UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

Beatriz Egerland Bueno

***Efeito da adição de fibras de cana-de-açúcar pré-tratadas na
produção de metano advinda da biodigestão anaeróbia de gorduras
do leite.***

Pirassununga, 2016

Beatriz Egerland Bueno

***Efeito da adição de fibras de cana-de-açúcar pré-tratadas na
produção de metano advinda da biodigestão anaeróbia de gorduras
do leite.***

“VERSÃO CORRIGIDA”

Dissertação apresentada à Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
a obtenção do Título de Mestre em
Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração: Biotecnologia
Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Giovana
Tommaso

Pirassununga, 2016

Beatriz Egerland Bueno

Efeito da adição de fibras de cana-de-açúcar pré-tratadas na produção de metano advinda da biodigestão anaeróbia de gorduras do leite.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração: Biotecnologia Ambiental

Data de aprovação: 13/04/2016

Banca Examinadora:

Profa.Dra. Giovana Tommaso – Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-USP -
Orientador(a)

Prof. Dr. Rogers Ribeiro - Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos-USP

Profa.Dra. Maria Angela Adorno - Departamento de
Engenharia Hidráulica e Saneamento - USP São Carlos

Dra. Sarita Rabello- Laboratório Nacional de Ciência e
Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

EB917E Egerland Bueno, Beatriz
e Efeito da adição de fibras de cana-de-açúcar pré-
tratadas na produção de metano advinda da
biodigestão anaeróbia de gorduras do leite. /
Beatriz Egerland Bueno ; orientadora Giovana
Tommaso. -- Pirassununga, 2016.
71 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. Tratamento de Resíduos. 2. Biodigestão
Anaeróbia. 3. Metano. 4. Fibras Celulósicas. 5. Bagaço
cana-de-açúcar. I. Tommaso, Giovana, orient. II.
Título.

RESUMO

BUENO, B. E. ***Efeito da adição de fibras de cana-de-açúcar pré-tratadas na produção de metano advinda da biodigestão anaeróbia de gorduras do leite.*** 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A digestão anaeróbia é uma alternativa para o tratamento de resíduos com altas concentrações de matéria orgânica. Por meio dos processos anaeróbios é possível a produção de biogás, fonte de energia renovável e ambientalmente amigável. Elevadas concentrações de lipídios, todavia, apesar de representarem elevado potencial metanogênico, interferem negativamente nos sistemas de tratamento, podendo inibir a atividade microbiana e, conseqüentemente, a produção de metano. O presente projeto avaliou o efeito da adição de bagaço de cana-de-açúcar no processo de biodigestão anaeróbia de elevadas concentrações de gorduras advindas de efluentes de laticínio. Para tanto foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas pelos seguintes métodos: organossolve, hidrotérmico, explosão à vapor e ácido diluído. O uso desse material lignocelulósico teve o objetivo de controlar a inibição causada pelos produtos da hidrólise dos lipídios por meio de sua adsorção e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de tais compostos no meio. Outra hipótese era que o bagaço de cana-de-açúcar pudessem agir como co-substrato no processo de biodigestão anaeróbia. Inicialmente realizaram-se ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com concentrações crescentes de gordura, que resultaram em relação entre substrato e microrganismo 0,06, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6 g DQO/gSTV. O ensaio com concentração em que foi verificada a inibição severa (0,4 gDQO/gSTV) do processo foi repetido com adição das fibras tratadas e não tratadas. Aos dados de produção acumulada de metano ajustou-se modelo de Gompertz, e parâmetros cinéticos foram inferidos. O bagaço de cana-de-açúcar mostrou potencial como adsorvente de gordura, pois as produções metanogênicas foram superiores à condição inibida sem adição desse material. A adição de fibras pré-tratadas por método organossolve resultou nas maiores produções de metano.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia longa; adsorção; biogás; inibição, produção de metano; material lignocelulósico.

