromáticos precursores da lignina



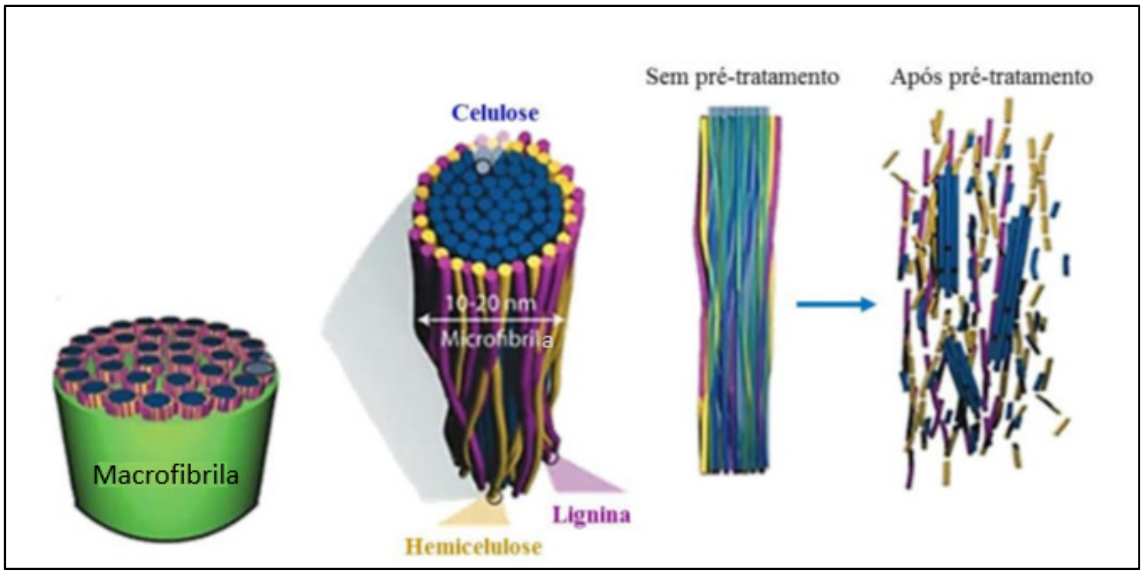
Fonte: adaptado de RALPH (2004).

No processo de formação da lignina, ocorrem reações secundárias que levam à formação de ligações entre a macromolécula e a hemicelulose. Ocorre, então, a formação de uma matriz que envolve a celulose, que cria um impedimento físico à hidrólise das estruturas polissacarídicas. Tais ligações são formadas entre as unidades de fenil-propano da lignina e os resíduos de arabinose e ácido glucurônico das xilanas (D'ALMEIDA, 1988).

2.4 PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA USO NA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Os pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas têm por objetivo a alteração estrutural de suas matrizes, separando as frações que as compõem (Figura 2.7), aumentando o acesso à celulose e à hemicelulose, permitindo assim o aproveitamento eficiente e praticamente integral quando submetido a um posterior ataque enzimático ou a uma hidrólise química (ROSE et al., 2015).

Figura 2.7 - Esquema do pré-tratamento da microfibrila de material lignocelulósico



Fonte: adaptado de ROSE et al. (2015).

É relativamente difícil o acesso à celulose e hemicelulose na matriz lignocelulósica para a liberação dos açúcares neles contidos e utilização dos mesmos na digestão anaeróbia. Galbe e Zachi (2012) apresentaram algumas das razões para tal, a saber:

1) Estrutura complexa da matriz lignocelulósica, que torna o ataque à mesma desafiador;
2) Mistura de hexoses e pentoses que podem causar problemas na eficiência do processo fermentativo e aproveitamento completo dos carboidratos, dado que as pentoses podem não ser prontamente fermentadas;
3) Formação de compostos que podem inibir a fermentação, como por exemplo o furfural e o hidroximetilfurfural;
4) Subprodutos da própria biomassa, como compostos aromáticos e ácidos alifáticos que podem inibir o processo de fermentação.

Por essas razões, se torna desafiador à microbiota responsável pela produção de metano e hidrogênio, via digestão anaeróbia, utilizar biomassas lignocelulósicas diretamente sem nenhum tipo de pré-tratamento (ZHENG et al., 2014) Deste fato advém a necessidade de se tratar as biomassas, tornando as macromoléculas e polímeros, bem como os açúcares que os compõem, biodisponíveis para a digestão, visando maiores taxas e rendimento em termos de produção de biogás.

A etapa de pré-tratamento é considerada a mais importante para viabilizar a conversão de biomassa em energia, tendo um grande impacto nas etapas a jusante. Existem vários tipos de métodos para o pré-tratamento de biomassas:

- Mecânicos: moagem, cominuição, trituração, extrusão e aplicação de radiação e ultrassom (MONLAU et al., 2013);
- Térmicos: explosão a vapor e hidrotérmico (HARMSEN et al., 2010; KUMAR et al., 2009);
- Químicos: ácido, alcalino, explosão de fibra com amônio, organosolv (DADI et al., 2007; HARMSEN et al., 2010; MCMILLAN, 1994; MOSIER et al., 2005; TEYMOURI et al., 2005; WYMAN et al., 2005);
- Biológicos: enzimas e microrganismos (PANAGIOTOPOULOS et al., 2009; SUN e CHENG, 2002).

O Quadro 2.1 apresenta alguns pré-tratamentos de biomassas, cujos efeitos foram investigados em termos de produção de metano. Os estudos demonstraram um ganho energético após o pré-tratamento das biomassas avaliadas, desconsiderando a energia utilizada no processo de tratamento.

Verifica-se na literatura que os pré-tratamentos termoquímicos, com ácido diluído e temperatura, são amplamente utilizados no que diz respeito à produção de biohidrogênio. Tais métodos atuam positivamente na mudança da matriz lignocelulósica, favorecendo a fermentação dos açúcares nela contida (CHANG et al., 2011; CUI et al., 2009; NISSILA et al., 2014; PANAGIOTOPOULOS et al., 2012; PATTRA et al., 2008). O ácido normalmente empregado nesse tipo de tratamento é o sulfúrico (H_2SO_4) com concentração entre 0,4 e 2% (m/v). A faixa de temperatura de trabalho se encontra tipicamente entre 160 e 220ºC (WILLFOR et al., 2005).

Em pré-tratamentos que utilizam ácido concentrado há um aspecto negativo, além da questão da elevada corrosividade: após o uso dos mesmos se faz necessária a neutralização do hidrolisado obtido, demandando grandes quantidades de agente alcalinizante para que o hidrolisado esteja com pH próprio para a fermentação (NISSILA et al., 2012).

Dentre todos os pré-tratamentos, o que emprega ácido e temperatura é considerado o mais fácil, um dos mais eficientes e o que apresenta maior potencial de viabilidade econômica quando se vislumbra a aplicação em escala industrial (HARMSEN et al., 2010; MOSIER et al., 2005).

Quadro 2.1 - Efeitos do pré-tratamento de biomassas na produção de metano

Biomassa lignocelulósica	Tipo de Pré-tratamento	Condições do pré-tratamento	Produção de CH_4 (mL de CH_4/gSV adicionados)	Energia a partir da biomassa bruta (KJ/gSV adicionados)	Energia a partir da biomassa pré tratada (KJ/g SV adicionados)	Ganho energético (%)	Referência
Palha de arroz	Biológico	Fungo *Polyporus ostreiformis*	295	8,91	11,74	32%	Ghosh & Bhattacharyya (1999)
		Fungo *Phanerochaete crysosporium*	328	8,91	13,05	46%	
	Alcalino + Físico	2,5% de NH_3, T = 90°C, 10 min	245	7,56	9,75	29%	Zhang & Zhang (1999)
Palha de Trigo	Físico (Mecânico)	Trituração (0,4 mm)	248	6,45	9,87	53%	Sharma et al. (1988)
	Físico (Explosão a vapor)	T = 170°C, 10 min	361	10,98	14,36	31%	Bauer et al. (2009)
Resíduos da colheita de milho	Alcalino + Físico	2% NaOH, 20°C, 3 dias	215	4,55	8,55	88%	Zheng et al. (2009)
Grama Bermuda	Físico	Trituração (0,4 mm)	228	5,45	9,07	66%	Sharma et al. (1988)

Fonte: elaboração própria (2019).

O Quadro 2.2 mostra a composição de alguns hidrolisados obtidos a partir do pré-tratamento com ácido e temperatura de resíduos lignocelulósicos de sorgo, biomassa e tipo de pré-tratamento alvos do presente trabalho. Pode-se verificar uma predominância de xilose no hidrolisado hemicelulósico e a presença de alguns inibidores como o furfural e compostos fenólicos.

Quadro 2.2 - Composição de hidrolisados de sorgo

Biomassa lignocelulósica	Condição pré-tratamento ácido	Composição do hidrolisado (g/L)						Referência
		Xilose	Glicose	Arabinose	Ácido Acético	Fenois	Furfural	
Bagaço de sorgo	relação sólido/líquido - 1/4 a 1/5g.mL^{-1}; [H_2SO_4] = 1,0 a 1,3%v/v; T - 120°C por 45'.	47,19 ± 2,20	n.d.	n.d.	8,65 ± 1,92	n.d.	0,17 ± 0,03	Barcelos et al. (2011)
Palha de sorgo	relação sólido/líquido - 1:10; 100 mg H_2SO_4/ g palha de sorgo; T - 121°C por 10min.	17,69	2,10	1,81	1,87	2,12	0,04	Sene et al. (2011)
	2% de H_2SO_4 ; T - 122°C , 71 min	19,1	6,7	5,3	1,1	n.d.	0,8	Sepúlveda-Huerta et al. (2006)
	Condição testada de maior produção de xilose: HCl 6%, T = 122°C, 60 min	16	4	n.d.	1,6	n.d.	0,75	Herrera et al. (2003)

Fonte: elaboração própria (2018).

Nota: n.d. significa que o metabólito não foi quantificado ou sua concentração estava abaixo dos limites de quantificação.

2.5 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo metabólico complexo de conversão de materiais orgânicos em metano, gás carbônico, água, amônia e gás sulfídrico, e que abrange uma microbiota com equilíbrio delicado, cujo funcionamento balanceado é fundamental para sua eficiência. O processo se dá em etapas sequenciais que dependem da atividade de, no mínimo, três grupos de microrganismos: o das bactérias fermentativas, conhecidas como acidogênicas; o das bactérias sintróficas acetogênicas; e o dos microrganismos metanogênicos (CHERNICHARO, 2007).

De maneira simplificada, o processo de digestão anaeróbia é subdividido em duas etapas: a acidogênica e a metanogênica. Porém, para melhor compreensão desse processo este é dividido em quatro etapas. São elas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Na primeira etapa, de hidrólise, compostos insolúveis como a celulose, proteínas e lipídeos são hidrolisados em suas formas monoméricas mais simples pela ação de exoenximas secretadas pelas bactérias fermentativas. A hidrólise dos carboidratos se

dá em poucas horas, dando origem a açúcares mais simples, enquanto a das proteínas e lipídeos pode demorar alguns dias e dá origem aos aminoácidos e ácidos graxos, respectivamente (DEUBLEIN e STEINHAUSER, 2008).

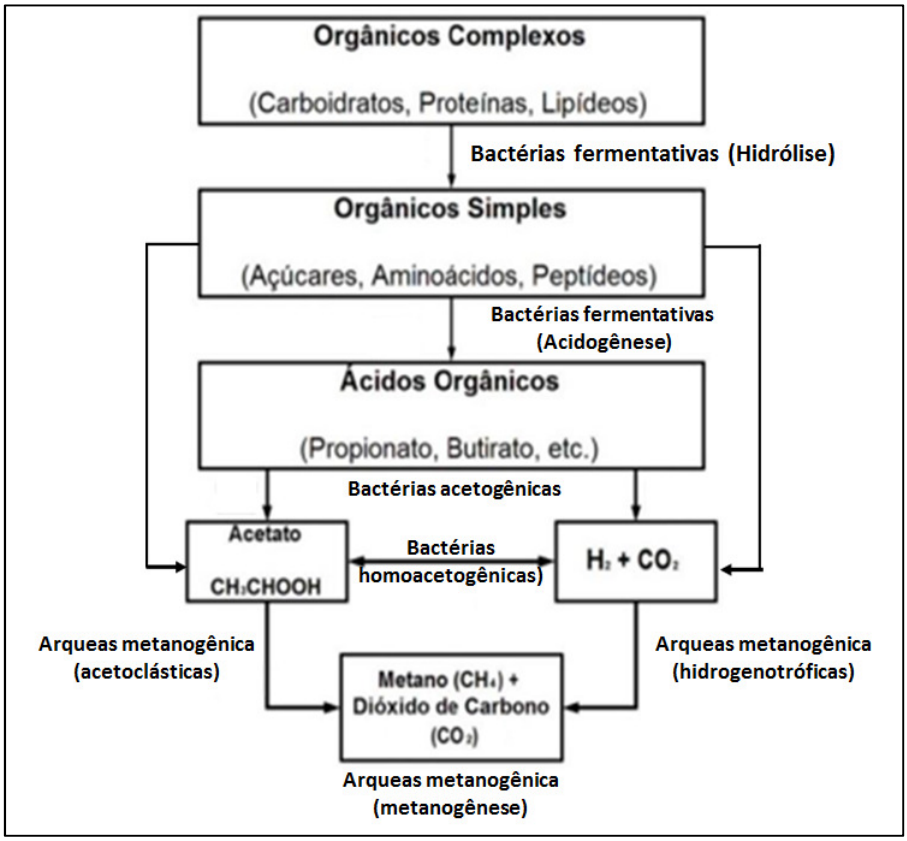
Na segunda etapa, a acidogênese, as unidades monoméricas e de menor massa molecular geradas após a hidrólise são assimiladas por bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas. Tais bactérias degradam essas unidades em ácidos orgânicos de cadeia curta, como os ácidos butírico, propiônico e acético, produzindo também álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio. A pressão parcial de hidrogênio no meio interfere no tipo de produto formado na fermentação: quanto maior ela for, menor a quantidade de compostos mais reduzidos, como o acetato, são formados (GERARDI, 2003).

Na terceira etapa, a acetogênese, os produtos formados na etapa acidogênica são convertidos em acetato, hidrogênio e CO_2. Há também bactéricas homoacetogênicas, que convertem H_2 e CO_2 a acetato. As bactérias dessa etapa atuam de maneira sintrófica com as arqueas metanogênicas: nessa etapa os ácidos orgânicos e álcoois são convertidos também a acetato, que é um dos substratos para a produção de metano pelas arqueas metanogênicas acetotróficas. Porém, o acumulo de hidrogênio que também é gerado é prejudicial, visto que a produção de acetato a partir de propionato, butirato e etanol apresenta energia livre de Gibbs (ΔG) maior que zero, sendo termodinamicamente desfavoráveis. Para que tais reações ocorram a pressão parcial de hidrogênio no meio reacional tem de estar baixa. E é justamente nesse sentido que atuam as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas que geram metano a partir de CO_2 e H_2, diminuindo a pressão parcial deste último (CHANDRA et al., 2012).

A quarta e última etapa da digestão anaeróbia é a metanogênese, que ocorre em condições estritamente anaeróbias. Nela, as arqueas metanogênicas podem converter acetato ou CO_2 e H_2 a metano, sendo o CO_2 o aceptor final de elétrons nesse caso. As reações de ambas as vias são exergônicas, o que auxilia no efeito sinérgico citado anteriormente (CHANDRA et al., 2012). Visto que os microrganismos metanogênicos ocupam a posição final no ambiente anaeróbio, durante a degradação dos compostos orgânicos, uma baixa taxa de crescimento e atividade dos mesmos representa um fator limitante no processo de digestão em geral. Na Figura 2.8 se

encontra esquematizada a digestão anaeróbia e os grupos de microrganismos envolvidos na degradação de matéria orgânica.

Figura 2.8 - Rotas metabólicas e grupos microbianos na digestão anaeróbia



Fonte: adaptado de CHERNICHARO (2007).

2.5.1 Fatores que afetam a digestão anaeróbia

O metano contido no biogás provém de um processo conduzido sob condições anaeróbias e específicas, suportadas por um consórcio microbiano que processa uma determinada matéria-prima (APPELS et al., 2008). Esse consórcio é sensível às condições ambientais às quais estão submetidos e, desta forma, o mau funcionamento do mesmo durante a digestão anaeróbia pode resultar na baixa produção de biogás (YADVIKA et al., 2004).

2.5.1.1 Efeitos da temperatura

A temperatura tem um efeito importante sobre as propriedades físico-químicas dos substratos presentes na digestão anaeróbia. Sua influência também se dá sobre a taxa de crescimento e no metabolismo dos microrganismos, ou seja, sobre a dinâmica populacional dentro do reator anaeróbio (HILL et al., 2001). Os grupos de microrganismos mais sensíveis a um aumento de temperatura são as metanogênicas acetotróficas (APPELS et al., 2008).

A digestão anaeróbia termofílica ocorre entre 45 e 70 ºC. Sua vantagem frente à digestão anaeróbia realizada em condições mesofílicas, isto é, entre 20 e 40ºC (CHERNICHARO, 2007), está no fato de suas taxas de reação metabólica serem mais rápidas. No entanto, uma rápida produção de ácidos orgânicos e acidificação pode ocorrer durante a digestão termofílica, inibindo a produção de biogás. Outra desvantagem da digestão termofílica é sua sensibilidade a mudanças no meio, apresentando pouca estabilidade (WANG et al., 2014). Sant'anna Júnior (2013) relata que a digestão anaeróbia ainda pode ocorrer em temperaturas inferiores a 20 ºC, sendo denominada de psicrofílica. As taxas metabólicas para as bactérias que atuam nessas condições são as mais baixas dentre as três citadas.

Os sistemas mesófilos apresentam melhor estabilidade em seus processos e maior concentração de bactérias. Entretanto, são mais sensíveis a cargas orgânicas elevadas de baixa biodegradabilidade (BOWEN et al., 2014). Sendo assim, as melhores condições para a digestão anaeróbia seriam a hidrólise e acidogênese termofílicas e metanogênese mesofílica, o que requer a digestão anaeróbia em duas etapas (HILL et al., 2001).

Há na literatura relatos de que, em virtude da diversidade de bactérias atuantes na digestão anaeróbia, o efeito da temperatura nas etapas de hidrólise e acidogênese não é significativo. Entretanto, nas etapas de acetogênese e metanogênese uma variação brusca de temperatura tem efeito negativo na fisiologia dos microrganismos, afetando o seu desempenho (RAJESHWARI et al. (2000).

2.5.1.2 Efeitos do pH, acidez e alcalinidade

O pH tem um efeito direto na digestão anaeróbia e na geração de biogás. A faixa ótima de pH de trabalho num reator anaeróbio operando em um único estágio está entre 6,8 e 7,0. Valores de pH muito fora desta faixa afetam a taxa de crescimento dos microrganismos envolvidos na degradação anaeróbia da matéria orgânica (METCALF e EDDY, 2003; GONZÁLEZ-CABALEIRO et al., 2015).

Chandra e colaboradores (2012) relataram que a atividade enzimática das bactérias fermentativas ocorre em pH acima de 5,0. Já segundo Lee e colaboradores (2009), o pH ótimo para as bactérias acidogênicas encontra-se entre 5,5 e 6,5. De acordo com Zhang et al.(2009), as arqueas metanogênicas são mais eficientes em pH entre 6,5 e 8,2, sendo o pH ideal 7,0. Suas atividades se reduzem muito em valores de pH inferiores a 6,0.

Zheng e colaboradores (2015) analisaram o efeito do pH sobre a fermentação acidogênica em reatores em batelada contendo resíduos de frutas e legumes deteriorados em um período de 96 h. Observaram diferentes composições de produtos na medida em se variou o pH. Para valores de pH igual a 4 e 5, houve rendimento maior em 84 h. Todavia em pH igual a 6, a produção de ácidos diminuiu. Isto ocorreu em função dos microrganismos metanogênicos serem capazes de sobreviver em pH igual a 6, e também por terem convertido os ácidos orgânicos voláteis em CO_2 e CH_4.

Os ácidos orgânicos voláteis produzidos durante a digestão anaeróbia tendem a reduzir o pH do meio reacional. Esta redução é normalmente contrabalanceada pela atividade das arqueas metanogênicas, pois estas também produzem alcalinidade na forma de dióxido de carbono e bicarbonatos (SANT'ANNA JÚNIOR., 2013).

O pH do sistema de digestão anaeróbia é controlado pela concentração de CO_2 na fase gasosa e pela concentração da alcalinidade inerente ao bicarbonato na fase líquida. Se a concentração de CO_2 na fase gasosa permanece constante, uma possível adição de alcalinidade na forma de bicarbonato no reator pode aumentar o pH (ISIK & SPONZA, 2005). Uma capacidade de tamponamento de 70 meq/L de $CaCO_3$ ou uma proporção molar de pelo menos 1,4:1 de bicarbonato: ácidos orgânicos

voláteis (AGV) deve ser mantida durante um processo de digestão estável e bem tamponado (AGDAG e SPONZA, 2005; APPELS et al., 2008).

Segundo Aquino e Chernicharo (2005), as diferenças cinéticas entre as bactérias fermentativas, acetogênicas e os microrganismos metanogênicos pode causar um desequilíbrio entre produção e consumo de compostos intermediários durante condições de choque de carga orgânica em um reator anaeróbio. Isso pode resultar no acúmulo de dióxido de carbono, hidrogênio e AGV, a depender da intensidade do choque e das particularidades do sistema de tratamento empregado.

O acúmulo de CO_2 pode então levar ao aumento da concentração de ácido carbônico dissolvido, aumentando assim a concentração de prótons (H^+) no meio, pelo deslocamento do equilíbrio químico do bicarbonato. O acúmulo de hidrogênio, por outro lado, pode resultar em maior produção dos ácidos orgânicos propionato e butirato, cuja degradação é inibida termodinamicamente pela presença de elevadas concentrações de acetato e hidrogênio dissolvido. A inibição dos microrganismos sintróficos pelo acúmulo de produtos acidogênicos ocasiona um contínuo acúmulo de AGV, que pode contribuir para o consumo de alcalinidade e decréscimo do pH.

A queda do pH supracitada pode afetar principalmente o crescimento de microrganismos metanogênicos e sintróficos, compondo o problema de acúmulo de AGV, podendo levar ao colapso do processo de digestão anaeróbia.

2.5.1.3 Nutrientes

A microbiota responsável pela digestão anaeróbia necessita de oligoelementos para seu crescimento e para homeostase de suas atividades enzimáticas. Suas necessidades nutricionais, usualmente, são estabelecidas a partir da composição química das células microbianas (LETTINGA et al., 1996 apud CHERNICHARO, 2007).

A degradação anaeróbia dos substratos em um processo de digestão depende da disponibilidade de diferentes nutrientes no meio, como por exemplo, nitrogênio e fósforo (DEUBLEIN e STEINHAUSER, 2008). Pode-se verificar a inibição da atividade microbiológica pela baixa concentração de fósforo e de íons amônio, que são a fonte

preferida de nitrogênio no substrato e esta deve ser suprida (CHERNICHARO, 2007; DEUBLEIN e STEINHAUSER, 2008).

Sugere-se que para biomassas com elevado coeficiente de produção celular, como processos que envolvem a degradação de carboidratos, a relação DQO: Nitrogênio: Fósforo seja de 350: 5: 1 (LETTINGA et al., 1996 *apud* CHERNICHARO, 2007).

Elementos como o níquel são fortes estimuladores da produção de metano. Sabe-se que a adição de cálcio e magnésio como suplementos nutricionais pode melhorar a produção de metano e que o tungstênio é importante por estimular a atividade metanogênica e a degradação de propionato (RIAÑO et al., 2011; FACCHIN et al., 2013). Além disso, a suplementação com cálcio, ferro, níquel e cobalto pode ser uma alternativa para se evitar o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis nos reatores de digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2007; MAO et al., 2015).

Facchin et al. (2013) avaliaram o efeito da suplementação de micronutrientes (Co, Mo, Ni, Se e W) sobre a produção de biogás, em um reator tipo tanque agitado contínuo (CSTR) em condições mesofílicas, utilizando efluentes gerados na digestão de resíduos de alimentos em escala de bancada, e verificaram um incremento de 45 a 65% na produção de metano.

2.5.1.4 Compostos inibidores e tóxicos

Segundo Chernicharo (2007), um mesmo composto químico pode ter atividade inibitória, estimulante ou ser tóxico dependendo da concentração em que se encontra no meio. No entanto, mesmo que o composto iniba a atividade da microbiota do lodo anaeróbio, esta pode ter uma determinada capacidade de adaptação, desde que o impacto da toxicidade causada por esses elementos possa ser minimizado por artifícios de projeto. O autor aponta soluções como a elevação da idade do lodo bem como a minimização do tempo de residência dos compostos tóxicos no reator.

Compostos como oxigênio, amônia, enxofre e cátions de metais alcalinos e alcalino terrosos como sódio, potássio, cálcio e magnésio são tidos, normalmente, como inibidores ou tóxicos. Na Tabela 2.4 são apresentados os níveis de inibição para alguns elementos.

Tabela 2.4 - Concentrações inibitórias e estimuladoras de alguns elementos

Íon	Concentração (mg/L)		
	Concentração desejada	Inibição moderada	Inibição elevada
Cálcio (Ca^{2+})	100-200	2500-4500	8000
Sódio (Na^{+})	100-200	3500-5500	8000
Potássio (K^{+})	200-400	2500-4500	12000
Magnésio (Mg^{2+})	75-150	1000-1500	3000

Fonte: adaptado de McCarty (1964 *apud* CHERNICHARO, 2007).

O enxofre se torna tóxico em concentrações superiores a 200 mg/L em pH ácido, que favorece a solubilização do gás sulfídrico no meio reacional. O sulfeto pode ser formado no reator por bactérias redutoras de sulfato, durante a sulfetogênese, com formação de gás sulfídrico e gás carbônico (CHERNICHARO, 2007).

Já o oxigênio passa a ter efeito inibitório quando sua concentração na fase líquida do reator é superior a 0,1 mg/L. Este gás pode ser introduzido no digestor anaeróbio com o afluente no momento da partida. Quando houver o contato do oxigênio com o lodo metanogênico, haverá inibição da atividade (CAMPOS, 1999; CHERNICHARO, 2007). Se não ocorrer uma aeração intensa no reator, o oxigênio dissolvido pode ser removido pelas bactérias acidogênicas anaeróbias facultativas, não havendo ação tóxica.

Com o que foi dito em mente, deve-se garantir uma vedação eficiente do reator para evitar difusão de O_2 para o meio reacional. Para se tornar o ambiente reacional anaeróbio durante a realização dos experimentos, pode-se purgar o conteúdo do reator com gases inertes como nitrogênio e argônio.

2.6 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS

Como apresentado nas seções anteriores, as bactérias fermentativas apresentam pH ótimo para sua atividade enzimática em faixas reconhecidamente ácidas, enquanto os microrganismos metanogênicos apresentam melhor atividade em valores de pH próximos à neutralidade ou levemente alcalino. Além do mais, quando

se conduz a digestão anaeróbia em um único estágio podem ocorrer problemas de acúmulo de AGV, que prejudicam a etapa metanogênica da digestão anaeróbia (AQUINO & CHERNICHARO, 2005).

Ambos aspectos remetem a uma estratégia que vem cada vez mais sendo estudada na literatura: a separação dos estágios acidogênico e metanogênico em reatores distintos O objetivo dessa estratégia é produzir AGV em condições ótimas de operação em um primeiro estágio e usar a saída deste para alimentar um segundo estágio metanogênico, também operando em condições ótimas para gerar metano. Dessa forma, no caso do primeiro reator produzir biohidrogênio, a extração líquida global de energia do processo em dois estágios é maior do que na configuração em estágio único (PARK et al., 2010).

Para aumentar a estabilidade da operação e melhorar o controle operacional do processo, a digestão anaeróbia em dois estágios compartimentaliza no primeiro estágio as reações de hidrólise e acidificação e no segundo estágio as reações metanogênicas (FOX & POHLAND, 1994). A heurística dessa separação está esquematizada na Figura 2.9.

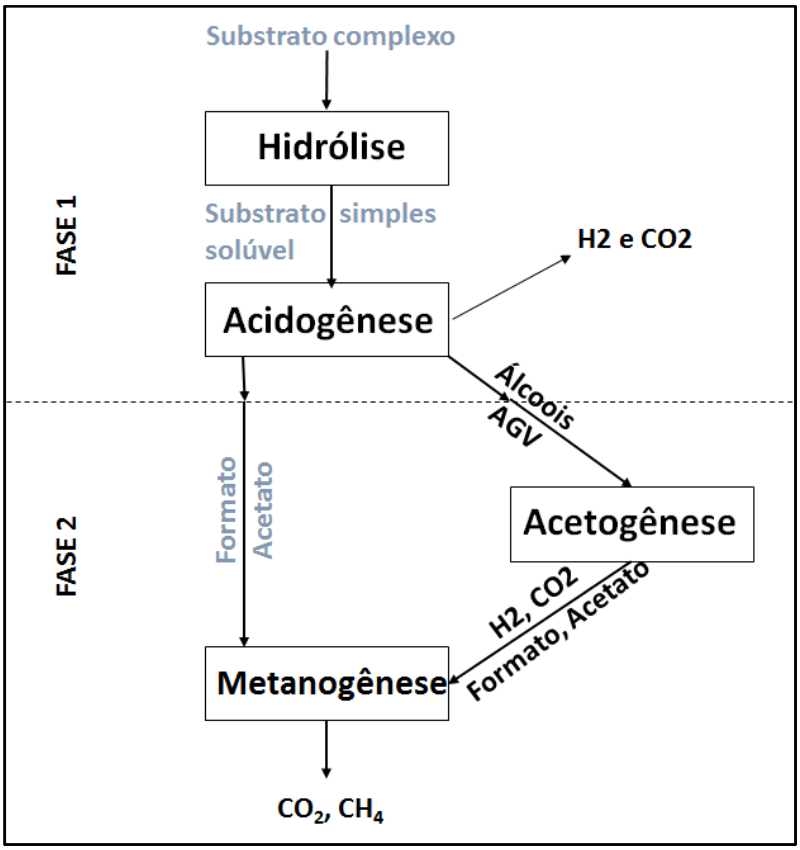
O processo de separação física dos estágios acidogênico e metanogênico em reatores distintos foi proposto pela primeira vez por Pohland e Ghosh (1971). Desde então, inúmeros estudos foram feitos utilizando essa heurística, empregando diferentes configurações de reatores. Vários tipos de substratos têm sido estudados, inclusive os de origem lignocelulósica, comparando-se em alguns casos o efeito dessa configuração em termos de potencial de produção de biometano (BMP).

Santos e colaboradores (2018) estudaram a digestão anaeróbia em um e dois estágios de hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir do pré-tratamento com ozônio de casca do grão de café. Foram utilizados diferentes graus de severidade no pré-tratamento: o pH variou de 3 a 11; a dosagem de ozônio variou de 6,8 a 81 mg O_3/ g de casca de café; já o tempo de pré-tratamento variou de 5 a 60 minutos. Cada hidrolisado teve sua DQO e concentração de açúcares totais determinada. Não se avaliou qualitativamente nem quantitativamente os inibidores presentes nos hidrolisados. O hidrolisado cujo pré-tratamento proporcionou melhor produtividade de metano na digestão em estágio único (91,1 NmL CH_4/ g $DQO_{alimentada}$), quando digerido em dois estágios gerou hidrogênio e metano com os seguintes rendimentos:

48,5 NmL H_2/g $DQO_{alimentada}$ e 284,6 NmL CH_4/g $DQO_{acidogênica}$. Verificou-se um aumento de 212% na produtividade de metano com a configuração em dois estágios.

Um resumo com este e outros estudos já realizados é apresentado no Quadro 2.3. Como se pode verificar, com exceção da digestão da fração líquida no trabalho de Parkinen et al. (2009), em que a produção de metano não havia se estabilizado por completo no segundo estágio quando da avaliação da produtividade de metano, todos os outros trabalhos apresentaram maior produção de metano quando da separação da digestão anaeróbia em duas etapas, provando a eficiência dessa estratégia que, por ser mais eficiente, também foi adotada no presente trabalho.

Figura 2.9 - Sequência simplificada da digestão anaeróbia em dois estágios



Fonte: Adaptado de FOX & POHLAND (1994).

Quadro 2.3 - Comparação entre processos de digestão anaeróbia em estágio simples e dois estágios

Substrato		Tipo de processo	Digestão em estágio simples	Digestão anaeróbia em dois estágios		Referência
				Primeiro estágio (H_2)	Segundo estágio (CH_4)	
			mL CH_4/gSV	mL H_2/gSV	mL CH_4/gSV	
Sorgo Sacarino	Fração sólida após pré-tratamento mecânico	Batelada	[a]78	-	-	Antonopoulou et al. (2008a)
	Fração líquida após pré-tratamento mecânico	Contínuo	-	[a]10,4	[a]29	
Efluente do pré-tratamento termomecânico de madeira de eucalipto		Contínuo	[b]300	[b]340		Viñas et al. (1993)
Resíduo de batata		Contínuo	-	[c]71	[c]513	Zhu et al. (2008)
Soro do Queijo		Contínuo	[d]310	[d]41	[d]364	Antonopoulou et al. (2008b)
Melaço		Contínuo	-	1,4	17,7	Park et al. (2010)
Resíduo alimentar		Batelada	-	290	240	Han et al. (2005)
Silagem de grama	Silagem Bruta	Batelada	431	5,6	467	Pakarinen et al. (2009)
	Fração sólida da silagem após pré-tratamento alcalino	Batelada	299	3,4	490	
	Fração líquida da silagem após pré-tratamento alcalino	Batelada	703	31,1	520	
Batata (simulando resíduo alimentar)		Batelada	-	[e]271	[e]158	Xie et al. (2008)
Casca dos grãos de café	Fração Líquida do pré-tratamento com O_3	Batelada	[f]91,1	[g]48,5	[f]284,6	Santos et al. (2018)

Notas: a : mL de biogás/ g de massa seca; b: mL de biogás/g DQO removida; c: mL/ g ST; d: mL de biogás/g DQO alimentada; e: mL/g SVT; f: NmL CH_4/ $gDQO_{alimentada}$; g: NmL de H_2/gDQOalimentada

Fonte: elaboração própria (2019).

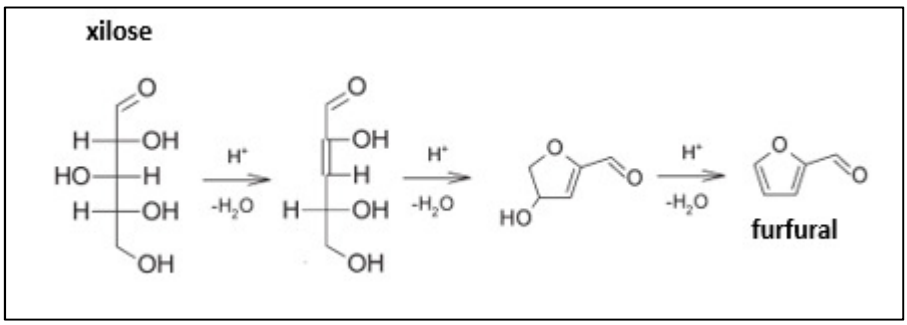
2.7 A FORMAÇÃO DO FURFURAL E SEUS EFEITOS INIBITÓRIOS

Durante o pré tratamento de biomassas lignocelulósicas utilizando tratamentos químicos e termoquímicos, subprodutos da decomposição desses materiais são formados na mesma medida em que os açúcares são liberados. Tais compostos podem ter efeitos negativos na digestão anaeróbia (BARAKAT et al., 2012; SIQUEIRA & REGINATTO, 2015).

Dentre os compostos liberados no processo supracitado, estão o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), subprodutos formados a partir da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente. Danon e colaboradores (2016) propuseram que o mecanismo de conversão de xilose a furfural pode se dar por desidratação por catalise homogênea em meio ácido (Figura 2.10).

Além dos subprodutos provenientes da degradação dos açucares contidos nas frações celulósica e hemicelulósica, podem estar presentes nos hidrolisados compostos fenólicos liberados a partir da degradação da lignina como a vanilina, o siringaldeído e o ácido 4-hidroxibenzóico (BARAKAT et al., 2012; GALBE & ZACCHI, 2012; SIQUEIRA & REGINATTO, 2015).

Figura 2.10 - Produção de furfural a partir de xilose via β-eliminação.



Fonte: adaptado de DANON et al. (2016).

De todos os inibidores estudados, o furfural e o HMF apresentam maior inibição na produção de biohidrogênio, com um efeito inibitório mais pronunciado associado ao primeiro (HAROUN et al., 2016).

Os efeitos inibitórios do furfural estão relacionados aos danos causados na membrana celular, à sua reatividade com o conteúdo intracelular, ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, à inibição do metabolismo fermentativo e à alteração

da permeabilidade da membrana celular (ALLEN et al., 2010; ALMEIDA et al., 2007; ZALDIVAR et al., 1999). A toxicidade desse metabólito está relacionada à sua estrutura química e hidrofobicidade, que permite sua passagem através da membrana (BARAKAT et al., 2012).

O furfural inibe enzimas NADH-dependentes, como a piruvato desidrogenase, que é fundamental para o correto funcionamento das principais vias metabólicas (MODIG et al., 2002; PALMQUIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). Os autores citam, também, que o furfural pode ser reduzido a álcool furfurílico, consumindo NADH. A depleção do mesmo reduz a produção de hidrogênio e de outros metabólitos que requerem NADH, diminuindo o rendimento na produção de biohidrogênio e biogás.

Algumas bactérias, em condições de estresse gerado por esses compostos inibitórios sintetizam proteínas de choque térmico, que auxiliam a reparar os danos que tais compostos causam no DNA e a manter a estrutura do sistema enzimático funcional (IBRAHEEMAND NNIMBA, 2013 *apud* MONLAU, 2014).Conhecer os níveis de inibição e o impacto do furfural e outros subprodutos tóxicos se torna fundamental para se definir os níveis de remoção destes em hidrolisados visando maximizar a produção de biogás (BARAKAT et al., 2012; KUMAR et al., 2014; SIQUEIRA & REGINATTO, 2015).

Akobi e colaboradores (2016) estudaram os efeitos do furfural sobre a taxa de produção e produtividade de hidrogênio na digestão de hidrolisado sintético contendo arabinose, xilose, manose, galactose, glicose, formato e acetato, empregando quatro diferentes relações substrato/inóculo (S_0/X_0): 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0. O pH 5,5 empregado nesse estudo é próprio para o estágio acidogênico. A concentração de inóculo foi mantida fixa, variando-se a concentração da solução de hidrolisado adicionada. Foram estudadas quatro concentrações do inibidor: 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L. Em relação aos controles, foi verificada maior produtividade de H_2 para a relação S_0/X_0 4,0: 0,99 mol H_2/ mol $açúcares_{inicial}$. Para todas as relações S_0/X_0 avaliadas com concentrações de furfural menores que 1 g/L, verificou-se aumento na produtividade de hidrogênio. Tal parâmetro chegou a ser quase 20% maior que o da sua condição controle para S_0/X_0 4,0 e 1 g/L de furfural. O aumento da concentração de furfural para 2 e 4 g/L ocasionou redução da produtividade de H_2 em 9% e 41%, respectivamente.

Cao e colaboradores (2010) estudaram os efeitos do furfural na produção de H_2, utilizando cepa isolada de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16*, na digestão de solução de xilose 10 g/L. Foram avaliadas concentrações do derivado furânico variando de 0,2 a 2,0 g/L. Foi verificado que concentrações até 0,5 g/L de furfural não diminuíram a produtividade em hidrogênio. A concentração de 1,0 g/L de furfural ocasionou redução de 20% nesse parâmetro e, com 2,0 g/L do inibidor não mais se verificou produção de hidrogênio.

Pekarová e colaboradores (2017) estudaram os efeitos do furfural em relação à produção de metano a partir da digestão anaeróbia de meios sintéticos contendo acetato de sódio na concentração de 10 g/L como fonte de carbono. Foram avaliadas concentrações de furfural de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L. O pH 7,8 empregado nesse estudo é próprio para o estágio metanogênico. A taxa máxima de produção de metano aumentou para todas as concentrações de furfural avaliadas. Até 0,5 g/L de furfural houve redução de até 46% na duração da fase de adaptação. A concentração mais alta do inibidor aumentou o tempo de adaptação em 260%. Em relação à produtividade de metano, verificou-se que até a concentração de 0,2 g/L houve um aumento nesse parâmetro, chegando a um rendimento até 8% maior em relação ao controle. Já na concentração mais alta de furfural foi verificada uma redução de 41% na produtividade de CH_4.

No estudo de Santos e colaboradores (2018), os autores investigaram os efeitos do tratamento de um hidrolisado hemicelulósico, obtido a partir do pré-tratamento com ozônio de casca do grão de café, com 4 g/L de carvão ativado em pó e seus efeitos na digestão anaeróbia em estágio único, comparando com a digestão em um e dois estágios do hidrolisado não tratado. Para a digestão em um e dois estágios do hidrolisado não tratado, as produtividades de metano foram, respectivamente, de 72,6 NmL CH_4/ g $DQO_{alimentada}$ e 185,9 NmL CH_4/g $DQO_{acidogênica}$. Já para a digestão em estágio único do hidrolisado tratado com carvão ativado verificou-se produtividade de metano de 218,2 NmL CH_4/ g $DQO_{alimentada}$.

A interpretação dos resultados de Santos e colaboradores (2018) permite verificar o quanto os inibidores, removidos por adsorção ao carvão ativado em um dos testes, podem ter efeitos negativos em relação à produtividade de metano. Daí se demonstra a importância de estudos para se determinar em termos quantitativos os

efeitos de diferentes concentrações de compostos furânicos e outros inibidores na digestão anaeróbia de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas.

Como sugerido por Vivekanand e colaboradores (2012), é difícil se estabelecer com clareza os efeitos de subprodutos de hidrolisados oriundos do pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas na digestão anaeróbia. Isso porque o efeito positivo da liberação de fontes de nutrientes durante o pré-tratamento pode mascarar total ou parcialmente os efeitos inibitórios desses subprodutos. Assim, outros trabalhos baseados no uso separado ou misturado dos subprodutos puros são fundamentais para se elucidar seus efeitos individuais ou possíveis efeitos sinérgicos.

Não foram encontrados na literatura estudos de digestão em dois estágios de hidrolisados sintéticos, nos quais se avaliasse os efeitos do furfural sobre o lodo adaptado em cada um dos estágios. A inovação do presente estudo é justamente esta: após a adaptação de lodo anaeróbio à digestão em dois estágios de hidrolisado sintético contendo xilose, avaliou-se os efeitos do furfural na produção de AGV no lodo adaptado em reator acidogênico e os efeitos do inibidor no lodo adaptado em reator metanogênico em relação aos parâmetros cinéticos de produção de metano.

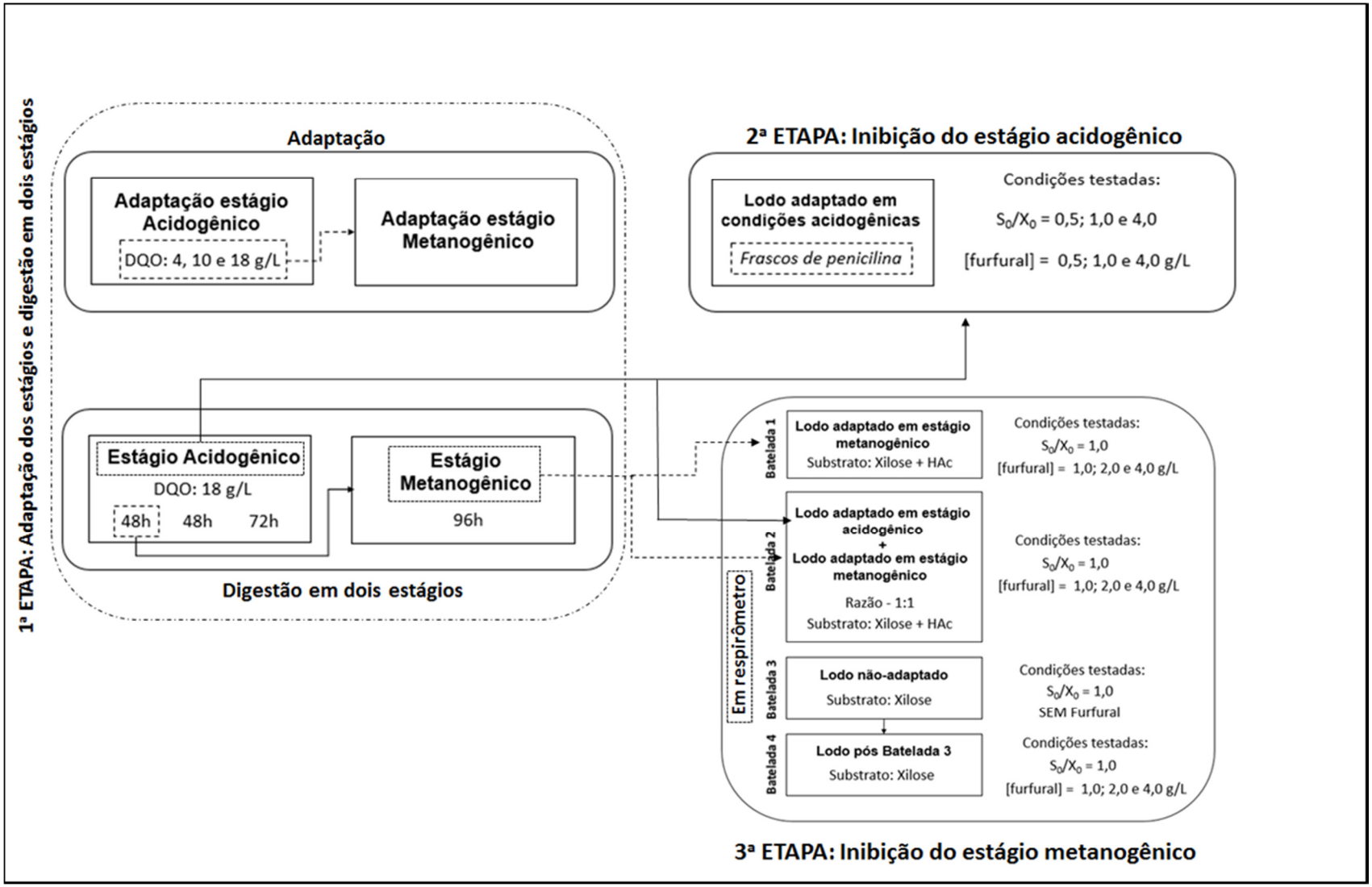
3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram utilizados reagentes de grau P.A. (pureza absoluta), exceto quando informado. Os meios sintéticos foram preparados para pronta utilização no dia de cada experimento e caracterizados assim que preparados. O lodo anaeróbio utilizado nos experimentos desta dissertação foi retirado de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) de uma planta tratamento de efluentes de uma indústria cervejeira. Após a coleta, as amostras de lodo foram mantidas sob refrigeração a 4ºC e, na medida da demanda, alíquotas do lodo foram retiradas, mantidas à temperatura ambiente para aclimatação e caracterizadas quanto a sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) para então se dar início aos experimentos.

O trabalho foi dividido em três etapas: adaptação do lodo anaeróbio para digestão em dois estágios; digestão anaeróbia em dois estágios; e avaliação dos efeitos inibitórios do furfural e ácidos graxos voláteis na digestão anaeróbia na fase acidogênica e na fase metanogênica, descritas nos itens 3.2, 3.3 e 3.4 desse capítulo.

O diagrama de blocos da Figura 3.1 descreve a sequência com que as etapas do estudo foram executadas.

Figura 3.1 - Diagrama de blocos simplificado das etapas de experimentos do estudo



Fonte: elaboração própria (2020).

3.1 MATERIAIS

Os equipamentos, bem como os principais produtos químicos e reagentes utilizados nesse trabalho encontram-se nos Quadros 3.1 e 3.2 a seguir.

Quadro 3.1 - Equipamentos Utilizados nos Experimentos

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Balança analítica	Ohaus	AR 2140 (classe I)
Digestor	Hach	DRB 200
Espectrofotômetro UV/VIS	Hach	DR 3900
Estufa de secagem (105°C)	Ética	400 (n°141)
Estufa microprocessada	Quimis	Q316M
Forno mufla	EDG	Forno Economic
Medidor de vazão de gás	Ritter	MGC-1 V 3.0
pHmetro microprocessado	Quimis	Q400MT
Placa de agitação magnética	Lab 1000	MS H280 Pro
Respirômetro	Bioprocess Control	AMPTS II
Titulador automático	Metrohm	888 Titrando

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.2 - Origem e Grau de Pureza dos Reagentes e Produtos Utilizados

REAGENTE	FABRICANTE	GRAU DE PUREZA
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	Inlab	P.A.
Ácido clorídrico 37%	Isofar	P.A.
Ácido sulfúrico	Qhemis	P.A.
Carbonato de sódio	Merck	P.A.
Dicromato de potássio	Synth	P.A.
Dihidrogenofosfato de potássio	Synth	P.A.
Furfural (ρ = 1,16 kg/L)	Sigma-Aldrich	99%
Hidrogenocarbonato de amônio	Synth	P.A.
Hidrogenocarbonato de sódio	Isofar	P.A.
Hidrogenoftalato de potássio	Merck	P.A.
Hidróxido de Sódio (micropérolas)	Proquimios	P.A.
Solução tampão pH 4,01	Qhemis	-
Solução tampão pH 6,86	Qhemis	-
Solução tampão pH 9,18	Qhemis	-
Sulfato de mercúrio (II)	Synth	P.A.
Sulfato de prata	Synth	P.A.
Tartarato de sódio e potássio	Reagen	P.A.
Xilose	Inlab	> 99%

Fonte: elaboração própria (2019).

3.2 ADAPTAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO

Baseando-se em revisão bibliográfica sobre a composição físico-química de hidrolisados da fração hemicelulósica da palha de sorgo, obtidos após pré-tratamento com ácido diluído, decidiu-se a priori realizar a adaptação do lodo à digestão anaeróbia, em condições mesofílicas (30ºC), de uma solução sintética que simulasse o hidrolisado obtido nas condições estudadas (HERRERA et al., 2003; SEPÚLVEDA-HUERTA et al., 2006; SENE et al., 2011).