ABSTRACT

BUENO, B. E. ***Effect of addition of pretreated sugarcane fibers in methane production from the anaerobic digestion of milk fats.*** 2016. 71p. M.Sc.Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Anaerobic digestion is an alternative for treating waste with high concentrations of organic matter. Through anaerobic processes biogas production is possible, which represents environmentally friendly renewable energy source. High lipid concentrations, however, although having high methanogenic potential, may negatively interfere with the treatment systems causing microbial activity inhibition and, consequently, depleting the production of methane. This project evaluated the effect of addition of cellulosic fibers in the anaerobic digestion process of high concentrations of fatty residues from dairy effluents. Therefore, sugarcane bagasse fibers were used *in natura* and pretreated by the following methods: organosolve, hydrothermal, steam explosion and dilute acid. The use of the fibers had the objective to control the inhibition caused by the products of the hydrolysis of lipids through adsorption and thus decrease the concentrations of such compounds in the medium. We also had the hypothesis that the cellulosic fibers could act as co-substrate in the anaerobic digestion process. Initially, anaerobic biodegradability tests were set with increasing concentrations of fatty residue, which resulted in relation entity substrate and microorganism of 0.057; 0.12; 0.24; 0.37 and 0.57 g COD / gSTV. The assay in which severe inhibition was verified (0.37 g COD/gSTV) was repeated with addition of treated and untreated fibers. The sugarcane bagasse showed potential as adsorbent because the methanogenic yields in the presence of the fibers were higher than the inhibited condition, without addition of that material. The addition of pretreated fibers by organosolv method resulted in higher methane production.

Key words: anaerobic digestion; long chain fat acids; fibers; biogas; inhibition; methane production.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular de lipídios	14
Figura 2. Condições testadas utilizando bentonita como adsorvente sintético	19
Figura 3. Estrutura do complexo lignocelulósico	22
Figura 4. Desenho ExperimentalFonte: Própria	28
Figura 5. Reator de adaptação da biomassa.	29
Figura 6. Caixa de Gordura do laticínio Tavolaro.....	32
Figura 7 Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado.....	37
Figura 8. Procedimentos de extração de AGCL.....	41
Figura 9. Separação de fases na biodigestão líquida	45
Figura 10. Biodigestão Anaeróbia Sólida	45
Figura 11. Produção acumulada de biogás das condições G1 (0,57 gDQO/gSTV - ■) e G0,1 (0,057gDQO/gSTV - ♦).....	47
Figura 12. Volume total de metano produzido nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar ..	51
Figura 13. Porcentagem de metano presente no biogás produzido nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar	52
Figura 14. Resultado do ajuste cinético nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição do efluente sintético à base de leite para o reator de adaptação.	30
Tabela 2. Composição da solução de macronutrientes (Zehnder <i>et al.</i> 1980).	30
Tabela 3. Composição da solução de micronutrientes (Zehnder <i>et al.</i> 1980).	30
Tabela 4. Composição do ensaio (AME) em frasco de 120 mL.	31
Tabela 5. Composição química das fibras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratadas (PT).	34
Tabela 6. Condições dos ensaios de biodigestão anaeróbia líquida para determinação de concentração inibitória.	35
Tabela 7. Condição dos ensaios de biodigestão anaeróbia sólida para determinar a faixa de concentração inibitória.	36
Tabela 8. Condições do ensaio de determinação da concentração inibitória.	37
Tabela 9. Condição dos ensaios de biodigestão anaeróbia com bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado.	38
Tabela 10. Características do Resíduo Gorduroso utilizado como substrato.	43
Tabela 11. Produção de Biogás Teórica (PBT) e Produção de Biogás Obtida (PBO).	44
Tabela 12. Produção Metanogênica Teórica (PMT) e Produção Metanogênica Observada (PMO) no ensaio com concentrações crescentes de gordura.	48
Tabela 13. Parâmetros Cinéticos do Ensaio com bagaço de cana-de-açúcar.	53