No Quadro 2.2 do capítulo anterior se verifica que a xilose é o açúcar majoritário, contido na fração líquida após o referido pré-tratamento. Por isso foi escolhida como carboidrato modelo a ser utilizado como fonte de carbono. Esta decisão foi tomada a fim de facilitar o monitoramento do processo de degradação. Para tal, uma solução, denominada daqui em diante de “hidrolisado sintético”, foi composta por 17,6 g/L de xilose (demanda química de oxigênio - DQO de 18 g/L). Esta foi suplementada com NH_4Cl e KH_2PO_4 de forma que a relação DQO:N:P fosse de 350:5:1. Além disso, conforme Chernicharo (2007), foi acrescentada solução de micronutrientes (Tabela 3.1) na proporção de 1 mL/L para suprir as necessidades nutricionais do lodo anaeróbio.

Considerando que as duas principais etapas da digestão anaeróbia apresentam valores de pH ótimo diferentes, decidiu-se separar a digestão anaeróbia em dois estágios em batelada: um acidogênico e outro metanogênico. O ponto de partida foi a adaptação do reator acidogênico, visto que o sobrenadante final da batelada desse estágio foi utilizado como alimentação para adaptação do lodo no reator metanogênico.

Tabela 3.1 - Solução de micronutrientes utilizada para suplementação

Nutriente	Concentração (g/L)
$FeCl_3.6H_2O$	2,0
$ZnCl_2$	0,05
$CuCl_2.2H_2O$	0,03
$MnCl_2.4H_2O$	0,5
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,05
$AlCl_3.6H_2O$	0,05
$CoCl_2.6H_2O$	2
$NiCl_2.6H_2O$	0,05
H_3BO_3	0,01

Fonte: adaptado de CHERNICHARO (2007).

Para essa adaptação em dois estágios, foram utilizados dois garrafões de vidro Pyrex® de 2L (volume total de 2,3L) como reatores (Figura 3.2). O volume útil nesses reatores foi de 2L, sendo 1L ocupado pelo leito de lodo (com concentração de SSV de 53 g/L) e 1L ocupado pela respectiva alimentação.

A adaptação do lodo no reator acidogênico foi feita alimentando-o com soluções diluídas do hidrolisado sintético preparado nas condições já citadas. Foram aumentados paulatinamente os valores de DQO da alimentação do reator até que este fosse alimentado com o hidrolisado sintético puro. Foram feitas três alimentações com DQO inicial de 4000 mg/L, três com DQO inicial de 10000 mg/L e três com a DQO inicial de 18000 mg/L (que se refere ao hidrolisado sintético suplementado com xilose na concentração média verificada na literatura - 17,6 g/L).

Figura 3.2 - Reatores para adaptação do lodo à digestão anaeróbia em duas fases

Fonte: elaboração própria (2018).

Em cada uma dessas etapas, após a alimentação com hidrolisado sintético, o conteúdo do reator foi completamente homogeneizado e teve seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 15N. A boca do reator foi vedada com rolha de borracha, com uma saída para gás (direcionado para fora da sala climatizada) e uma saída para coleta de amostra, e selado com cola de silicone (Figura 3.2). O reator foi mantido em sala climatizada a 30 ºC. Diariamente, o conteúdo do reator foi homogeneizado e após sedimentação do leito de lodo até a marcação de 1L, foram retiradas alíquotas de 5 mL para análise de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos. As bateladas foram encerradas quando se verificou a estabilização da produção desses ácidos.

Nas duas primeiras etapas da adaptação (alimentação com DQO 4000 mg/L) os sobrenadantes finais das bateladas foram analisados quanto a pH, DQO_s, alcalinidade e AGV e descartados. A partir da última batelada alimentada a 4000 mg/L de DQO e nas bateladas subsequentes, após a retirada do sobrenadante pós-acidogênese, o mesmo foi caracterizado quanto ao pH, DQO_s, alcalinidade e concentração de AGV e reservado para alimentação do reator metanogênico. O Quadro 3.3 a seguir resume como se deu a alimentação de cada batelada.

Quadro 3.3 - Logística de alimentação para adaptação do lodo no estágio metanogênico

Saída do reator acidogênico utilizada	Batelada reator metanogênico alimentada
Acidogênese - Batelada 3 DQO_i = 4000 mg/L	Batelada 1 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 1 DQO_i = 10000 mg/L	Batelada 2 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 2 DQO_i = 10000 mg/L	Batelada 3 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 3 DQO_i = 10000 mg/L	Batelada 4 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 1 DQO_i = 18000 mg/L	Batelada 5 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 2 DQO_i = 18000 mg/L	Batelada 6 - metanogênese
Acidogênese - Batelada 3 DQO_i = 18000 mg/L	Batelada 7 - metanogênese

Fonte: elaboração própria (2019).

O volume de sobrenadante retirado do reator acidogênico foi ajustado para 1L em balão volumétrico, suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo, para se obter uma relação DQO:N:P de 350:5:1, bem como com solução de micronutrientes de acordo com Chernicharo (2007). O pH foi ajustado com $NaHCO_3$ até 6,5-6,8, pois após a homogeneização com o lodo do reator metanogênico o pH se aproximava de 7,0. Uma alíquota de 10 mL era retirada para caracterização da alimentação do reator metanogênico quanto à DQO_s, alcalinidade e concentração de AGV.

Após o ajuste de volume, suplementação e correção do pH, cada alimentação foi introduzida no reator metanogênico que teve seu conteúdo homogeneizado. A boca do reator foi então vedada com uma rolha de borracha e cola de silicone, adaptada com uma saída para captação de biogás. O biogás produzido no reator passava por um selo hídrico e seguia para um medidor de vazão gasométrica Ritter.

A produção acumulada de biogás foi medida pelo menos três vezes ao dia após a homogeneização do conteúdo do reator para liberação do biogás retido no leito de lodo. As bateladas no reator metanogênico se estendiam até a estabilização da produção de biogás. Ao fim da batelada, o sobrenadante era retirado e caracterizado quanto ao pH, DQO_s, alcalinidade e concentração de AGV.

3.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS

Após a adaptação do lodo anaeróbio nos dois reatores sob condições adequadas para a acidogênese e metanogênese, foi dado início ao processo de digestão anaeróbia do hidrolisado sintético em dois estágios.

A digestão no reator acidogênico foi conduzida da seguinte maneira: hidrolisado sintético com concentração de xilose de 17,6 g/L, suplementado com NH_4HCO_3 e KH_2PO_4 (de forma a se estabelecer uma relação DQO:N:P de 350:5:1) e 1 mL/L de solução de micronutrientes (conforme Chernicharo, 2007), foi alimentado ao reator acidogênico com lodo já adaptado. Após homogeneização, ajustou-se o pH inicial para 5,0 com NaOH 15N todas as segundas, quartas e sextas-feiras das semanas em que se procederam os testes.

Cada batelada durou 48, 48 e 72 horas, respectivamente, sendo retirados os sobrenadantes finais das bateladas às quartas, sextas e segundas-feiras. As alimentações e os sobrenadantes finais foram caracterizados quanto à DQO_s, pH, alcalinidade total e concentração de AGV. Toda semana, os sobrenadantes finais das bateladas da acidogênese encerradas na quarta-feira foram armazenados sob refrigeração a 4 ºC. Após caracterização, estes foram suplementados com as mesmas fontes de nitrogênio e fósforo usadas na primeira etapa da digestão anaeróbia, bem como com solução de micronutrientes, conforme Chernicharo (2007).

Os sobrenadantes finais supracitados foram então avolumados a 1L em balão volumétrico, o pH corrigido a 6,8 com $NaHCO_3$, e alimentados ao reator metanogênico. As bateladas desse segundo estágio da digestão tinham duração de aproximadamente 96 horas. Foram também caracterizados DQO_s, pH, alcalinidade total e concentração de AGV iniciais e finais de cada batelada para essa etapa da digestão. Ao todo, os dois reatores foram operados no regime descrito por sete semanas.

Durante as bateladas no reator metanogênico, foi acompanhada a produção de biogás por meio de um medidor Ritter a fim de se modelar essa produção, ajustando-a ao clássico modelo de Gompertz (equação 1) (ZWIETERING et al., 1990 *apud* CAO et al., 2017).

$$\boldsymbol{Y = Gm.e^{\left(-e^{\left(\frac{2,7182.Rm.(L-X)}{Gm}\right)+1}\right)}} \qquad (1)$$

Onde Y é a produção específica de biogás/metano no tempo X, G_m indica o potencial de produção específica de biogás/metano, R_m a taxa máxima específica de produção de biogás/metano e L a duração da fase *lag*.

A função objetivo utilizada foi a soma do erro quadrático médio entre os valores estimados pelo modelo e os dados experimentais. Para minimização da mesma utilizou-se o Método do Gradiente Reduzido Generalizado (GRG) desenvolvido por Carpentier e Abadie (1966), que é próprio para a resolução de problemas com função objetivo não-linear.

Ao se plotar a produção específica de biogás nas CNTP (Y) no tempo transcorrido em dias (X), foi possível ajustar os dados de produção de biogás ao modelo de Gompertz e estimar os parâmetros G_m, R_m e L. O ajuste dos dados ao modelo foi feito pela minimização da soma do erro quadrático médio entre os valores estimados pelo modelo e os dados experimentais utilizando o Solver do Excel. A partir dos valores estimados de G_m, R_m e L se pôde então determinar a curva do modelo e o coeficiente de correlação entre os dados experimentais e os gerados pelo modelo.

3.4 INIBIÇÃO POR FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO

Após a adaptação do lodo em dois reatores, separando os estágios acidogênico e metanogênico em reatores distintos, e a digestão anaeróbia de hidrolisado sintético de sorgo usando esta heurística, foram avaliados os efeitos do principal inibidor existente nos hidrolisados da fração hemicelulósica, o furfural, e dos ácidos graxos voláteis no desempenho da digestão anaeróbia nos dois estágios supracitados.

3.4.1 Inibição do estágio acidogênico pelo furfural

Para a avaliação dos efeitos do furfural no desempenho do estágio acidogênico foram preparadas três bateladas de experimentos em frascos de penicilina de 100 mL com 80 mL de volume útil. Foram estudadas três relações substrato/inóculo (S_0/X_0) diferentes: 0,5; 1,0 e 4,0 g/g. A massa de lodo (X_0) foi medida em termos de g SSV e a massa de substrato (S_0) em g de xilose adicionada. Após o preparo, os frascos foram incubados em estufa microprocessada a 30ºC (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Experimento para avaliação dos efeitos inibitórios do furfural

Fonte: elaboração própria (2019).

Nesta etapa do trabalho foi utilizado o lodo já adaptado à condição acidogênica, bem como meio sintético contendo 17,6 g/L de xilose suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo (para uma relação DQO:N:P de 350:5:1) e solução de micronutrientes (conforme Chernicharo, 2007). A este meio sintético foram acrescentadas diferentes concentrações de furfural: 0,5; 1,0 e 4,0 g/L. A condição Controle dos testes foi feita com meio sintético sem adição de furfural, sendo conduzida nas mesmas condições dos frascos contendo furfural. Todas as condições foram avaliadas em triplicata.

Em cada batelada foram preparados dois frascos de penicilina com os mesmos volumes total e útil, contendo apenas o lodo adaptado e soluções dos macronutrientes nitrogênio e fósforo e de elementos traço nas mesmas proporções utilizadas nos frascos contendo xilose e furfural. Esses frascos serviram como branco dos ensaios.

Ao final de cada batelada, foram verificados os efeitos do furfural na produção de AGV e consumo de xilose (quantificada por método analítico para açúcares redutores totais). As soluções utilizadas no preparo das bateladas com relação S_0/X_0 = 0,5, S_0/X_0 = 1,0 e S_0/X_0 = 4,0 estão descritas nos Quadros 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente. Já o preparo das bateladas com essas mesmas relações S_0/X_0 está descrito nos Quadros 3.7, 3.8 e 3.9, respectivamente.

Quadro 3 4 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 0,5)

Solução de substrato	Preparo
Solução xilose concentrada 4 vezes	14,08 g de xilose + 1160 mg de NH_4HCO_3 + 180,6 mg de KH_2PO_4; avolumado a 200 mL
Solução xilose (F = 0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 347 µL da solução de micronutrientes (conforme CHERNICHARO, 2007); avolumado a 200 mL.
Solução xilose (F = 0,5 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 347 µL da solução de micronutrientes + 151 µL furfural (F); avolumado a 200 mL.
Solução xilose (F = 1,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 347 µL da solução de micronutrientes + 302 µL furfural; avolumado a 200 mL.
Solução xilose (F = 4,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 347 µL da solução de micronutrientes + 1208 µL furfural; avolumado a 200 mL.
Solução Branco	290,2 mg de NH_4HCO_3 + 45,2 mg de KH_2PO_4 + 347 µL da solução de micronutrientes; avolumado a 200 mL.

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.5 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 1,0)

Solução de substrato	Preparo
Solução xilose concentrada 4 vezes	17,6 g de xilose + 1451 mg de NH_4HCO_3 + 225,8 mg de KH_2PO_4; avolumado a 250 mL
Solução xilose (F = 0 g/L)	80 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 441 µL da solução de micronutrientes (conforme CHERNICHARO, 2007); avolumado a 320 mL.
Solução xilose (F = 0,5 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 276 µL da solução de micronutrientes + 120 µL furfural (F); avolumado a 200 mL.
Solução xilose (F = 1,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 276 µL da solução de micronutrientes + 240 µL furfural; avolumado a 200 mL.
Solução xilose (F = 4,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 4 vezes + 276 µL da solução de micronutrientes + 960 µL furfural; avolumado a 200 mL.
Solução Branco	290,2 mg de NH_4HCO_3 + 45,2 mg de KH_2PO_4 + 276 µL da solução de micronutrientes; avolumado a 200 mL.

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.6 - Preparo das soluções do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 4,0)

Solução de substrato	Preparo
Solução xilose concentrada 5 vezes	22 g de xilose + 1841 mg de NH_4HCO_3 + 282,3 mg de KH_2PO_4; avolumado a 250 mL.
Solução Xilose (F = 0 g/L)	100 mL da solução xilose concentrada 5 vezes + 548 µL da solução de micronutrientes (conforme CHERNICHARO, 2007); avolumado a 500 mL.
Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 5 vezes + 274 µL da solução de micronutrientes + 120 µL furfural (F); avolumado a 250 mL.
Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 5 vezes + 274 µL da solução de micronutrientes + 240 µL furfural; avolumado a 250 mL.
Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	50 mL da solução xilose concentrada 5 vezes + 274 µL da solução de micronutrientes + 960 µL furfural; avolumado a 250 mL.
Solução Branco	362,8 mg de NH_4HCO_3 + 56,5 mg de KH_2PO_4+ 274 µL da solução de micronutrientes; avolumado a 250 mL.

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.7 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 0,5)

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	$pH_{mistura\ lodo+substrato}$	Volume NaOH 8M (μL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	34	56 mL Solução Branco	4,05	350	4,98	10
2	Branco 2	34	56 mL Solução Branco	4,08	350	4,97	10
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	34	50 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,99	360	4,99	4
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	34	46 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,98	360	4,96	-
5	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	34	46 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,98	360	5,08	-
6	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 1)	34	50 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	4,05	340	5,05	4
7	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 2)	34	46 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	4,00	340	5,01	-
8	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 3)	34	46 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	4,01	340	5,02	-
9	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	34	50 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,06	320	4,99	4
10	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	34	46 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,03	320	4,96	-
11	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	34	46 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,02	320	4,94	-
12	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	34	50 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,06	320	5,04	4
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	34	46 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,01	320	4,94	-
14	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	34	46 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,01	320	4,99	-

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.8 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 1,0)

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	$pH_{mistura\ lodo+substrato}$	Volume NaOH 8M (μL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	22	68 mL Solução Branco	3,67	290	5,12	10
2	Branco 2	22	68 mL Solução Branco	3,68	270	4,99	10
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	22	62 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,68	260	5,02	4
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	22	58 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,68	260	5,00	-
5	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	22	58 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,69	260	5,02	-
6	Xilose + [furfural] = 0 g/L (sacrifício)	22	58 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,68	260	4,99	-
7	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 1)	22	62 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	3,70	260	5,04	4
8	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 2)	22	58 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	3,69	260	5,07	-
9	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 3)	22	58 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	3,70	260	5,03	-
10	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	22	62 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,69	260	5,11	4
11	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	22	58 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,71	260	5,01	-
12	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	22	58 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,71	260	5,01	-
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	22	62 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,72	250	5,06	4
14	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	22	58 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,72	250	5,03	-
15	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	22	58 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,73	250	5,07	-

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.9 - Preparo do teste de inibição da acidogênese (S_0/X_0 = 4,0)

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	$pH_{mistura\ lodo+substrato}$	Volume HCl 5M (µL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	7	83 mL Solução Branco	6,73	230	5,05	10
2	Branco 2	7	83 mL Solução Branco	6,70	230	5,01	10
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	7	77 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	6,58	210	4,97	4
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	7	73 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	6,75	220	4,94	-
5	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	7	73 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	6,65	210	5,04	-
6	Xilose + [furfural] = 0 g/L (sacrifício)	7	73 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	6,72	210	4,95	-
7	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 1)	7	77 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	6,83	220	5,00	4
8	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 2)	7	73 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	6,73	210	4,93	-
9	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L (réplica 3)	7	73 mL Solução Xilose (F = 0,5 g/L)	6,80	210	5,03	-
10	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	7	77 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	6,76	220	4,99	4
11	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	7	73 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	6,80	210	4,96	-
12	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	7	73 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	6,71	210	5,00	-
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	7	77 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	6,71	220	4,93	4
14	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	7	73 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	6,72	210	4,94	-
15	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	7	73 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	6,75	210	4,94	-

Fonte: elaboração própria (2019).

As massas de lodo adaptado em reator acidogênico, na forma de SSV, e xilose adicionados em cada frasco de penicilina estão resumidos no Quadro 3.10.

Quadro 3.10 - Substrato e inóculo utilizados no teste de inibição da acidogênese

Razão S_0/X_0	Massa de SSV (g)	Massa de xilose (g)
0,5	1,64	0,82
1,0	1,05	1,05
4,0	0,33	1,32

Fonte: elaboração própria (2019).

Para cada relação S_0/X_0 estudada, um frasco controle (sem adição de furfural) de sacrifício foi preparado para se acompanhar a produção de AGV e consumo de ART ao longo do tempo de experimento.

3.4.2 Inibição do lodo no estágio metanogênico por furfural e AGV

Para a avaliação dos efeitos do furfural no desempenho do lodo no estágio metanogênico foram preparadas quatro bateladas de experimentos em respirômetro (AMPTS II). Foram utilizados, para o preparo das réplicas dentro de cada batelada, frascos Schott de 500 mL com 300 mL de volume útil e relação substrato/inóculo (S_0/X_0) igual a 1,0 g DQO/g SSV. A concentração de lodo (X_0) foi medida em termos de SSV e a concentração de substrato (S_0), em termos de DQO referente à xilose adicionada. Todos os frascos foram purgados com nitrogênio puro para garantir condições anaeróbias no reator.

Na primeira batelada foi utilizado lodo adaptado à condição metanogênica e, como substrato, meio sintético contendo 4,3 g/L de xilose e 8,2 g/L de ácido acético para mimetizar o sobrenadante final da batelada do teste de inibição da fase acidogênica com melhor produção de AGV. Cada frasco foi suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo, de forma a manter uma relação DQO:N:P de 350:5:1, e com 1 mL/L de solução de micronutrientes, conforme Chernicharo (2007).

Na segunda batelada foi utilizada mistura na proporção 1:1 (SSV:SSV) de lodo adaptado à condição acidogênica e lodo adaptado à condição metanogênica e, como substrato, meio sintético contendo 4,3 g/L de xilose e 8,2 g/L de ácido acético para

mimetizar o sobrenadante final da batelada do teste de inibição da fase acidogênica com melhor produção de AGV. Cada frasco foi suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo de forma a manter uma relação DQO:N:P de 350:5:1, e com 1mL/L de solução de micronutrientes, conforme Chernicharo (2007).

Na terceira batelada foi utilizado lodo coletado em reator anaeróbio de indústria cervejeira e, como substrato, meio sintético contendo 17,6 g/L de xilose suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo, de forma a manter uma relação DQO:N:P de 350:5:1, e 1 mL/L de solução de micronutrientes, conforme Chernicharo (2007).

Na quarta batelada, drenou-se o sobrenadante de cada frasco da terceira batelada por sifonamento, utilizando-se o lodo adaptado nessa batelada e, como substrato, meio sintético contendo 17,6 g/L de xilose suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo, de forma a manter uma relação DQO:N:P de 350:5:1, e 1 mL/L de solução de micronutrientes, conforme Chernicharo (2007).

No capítulo de Resultados e Discussão se encontram explicações sobre a composição de cada uma das bateladas avaliadas. Resumidamente, as condições testadas em cada batelada estão descritas no Quadro 3.11.

Na primeira, segunda e quarta bateladas foram avaliadas, em triplicata, diferentes concentrações de furfural: 0; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L. Em cada uma das quatro bateladas foram preparados também dois frascos Schott com mesmo volume total e volume útil contendo apenas o lodo e soluções dos macronutrientes nitrogênio e fósforo e de elementos traço nas mesmas proporções utilizadas nos frascos contendo xilose e furfural. Esses frascos serviram como branco dos ensaios.

Quadro 3.11 – Experimentos para avaliação da inibição do estágio metanogênico

Batelada	Inóculo	Condição
Primeira	Lodo metanogênico adaptado (puro)	Branco
		Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L
Segunda	Lodos metanogênico + acidogênico (1:1)	Branco
		Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L
		Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L
Terceira	Lodo de cervejaria não adaptado	Branco
		Adaptação Xilose (triplicata 1)
		Adaptação Xilose (triplicata 2)
		Adaptação Xilose (triplicata 3)
		Adaptação Xilose (triplicata 4)
Quarta	Lodo de cervejaria após um contato com hidrolisado sintético	Branco
		Xilose + [furfural] = 0,0 g/L
		Xilose + [furfural] = 1,0 g/L
		Xilose + [furfural] = 2,0 g/L
		Xilose + [furfural] = 4,0 g/L

Fonte: elaboração própria (2019).

Ao final de cada batelada foram verificados os efeitos do furfural e concentração de AGV nos parâmetros cinéticos de produção de metano, bem como no consumo de xilose. O preparo das soluções que foram usadas nas quatro bateladas de testes dessa etapa do trabalho está detalhado nos Quadros 3.12 a 3.15. Já o preparo das quatro bateladas de experimentos está detalhado nos Quadros 3.16 a 3.19.

Os dados de produção específica de metano (PEM) foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado usando o macro ‘Solver’ do Excel. A função objetivo utilizada nessa etapa do trabalho também foi a soma do erro quadrático médio entre os valores estimados pelo modelo e os dados experimentais. Para sua minimização utilizou-se o Método do Gradiente Reduzido Generalizado (GRG).