Lista de Abreviações

AGCL: ácidos graxos de cadeia longa

AGV: ácidos graxos voláteis

AME: atividade metanogênica específica

BMP: potencial bioquímico de produção de metano

DCM: dicloro metano

DQO: demanda química de oxigênio

E1G: etanol de primeira geração

E2G: etanol de segunda geração

FID: detector de ionização de chama

LBA: Laboratório de Biotecnologia Ambiental

MLC: material lignocelulósico

STV: Sólidos Totais Voláteis

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente em Manto de Lodo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos Específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Digestão anaeróbia	13
3.2. Degradação anaeróbia de compostos gordurosos	14
3.3. Inibição Metanogênica pela presença de ácidos graxos de cadeia longa	16
3.4. Mitigação de inibição pela presença de AGCL: adsorventes e co-digestão	18
3.5. Material Lignocelulósico	21
3.6. Pré-Tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos	22
3.6.1. Organossolve	23
3.6.2. Ácido diluído	24
3.6.3. Hidrotérmico	25
3.6.4. Explosão a vapor com peróxido de hidrogênio.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Desenho Experimental.....	27
4.2. Caracterização da Biomassa.....	28
4.2.1. Análise da Atividade Metanogênica Específica (AME)	31
4.3. Caracterização do Substrato.....	31
4.4. Caracterização do Bagaço de cana-de-açúcar	33
4.5. Análise de Biodigestão Anaeróbia.....	34
4.5.1. Determinação de Inibição Metanogênica	35
4.5.2. Determinação da faixa de concentração inibitória.....	35
4.5.3. Determinação da condição de inibição severa	36
4.5.4. Utilização do Bagaço de cana-de-açúcar	37
4.6. Acompanhamento da Biodigestão Anaeróbia	39
4.6.1. Análise da composição de biogás	39
4.6.2. Ácidos graxos de cadeia longa	40
4.6.3. Ácidos Graxos de Cadeia Curta	41
4.7. Inferência de parâmetros cinéticos.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1. Caracterização da Biomassa e do Substrato	43
5.2. Ensaios de Biodigestão Anaeróbia: determinação da concentração inibitória	43
5.3. Adição de bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado	49
6. CONCLUSÕES	57
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
8. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos do processamento de produtos de origem animal possuem alto potencial poluidor, pois são ricos em matéria orgânica e estão sendo gerados cada vez mais em maiores quantidades, acompanhando a crescente demanda da produção alimentícia. A biodigestão anaeróbia representa uma alternativa para o tratamento de efluentes com elevado teor de matéria orgânica, pois permite a redução do potencial poluidor e, além disso, promove a geração do biogás, que pode ser utilizado como fonte de energia alternativa.

O Brasil é o maior produtor de leite da América do Sul, ocupando a primeira posição com uma produção anual de aproximadamente 33 mil toneladas de litros de leite. Mundialmente, o Brasil ocupa a quinta posição no *ranking* dos maiores produtores de leite de acordo com a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013). No entanto, a geração de resíduos durante a transformação de leite em produtos lácteos é enorme e, por isso, são necessárias alternativas sustentáveis de tratamentos para que não ocorram danos ao meio ambiente. A composição dos resíduos de laticínios está principalmente relacionada com os componentes do leite e com produtos utilizados nas operações de higiene dos equipamentos, por isso, possuem altos teores de matéria orgânica, elevadas concentrações de lipídeos e altos teores de nitrogênio e fósforo (CICHELO; RIBEIRO; TOMMASO, 2013).

As altas concentrações de lipídios causam diversos problemas em processos anaeróbios, tais como colmatação de leitos fixos, desagregação e flotação da biomassa e redução ou até mesmo inibição da atividade metanogênica por acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) adsorvidos à biomassa (ALVES *et al.*, 2001b). No entanto, os lipídios são substratos interessantes para a digestão anaeróbia devido ao elevado rendimento na produção de metano, o que pode fazer desses resíduos ricos em gordura uma fonte de energia renovável (CIRNE *et al.*, 2007).