Quadro 3.12 - Preparo das soluções da primeira batelada do teste de inibição da metanogênese

Solução de substrato	Preparo
Solução Xilose (F = 0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1288 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1288 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 1,12 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1288 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 2,24 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1288 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 4,48 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Branco	516 mg de NH_4HCO_3 + 80,2 mg de KH_2PO_4 + 644 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 500 mL

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.13 - Preparo das soluções da segunda batelada do teste de inibição da metanogênese

Solução de substrato	Preparo
Solução Xilose (F = 0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1277 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 1 L. *pH ajustado de 2,70 para 4,68 com 6,09 g de $NaHCO_3$.*
Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1277 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 1,11mL de furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L; *pH ajustado de 2,67 para 4,65 com 6,09 g de $NaHCO_3$*
Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 +1277 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 2,22 mL de furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L; *pH ajustado de 2,74 para 4,68 com 6,09 g de $NaHCO_3$*
Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,3 g de xilose + 7,8 mL de HAc glacial (ρ = 1,05 kg/L) + 1032 mg de NH_4HCO_3 + 160,8 mg de KH_2PO_4 + 1277 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 4,44 mL de furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L; *pH ajustado de 2,74 para 4,69 com 6,09 g de $NaHCO_3$*
Solução Branco	516 mg de NH_4HCO_3 + 80,2 mg de KH_2PO_4 + 639 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 500 mL

Fonte: elaboração própria (2019)

Quadro 3.14 - Preparo das soluções da terceira batelada do teste de inibição da metanogênese

Solução de substrato	Preparo
Solução Xilose	36,96 g de xilose + 3,0471 g de NH_4HCO_3 + 474,2 mg de KH_2PO_4 + 3,68 mL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 2,1 L
Solução Branco	725,5 mg de NH_4HCO_3 + 112,9 mg de KH_2PO_4 + 877 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 500 mL

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.15 - Preparo das soluções da quarta batelada do teste de inibição da metanogênese

Solução de substrato	Preparo
Solução Xilose (F = 0 g/L)	17,6 g de xilose + 1451 mg de NH_4HCO_3 + 225,8 mg de KH_2PO_4 + 1754 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	17,6 g de xilose + 1451 mg de NH_4HCO_3 + 225,8 mg de KH_2PO_4 + 1754 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 1,53 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	17,6 g de xilose + 1451 mg de NH_4HCO_3 + 225,8 mg de KH_2PO_4 + 1754 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 3,06 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	17,6 g de xilose + 1451 mg de NH_4HCO_3 + 225,8 mg de KH_2PO_4 + 1754 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007) + 6,12 mL furfural (99%, ρ = 1,16 kg/L); avolumado a 1 L
Solução Branco	712 mg de NH_4HCO_3 + 112,9 mg de KH_2PO_4 + 877 µL da solução de micronutrientes (Chernicharo, 2007); avolumado a 500 mL

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.16 - Preparo da primeira batelada do teste de inibição da metanogênese

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	pH mistura lodo+substrato	Volume NaOH 8M ou *HCl* $_{(c)}$ *. somente para brancos* (mL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	67	245 mL Solução Branco	7,91	*0,1*	6,82	12
2	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	67	237 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,88	3,8	6,81	4
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	67	233 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,95	3,8	6,85	-
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	67	233 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	3,93	3,8	6,83	-
5	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	67	237 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,89	3,8	6,81	4
6	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	67	233 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,81	3,8	6,82	-
7	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	67	233 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	3,86	3,8	6,82	-
8	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 1)	67	237 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	3,90	3,8	6,82	4
9	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 2)	67	233 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	3,91	3,8	6,84	-
10	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 3)	67	233 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	3,91	3,8	6,81	-
11	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	67	237 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,89	3,8	6,80	4
12	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	67	233 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,92	3,8	6,85	-
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	67	233 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	3,91	3,8	6,81	-
14	Branco 2	67	245 mL Solução Branco	7,87	*0,1*	6,84	12

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.17 - Preparo da segunda batelada do teste de inibição da metanogênese

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	pH mistura lodo+substrato	Volume NaOH 8M ou *HCl 2M somente para brancos* (mL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	65	247 mL Solução Branco	*7,58*	*0,3*	*6,87*	12
2	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	65	239 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	4,89	2,2	6,86	4
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	65	235 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	4,90	2,2	6,82	-
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	65	235 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	4,90	2,2	6,86	-
5	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	65	239 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,88	2,2	6,82	4
6	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	65	235 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,90	2,2	6,86	-
7	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	65	235 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	4,89	2,2	6,82	-
8	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 1)	65	239 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	4,89	2,2	6,81	4
9	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 2)	65	235 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	4,92	2,2	6,82	-
10	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 3)	65	235 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	4,92	2,2	6,89	-
11	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	65	239 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,92	2,2	6,82	4
12	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	65	235 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,92	2,2	6,83	-
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	65	235 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	4,92	2,2	6,82	-
14	Branco 2	65	247 mL Solução Branco	*7,57*	*0,3*	*6,91*	12

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.18 - Preparo da terceira batelada do teste de inibição da metanogênese

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	Volume de H_2O destilada (mL)	pH mistura lodo+substrato	Massa $NaHCO_3$ adicionada (mg) *ou volume de HCl 1M somente para o branco* (mL)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	63	171 mL Solução Branco	76	7,35	*0,3*	7,20	10
2	Xilose F2	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	7,04	82	7,20	1
3	Xilose F3	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	7,02	130	7,20	1
4	Xilose F4	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	7,10	71	7,20	1
5	Xilose F5	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	7,01	152	7,20	-
6	Xilose F6	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	7,05	107	7,21	-
7	Xilose F7	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	7,02	124	7,21	-
8	Xilose F8	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	7,06	79	7,20	-
9	Xilose F9	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	7,07	84	7,20	-
10	Xilose F10	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	7,08	73	7,20	-
11	Xilose F11	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	7,14	20	7,20	-
12	Xilose F12	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	7,15	20	7,21	-
13	Xilose F13	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	7,13	35	7,20	-
14	Branco 2	63	171 mL Solução Branco	76	7,34	*0,3*	7,20	10

Fonte: elaboração própria (2019).

Quadro 3.19 - Preparo da quarta batelada do teste de inibição da metanogênese

Frasco	Conteúdo	Volume de lodo anaeróbio (mL)	Volume da solução de substrato	Volume de H_2O destilada (mL)	pH mistura lodo+substrato	Massa $NaHCO_3$ adicionada (g)	pH_{final}	Volume sobrenadante retirado para caracterizações (mL)
1	Branco 1	63	171 mL Solução Branco	76	7,14	0,03	7,20	10
2	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 1)	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	5,35	2,81	7,19	1
3	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 2)	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	5,48	2,61	7,20	1
4	Xilose + [furfural] = 0 g/L (réplica 3)	63	171 mL Solução Xilose (F = 0 g/L)	67	5,60	2,48	7,20	1
5	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 1)	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	5,48	2,51	7,20	-
6	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 2)	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	5,70	2,28	7,20	-
7	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L (réplica 3)	63	171 mL Solução Xilose (F = 1,0 g/L)	66	5,37	3,18	7,20	-
8	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 1)	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	5,57	2,49	7,20	-
9	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 2)	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	5,60	2,70	7,20	-
10	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L (réplica 3)	63	171 mL Solução Xilose (F = 2,0 g/L)	66	5,27	3,51	7,20	-
11	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 1)	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	5,65	2,59	7,20	-
12	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 2)	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	5,50	2,83	7,20	-
13	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L (réplica 3)	63	171 mL Solução Xilose (F = 4,0 g/L)	66	5,20	3,96	7,20	-
14	Branco 2	63	171 mL Solução Branco	76	7,20	-	7,20	10

Fonte: elaboração própria (2019).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os principais métodos analíticos utilizados neste trabalho e suas respectivas referências encontram-se no Quadro 3.20 a seguir. Nas amostras em que foi necessário separar o lodo antes das análises (DQO_s, ART), foi empregada filtração a vácuo através de membrana de acetato de celulose da Sartorius com diâmetro de poro de 0,45 μm.

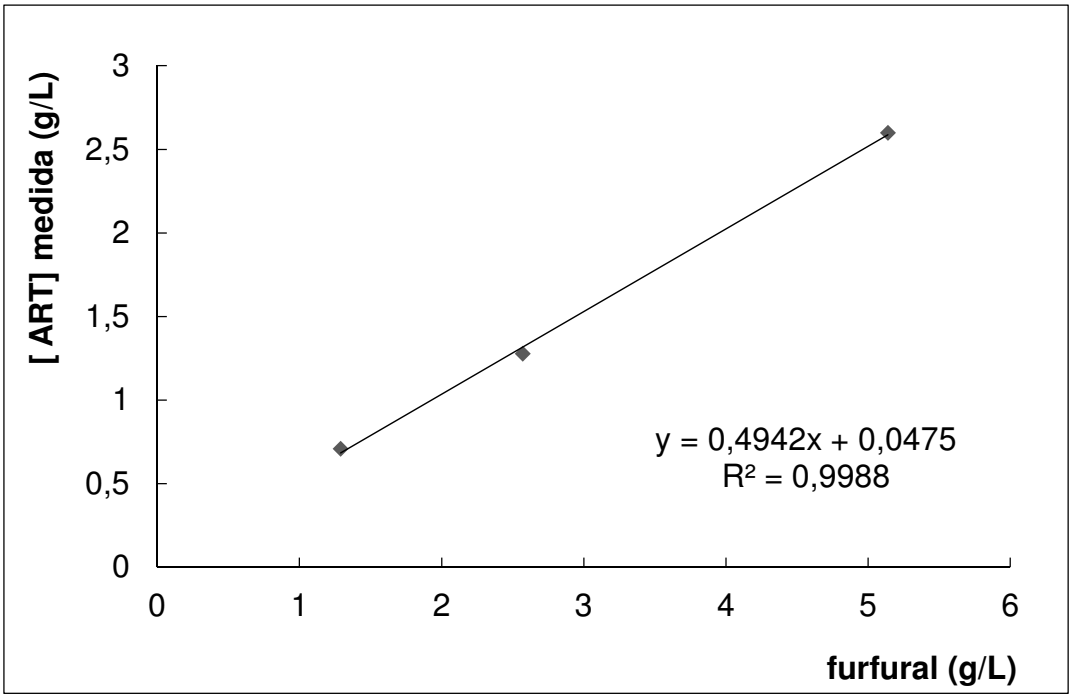
Quadro 3 20 - Parâmetros analisados e metodologias utilizadas nos experimentos

PARÂMETRO	MÉTODO	REFERÊNCIA
Sólidos Suspensos Totais	Gravimétrico	APHA 2540 D (2017)
Sólidos Suspensos Voláteis	Gravimétrico	APHA 2540 E (2017)
pH	Potenciométrico	APHA 4500-H^+ B (2017)
DQO	Refluxo fechado e análise espectrofotométrica	APHA 5220 D (2017)
Acidez	Potenciométrico	APHA 2310 B (2017)
Alcalinidade	Potenciométrico	APHA 2320 B (2017)
Açúcares Redutores Totais	Análise espectrofotométrica (método DNS)	Embrapa (2013)

Fonte: elaboração própria (2019).

Após o preparo das soluções de hidrolisado sintético contendo furfural, foi verificado durante a quantificação de ART que quanto maior a concentração de furfural, maior e mais discrepante era a quantidade de ART medida com relação à quantidade de xilose efetivamente adicionada. Foi feita, então, uma correlação entre o valor correspondente de ART medido pelo método do DNS e soluções com diferentes concentrações de furfural puro. Na Figura 3.4 se verifica uma correlação linear entre os dois parâmetros citados. Sabendo-se a concentração de furfural em cada frasco foi possível corrigir a quantidade efetiva de ART nos mesmos, descontando-se do valor quantificado o correspondente em ART referente ao furfural.

Figura 3.4 - Concentração de ART medida x concentração de furfural



Fonte: elaboração própria (2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ADAPTAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO

Conforme descrito no capítulo anterior, a primeira etapa do trabalho consistiu na adaptação do lodo anaeróbio coletado em uma planta de tratamento de efluentes de indústria cervejeira em reatores diferentes. Assim, a digestão anaeróbia de um hidrolisado sintético baseado na composição da fração hemicelulósica do sorgo pôde se dar em dois estágios separados sob condições ótimas: um acidogênico e outro metanogênico.

4.1.1 Adaptação do lodo no estágio acidogênico

A primeira etapa do trabalho consistiu na adaptação do lodo em reator sob condições ideais para a etapa acidogênica, com pH inicial próximo a 5,0. Foram conduzidas seis bateladas com hidrolisado sintético diluído: três com valores de DQO inicial de 4000 mg/L e três com DQO de 10000 mg/L, seguido de mais três bateladas com o hidrolisado sintético sem diluição, com DQO de 18000 mg/L.

Na Tabela 4.1 são apresentados os principais parâmetros monitorados durante a adaptação do lodo no estágio acidogênico. Se verificou que, com o aumento da concentração de matéria orgânica alimentada (DQO inicial), o pH ao fim das bateladas apresentou valores cada vez menores, acompanhando a maior produção de AGV e o consumo da alcalinidade disponível a partir das alimentações com DQO de 10000 mg/L Tal aumento na produção de AGV caracterizou a capacidade do lodo de se adaptar a concentrações crescentes de xilose, hidrolisando o açúcar para geração dos ácidos orgânicos pelas bactérias fermentativas.

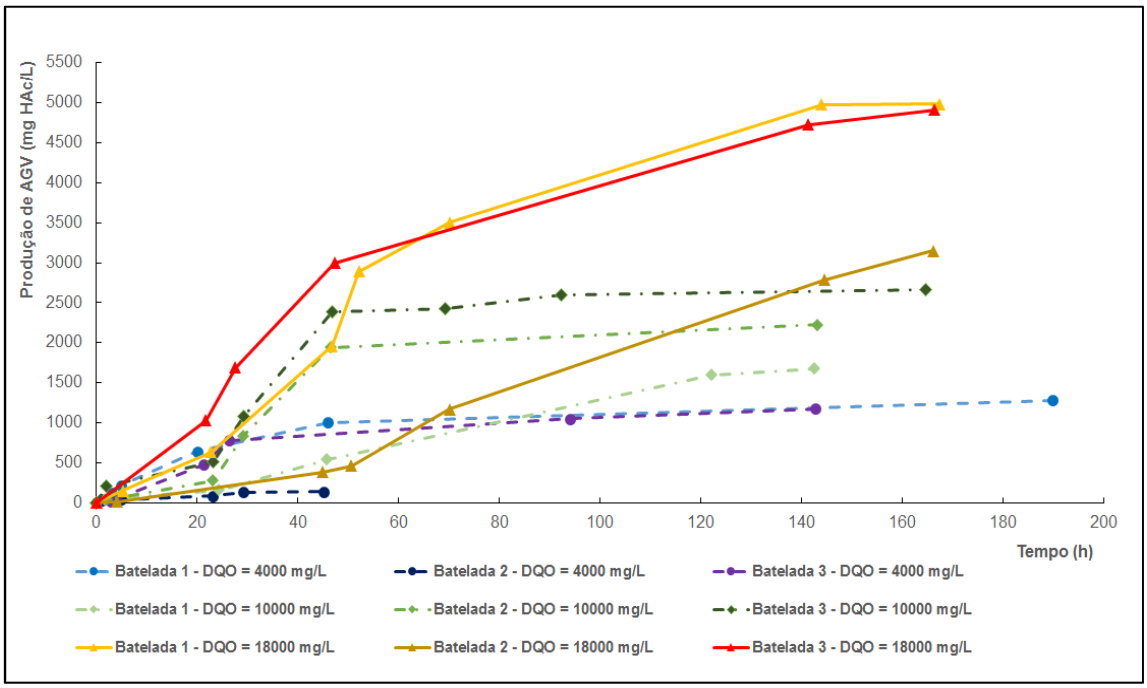
Na Figura 4.1 pode se observar a produção de AGV ao longo do tempo para todas as bateladas da adaptação do lodo no reator acidogênico. Com o aumento da concentração de matéria orgânica alimentada, a produção cumulativa de AGV também aumentou, corroborando que o lodo se adaptou bem ao hidrolisado sintético, conseguindo converter a xilose em ácidos orgânicos.

Tabela 4.1 – Resultados da adaptação do lodo no estágio acidogênico

Etapa da adaptação		pH_i	pH_f	$Alcalinidade_i$ (mg $CaCO_3$/L)	$Alcalinidade_f$ (mg $CaCO_3$/L)	$AGV_{produzidos}$ (mg HAc/L)
DQO_i 4000 mg/L	Batelada 1	5.05	4,86	352	561	1281
	Batelada 2	5.02	4,98	274	378	138
	Batelada 3	5,02	4,81	293	292	1173
DQO_i 10000 mg/L	Batelada 1	5,02	4,33	402	-	1676
	Batelada 2	5,00	4,20	594	-	2221
	Batelada 3	5,03	4,42	792	249	2667
DQO_i 18000 mg/L	Batelada 1	5,10	4,24	701	-	4984
	Batelada 2	4,98	4,42	843	-	3149
	Batelada 3	5,12	4,10	732	-	4913

Fonte: elaboração própria (2019).

Figura 4.1 – Produção de AGV durante adaptação do lodo no estágio acidogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

4.1.2 Adaptação do lodo no estágio metanogênico

Verificada a capacidade do lodo, no reator acidogênico, de produzir AGV, os sobrenadantes finais de cada batelada a partir da última batelada com alimentação de 4000 mg/L de DQO foram empregados para alimentar o reator metanogênico e se proceder a adaptação dessa fase, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos.

Na Tabela 4.2 são apresentados os principais parâmetros monitorados durante a adaptação do lodo ao estágio metanogênico. Foi verificado que ao longo da adaptação desse estágio o lodo respondeu bem ao aumento da concentração de matéria orgânica na alimentação. A remoção de DQO, inicialmente em 48%, aumentou logo na segunda batelada para 90%, alcançando 99% na última batelada dessa etapa do trabalho.

A alcalinidade na alimentação foi suficiente para suprir a demanda da microbiota para produção de biogás, visto que em nenhum momento foi exaurida durante a etapa de adaptação. O pH aumentou durante a degradação da matéria orgânica e, com exceção da primeira batelada, se manteve dentro da faixa tolerada para a digestão anaeróbia (6,5 a 8,0), segundo Ciobla et al. (2012).

Além disso, foi observado que o consumo de AGV, utilizados na produção de biogás, aumentou de 70% na primeira batelada para 97% na última batelada da adaptação.

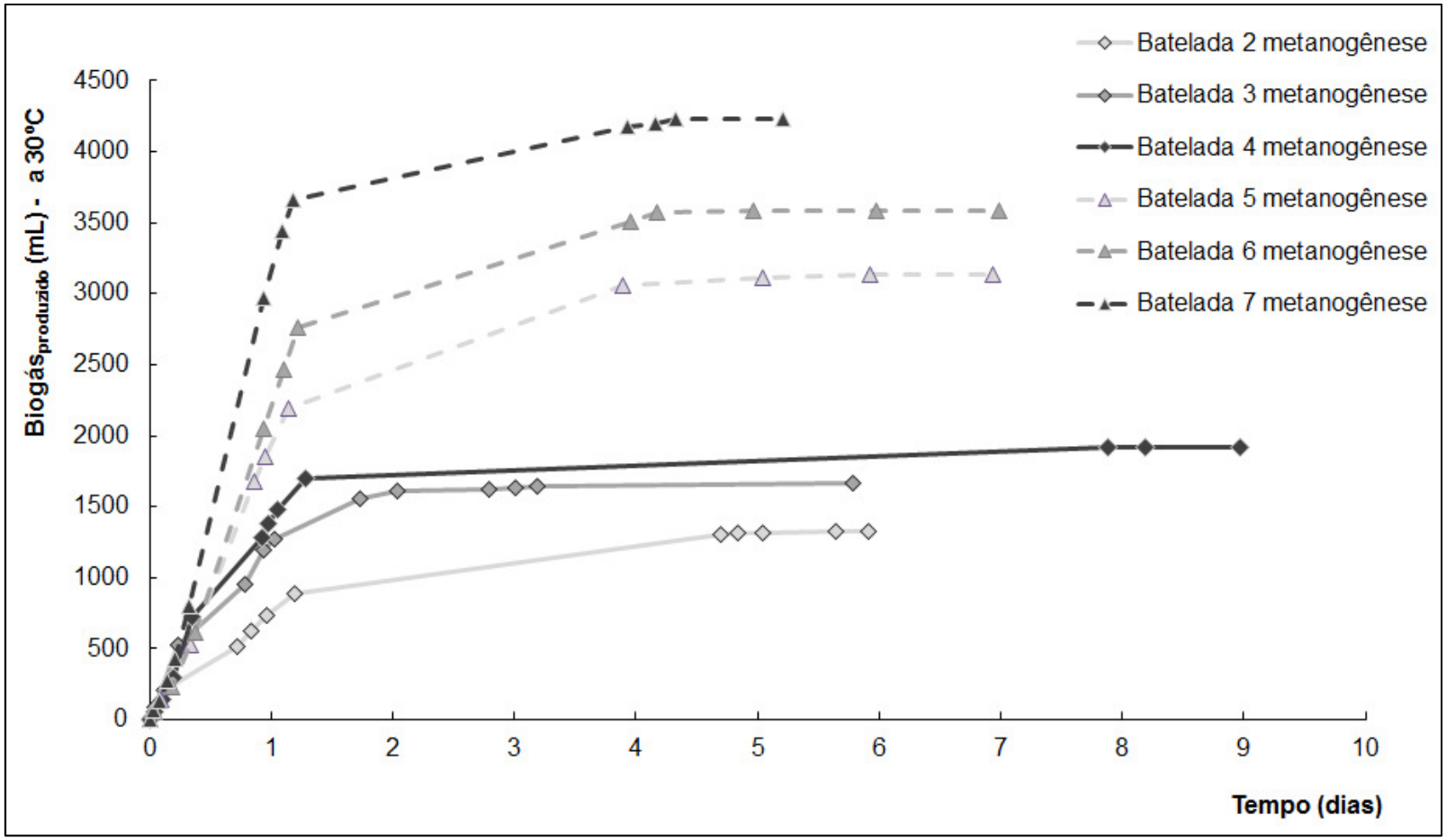
A Figura 4.2 apresenta a produção acumulada de biogás ao longo das bateladas de adaptação. A batelada 1 não se encontra representada por conta de um vazamento na mangueira de saída de gás junto ao medidor, que foi remediado nas bateladas subsequentes. Pode-se observar o aumento da produção de biogás da batelada 2 até a batelada 7 que, aliado ao consumo quase total de DQO e AGV alimentados ao reator, permite concluir que o lodo anaeróbio se adaptou bem ao aumento de concentração de matéria orgânica, se tornando apto a digerir o hidrolisado sintético contendo xilose, sem nenhuma diluição. A pequena redução da PEB, cerca de 15% comparando-se a segunda e última bateladas (Tabela 4.2) pode ser devido a uma limitação da massa de microrganismos no reator, dado que tanto a DQO como os AGV mantêm elevadas remoções até a última batelada.

Tabela 4.2- Resultados da adaptação do lodo no estágio metanogênico

Etapa da adaptação metanogênese	pH_i	pH_f	$DQO_{alimentada}$ (mg/L)	DQO_{final} (mg/L)	Consumo de DQO (%)	$Alcalinidade_i$ (mg $CaCO_3$/L)	$Alcalinidade_f$ (mg $CaCO_3$/L)	$AGV_{alimenados}$ (mg HAc/L)	AGV_{final} (mg HAc/L)	Consumo de AGV (%)	Volume de Biogás produzido (mL)	Produção específica de biogás (mL de biogás/ g de DQQ cunsumida)
Batelada 1	6,90	8,31	1920	995	48%	3274	3224	1721	513	70%	-	-
Batelada 2	7,03	7,42	2519	253	90%	5344	4512	2342	196	92%	1324	584
Batelada 3	7,12	7,52	3180	124	96%	6002	5720	3553	573	84%	1663	544
Batelada 4	7,04	7,7	4540	95	98%	4005	3850	3953	160	96%	1920	432
Batelada 5	7,17	7,76	6447	114	98%	3658	3948	6514	191	97%	3136	495
Batelada 6	7,05	7,7	8760	101	99%	2390	3504	4265	204	95%	3579	413
Batelada 7	7,14	7,85	8620	90	99%	3516	3708	6810	193	97%	4228	496

Fonte: elaboração própria (2020).

Figura 4 2 - Produção de biogás durante a adaptação do lodo no estágio metanogênico



Fonte: elaboração própria (2020).

4.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO EM DOIS ESTÁGIOS

Após a etapa de adaptação do lodo anaeróbio em estágios separados, deu-se prosseguimento à etapa de digestão anaeróbia em dois estágios.

Seguindo a metodologia descrita no capítulo 3, foram conduzidos sete ensaios de digestão anaeróbia em dois estágios. Como o tempo de batelada do reator acidogênico era menor que o do metanogênico, o número de bateladas do primeiro reator foi maior que o do segundo. Sendo assim, todas as dezesseis bateladas do reator acidogênico foram monitoradas e os principais parâmetros avaliados se encontram na Tabela 4.3.

Como se pode verificar na Figura 4.3(a), o pH ao final das bateladas aumentou de 3,6 na segunda para 4,6 na última batelada do reator acidogênico. Esse aumento está correlacionado com a redução da concentração final de AGV, que da terceira para a última batelada caiu de 10207 mg/L para 3564 mg/L (Figura 4.3(b)).

Os comportamentos supracitados podem estar relacionados às elevadas concentrações de AGV a que o lodo foi submetido durante a operação do reator acidogênico. Picos pontuais na concentração final de AGV podem ser visualizados nas bateladas 3 e 7.

Vale salientar que durante toda a operação do reator acidogênico a concentração de sódio, decorrente do ajuste de pH da alimentação para valores em torno de 5,0 com NaOH, foram mantidos abaixo de 900 mg/L. Portanto, não houve inibição por sódio, já que concentrações de sódio abaixo de 3500 mg/L não são consideradas inibitórias (KUGELMAN e MCCARTY, 1964 *apud* CHERNICHARO, 2007).

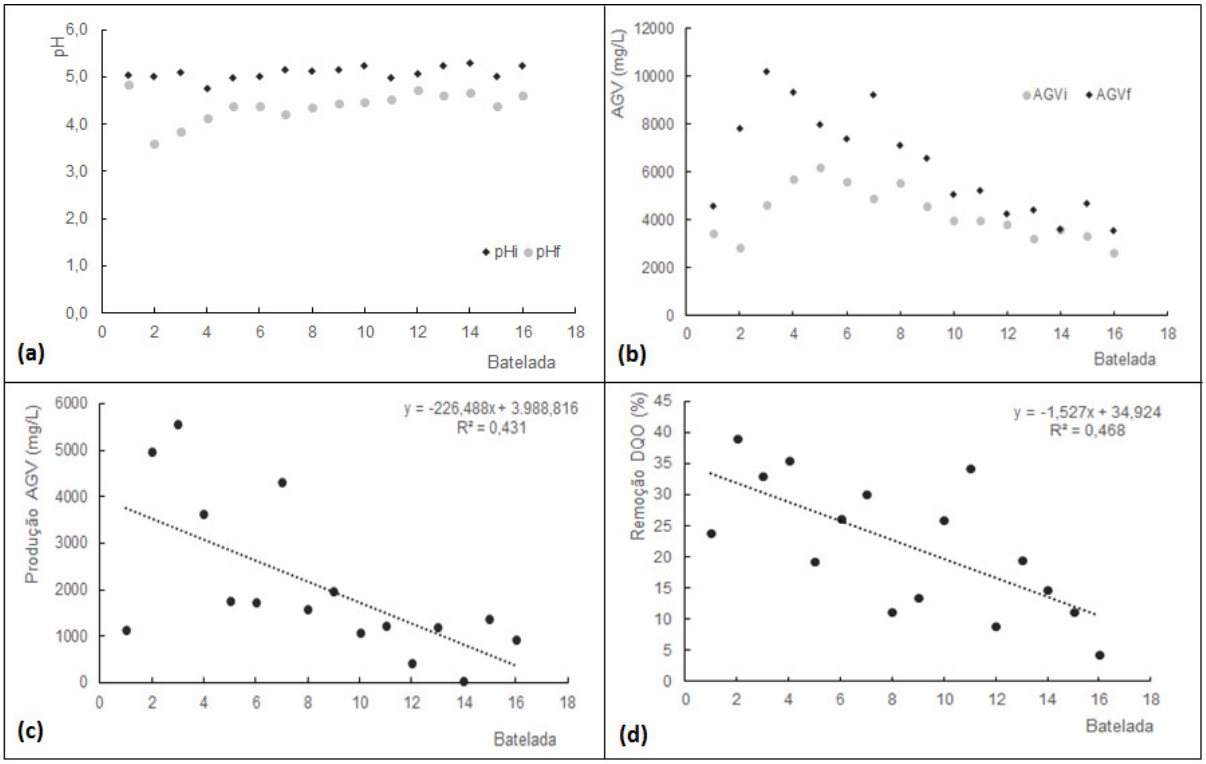
A tendência de queda na produção de AGV é nítida na Figura 4.3(c), que foi acompanhada por uma tendência de diminuição na remoção de DQO (Figura 4.3(d)). No início da operação do reator acidogênico, verificou-se maiores remoções de DQO (de 24 a 39% nas primeiras bateladas para 4 a 15% nas últimas), o que pode ser explicado por alguma atividade de arqueas presentes no lodo, mesmo sob condições próprias para a atividade acidogênica.

Tabela 4.3 – Parâmetros de operação do reator acidogênico

Batelada	pH_i	pH_f	$DQOs_i$ (mg/L)	$DQOs_f$ (mg/L)	Remoção DQO (%)	AGV_i (mg HAc/L)	AGV_f (mg HAc/L)	Produção AGV (mg HAc/L)	$AGV/DQO_{remov.}$	$Alcalinidade_i$ (mg $CaCO_3$/L)	$Alcalinidade_f$ (mg $CaCO_3$/L)	$[Na]_{reator}$ (mg Na/L)
1	5,04	4,84	18117	13787	23,9	3443	4596	1153	0,27	780	719	172,5
2	5,01	3,60	18417	11227	39,0	2885	7850	4965	0,69	589	-	0,0
3	5,10	3,84	18867	12653	32,9	4644	10207	5563	0,90	759	-	690,0
4	4,75	4,12	18317	11807	35,5	5704	9352	3648	0,56	469	-	862,5
5	4,97	4,40	17983	14500	19,4	6220	7996	1776	0,51	732	529	690,0
6	5,02	4,39	17867	13200	26,1	5637	7371	1734	0,37	667	610	690,0
7	5,14	4,21	19083	13340	30,1	4907	9236	4329	0,75	1024	-	690,0
8	5,13	4,37	17800	15793	11,3	5569	7142	1574	0,78	851	440	690,0
9	5,16	4,45	17817	15420	13,5	4594	6574	1980	0,83	760	688	517,5
10	5,25	4,47	18733	13860	26,0	3982	5066	1084	0,22	998	444	431,3
11	4,98	4,53	18533	12167	34,3	3976	5221	1244	0,20	631	316	345,0
12	5,08	4,74	17650	16067	9,0	3810	4243	433	0,27	626	240	345,0
13	5,24	4,60	17900	14400	19,6	3254	4446	1192	0,34	981	522	517,5
14	5,30	4,68	17600	15000	14,8	3591	3622	31	0,01	828	404	431,3
15	5,01	4,40	17541	15567	11,3	3329	4697	1368	0,69	741	-	258,8
16	5,25	4,62	17867	17073	4,4	2618	3564	946	1,19	467	743	217,0

Fonte: elaboração própria (2019).

Figura 4.3 – (a) pH; (b) Concentração de AGV; (c) Produção de AGV; (d) Remoção de DQO na operação do reator acidogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

Estudos conduzidos com digestão anaeróbia em dois estágios demonstraram que pode haver arqueas metanogênicas em atividade no estágio acidogênico, mesmo que este opere em pH entre 5,0 e 6,5. Neste caso, a concentração de metano pode chegar a 20% no biogás gerado nesse estágio, evidenciando a presença das arqueas metanogênicas no lodo (XIAO et al., 2013; SHIMADA et al., 2011).

Na etapa acidogênica da digestão anaeróbia, verificou-se ainda uma produção de AGV cada vez mais diminuta. Nas bateladas iniciais de operação desse reator chegou a se observar produção de AGV superior a 5000 mg/L, valor que foi reduzido a menos de 1000 mg/L na última batelada. Tal redução pode estar associada a um efeito inibitório cumulativo de seguidos contatos do lodo com ácidos orgânicos presentes no sobrenadante, principalmente na forma não dissociada dos mesmos.

Estudos prévios reportaram redução de até 60% da taxa de produção de AGV na digestão anaeróbia de uma solução padrão de glicose, por lodo adaptado a condições acidogênicas, quando a concentração da forma não dissociada do ácido acético aumentou de 520 para 2140 mg/L (concentrações apresentadas como DQO) em pH 6,0 e 4,5, respectivamente. Efeito semelhante também foi verificado para os

ácidos propiônico e butírico (XIAO et al., 2016). No presente estudo, as concentrações de AGV nas bateladas do reator acidogênico estiveram sempre acima do valor mencionado, o que pode justificar a queda observada na produção dos ácidos orgânicos, citada anteriormente.

Retomando a discussão sobre a digestão anaeróbia em duas fases, na Tabela 4.4 são apresentados os resultados dos principais parâmetros monitorados durante a operação em sequência dos reatores acidogênico e metanogênico. Nesta tabela são apresentados resultados somente das bateladas do reator acidogênico cujos sobrenadantes finais foram conduzidos para alimentação das bateladas do reator metanogênico.

Nessa tabela também são mostrados os volumes finais e as produções específicas de biogás (PEB) nas sete bateladas do estágio metanogênico. Mesmo com alimentações contendo concentrações cada vez menores de AGV e maiores concentrações de açúcares provenientes do reator acidogênico, a remoção de DQO_s e a produção de biogás no reator metanogênico aumentaram da 1ª para a 7ª batelada. Isso comprova que a microbiota é capaz de consumir com eficiência a xilose presente no hidrolisado sintético.

A produção de biogás e a PEB foram menores na segunda batelada, justamente quando a concentração de AGV alimentada foi maior (8 g HAc/L), caracterizando o efeito inibitório que esses ácidos orgânicos têm na etapa metanogênica. Cabe ressaltar que, além da concentração de AGV medida na alimentação, também ocorre produção de AGV na degradação da xilose residual do estágio acidogênico. Siegert e Banks (2005) estudaram os efeitos da adição de AGV na digestão anaeróbia de um meio sintético contendo 15,7 g/L de glicose, variando a concentração de AGV adicionada de 1 a 20 g/L. Foi verificado que mesmo nas concentrações mais altas de AGV utilizadas havia a produção de até 13 g/L desses ácidos orgânicos.

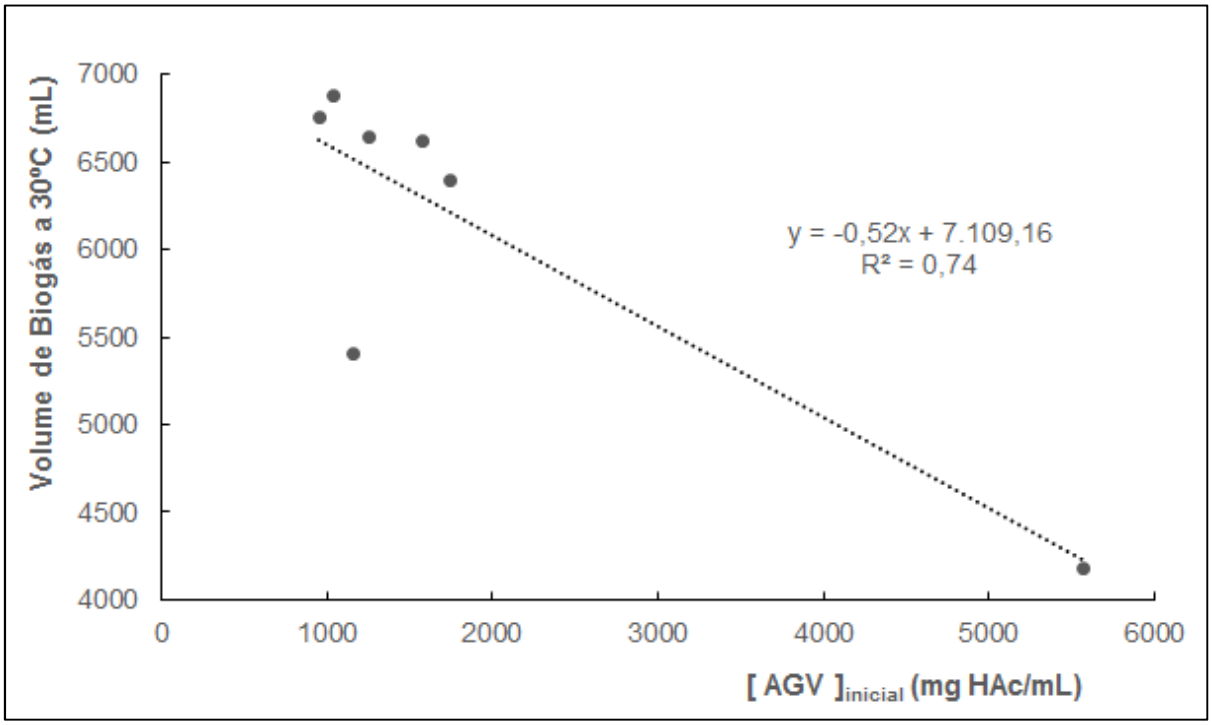
Tabela 4.4 – Parâmetros dos reatores acidogênico e metanogênico em sequência durante digestão em dois estágios

Batelada	Estágio	pH_i	pH_f	$Alcalinidade_i$ (mg $CaCO_3$/L)	$Alcalinidade_f$ (mg $CaCO_3$/L)	$DQOs_i$ (mg/L)	$DQOs_{final}$ (mg/L)	Remoção DQOs (%)	AGV_i (mg HAc/L)	AGV_f (mg HAc/L)	Produção $AGV_{acidogênese}$ (mgHAc/L) / *Consumo $AGV_{metanogênese}$ (%)*	$Biogás_{produzido}$ (mL)	PEB (mL biogás/ gDQOs)
1	Acidogênico 1	5.04	4.84	780	719	18117	13787	24%	3443	4596	1153	-	-
	Metanogênico 1	6.97	7.63	2739	3492	11900	1673	86%	3775	2045	*46%*	5415	529
2	Acidogênico 2	5.10	3.84	758	-	18867	12653	33%	4644	10207	5563	-	-
	Metanogênico 2	7.21	7.88	3125	4040	10113	1473	85%	7990	1587	*80%*	4189	485
3	Acidogênico 3	5.02	4.39	667	610	17867	13200	26%	5637	7371	1734	-	-
	Metanogênico 3	7.04	7.69	2652	3891	13940	1144	92%	6268	1597	*75%*	6396	500
4	Acidogênico 4	5.13	4.37	851	440	17800	15793	11%	5569	7142	1574	-	-
	Metanogênico 4	7.19	7.79	2031	3765	12533	1200	90%	6305	1266	*80%*	6628	585
5	Acidogênico 5	4.94	4.53	631	316	18533	12167	34%	3976	5221	1244	-	-
	Metanogênico 5	7.19	7.59	1516	3205	14367	773	95%	4275	1026	*76%*	6647	489
6	Acidogênico 6	5.30	4.68	828	404	17600	15000	15%	2591	3622	1031	-	-
	Metanogênico 6	7.21	7.62	1140	2721	12760	477	96%	3206	919	*71%*	6882	560
7	Acidogênico 7	5.25	4.62	467	734	17867	17073	4%	2618	3564	946	-	-
	Metanogênico 7	7.02	7.41	1877	4257	12053	363	97%	3158	615	*81%*	6761	578

Fonte: elaboração própria (2019).

Uma análise mais atenta permite verificar que há uma correlação negativa entre a produção de biogás e a quantidade de AGV alimentados ao reator como se observa na Figura 4.4. Dogan e colaboradores (2005) demonstraram que em um reator UASB alimentado com diferentes concentrações de acetato, níveis maiores que 4000 mg/L já inibiam a atividade metanogênica. Com 13000 mg/L e 25000 mg/L de acetato na alimentação, a taxa de produção de metano era reduzida à metade e cessava, respectivamente.

Figura 4.4 – Correlação entre volume de biogás produzido e AGV alimentados no reator metanogênico.

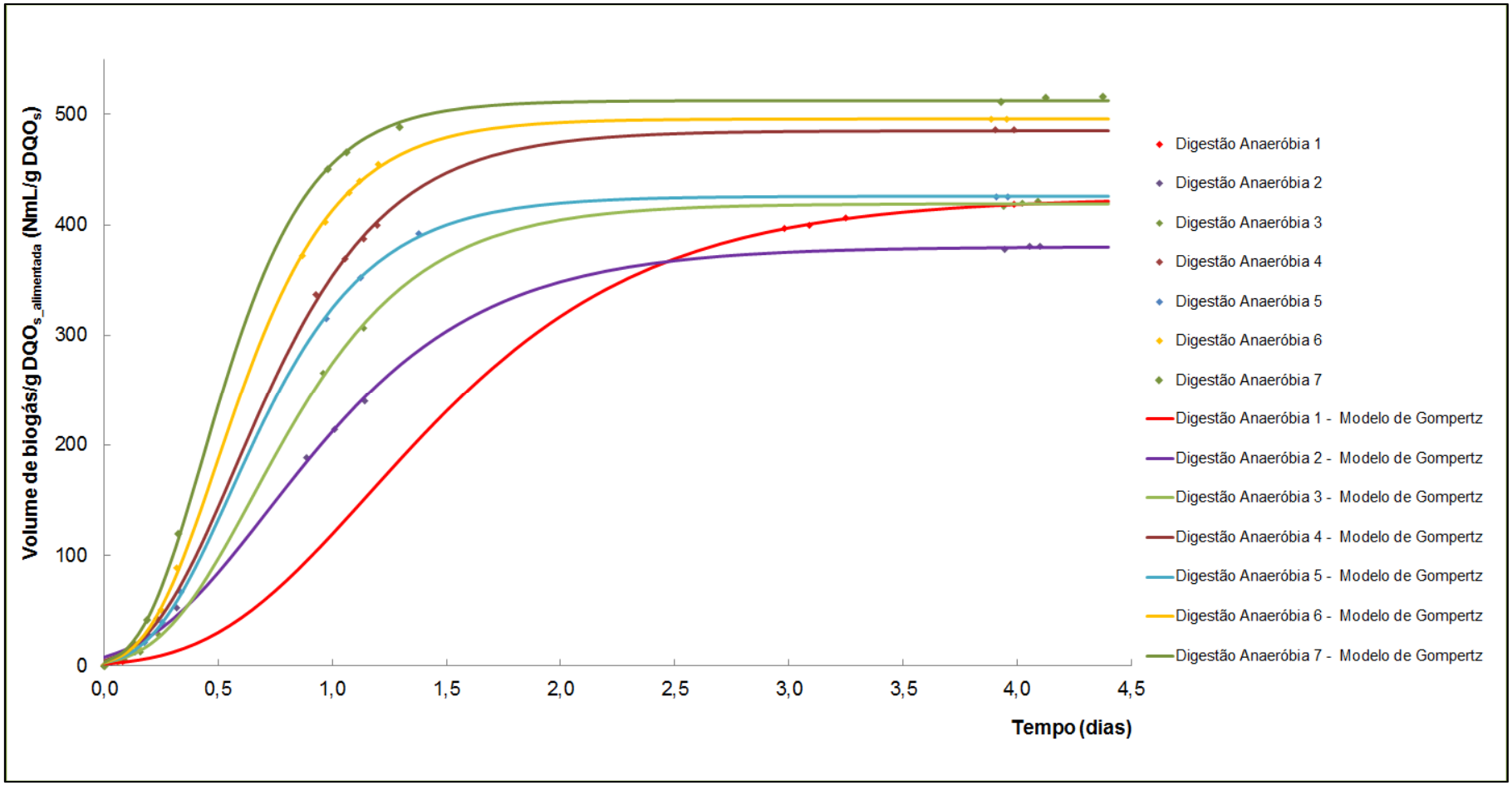


Fonte: elaboração própria (2019).

Mesmo com alimentações contendo concentrações cada vez menores de AGV e maiores concentrações de açúcares provenientes do reator acidogênico, a remoção de DQO_s e a produção de biogás no reator metanogênico aumentaram. Isso comprova que a microbiota é capaz de consumir com eficiência a xilose presente no hidrolisado sintético.

Para ratificar a capacidade do lodo para digerir o hidrolisado sintético e produzir biogás, plotou-se um gráfico de produção de biogás normalizada pela massa de DQO_s alimentada *versus* tempo, que pode ser visto na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Ajuste da produção normalizada de biogás na digestão anaeróbia em dois estágios ao modelo de Gompertz



Fonte: elaboração própria (2019).

Na Tabela 4.5 estão os valores ajustados dos parâmetros G_m, R_m e L do modelo de Gompertz, bem como o coeficiente de determinação R^2. Os valores dos coeficientes G_m, R_m e L do modelo de Gompertz modificado foram calculados para cada batelada do estágio metanogênico, verificando-se um ajuste quase perfeito dos dados experimentais de rendimento de biogás ao modelo (coeficientes de determinação $R^2 > 0,999$).

Verificou-se um aumento de 210% na taxa máxima de produção específica de biogás (R_m – de 229 para 710 NmL biogás/dia. $gDQO_s$) e de 21% na produção específica de biogás (G_m – de 425 para 513 NmL biogás/ $gDQO_s$), bem como uma redução de 65% na duração da fase lag (L – de 0,48 para 0,17 dias) da primeira para a sétima batelada.

Esses dados, somados ao fato de que após sete bateladas de digestão anaeróbia em duas fases a remoção de DQO alcançou o patamar de 98%, provam que a xilose contida nos hidrolisados de frações hemicelulósicas pode ser metabolizada em um processo de digestão anaeróbia utilizando-se lodo que fora adaptado a uma alimentação baseada em hexoses (lodo de reator UASB em operação em planta de tratamento de efluentes de indústria cervejeira).

Mantida uma remoção de DQO de 97% na fase metanogênica, um rendimento de biogás de 513 NmL/$gDQO_s$ alimentada, e verificando-se um percentual de metano no biogás de até 65% (GUO et al., 2015), o rendimento de metano pode atingir 344 NmL CH_4/$gDQO_s$ removida, valor próximo ao estequiométrico de 350 NmL CH_4/gDQO removida (ZHAO et al., 2017).

Tabela 4.5 – Parâmetros ajustados ao modelo de Gompertz para a etapa metanogênica da digestão anaeróbia em duas fases

Parâmetros Modelo de Gompertz	Digestão Anaeróbia 1	Digestão Anaeróbia 2	Digestão Anaeróbia 3	Digestão Anaeróbia 4	Digestão Anaeróbia 5	Digestão Anaeróbia 6	Digestão Anaeróbia 7
G_m (NmL de Biogás.g DQO_s^{-1})	425	380	419	485	426	496	513
R_m (NmL de Biogás.dia^{-1}.g DQO_s^{-1})	229	266	382	482	457	611	710
L (dia)	0,48	0,19	0,25	0,20	0,21	0,19	0,17
R^2	0,99998	0,99934	0,99982	0,99978	0,99990	0,99983	0,99986

Fonte: elaboração própria (2019).

4.3 INIBIÇÃO POR FURFURAL E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE HIDROLISADO SINTÉTICO DE SORGO

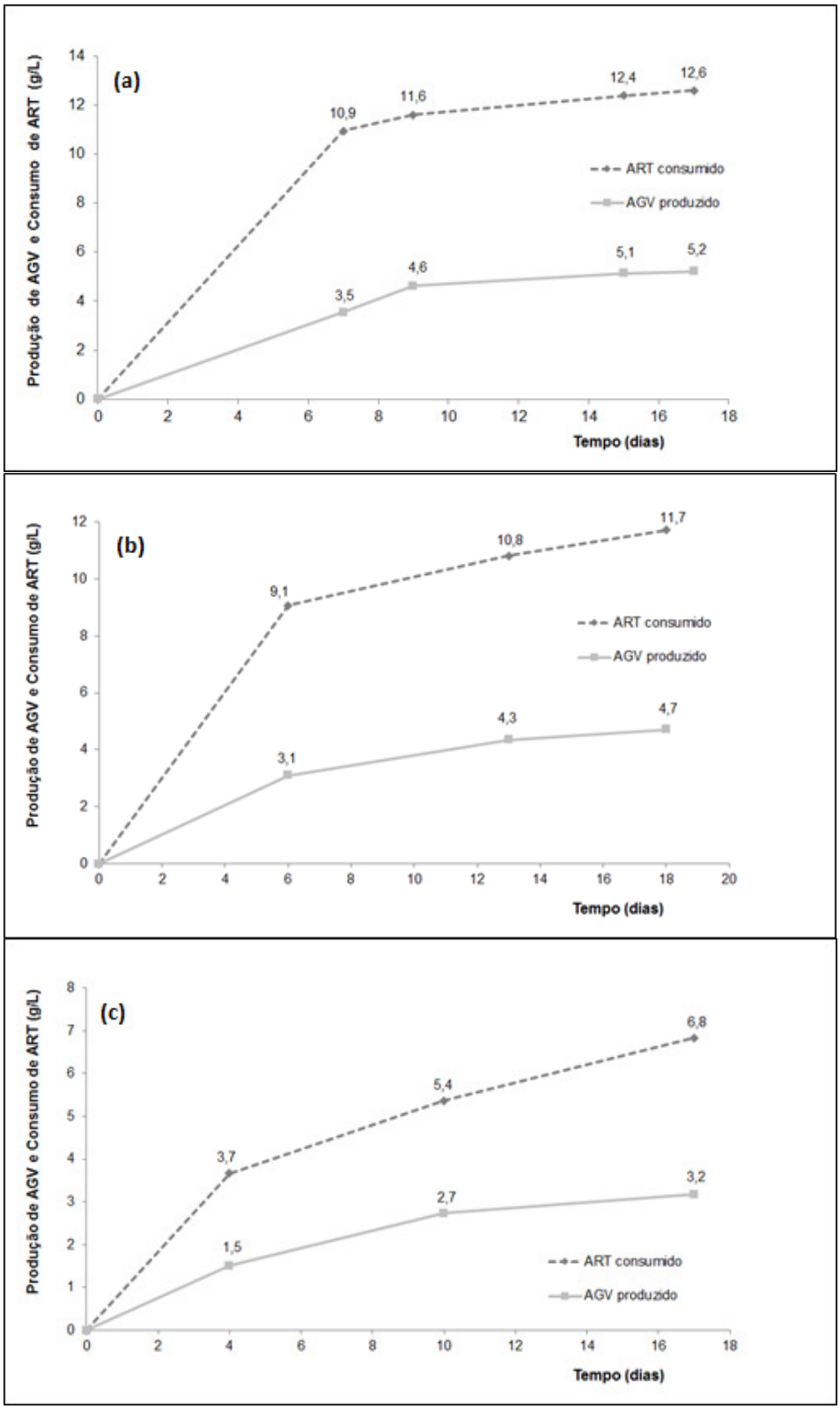
A avaliação dos efeitos do principal inibidor existente nos hidrolisados da fração hemicelulósica, o furfural, e dos AGV no desempenho da digestão anaeróbia foi feita de maneira separada para cada estágio utilizando-se lodo anaeróbio adaptado nos respectivos reatores, conforme descrito nas seções anteriores.

4.3.1 Inibição do lodo por furfural no estágio acidogênico

Nessa etapa do trabalho foi estudado o efeito do furfural na fase acidogênica da digestão anaeróbia. Para tanto, foi avaliado o perfil de consumo de xilose, quantificada pela metodologia de dosagem de açucares redutores totais (ART), bem como o de consumo de DQO_s, e produção de AGV. Foram estudadas três diferentes razões substrato/inóculo (S_0/X_0): 0,5; 1,0 e 4,0 e para cada relação substrato/inóculo foram testadas três diferentes concentrações de furfural: 0,5; 1,0 e 4,0 g/L.

A Figura 4.6 ilustra o acompanhamento da produção de AGV e consumo de ART ao longo do tempo de experimento nos frascos controle de sacrifício, referentes às condições S_0/X_0 iguais a 0,5; 1,0 e 4,0. Tendo em vista o acompanhamento para o frasco de sacrifício com S_0/X_0 de 0,5, primeira condição a ser testada, padronizou-se que os testes seriam encerrados com vinte e um dias, sendo os frascos penicilina abertos para análise do sobrenadante.

Figura 4.6 – Consumo de ART e produção de AGV para S_0/X_0: 0,5 (a), 1,0 (b) e 4,0 (c)



Fonte: elaboração própria (2019).

Na Tabela 4.6 estão resumidos todos os parâmetros monitorados no teste de inibição. Nas relações S_0/X_0 estudadas, observou-se que para cada concentração de inibidor avaliada o pH final foi tão menor quanto maior a produção de AGV. Para a relação S_0/X_0 igual a 4, apesar da produção de AGV ter sido a menor, o pH final foi o menor de todos. Isso se justifica pelo fato do ajuste inicial do pH após a mistura do hidrolisado sintético com o lodo ter sido feita com HCl 5M, que consome alcalinidade do meio (PEIRCE et al., 1998). Para os experimentos com menor relação S_0/X_0 a queda de pH foi menos acentuada, dado que o ajuste foi feito com NaOH 8M.