Em função de sua capacidade de adsorção, uma possibilidade de controle da inibição é a utilização de materiais lignocelulósicos que impedem ou reduzem a adsorção dos AGCL à biomassa, evitando assim a inibição da metanogênese. O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria alcooleira utilizado, como

combustível para geração de energia e calor (SUN *et al.*, 2004). A utilização desse material lignocelulósico em outros processos, como no tratamento anaeróbio de resíduos ricos em lipídios, pode valorizar ainda mais esse subproduto.

A camada externa dos materiais lignocelulósicos é resistente à ação microbiana e a ligação química entre a lignina, a celulose e as hemiceluloses torna a fibra menos biodegradável (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). No entanto, quando os materiais lignocelulósicos são pré-tratados tornam-se mais biodegradáveis pelos microrganismos e liberam compostos que podem atuar como co-substrato. Os pré-tratamentos promovem a conversão de celulose e hemicelulose em açúcares, ou podem proporcionar melhor acessibilidade da celulose por enzimas hidrolíticas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Assim, além de agirem como adsorventes da gordura, diminuindo a problemática da inibição por AGCL, materiais lignocelulósicos pré-tratados podem atuar como co-substratos. Nesse estudo foram empregados os seguintes pré-tratamentos: Organossolve, Hidrotérmico, Explosão a Vapor e Ácido Diluído.

A otimização do processo de digestão anaeróbia pode contribuir positivamente para melhoria do ambiente, pois minimiza o impacto devido à má disposição dos resíduos gordurosos, além de propiciar a produção de biogás, um combustível limpo e renovável, de maneira mais eficiente. O uso do bagaço de cana-de-açúcar agrega valor a esse subproduto e contribui com a sustentabilidade do agronegócio no Brasil. Além disso, a aplicação de pré-tratamentos diversificados nesse material lignocelulósico é um diferencial neste estudo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral dessa pesquisa foi estudar a biodigestão anaeróbia de gorduras advindas de resíduos de laticínios e avaliar a adição do bagaço de cana-de-açúcar como estratégia para mitigação de processos inibitórios.

2.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a produção metanogênica advinda da estabilização da biodigestão anaeróbia do resíduo gorduroso de laticínio em diferentes concentrações;
- Identificar as concentrações inibitórias e definir uma delas para os ensaios;
- Analisar a utilização do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado na contenção da inibição dos processos anaeróbios de degradação de lipídios;
- Analisar o potencial do bagaço de cana-de-açúcar como co-substrato na biodigestão anaeróbia de efluentes de laticínios.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo onde um consórcio microbiano degrada matéria orgânica num ambiente isento de oxigênio molecular. Além de ser eficiente na remoção de matéria orgânica de efluentes, um dos principais benefícios dos digestores anaeróbios é a produção de biogás (FORESTI, 1994; HAMAWAND, 2015). Cerca de 70 a 90% do material orgânico biodegradável presente em um sistema anaeróbio pode ser convertido em biogás, o qual pode ser utilizado como fonte de energia alternativa no próprio estabelecimento onde o tratamento do resíduo é realizado (KAPDI *et al.*, 2005). Além de gerar uma fonte de energia alternativa, o processo de digestão anaeróbia também produz um material estabilizado que pode ser usado como fertilizante em aplicações terrestres (ESCUDERO *et al.*, 2014).

A digestão anaeróbia é dividida em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, nas quais três grupos de microrganismos participam do processo: bactérias fermentativas, bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas. Na acidogênese as bactérias fermentativas (hidrolíticas e acidogênicas) promovem a conversão de monômeros orgânicos em hidrogênio, bicarbonato, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido láctico (além de outros ácidos em menores proporções) e etanol. O produto final das bactérias fermentativas será substrato para as bactérias acetogênicas que produzirão ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono. Em um processo equilibrado, acetato e hidrogênio serão, por sua vez, os substratos necessários para as arqueias metanogênicas na produção de metano. De todo metano produzido, 70% é formado a partir do ácido acético pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas e 30% a partir do hidrogênio pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (COSTA *et al.*, 2014; AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Apesar de ser um processo biológico complexo no qual muitas variáveis têm efeitos significativos em seu desempenho, a biodigestão anaeróbia tem sido considerada como o processo mais eficiente em termos energéticos de produção de bioenergia (HAMAWAND, 2015). Por todos esses motivos, tornam-se necessários

estudos para compreender e aperfeiçoar todas as etapas que ocorrem durante a biodigestão anaeróbia para que suas vantagens possam ser maximizadas e melhor aplicadas.