Também foi observado que com o aumento da relação S_0/X_0 houve uma queda significativa no consumo de xilose (quantificada como ART), quando comparados os consumos obtidos nas condições com furfural e nos controles. A redução no consumo de xilose, que foi de no máximo 15% para S_0/X_0 de 0,5, chegou a 71% para S_0/X_0 igual a 4,0.

Analisando-se os Brancos das três relações S_0/X_0 estudadas verifica-se que há uma DQO_s inicial referente a ácidos orgânicos remanescentes da etapa de adaptação do lodo à condição acidogênica ou até mesmo a material intracelular proveniente de autólise da microbiota. Essa DQO_s foi parcialmente consumida e, como se pode verificar, houve um aumento de pH no sobrenadante. Isso pode estar relacionado à presença de arqueas metanogênicas, mesmo no lodo adaptado em condições acidogênicas, conforme reportado por Xiao e colaboradores (2013). A atividade de arqueas metanogênicas acetoclásticas pode ter consumido parte do ácido acético presente no sobrenadante, gerando CH_4 e CO_2, o qual pode ocasionar o aumento da alcalinidade do meio, ocasionando o aumento de pH, conforme foi verificado.

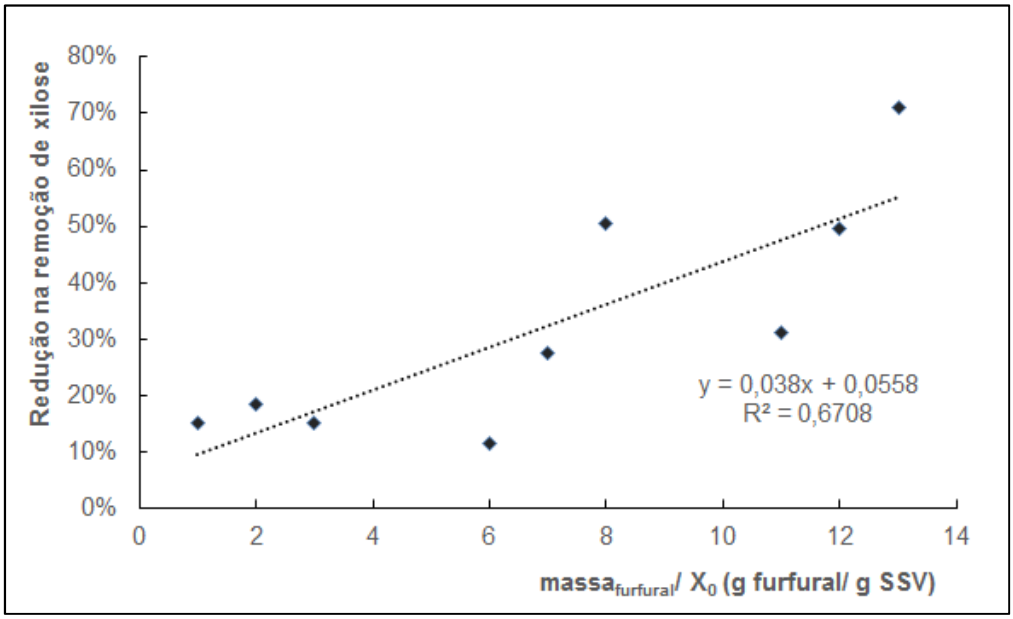
Tabela 4.6 – Parâmetros do teste de inibição da atividade acidogênica por furfural

Razão (S_0/X_0)	Condição	Furfural/X_0 (g furf/ g SSV)	Parâmetros										
			$pH_{inicial}$	pH_{final}	$ART_{inicial}$ (g/L)	ART_{final} (g/L)	Consumo ART (%)	$DQOs_{inicial}$ (mg/L)	$DQOs_{final}$ (mg/L)	Consumo DQOs (%)	$AGV_{produzidos}$ (mg HAc/L)	($AGV_{prod}/DQOs_{consumida}$) (g HAc/ g DQOs)	Redução Produção AGV (%)
S_0/X_0 = 0,5	Branco	-	4,98	6,00	0,00	0,00	0	3638	3417	6%	0	0,00	-
	Xilose + [furfural] = 0,0 g/L	-	5,01 ± 0,06	3,98 ± 0,04	17,6	4,3 ± 0,2	76%	17833	10923 ± 1230	39%	4277 ± 210	0,62	-
	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L	0,025	5,03 ± 0,02	4,05 ± 0,01	17,4	6,1 ± 0,1	65%	18933	13730 ± 693	27%	3162 ± 460	0,61	26%
	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L	0,049	4,96 ± 0,03	4,02 ± 0,03	17,4	6,5 ± 0,4	63%	19533	14243 ± 467	27%	4059 ± 261	0,77	5%
	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L	0,198	4,99 ± 0,05	4,31 ± 0,02	17,7	6,4 ± 0,1	64%	24383	15877 ± 599	35%	2454 ± 334	0,29	43%
S_0/X_0 = 1,0	Branco	-	5,06	6,03	0,00	0,00	0	3577	1865	48%	52	0,03	-
	Xilose + [furfural] = 0,0 g/L	-	5,01 ± 0,01	3,59 ± 0,02	17,5	5,8 ± 0,1	67%	18083	11983 ± 2073	34%	4710 ± 179	0,77	-
	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L	0,039	5,03 ± 0,04	3,70 ± 0,02	17,9	7,5 ± 0,4	58%	19300	13023 ± 665	33%	3145 ± 31	0,50	33%
	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L	0,078	5,05 ± 0,05	3,84 ± 0,02	18,0	9,5 ± 0,3	47%	21017	12878 ± 2511	39%	2320 ± 149	0,28	51%
	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L	0,314	5,03 ± 0,03	4,04 ± 0,01	17,8	12,0 ± 1,6	33%	27467	15340 ± 3021	44%	1778 ± 194	0,15	62%
S_0/X_0 = 4,0	Branco	-	5,03	5,98	0,00	0,00	0	896	470	48%	0	0,00	-
	Xilose + [furfural] = 0,0 g/L	-	4,98 ± 0,05	3,27 ± 0,06	18,0	10,9 ± 0,5	39%	17733	13127 ± 132	26%	2649 ± 138	0,58	-
	Xilose + [furfural] = 0,5 g/L	0,125	4,99 ± 0,05	3,34 ± 0,02	17,9	13,0 ± 0,8	27%	18667	13700 ± 1229	27%	1642 ± 60	0,33	38%
	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L	0,250	4,98 ± 0,02	3,29 ± 0,03	17,9	14,3 ± 0,1	20%	19950	14564 ± 306	27%	1566 ± 63	0,29	41%
	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L	1,000	4,94 ± 0,01	3,30 ± 0,02	18,1	16,0 ± 0,5	11%	25067	17229 ± 986	31%	1031 ± 50	0,13	61%

Fonte: elaboração própria (2019).

Pode-se ver na Figura 4.7, que correlaciona a diminuição percentual no consumo de xilose com a razão massa de furfural:massa de inóculo (F/X_0), que quanto maior essa razão, mais acentuada é a redução no consumo de xilose. Essa redução no consumo da pentose está diretamente associada à menor produção de AGV, tanto maior fosse a concentração de furfural e a relação S_0/X_0. Via de regra se observou que a produção específica de AGV, em relação à remoção de xilose, em forma de ART, apresentou a mesma tendência.

Figura 4.7 – Correlação entre a redução no consumo de xilose e a razão Furfural/X_0

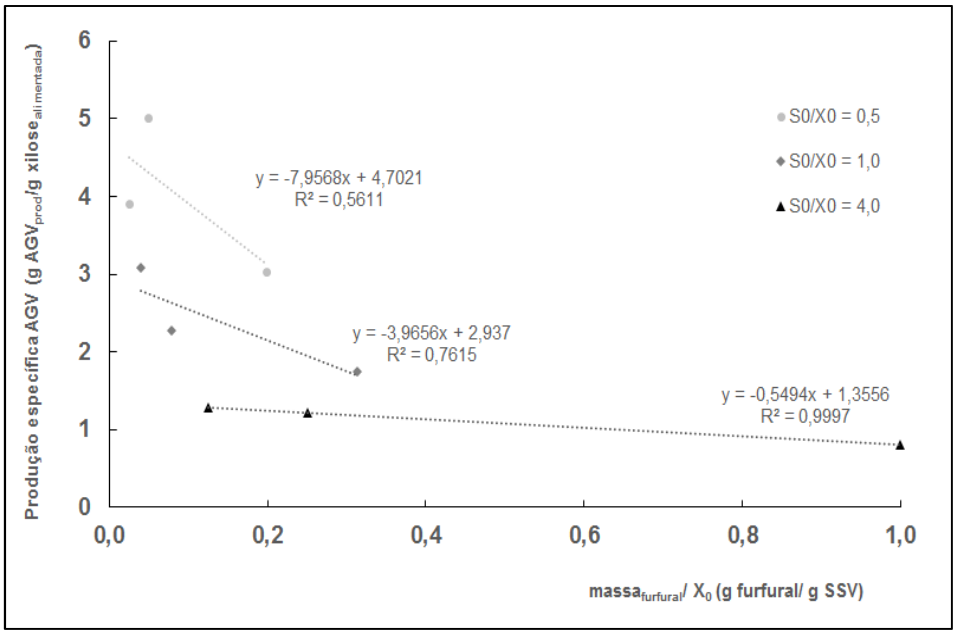


Fonte: elaboração própria (2019).

No trabalho de Akobi e colaboradores (2016), foi estudada a inibição da produção de hidrogênio por furfural a partir da fermentação de hidrolisado sintético. Esse estudo foi conduzido em condições próprias para o estágio acidogênico da digestão anaeróbia e utilizou lodo anaeróbio mesofílico proveniente de estação de tratamento de esgoto em condições acidogênicas. Foi verificado que quanto maior a razão F/X_0, menor era o rendimento em hidrogênio, independentemente da razão S_0/X_0 avaliada.

Como se pode ver na Figura 4.8, nessa etapa do teste de inibição da atividade acidogênica a produção específica de AGV também apresenta correlação negativa com a razão F/X_0. Percebe-se que o furfural apresenta uma concentração limiar abaixo da qual seus efeitos inibitórios não são tão expressivos, principalmente para condições nas quais a relação F/X_0 se manteve no menor valor testado (0,025).

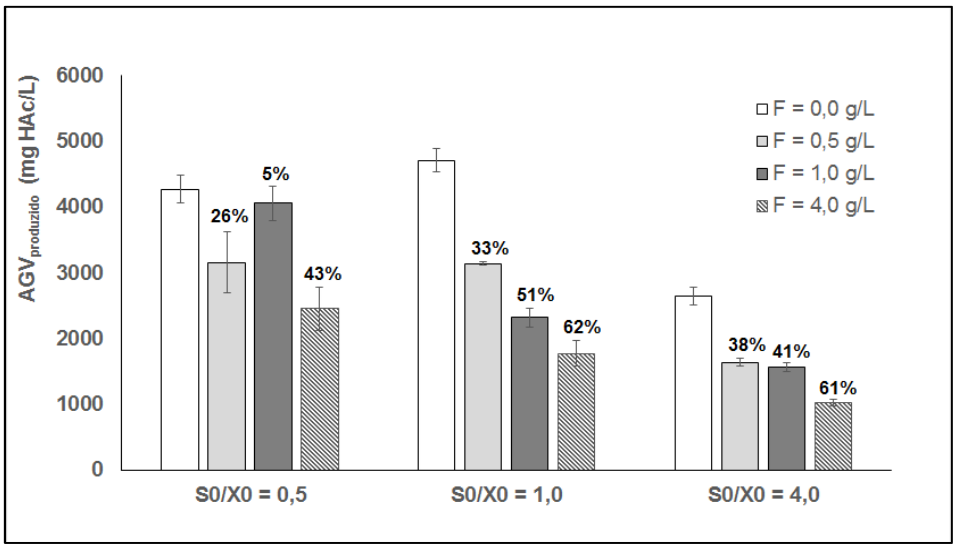
Figura 4.8 – Correlação entre a produção normalizada de AGV e a razão F/X_0



Fonte: elaboração própria (2019).

Na análise da Figura 4.9, se observa que para uma concentração de furfural de 0,5 g/L, o aumento da relação S_0/X_0 de 0,5 para 4,0 apresentou efeitos moderados quanto à redução da produção de AGV (reduções de 26 a 38%). A inibição foi mais pronunciada (reduções de 61 e 62% da produção de AGV) quando avaliadas condições com relação S_0/X_0 de 1,0 e 4,0 e concentração de furfural de 4,0 g/L quando a relação F/X_0 foi maior que 0,3.

Figura 4.9 - Produção de AGV em função da relação S_0/X_0



Fonte: elaboração própria (2019).

Nota – acima das barras está a redução na produção de AGV em relação a cada controle.

Tendo em vista os dados apresentados nesta subseção, a condição que apresentou melhor resultado em relação à presença de furfural foi a com S_0/X_0 de 0,5 g xilose/ g SSV, visto que a adição de furfural reduziu em no máximo 15% o consumo da pentose contida nos hidrolisados sintéticos, além de ser a condição na qual a adição de furfural ocasionou a menor redução na produção específica de AGV em relação à alimentação de xilose.

4.3.2 Inibição do estágio metanogênico pelo furfural

A avaliação dos efeitos do furfural no desempenho do lodo no estágio metanogênico foi feita em quatro bateladas de experimentos realizadas em respirômetro anaeróbio (AMPTS II).

Da primeira, com lodo metanogênico adaptado como inóculo, para a segunda batelada de ensaios, com mistura 1:1 de lodos acidogênico e metanogênico adaptados, foi investigado se a utilização de um inóculo misto adaptado resultaria em melhor desempenho quando comparado ao lodo metanogênico puro adaptado na digestão de hidrolisado sintético. Nestes ensaios, o hidrolisado sintético mimetizou o sobrenadante final da batelada do teste de inibição da fase acidogênica com melhor produção de AGV, que continha 8,2 g/L de AGV e 4,3 g/L de xilose, investigando-se simultaneamente o impacto de AGV, na forma de ácido acético, e do furfural na digestão anaeróbia.

Como se pode verificar na Tabela 4.7, para todas as condições testadas, incluindo os controles, o pH final ficou abaixo de 6,0, caracterizando o acúmulo de AGV. Tal acúmulo é prejudicial à digestão anaeróbia e se verifica quando a biomassa recebe choques de carga orgânica (AQUINO & CHERNICHARO, 2005).

Um ponto positivo nesses dois ensaios foi que o lodo manteve elevada afinidade pela xilose, consumindo-a totalmente do substrato. No entanto, a remoção de DQO se manteve baixa, com maior remoção no lodo adaptado puro (55% em média). Também se verificou que para o lodo adaptado puro a produção de AGV aumentava com a concentração de furfural. Como toda xilose foi consumida em todas as concentrações de furfural, depreende-se que bactérias acidogênicas no lodo poderiam utilizar furfural como fonte de carbono.

Tabela 4.7 – Resultados da primeira e segunda bateladas do teste de inibição do estágio metanogênico

Inóculo	Condição	Parâmetros										
		$pH_{inicial}$	pH_{final}	$AR_{inicial}$ (g/L)	$AR_{consumido}$ (g/L)	$DQO_{inicial}$ (mg/L)	$DQO_{consumida}$ (mg/L)	Remoção de DQO	$AGV_{produzidos}$ (mg HAc/L)	Volume de CH_4 final (NmL)	Vol. de CH_4 produzido/$DQO_{alimentada}$ (NmL/ g $DQO_{alimentada}$)	PEM (NmL CH_4 /g$DQO_{consumida}$)
Lodo metanogênico adaptado (puro)	Branco	6,83	7,37	0,00	0,0	142	0	0%	0	-	-	-
	Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L	6,83 ± 0,02	5,80 ± 0,01	4,51	4,51 ± 0,0	12883	7527 ± 80	58%	343 ± 69	106	35,4 ± 1,3	61
	Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L	6,82 ± 0,01	5,52 ± 0,01	4,59	4,59 ± 0,0	15217	7237 ± 734	48%	1844 ± 166	103	28,9 ± 1,1	61
	Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L	6,82 ± 0,02	5,45 ± 0,01	4,73	4,73 ± 0,0	17133	10494 ± 349	61%	2220 ± 597	108	27,2 ± 0,8	44
	Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L	6,82 ± 0,03	5,32 ± 0,01	4,76	4,76 ± 0,0	21667	11176 ± 12	52%	2667 ± 69	145	28,7 ± 0,0	56
Lodos metanogênico + acidogênico (1:1)	Branco	6,89	7,05	0,00	0,0	435	86	20%	0	-	-	-
	Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L	6,85 ± 0,02	5,75 ± 0,04	4,84	4,84 ± 0,0	12817	5866 ± 908	46%	1620 ± 187	114	37,8 ± 2,6	83
	Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L	6,83 ± 0,02	5,54 ± 0,03	4,86	4,86 ± 0,0	15300	7468 ± 1079	49%	2052 ± 104	98	27,1 ± 0,1	55
	Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L	6,84 ± 0,04	5,36 ± 0,03	4,59	4,59 ± 0,0	17067	8103 ± 1374	47%	2346 ± 90	59	14,8 ± 0,2	31
	Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L	6,82 ± 0,01	4,96 ± 0,03	5,10	5,10 ± 0,0	21000	8128 ± 1378	39%	1947 ± 363	29	5,8 ± 0,6	15

Fonte: elaboração própria (2019).

A maior produção de AGV, no entanto, não se traduziu em maior produção de metano, devido à inibição causada pelo acúmulo de ácidos orgânicos e queda do pH.

A produção de AGV foi maior para o ensaio controle com lodo misto. Tal comportamento era esperado, dada a presença de uma população acidogênica melhor adaptada ao hidrolisado sintético. Entretanto, o consórcio do lodo misto foi mais afetado pelo furfural dada a visível diminuição na PEM com o aumento da concentração de furfural à qual o lodo estava submetido.

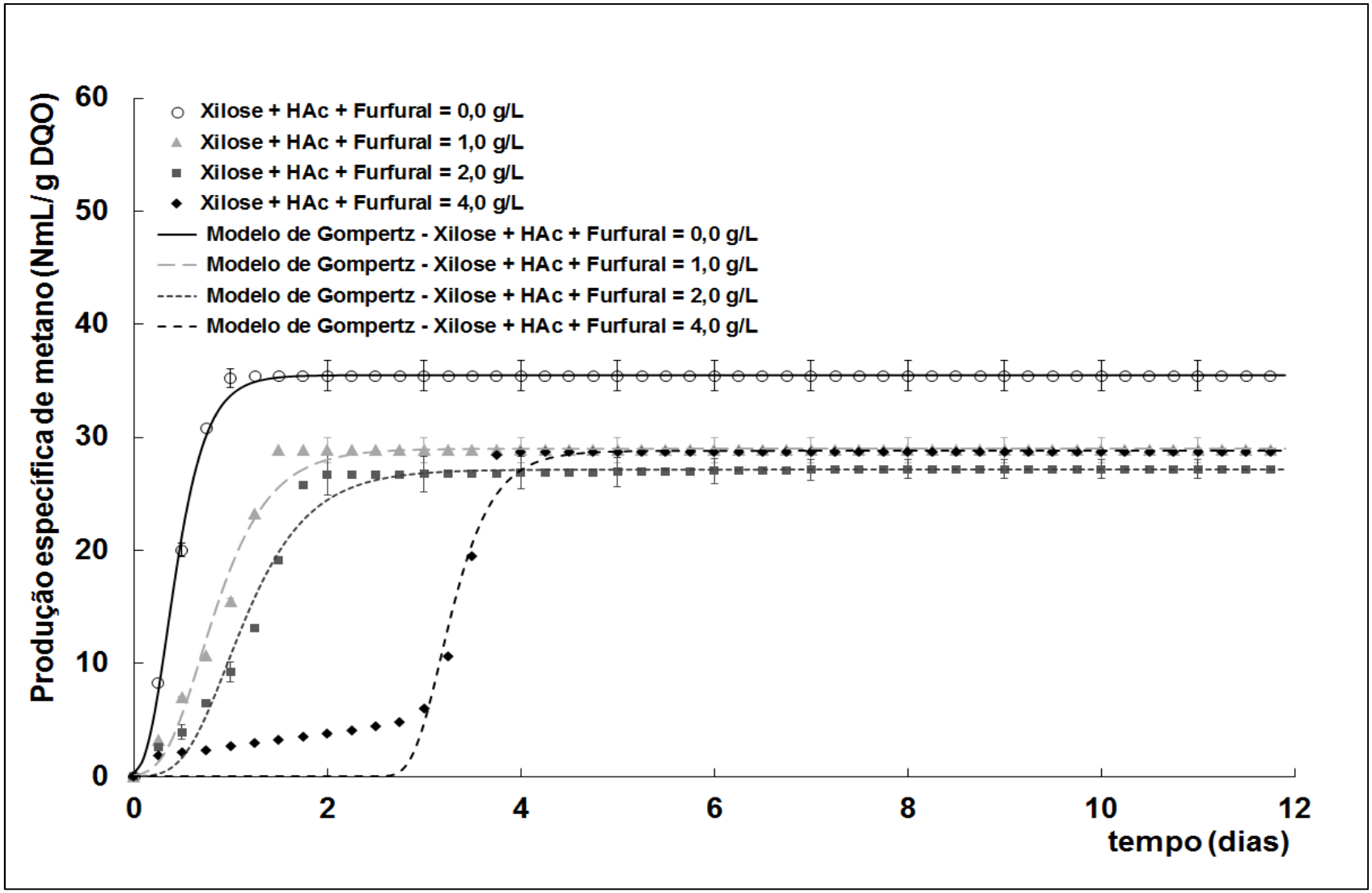
À semelhança da etapa de digestão em dois estágios, decidiu-se fazer o ajuste dos dados de produção de CH_4 normalizada pela DQO alimentada para as duas bateladas de teste, conforme apresentado nas Figuras 4.10 e 4.11. Os parâmetros referentes ao ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz modificado para as duas bateladas de teste se encontram na Tabela 4.8. Nos ensaios com lodo adaptado puro a produção específica máxima de metano (G_m) foi pouco afetada até 4,0 g/L de furfural, com redução de até 23% em relação ao Controle. O que não se verificou para a taxa máxima de produção específica de metano (R_m) que para as concentrações de furfural de 1,0 e 2,0 g/L foi mais de 50% inferior à taxa da condição controle.

Tabela 4.8 - Parâmetros ajustados do modelo de Gompertz para as duas primeiras bateladas de teste de inibição do estágio metanogênico

Inóculo	Condição	Parâmetros do Modelo de Gompertz			
		G_m (NmL de CH_4.g DQO^{-1})	Rm (NmL de CH_4.dia^{-1}.g DQO^{-1})	L (dia)	R^2
Lodo metanogênico adaptado (puro)	Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L	35,5	59,3	0,13	0,9971
	Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L	29,0	27,7	0,31	0,9862
	Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L	27,2	21,9	0,51	0,9860
	Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L	28,8	35,9	2,88	0,9916
Lodos metanogênico + acidogênico (1:1)	Xilose + HAc + [furfural] = 0,0 g/L	37,9	67,4	0,18	0,9932
	Xilose + HAc + [furfural] = 1,0 g/L	27,4	25,4	0,23	0,9734
	Xilose + HAc + [furfural] = 2,0 g/L	14,0	6,8	0,00	0,9672
	Xilose + HAc + [furfural] = 4,0 g/L	5,5	3,1	0,00	0,7910

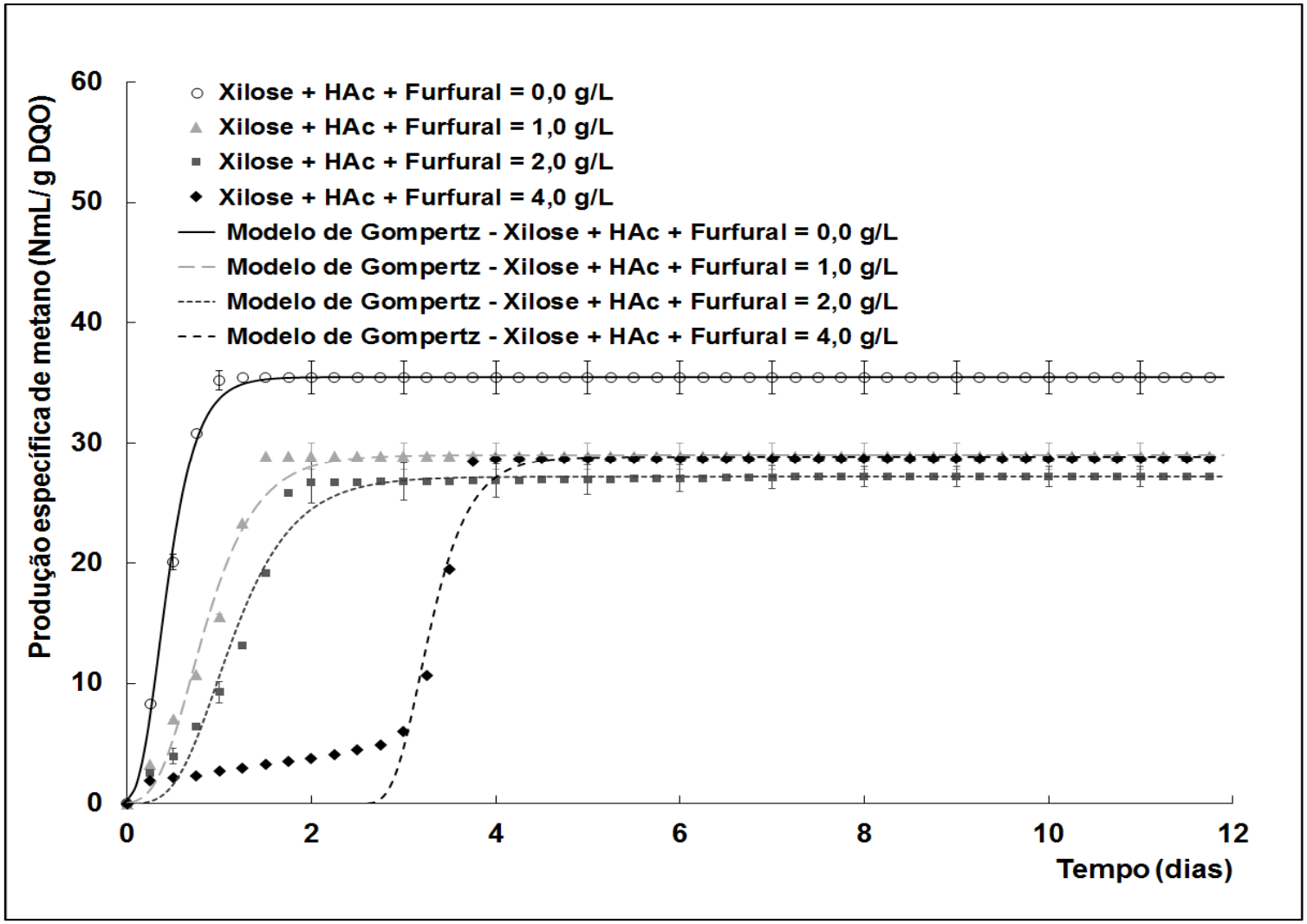
Fonte: elaboração própria (2019).

Tabela 4.9 – Produção normalizada de CH_4 da primeira batelada de testes de inibição do estágio metanogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

Figura 4.10 – Produção normalizada de CH_4 da segunda batelada de testes de inibição do estágio metanogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

Nos ensaios conduzidos com lodo misto observou-se que a inibição aumentava com a concentração de furfural, verificando-se redução acentuada de R_m e G_m a partir de 2,0 g/L. O fato mais notável foi que o aumento da concentração de furfural nos ensaios com lodo puro adaptado resultou em aumento da fase *lag*, bastante acentuado na maior concentração de furfural. Porém, mesmo a essa maior concentração, a produção de metano foi restabelecida após a fase *lag*, provavelmente devido à metabolização do furfural e destoxificação do meio.

Pekarová e colaboradores (2017) estudaram os efeitos do furfural e do 5-hidroximetilfurfural na inibição da digestão anaeróbia de meios sintéticos contendo somente celulose ou acetato como fontes de carbono. Em maior grau para o acetato de sódio do que para a celulose, foi verificado um padrão parecido de retomada de produção de metano, com taxas máximas de produção semelhantes ao controle após a fase *lag*. Foi sugerido que uma etapa anterior à metanogênese deve ser mais sensível ao furfural.

Nos ensaios do presente estudo, com lodo misto, provavelmente há uma maior concentração de microrganismos adaptados à condição acidogênica que sofreram pressão seletiva para tanto. E justamente nesses ensaios não se observou uma retomada na produção de metano para as maiores concentrações de furfural, sendo verificadas quedas acentuadas em G_m e R_m para as maiores concentrações do inibidor.

Os dois últimos ensaios em respirômetro foram conduzidos com lodo de indústria cervejeira e hidrolisado contendo somente xilose, a fim de se investigar os efeitos inibitórios exclusivamente relacionados ao furfural com xilose como única fonte de carbono. Os dados referentes a esses ensaios estão resumidos na Tabela 4.9. As réplicas dos ensaios de adaptação do lodo ao hidrolisado contendo somente xilose foram agrupadas em triplicatas de forma a ocupar as posições equivalentes a triplicatas das condições avaliadas nos ensaios de avaliação do efeito do furfural no teste subsequente.

Figura 4.11 – Resultados da terceira e quarta bateladas do teste de inibição do estágio metanogênico

Inóculo	Condição	Parâmetros										
		$pH_{inicial}$	pH_{final}	$AR_{inicial}$ (g/L)	$AR_{consumido}$ (g/L)	$DQO_{inicial}$ (mg/L)	$DQO_{consumida}$ (mg/L)	Remoção de DQO	$AGV_{produzidos}$ (mg HAc/L)	Volume de CH_4 final (NmL)	Vol. de CH_4 produzido/$DQO_{alimentada}$ (NmL/ g $DQO_{alimentada}$)	PEM (NmL CH_4 /g$DQO_{consumida}$)
Lodo de cervejaria não adaptado	Branco	7,20	7,20	0,0	0,0	159	70	44%	110	-	-	-
	Adaptação Xilose (triplicata 1)	7,20 ± 0,00	4,37 ± 0,05	18,0	18,0 ± 0,0	17533	12411 ± 56	71%	2693 ± 56	277	92,4 ± 2,7	131
	Adaptação Xilose (triplicata 2)	7,21 ± 0,01	4,40 ± 0,07	18,0	18,0 ± 0,0	17533	12284 ± 720	70%	2689 ± 74	280	93,3 ± 2,9	133
	Adaptação Xilose (triplicata 3)	7,20 ± 0,00	4,37 ± 0,04	18,0	18,0 ± 0,0	17533	11915 ± 253	68%	2495 ± 317	273	91,1 ± 3,4	134
	Adaptação Xilose (triplicata 4)	7,20 ± 0,01	4,29 ± 0,04	18,0	18,0 ± 0,0	17533	12069 ± 842	69%	2862 ± 124	266	88,7 ± 1,9	129
Lodo de cervejaria após um contato com hidrolisado sintético	Branco	7,20	7,15	0,0	0,0	654	296	45%	115	-	-	-
	Xilose + [furfural] = 0,0 g/L	7,20 ± 0,01	6,61 ± 0,18	17,5	17,5 ± 0,0	17800	8369 ± 687	47%	4541 ± 1025	340	111,9 ± 12,2	238
	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L	7,20 ± 0,00	6,39 ± 0,20	17,6	17,6 ± 0,0	20750	10466 ± 1111	50%	5568 ± 796	280	79,1 ± 2,4	157
	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L	7,20 ± 0,00	6,42 ± 0,29	18,7	18,7 ± 0,0	23950	12842 ± 630	54%	6141 ± 1022	405	98,8 ± 4,3	184
	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L	7,20 ± 0,00	5,43 ± 0,71	18,9	18,1 ± 0,4	28866	14066 ± 1604	49%	6478 ± 830	136	27,5 ± 1,0	56

Fonte: elaboração própria (2019).

Mesmo o lodo utilizado não estando adaptado à digestão de hidrolisado sintético contendo xilose, este apresentou rendimento de metano maior que o obtido nos controles dos dois primeiros ensaios, reiterando o fato de que elevados níveis de AGV, como os presentes nesses ensaios na forma de ácido acético, são inibitórios da produção de metano.

Outro fato a se destacar é que toda a xilose foi novamente consumida nos dois ensaios, excetuando-se a condição de maior concentração de furfural (4,0 g/L), que apresentou concentração residual desse açúcar ao fim da batelada (0,8 g/L). Isso comprova a excelente capacidade do lodo de cervejaria para assimilação de xilose, mesmo exposto a concentrações crescentes de furfural.

Verificou-se também que o lodo com menos contato com o hidrolisado sintético (lodo de indústria cervejeira), utilizado no último ensaio, foi muito mais suscetível aos efeitos inibitórios do furfural do que o lodo anteriormente adaptado. Ao se comparar o controle (sem furfural) com a condição contendo 4 g/L de furfural, o lodo adaptado tem rendimento de metano praticamente igual ao seu respectivo controle (61 e 56 NmL CH_4/g $DQO_{consumida}$), enquanto o lodo menos adaptado apresentou uma redução de mais de quatro vezes quando comparado ao seu controle (de 238 para 56 NmL CH_4/g $DQO_{consumida}$).

Akobi e colaboradores (2016) citam que os microrganismos presentes no lodo podem minimizar os efeitos inibitórios do furfural metabolizando-o a compostos menos tóxicos como álcool furfurílico ou ácido furóico. Isso, claro, desde que o inibidor não exceda níveis toleráveis.

Como se sabe o furfural é um derivado da xilose, obtido pela desidratação natural dessa pentose (MATHEW et al., 2018). Pela proximidade estrutural dos compostos é possível que as rotas metabólicas que degradam esse inibidor a compostos menos tóxicos tenham seu fluxo metabólico estimulado pelo consumo de xilose. Assim, espera-se que o maior o número de contatos do lodo com a pentose torne os microrganismos mais tolerantes à presença de furfural no meio.

Dessa forma, os microrganismos podem adquirir um arcabouço metabólico que lhes permita a degradação do derivado furânico aqui estudado. Tal comportamento foi verificado no presente trabalho quando comparado um lodo adaptado, submetido a seguidos contatos com o hidrolisado sintético contendo xilose, como o utilizado na

primeira batelada, com um lodo que teve apenas um contato com meio contendo a pentose, como o utilizado na última batelada.

À semelhança do que foi feito para as duas primeiras bateladas de ensaios dessa etapa do trabalho, os dados de produção de CH_4 normalizada pela DQO alimentada da terceira e quarta bateladas de experimentos foram plotados contra o tempo, como se observa nas Figuras 4.12 e 4.13. Da mesma maneira, tais dados foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado usando o macro 'Solver' do Excel e o ajuste dos parâmetros foi feito seguindo a mesma heurística descrita no Capítulo 2.

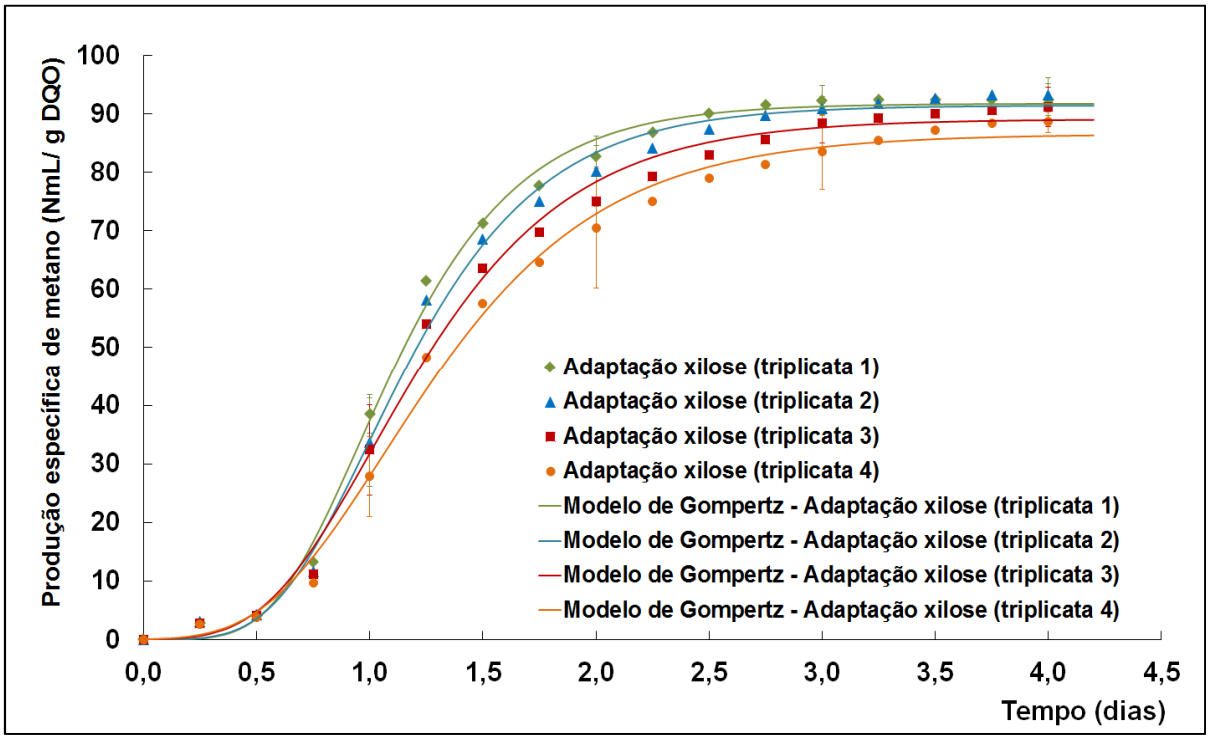
Os parâmetros referentes ao ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz para as duas bateladas de testes se encontram na Tabela 4.10. No ensaio de inibição, o pH se manteve próximo a valores mais adequados à digestão anaeróbia (entre 6,5 e 7,5, segundo MAO et al., 2017) no Controle e nas condições com 1 e 2 g/L de furfural (vide Tabela 4.9). Nestas condições, apesar do maior residual de AGV não consumidos, a maior atividade dos microrganismos, evidenciada pelos maiores valores de Rm com 4 g/L de furfural, permitiu um melhor tamponamento do pH e conversão dos AGV a metano.

Tabela 4.10- Parâmetros ajustados do modelo de Gompertz para as duas últimas bateladas de teste de inibição do estágio metanogênico

Inóculo	Condição	Parâmetros do Modelo de Gompertz			
		G_m (NmL de CH_4.g DQO^{-1})	Rm (NmL de CH_4.dia^{-1}.g DQO^{-1})	L (dia)	R^2
Lodo de cervejaria não adaptado	Adaptação Xilose (triplicata 1)	91,8	86,9	0,57	0,9972
	Adaptação Xilose (triplicata 2)	91,5	79,8	0,57	0,9960
	Adaptação Xilose (triplicata 3)	89,1	68,3	0,53	0,9946
	Adaptação Xilose (triplicata 4)	86,6	60,0	0,53	0,9947
Lodo de cervejaria após um contato com hidrolisado sintético	Xilose + [furfural] = 0,0 g/L	112,1	297,8	0,15	0,9990
	Xilose + [furfural] = 1,0 g/L	79,3	165,3	0,21	0,9972
	Xilose + [furfural] = 2,0 g/L	99,3	213,6	0,51	0,9910
	Xilose + [furfural] = 4,0 g/L	28,1	28,1	1,92	0,9650

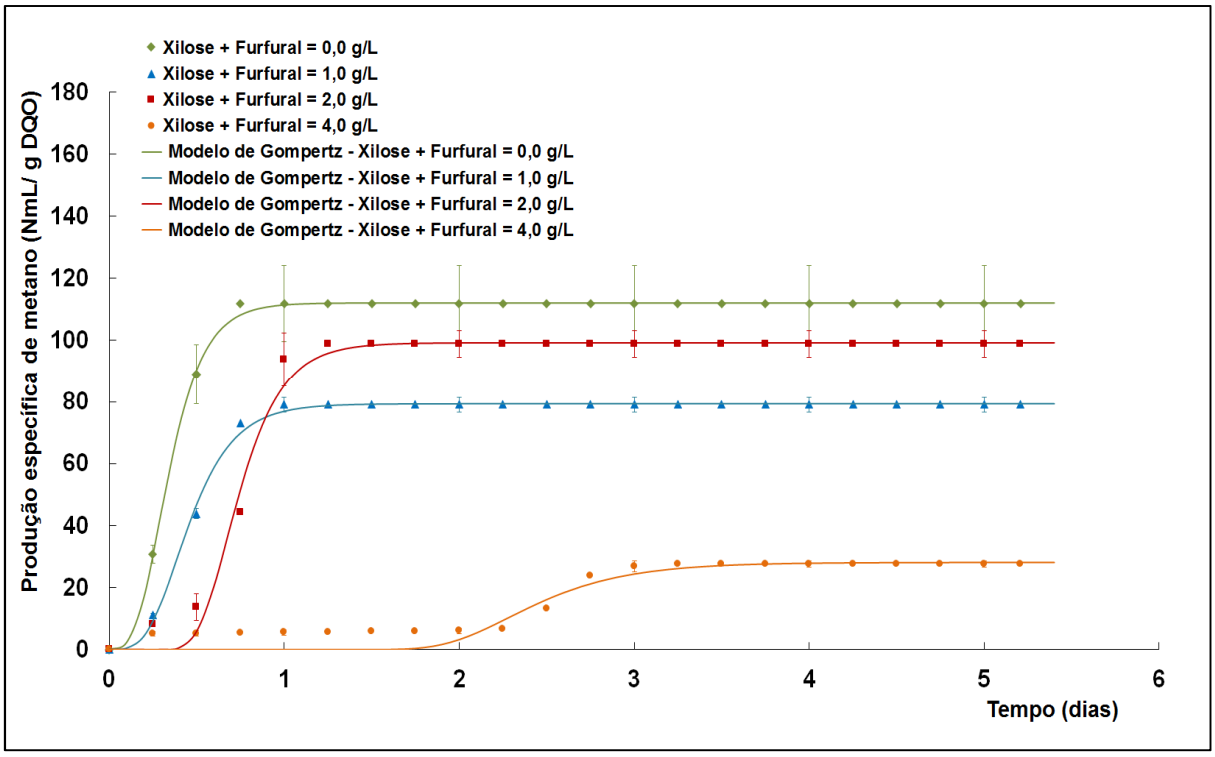
Fonte: elaboração própria (2019).

Figura 4.12 – Produção normalizada de CH_4 da terceira batelada de testes de inibição do estágio metanogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

Figura 4.13 – Produção normalizada de CH_4 da quarta batelada de testes de inibição do estágio metanogênico



Fonte: elaboração própria (2019).

Percebe-se no gráfico da Figura 4.12 a reprodutibilidade das réplicas no teste que serviu para adaptar o lodo de cervejaria ao hidrolisado sintético. Analisando a Tabela 4.10 fica ainda mais clara a semelhança entre as réplicas com valores de G_m e L bem próximos. Uma possível explicação para os valores mais baixos de G_m, L e principalmente Rm, verificados nos dois últimos experimentos (triplicatas 3 e 4) da terceira batelada seria uma agitação mais lenta dos motores. Nestes experimentos foi utilizada uma linha de motores mais antigos que, quando ligados em série, apresentaram aumento da impedância elétrica e agitação mais lenta.

Na quarta batelada, o pH se manteve em valores mais adequados à digestão anaeróbia no Controle e nas condições com 1 e 2 g/L de furfural. Nestas condições, apesar do maior residual de AGV, a maior atividade dos microrganismos, evidenciada pelos maiores valores de Rm, permitiu um melhor tamponamento do pH e conversão dos AGV a metano.

A Figura 4.13, referente à quarta corrida no respirômetro, evidencia um comportamento semelhante ao verificado na primeira corrida, desta vez com relação à condição com concentração de furfural igual a 2,0 g/L: após a fase *lag* pode ter havido uma degradação e destoxificação do inibidor, convertendo-o a um derivado menos tóxico. A partir dessa fase, deu-se início à produção de metano com taxa máxima de produção específica (R_m) até maior do que para a condição com concentração de inibidor de 1,0 g/L, conforme observado na Tabela 4.10.

Barakat e colaboradores (2012) estudaram a digestão anaeróbia de meios sintéticos contendo 1 g/L de xilose (condição controle) e 1 g/L de xilose adicionada de 1 g/L de compostos furânicos, dentre eles o furfural. Estudaram também a digestão anaeróbia de meio contendo 2 g/L de furfural. Foi verificado que na condição contendo xilose e furfural na proporção de 1:1 a produção de biometano foi cerca de 30% superior ao da condição controle. Além disso, foi verificada a possibilidade de se produzir metano tendo apenas o furfural como fonte de carbono. Após uma fase de adaptação de quatro dias, a produção de metano a partir do composto furânico iniciou a fase exponencial. Ao fim dos ensaios foi verificado um potencial de produção de metano de 430 mL/ g de furfural.

Pekarová e colaboradores (2017) estudaram os efeitos da adição de furfural na digestão anaeróbia de meio sintético contendo 10 g/L de acetato de sódio como única

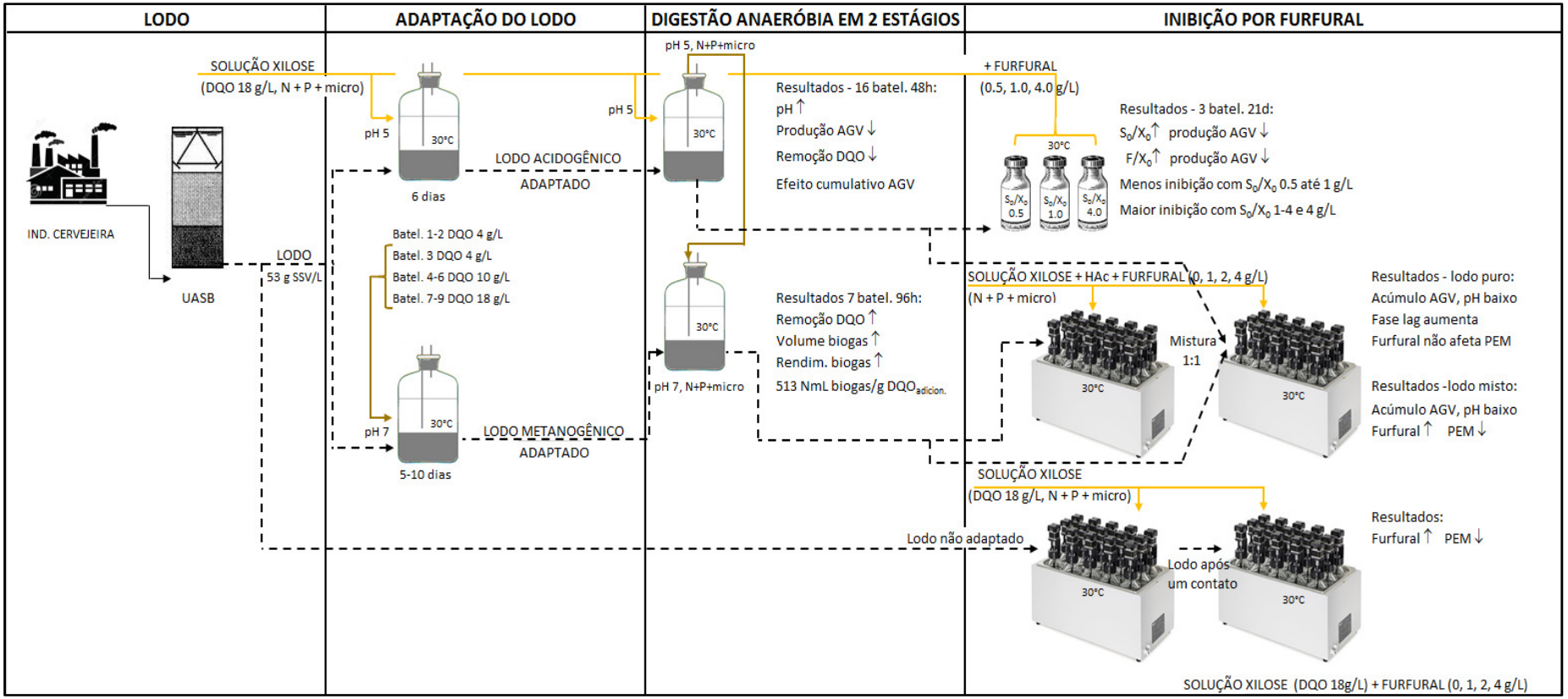
fonte de carbono. As concentrações de furfural estudadas variaram de 0,1 a 2,0 g/L. Foi observado que a duração da fase *lag*, que era de 5 dias para o controle aumentou para 9,9 e 20 dias paras os testes contendo 1 e 2 g/L de furfural, respectivamente. Em relação ao potencial de produção de metano, ouve uma redução de 15% e 41% quando da adição de 1 e 2 g/L de furfural, respectivamente, em relação ao controle.

Esse perfil de inibição também foi verificado no presente trabalho. A adição de furfural nas concentrações de 1 e 2 g/L ocasionaram um aumento de 40 e 240% na duração da fase de adaptação; além disso, tais concentrações ocasionaram redução de 29 e 11% no potencial de produção de metano. As comparações referentes a ambos os parâmetros foram feitas em relação à condição controle.

Na comparação entre a primeira e a última batelada de testes, se observa que a fase *lag* manteve o padrão de ser mais duradoura para a maior concentração de furfural. No entanto, G_m e R_m diminuíram de maneira mais drástica na última corrida corroborando a hipótese de que um lodo menos adaptado é mais suscetível aos efeitos deletérios do inibidor. Deduz-se, pois, que uma maior quantidade de contatos do lodo com o hidrolisado pode torná-lo mais robusto à digestão de hidrolisados contendo inibidores com concentrações cada vez maiores.

Para facilitar o entendimento das etapas do estudo e dos principais resultados foi feito um fluxograma esquematizando-os (Figura 4.14).

Figura 4.14 – Fluxograma com a sequência de experimentos e os principais resultados



Fonte: elaboração própria (2020).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

No presente estudo se verificou que a xilose, componente majoritário de frações hemicelulósicas de sorgo, pode ser metabolizada com alto aproveitamento em um processo de digestão anaeróbia de dois estágios utilizando lodo proveniente do tratamento de efluente rico em hexoses (lodo de reator anaeróbio em operação em indústria cervejeira). O tratamento de solução contendo 18 g DQO/L de xilose utilizando a heurística de digestão em dois estágios atingiu remoção de DQO de 98% após sete bateladas sequenciais. A taxa máxima de produção de biogás aumentou em 210% ao longo de sete bateladas sequenciais, bem como o rendimento de biogás que alcançou o patamar de 513 NmL/g DQO_s adicionada, ao final do estágio metanogênico, representando um aumento de 21% em relação à primeira batelada realizada com a solução de xilose concentrada.