3.2. Degradação anaeróbia de compostos gordurosos

Os lipídeos são ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) ligados a glicerol, álcoois ou outros grupos funcionais, por um éster ou por ligação éter. Gorduras e óleos fazem parte de um subgrupo dos lipídeos que têm o grupo álcool esterificado com ácidos graxos, predominantemente, sob a forma de triglicerídeos (um glicerol com três AGCL) (ALVES *et al.*, 2009); a Figura 1 mostra a estrutura molecular de lipídeos.

Figura 1. Estrutura molecular de lipídios

Fonte: <http://www.mundoeducacao.com/quimica/classificacao-dos-lipidios.htm>

Durante a biodigestão anaeróbia de resíduos gordurosos, lipídios são hidrolisados e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são então liberados para a fase líquida. Em condições anaeróbias, a partir de tais produtos, a biomassa produz ácidos graxos voláteis (AGV), que são então convertidos em biogás. Elevadas concentrações de lipídios podem causar, todavia, problemas para o processo de digestão anaeróbia em função do acúmulo dos AGCLs e AGVs, que inibem o processo metanogênico, pois causam desequilíbrio nas etapas anteriores (ESCUADERO *et al.*, 2014). Sun *et al.* (2014) estudaram a influência da concentração de lipídios sobre a co-digestão anaeróbia de biomassa de resíduos urbanos e lodos ativados em um reator contínuo agitado. Os resultados dos testes em escala de bancada mostraram que, em concentrações de lipídios menores que 60%, a produção de metano foi reforçada com o aumento da concentração desses compostos. Porém, quando a concentração de lipídios excedeu 65%, a produção de metano diária diminuiu cerca de 8%.

As gorduras podem causar ainda colmatção de leitos fixos, desagregação e flotação da biomassa granular devido à adsorção de uma camada lipídica em torno das partículas da biomassa (ALVES *et al.*, 2001b). Todos estes problemas limitam a eficiência operacional dos reatores e, normalmente, pré-tratamentos físico-químicos são aplicados a fim de promover a redução da concentração de lipídios antes do processo anaeróbio. A remoção de lipídios geralmente é feita com o uso de caixas de gordura comuns que permitem sua separação manualmente ou por meio de raspadores de superfície. Quando há presença de gorduras emulsificadas utilizam-se produtos químicos e flotadores com ar dissolvido para quebrá-las, o que melhora significativamente a remoção. A flotação, todavia, gera altos custos e produz um lodo químico que deve ser destinado adequadamente (MENDES *et al.*, 2005a).

Por outro lado, os lipídios são substratos interessantes para a digestão anaeróbia devido ao elevado rendimento na produção de metano, o que pode fazer desses resíduos ricos em gordura uma fonte de energia renovável (CIRNE *et al.*, 2007). De acordo com Alves *et al.* (2009) efluentes ricos em lipídios são substratos ideais para a produção de biogás, uma vez que 1 g de lipídeo gera 1,425 L de biogás, sendo que 68,5% equivale ao gás metano (CH₄), enquanto que cada grama de carboidratos e proteínas, produzem, respectivamente, 0,830 L (contendo 50% metano) e 0,921L (contendo 68,8% metano).