A avaliação do efeito do furfural na etapa acidogênica da digestão anaeróbia em dois estágios revelou que este não apresentou efeito inibitório significativo quando a relação F/X_0 se manteve no menor patamar testado: 0,025 g furfural/g SSV. Verificou-se também que maior inibição da produção de AGV foi observada tanto nas menores concentrações de inóculo (nas menores relações S_0/X_0 estudadas - 1,0 e 4,0 g xilose/ g SSV) quanto nas condições com maior concentração de furfural (4 g/L) quando a relação F/X_0 foi maior que 0,3. Nestas condições a redução na produção de AGV foi superior a 60% quando comparada à condição controle.

Na comparação de lodo metanogênico puro (digestão em única etapa) e mistura de lodo acidogênico e metanogênico (digestão em duas etapas), o último foi mais afetado pelo furfural, com diminuição acentuada do rendimento de metano na digestão de solução sintética de xilose e ácido acético com o aumento da concentração de furfural. Para a concentração máxima de furfural avaliada essa redução chegou a 85% em relação ao controle.

Na avaliação dos efeitos inibitórios do furfural sobre lodo de indústria cervejeira empregando xilose como única fonte de carbono, o pouco tempo de adaptação do

lodo ao hidrolisado sintético o tornou muito mais suscetível à inibição. Enquanto o lodo adaptado apresentou rendimento de metano praticamente igual ao controle quando submetido à maior concentração de furfural, de 4 g/L, o lodo não adaptado apresentou rendimento quatro vezes menor que no controle na mesma concentração de furfural.

Dos resultados analisados fica evidente a importância da adaptação prévia do lodo, com sucessivos contatos do mesmo com a fonte de carbono que irá digerir. Além disso, empregar concentrações mais altas de inóculo no estágio acidogênico pode tornar a operação menos suscetível aos efeitos inibitórios do furfural, principalmente nas concentrações mais altas desse composto furânico.

5.2 SUGESTÕES

O trabalho demonstrou a eficiência da separação dos estágios acidogênico e metanogênico para a digestão anaeróbia do hidrolisado sintético contendo xilose, em regime de batelada. Como foi demonstrado que os sucessivos contatos com este hidrolisado tornaram o lodo anaeróbio mais resiliente em relação ao furfural, sugere-se que, após uma etapa de adaptação em batelada, seja testada a digestão do hidrolisado sintético com a separação dos estágios em regime contínuo. Sugere-se também que, após a estabilização da produção de biogás, sejam alimentados hidrolisados sintéticos com concentrações crescentes de furfural para avaliar os efeitos de diferentes concentrações do inibidor nos parâmetros cinéticos de produção do biogás.

Aventa-se também a possibilidade de se digerir em dois estágios separados a fração de hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo, obtido a partir de pré-tratamento com ácido diluído, usando a heurística de bateladas sequenciais partindo-se de uma alimentação com hidrolisado diluído até se chegar ao hidrolisado concentrado. Sugere-se que concomitantemente à operação das bateladas sequenciais se analise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o perfil de consumo dos AGV, açúcares e furfural no estágio metanogênico, bem como o perfil de ácidos orgânicos gerados no estágio acidogênico.

Em relação aos ensaios de inibição dos estágios acidogênico e metanogênico por furfural, empregando-se hidrolisado sintético, sugere-se que futuramente se avalie

o perfil de AGV produzidos e consumidos nessas etapas, bem como o de consumo de xilose e furfural por meio da CLAE. Outra sugestão é que se avalie os efeitos de diferentes concentrações de furfural em relação à diversidade microbiana do lodo submetido a diferentes concentrações de furfural. Técnicas como a metagenômica permitem avaliar domínios bem conservados como os do gene 16S rRNA, que são característicos para cada gênero e espécie de bactérias e arqueas que compõem o lodo. Essa técnica possibilitaria a avaliação qualitativa e quantitativa das espécies que compõem a microbiota, atendendo ao objetivo supracitado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGDAG, O. N.; SPONZA, D. T. Effect of alkalinity on the performance of a simulated landfill bioreactor digesting organic solid wastes. **Chemosphere**, v. 59, p. 871-879, 2005.

AKOBI, C.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. **Bioresource Technology**, 221, p.598-606, 2016.

ALLEN, S. A.; CLARK, W.; MCCAFFERY, J. M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P. J.; LIU Z. L.; GORSICH, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology for Biofuel**; 3, 2, 2010.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by S*accharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemichal Technology an Biotechnology,** 82, p.340-349, 2007.

ALMODARES, A.; HADI, M.R. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.9, p.772-780, 2009.

ÁLVAREZ, C.; REYES-SOSA, F. M.; DÍEZ, B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. **Microbial Biotechnology***,* 9(2)*,* p.149-156, 2016.

ANEEL. (2012). Resolução Normativa nº 482, de 17 de abril de 2012**. Agência Nacional de Energia Elétrica**, Rio de Janeiro. Disponível em:< http://www2.aneel.gov.br/arquivos/PDF/Resolução%20Normativa%20482,%20de%202012%20-%20bip-junho-2012.pdf>. Acessado em: 20 de novembro de 2019.

ANEEL. (2015). Resolução Normativa nº 687, de 24 de novembro de 2015. **Agência Nacional de Energia Elétrica**, Rio de Janeiro. Disponível em: < https://www2.aneel.gov.br/cedoc/ren2015687.pdf>. Acessado em 20 de Novembro de 2019.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; ANGELOPOULOS, K.; LYBERATOS, G. (2008a). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, 99 (1), p. 110-119, 2008.

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. (2008b). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 47 (15), p.5227-5233, 2008.

APHA, AWWA, WPCF, Rice , E.W.; Baird, R.B. ; Eaton, A.D.. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd ed. Washington: D.C.: American Public Health, Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017.

APPELS, I.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755-781, 2008.

AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005 .

ARREOLA-VARGAS, J.; FLORES-LARIOS, A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I.; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, 41(2), p.897-904, 2016.

BARAKAT, A.; MONLAU, F.; STEYER, J-P.; CARRERE, H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production**. Bioresource Technology**; 104, p.90-99, 2012.

BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; MAEDA, R. N.; PEREIRA, N. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] para a produção de bioetanol. **Boletim Tecnico da PETROBRAS** , v.54, p. 29-46, 2011.

BAUER, A.; BOSCH, P.; FRIEDL, A.; AMON, T. Analysis of methane potentials of steam exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. **Journal of Biotechnology**, 142, p.50-55, 2009.

BOWEN, E. J.; DOLFING, J.; DAVENPORT, R. J.; READ, F. L.; CURTIS, T. P. Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic wastewater. **Water Science & Technology**, v. 69, n. 5, p. 1004-1013, 2014.

BRASIL. Lei n. 13.576, de 26 de Dezembro de 2017. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, p. 4, Brasília, DF, 27 de Dezembro de 2017, PL 9086/2017.

CAMARGO, D.; SYDNEY, E. B.; LEONEL, L. V.; PINTRO, T. C.;SENE, L. Dilute acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse and fermentability of the hemicellulosic hydrolysate. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, 36(1), p.143-156, 2019.

CAMPOS, C. M. M.; HARDOIM, P. C.; BOTELHO, C. G.; SEVERO, J. C. A. **Programa computacional para simulação e dimensionamento de sistemas de tratamento de dejetos de suínos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA (CONBEA), 28., 1999, Pelotas, RS. Anais. Pelotas: SBEA, 1999.

CAO, G.-L.; REN, N.-Q.; WANG, A.-J.; GUO, W.-Q.; XU, J.-F.; LIU, B.-F. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16*. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35(24), p.13475-13480, 2010.

CAO, W.; SUN, C.; LI, X.; QIU, J.; & LIU, R. Methane production enhancement from products of alkaline hydrogen peroxide pretreated sweet sorghum bagasse. **RSC Advances**, 7,10, p. 5701–5707, 2017.

CARPENTIER, J.; ABADIE, J. Généralisation de la Méthode du Gradient Réduit de Wolfe au cas des Contraintes Non Lineaires IV International Conference on Operational Research. **PROCEEDINGS OF OPERATIONS RESEARCH SOCIETY OF AMERICA**. New York: D. B. Herts and J. Melese, 1966.

CAYIR ERVURAL, B.; EVREN, R.; DELEN, D. A multi-objective decision-making approach for sustainable energy investment planning. **Renewable Energy**, 126, p. 387-402, 2018.

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**, 16(3), p. 1462-1476, 2012.

CHANG, A. C. C.; TU, Y.; HUANG, M.; LAY, C.; LIN C. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolysed rice straw hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy***,* 36 (21), p. 14280-14288, 2011.

CHEN, W-H.; CHEN, S-Y.; KHANAL, S. K.; SUNG, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy,** 31, p.2170-2178, 2006.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Belo Horizonte: UFMG - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007, 2.ed., 380 p.

CIOABLA, A. E.; IONEL, I.; DUMITREL, G. A.; POPESCU, F. Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. **Biotechnology for biofuels**, 5, 39, 2012.

CONAB, 2018, **Série Histórica de Grãos** - Safra 2010/11 a 2017/18, Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=30>, acessado em 15/10/2019.

CUI, M.; YUAN, Z.; ZHI, X.; SHEN, J. Optimization of biohydrogen production from beer lees biomass using anaerobic mixed bacteria. ***International Journal of Hydrogen Energy***, 34 (19), p. 7971-7978, 2009.

DADI, A. P.; SCHALL, C. A.; VARANASI, S. Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 137, p.407-421, 2007.

D'ALMEIDA, M.L.O. **Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. In: Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. (IPT). 2º Edição, v. 1, Capitulo III, p. 45-106, 1988.

DANON, B.; MARCOTULLIO, G.; & DE JONG, W. Mechanistic and kinetic aspects of pentose dehydration towards furfural in aqueous media employing homogeneous catalysis. **Green Chemistry***,* 16(1), p. 39-54, 2016.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from Waste and Renewable Resources:** An Introduction. Weinheim: WILEY-VCH, 2008, 443 p.

DOGAN, T.; INCE, O.; OZ, N. A.; INCE, B. K. Inhibition of Volatile Fatty Acid Production in Granular Sludge from a UASB Reactor. Journal of **Environmental Science and Health, Part A,** 40(3), p. 633-644, 2005.

EPE, 2018. **Matriz Energética e Elétrica**. Disponível em: < http://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica> Acessado em: 02 de setembro de 2019.

EPE, 2019a, **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis Ano 2018**. Empresa de Pesquisa Energética. Disponível em: < http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-402/Análise_de_Conjuntura_Ano%202018.pdf>. Acessado em 02 de setembro de 2019.

EPE, 2019b, **Balanço Energético Nacional 2019: Ano-base 2018**. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro. Disponível em: < http://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2019>. Acessado em 02 de setembro de 2019.

FACCHIN, V.; CAVINATO, C.; PAVAN, P.; BOLZONELLA, D. Batch and continuous mesophilic anaerobic digestion of food waste - effect of trace elements supplementation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 457-462, 2013.

FOX, P.; POHLAND, F.G.; Anaerobic Treatment Applications and Fundamentals: Substrate Specificity during Phase Separation. **Water Environment Research**, v. 66, n.5, p. 716-724, 1994.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass Bioenergy***,* 46, p. 70-78, 2012.

GERARDI, M.H. **The microbiology of anaerobic digesters**. Waste Water Microbiology Series Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2003, 192 p.

GHOSH, A.; BHATTACHARYYA, B. C. Biomethanation of white rotted and brown rotted rice straw. **Bioprocess Engineering***,*20, p.297–302, 1999.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, 101(13), p. 4775-4800, 2010.

GONZÁLEZ-CABALEIRO, R.; LEMA, J. M.; RODRÍGUEZ, J. Metabolic Energy-Based Modelling Explains Product Yielding in Anaerobic Mixed Culture Fermentations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective**. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 42, p.712-725, 2015.

HAN, S. K.; KIM, S.H.; KIM, H.W.; SHIN, H-S. Pilot-scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis. **Water Science Technology***,* 2, p.131-138, 2005.

HARMSEN, P. F. H.; HUIJGEN, W. J. J.; BERMUDEZ LOPEZ, L. M.; BAKKER, R. R. C. Literature Review of Physical and Chemical pretreatment processes of lignocellulosic biomass. **Food and Biobased Research**/**Biosynergy**. Energy Research Centre of the Netherlands, report 1184, ISBN: 978-90-8585-757-0, 2010, 54 p.

HAROUN, B. M.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H.; FAYZA, A. N. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. **Renewable Energy**, 93, p.302-311, 2016.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 100, p. 10 -18, 2009.

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U.;HERNÁNDEZ-DE LIRA, I. O.; CRUZ-SANTOS, M. M.; SAUCEDO-LUEVANOS, A.; HERNÁNDEZ-TERÁN, F.; BALAGURUSAMY, N. Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. **Applied Sciences**, 9(18), 3721, 2019.

HERRERA, A.; TELLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A. ; VÁZQUEZ, M. ; Production of Xylose from Sorghum Straw Using Hydrochloric Acid. **Journal of Cereal Science**, vol. 37, p. 267-274, 2003.

HILL, D. T.; TAYLOR, S. E.; GRIFT, T. E. Simulation of low temperature anaerobic digestion of dairy and swine manure. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 127-131, 2001.

IEA, 2019, **World Energy Outlook 2019**. International Energy Agency. Disponível em: < https://iea.blob.core.windows.net/assets/1f6bf453-3317-4799-ae7b-9cc6429c81d8/English-WEO-2019-ES.pdf> Acessado em 28 de dezembro de 2019.

ISIK, M.; SPONZA, D. T. Effects of alkalinity and co-substrate on the performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor through decolorization of Congo Red azo dye. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 633-643, 2005.

KIM, M.; DAY, D. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803-807, 2011.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, 26(4), p.361-375, 2004.

KUMAR, G.; CHEON, H.C.; KIM, S-H. Effects of 5-hydroxylmethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H_2 production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, 39, p.16885-16890, 2014.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 48, p. 3713 -3729, 2009.

LEE, D. H.; BEHERA, S. K.; KIM, J. W.; PARK, H. S. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: A lab-scale study. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 876-882, 2009.

LIN, L., XU, F., GE, X., & LI, Y. Biological treatment of organic materials for energy and nutrients production - Anaerobic digestion and composting. **Advances in Bioenergy**, v. 4, 2019, p. 121-181, 2019.

LIU, Z.L.; SLININGER, P.J.; DIEN, B.S; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; S. W.GORSICH . Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 345-352, 2004.

MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review of research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540-555, 2015.

MAO, C., ZHANG, T., WANG, X. *et al.* Process performance and methane production optimizing of anaerobic co-digestion of swine manure and corn straw. **Scientific Reports,** 7, 9379, 2017.

MATHEW, A. K., ABRAHAM, A., MALLAPUREDDY, K. K., SUKUMARAN, R. K. Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources? **Waste Biorefinery***,* p. 267–297, 2018.

MATHUR, S.; UMAKANTH, A. V.; TONAPI, V. A.; SHARMA, R.; SHARMA, M. K. Sweet sorghum as biofuel feedstock: recent advances and available resources. **Biotechnology for biofuels**, 10, 146, 2017.

MCMILLAN., J. D. Pretreatment of Lignocellulosic biomass. **ACS Symposium Series**, 566, p. 292 – 324, 1994.

METCALF e EDDY Inc. **Wastewater Engineering: Treatment: and Reuse***.* New York: McGraw - Hill Book, 2003, 4th, 1815 p.

MMA, 2017, Documento-base para subsidiar os diálogos estruturados sobre a elaboração de uma estratégia de implementação e financiamento da contribuição nacionalmente determinada do brasil ao acordo de paris. **Ministério do Ambiente,** Brasília, 2017. Disponível em < https://www.mma.gov.br/images/arquivo/80051/NDC/documento_base_ndc_2_2017.pdf>. Acessado em 05 de dezembro de 2019.

MODIG, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemichal Journal**, 363, p.769-776, 2002.

MONLAU, F.; BARAKAT, A.; TRABLY, E.; DUMAS, C.; STEYER, J.P.; CARRÈRE, H. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 43(3), p.260–322, 2013.

MONLAU, F.; SAMBUSITI, C.; BARAKAT, A.; QUÉMÉNEUR, M.; TRABLY, E.; STEYER, J.P.; CARRÈRE, H. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances***,* 32(5), p. 934-951, 2014.

MOREIRA, H. M.; GIOMETTI, A. B. R.. Protocolo de Quioto e as possibilidades de inserção do Brasil no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo por meio de projetos em energia limpa. **Contexto Internacional**, Rio de Janeiro , v. 30, n. 1, p. 9-47, abril de 2008.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R., LEE; Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. Produção biotecnológica de xilitol a partir de palha de arroz. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento,** v.28, p. 24-39, 2002.

NISSILA, M. E.; LI, Y. C.; WU, S. Y.; PUHAKKA, J. A. Dark fermentative hydrogen production from neutralized acid hydrolysates of conifer pulp*.* **Appied Biochemical Biotechnology**, 168 (8), p. 2160 -2169, 2012.

NISSILA, M. E.; LAY, C.; PUHAKKA, J. A. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. **Biomass Bioenergy***,* 67, p. 145-159, 2014.

PAKARINEN, O. M.; TÄHTI, H. P.; RINTALA, J. A. One-stage H_2 and CH_4 and two-stage H_2 + CH_4 production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. **Biomass Bioenergy**; 33, p.1419-1427, 2009.

PALMQVIST E., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**; 74 (1), p.17 -24, 2000.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; BUDDE, M. A. W.; DE VRIJE, T.; CLAASSEN, P. A. M.; KOUKIOS, E. G. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: a comparative study. **Bioresource Technology,** 100(24), p. 6331–6338, 2009.

PARK, M. J.; JO, J. H.; PARK, D.; LEE, D. S.; PARK, J. M. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, 35(12), p.6194-6202, 2010.

PEKAŘOVÁ, S.; DVOŘÁČKOVÁ, M.; STLOUKAL, P.; INGR, M.; ŠERÁ, J.; KOUTNY, M. Quantitation of the Inhibition Effect of Model Compounds Representing Plant Biomass Degradation Products on Methane Production. **BioResources**, 12,2, p.2421-243, 2017.

PEIRCE, J. J.; WEINER, R. F.; VESILIND, P. A. Measurement of Water Quality. **Environmental Pollution and Control**, 4th edition, Butterworth-Heinemann, 392 p., 1998.

POHLAND, F. G.; GHOSH S. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes: the two-phase concept. **Environmental Letters**, 1, p. 255-266, 1971.

PRASAD, S., SINGH, A., JAIN, N. & JOSHI, H.C. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India, **Energy & Fuels**, Vol. 21, n. 4, pp. 2415-2420, 2007.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. **Phytochemistry Reviews**, 3, p. 29-60, 2004.

RAJESHWARI, K. .; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A., LATA; K.; KISHORE, V. V. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 4(2), p.135-156, 2000.

RAY, D.K.; MUELLER, N.D.; WEST, P.C.; FOLEY, J.A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. **PLoS ONE**, 8(6): e66428, 2013.

RIAÑO, B.; MOLINUEVO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Potential for methane production from anaerobic do-digestion of swine manure with winery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4131-4136, 2011.

RODIONOVA, M.V.; POUDYAL, R.S.; TIWARI, I.; VOLOSHIN, R.A.; ZHARMUKHAMEDOV, S.K.; NAM, H.G. et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy,** 42(12), p. 8450-8461, 2017.

ROONEY, W.L.; BLUMENTHAL, J.; BEAN, B.; MULLET, J.E. Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** 1(2):147-157, 2007.

ROSE, M.; BABI, M.; MORAN-MIRABAL, J. The study of cellulose structure and depolymerization through single-molecule methods. **Industrial Biotechnology**, 11(1), p. 16-24, 2015.

RUAN, R.; ZHANG, Y.; CHEN, P.; LIU, S.; FAN, L.; ZHOU, N.; LI, Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, **Academic Press**, 2.ed., 2019. 886 p.

SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes**: **fundamentos e aplicações**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2013, 424 p.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A; GUIMARÃES, V. M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35 n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, L. C. dos; ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. de. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, 263, p.601–612, 2018.

SENE, L.; ARRUDA, P. V.; OLIVEIRA, S. M.M.; FELIPE, M. G.A. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1141 – 1146, 2011.

SEPÚLVEDA-HUERTA, E.; TELLEZ-LUIS, S.J.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Production of detoxified sorghum straw hydrolysates for fermentative purposes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p. 2579-2586, 2006.

SHARMA, S. K.; MISHRA, I. M.; SHARMA, M. P.; SAINI, J. S. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. **Biomass**; 17 (4), p. 251–263, 1988.

SHIMADA, T.; MORGENROTH, E.; TANDUKAR, M.; PAVLOSTATHIS, S. G.; SMITH, A.; RASKIN, L.; KILIAN, R. E. Syntrophic acetate oxidation in two-phase (acid–methane) anaerobic digesters. **Water Science and Technology**, 64(9), p. 1812–1820, 2011.

SIEGERT, I.; BANKS, C. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. **Process Biochemistry**, 40(11), p.3412-3418, 2005.

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

SUHAS, V.K.; GUPTA, P.J.M.; CARROTT, R.; SINGH, M.; CHAUDHARY,S. K. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, 216, p. 1066-1076, 2016.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, 83, p. 1-11. 2002.

TEYMOURI, F.; LAUREANO-PEREZ, L.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Optimization of ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, 96, p.2014 -2018, 2005.

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 26, n. 74, p. 247-260, 2012.

TYE, Y. Y.; LEE, K. T.; WAN ABDULLAH, W. N.; LEH, C. P. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 155-172, 2016.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). **World Population Prospects 2019: Highlights** (ST/ESA/SER.A/423). Disponível em: <https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf.> Acessado em 20 de Janeiro de 2020.

VASCONCELOS, N.M.; PINTO, G.A.S.; ARAGÃO, F.A.S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. ISSN 1679-6543.

VIÑAS, M.; MARTÍNEZ, J.; BASELLI, B. Advantages of anaerobic reactor for TMP wastewater with separated acidogenic and methanogenic stages. **Environmental Technology,** 14 (1), p.995-1000, 1993.

VIVEKANAND, V.; RYDEN, P.; HORN, S.J., TAPP, H.S.; WELLNER, N.; EIJSINK, V.G.; et al. Impact of steam explosion on biogas production from rape straw in relation to changes in chemical composition**. Bioresource Technology**, 123(11), p. 608-615, 2012.

WANG, X.; LU, X.; LI, F.; YANG, G. Effects of temperature and carbon-nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and race straw: focusing on ammonia inhibition. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, e97265, 2014.

WILLFOR, S.; SUNDBERG, A.; HEMMING, J.; HOLMBOM, B. Polysaccharides in some industrially important softwood species. **Wood Science Technology**, 39, p. 245 – 258, 2005.

WU, X., STAGGENBORG, S., PROPHETER, J.L., ROONEY, W.L., YU, J., WANG, D. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation, **Industrial Crops and Products**, Vol. 31, n. 1, p. 164-170, 2010.

WYMAN, C. E. Potential Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, and Power. **Biotechnology Progress**, 19(2), p.254-62, 2003.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, U. Y. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, 96, p. 2026-2032, 2005.

XIAO, K. K.; GUO, C. H.; ZHOU, Y.; MASPOLIM, Y.; WANG, J. Y.; NG, W. J. Acetic acid inhibition on methanogens in a two-phase anaerobic process. **Biochemical Engineering Journal,** 75, p.1-7, 2013.

XIAO, K.; ZHOU, Y.; GUO, C.; MASPOLIM, Y.; NG, W. J. Impact of undissociated volatile fatty acids on acidogenesis in a two-phase anaerobic system. **Journal of Environmental Sciences**, 42, p.196-201, 2016.

XIE, B. F.; CHENG, J.; ZHOU, J. H.; SONG, W. L.; LIU, J. Z.; CEN, K. F.. Production of hydrogen and methane from potatoes by two-phase anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, 99 (13), p.5942-5946, 2008.

YADVIKA; SANTOSH; SREEKRISHNAN, T. R.; KOHLI, S.; RANA, V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 1-10, 2004.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioenery***,* 65, p.24–33, 1999.

ZHANG, P.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3735-3742, 2009.

ZHANG, R. H., ZHANG, Z. Q. Biogasification of rice straw with an anaerobic-phased solids digester system. **Bioresource Technology**, 68, p.235–245, 1999.

ZHAO, Z.; ZHANG, Y.; LI, Y.; DANG, Y.; ZHU, T.; QUAN, X. Potentially shifting from interspecies hydrogen transfer to direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism to resist acidic impact with conductive carbon cloth. **Chemical Engineering Journal**, 313, p.10-18. 2017.

ZHENG, M. X.; LI, X. J.; LI, L. Q.; YANG, X. J.; HE, Y. F. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, 100, p.5140–5145, 2009.

ZHENG, M.; ZHENG, M.; WU, Y.; MA, H.; WANG, J. Effect of pH on types of acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, p. 298-303, 2015.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, 42, p. 35-53, 2014.

ZHU, H.; STADNYK, A.; BÉLAND, M.; SETO, P. Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process**.** **Bioresource Technology**, 99, p.5078-5084, 2008.