3.3. Inibição Metanogênica pela presença de ácidos graxos de cadeia longa

Em altas concentrações, os lipídios presentes em óleos e gorduras podem causar grandes problemas em reatores anaeróbios, incluindo a inibição metanogênica devido à presença de AGCL (ANGELIDAKI; AHRING, 1992). Os AGCL são oxidados em ácido acético e hidrogênio, que são convertidos em metano na metanogênese (HWU; DONLON; LETTINGA, 1996); no entanto, o efeito inibitório dos lipídios é geralmente atribuído aos AGCL por possuírem um efeito tóxico na atividade microbiana anaeróbia. A inibição da metanogênese pelos AGCL é uma das principais limitações na exploração da produção de biogás a partir de efluentes ricos em gordura (SILVA *et al.*, 2014).

Lipídios são substâncias biodegradáveis e podem ser excelentes substratos para o metabolismo energético dos microrganismos, mas os microrganismos utilizam os lipídios somente depois da hidrólise da ligação éster. As enzimas extracelulares chamadas de lipases são responsáveis pela hidrólise e são excretadas pelas bactérias acidogênicas. O resultado da ação das enzimas é a liberação dos ácidos graxos livres e do glicerol, e todas estas substâncias podem ser atacadas tanto anaerobiamente quanto aerobiamente por microrganismos (MADIGAN *et al.*, 1996). No caso da conversão anaeróbia, após a hidrólise, enquanto os AGCL são convertidos em ácido acético e hidrogênio através da beta-oxidação pelas bactérias redutoras acetogênicas, o glicerol é convertido em ácido acético na acidogênese num processo fermentativo (CIRNE *et al.*, 2007).

As reações acetogênicas não são termodinamicamente favoráveis nas condições padrão (MCCARTY, 1972), porém ocorrem naturalmente em reatores anaeróbios graças à interação de microrganismos acetogênicos e metanogênicos. No entanto, as reações sintróficas produzem baixa energia e por isso os microrganismos acetogênicos são obrigatoriamente produtores de hidrogênio. As reações acetogênicas só acontecerão se as concentrações dos produtos, hidrogênio e ácido acético forem mantidas baixas pelos microrganismos consumidores de acetato e hidrogênio. As diferenças cinéticas dos microrganismos acetogênicos e metanogênicos podem levar ao acúmulo de dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético, e outros AGVs em reatores anaeróbios durante choque de cargas orgânicas devido à limitação de transferência de hidrogênio entre esses microrganismos. O

acúmulo de hidrogênio pode resultar em maiores produções de ácidos orgânicos mais reduzidos (ácido propionico e butírico) cuja degradação é inibida devido à presença de elevadas concentrações de ácido acético, hidrogênio dissolvido e ácido fórmico. A inibição dos microrganismos sintróficos pela acumulação de produtos acidogênicos levará a um contínuo acúmulo de AGV, o que contribui para o consumo da alcalinidade e decréscimo de pH, afetando o crescimento dos microrganismos metanogênicos (AQUINO & CHERNICHARO, 2005).

Além de serem tóxicos aos microrganismos acetogênicos e metanogênicos, os ácidos graxos de cadeia longa são adsorvidos na superfície da parede de célula microbiana, prejudicando a transferência de substratos e produtos (CIRNE *et al.*, 2007). A adsorção dos AGCL é pré-requisito para a sua degradação; no entanto uma adsorção excessiva pode inibir a metanogênese e causar flotação da biomassa nos reatores (HWU, *et al.*, 1998).

Esses ácidos são compostos de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, o que pode causar outro problema em relação à manutenção da biomassa em reatores de leito granular: a desintegração dos grânulos. Este fenômeno ocorre devido ao fato de os AGCL atuarem como agentes surfactantes, baixando a tensão superficial da biomassa (ALVES *et al.*, 2009).

A inibição de processos anaeróbios depende do tipo de AGCL, da população microbiana, e da temperatura (SILVESTRE *et al.*, 2014). Por exemplo, o ácido oleico, seguido de ácidos palmítico e esteárico, tem sido descrito como o AGCL com o maior efeito inibitório sobre termófilos e o que mais causa problemas inibitórios na digestão anaeróbia em tratamentos de efluentes (PEREIRA *et al.*, 2005). A toxicidade dos AGCL também varia com o tipo de biomassa utilizada e está relacionada mais com as características físicas da biomassa, como tamanho da área de superfície dos grânulos, do que com características biológicas (HWU *et al.*, 1996).

Hwu & Lettinga, (1997) estudaram a influência da temperatura de operação na toxicidade dos AGCL. A temperatura está relacionada às populações de bactérias presentes na biomassa utilizada, mesófilas e termófilas, que podem responder de maneira diferente à toxicidade de AGCL, já que o mecanismo de toxicidade está relacionado à adsorção dos AGCL sobre as células microbianas. Este estudo

concluiu que as bactérias termófilas são mais suscetíveis à toxicidade que as mesófilas. Os AGCL também são responsáveis pelo decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP), que é utilizada como fonte de energia pelas células microbianas, causando inibição das atividades fisiológicas das bactérias (MENDES *et al.*, 2005b).

Silva *et al.* (2014) concluíram que a quantidade de AGCL associada à quantidade biomassa e um longo período de adaptação são fatores indispensáveis para evitar o atraso da produção de metano devido aos AGCL, uma vez que a adaptação evita o acúmulo excessivo de tais compostos. Nesse sentido, Alves *et al.* (2001a) estudaram a toxicidade e biodegradabilidade do ácido oleico em dois tipos de reatores anaeróbios; um com biomassa adaptada com lipídios e o outro, com biomassa não adaptada. O reator com biomassa adaptada mostrou maior tolerância à toxicidade do ácido oleico em comparação com o outro reator. Neves *et al.* (2009) também relataram que a conversão do ácido oleico por biomassa adaptada ocorre com maior eficiência. Além da adaptação da biomassa, outras medidas podem contribuir para a redução do impacto que o excesso de AGCL causa na produção metanogênica e na maioria das vezes, tais medidas relacionam-se à diminuição da concentração do inibidor, ainda que temporária (SPEECE, 1996).

3.4. Mitigação de inibição pela presença de AGCL: adsorventes e co-digestão

Palatsi *et al.* (2009) testaram diversas estratégias de recuperação de processos inibidos por ácidos de cadeia longa. Dentre os métodos testados os que se mostraram como as melhores estratégias foram a realização de diluição do conteúdo dos reatores com inóculo, aumentando assim a proporção de biomassa / AGCL, e a adição de adsorventes. Os autores salientaram que o uso de adsorventes parece ser a estratégia mais segura para aplicação em instalações industriais, onde não é fácil ou possível a introdução de práticas de diluição. O efeito do uso dos adsorventes foi relacionado com sua capacidade em remover temporariamente os AGCL, reduzindo assim o seu efeito inibitório, favorecendo o transporte de substrato

através da membrana dos microrganismos. Os adsorventes utilizados foram bentonita e fibras celulósicas advindas do trato intestinal de bovinos.

A Figura 2 mostra as condições testadas em um estudo semelhante realizado por Palatsi *et al.* (2012), que avaliou o impacto dos AGCL sobre a atividade metanogênica na presença e na ausência de bentonita como um adsorvente sintético. Na condição A a biomassa é colocada primeiro em contato com os adsorventes e depois com o substrato (AGCL), o que não permite que a bentonita adsorva com eficácia os AGCL. Na condição B o substrato e a biomassa entram em contato primeiro e, em seguida, os adsorventes são adicionados. A bentonita consegue adsorver parte dos AGCL, porém grande parte já foi adsorvida pela biomassa. A condição C seria a mais interessante, pois nela os AGCL entram em contato tanto com o adsorvente quanto com a biomassa, porém em menor concentração. O adsorvente adsorve mais em maiores concentrações e menos em menores concentrações, resultando em um processo dinâmico.

Figura 2. Condições testadas utilizando bentonita como adsorvente sintético

Fonte: Palatsi *et al.* (2012)

A indústria sucroalcooleira brasileira produz uma quantidade de subprodutos significativa, como é o caso, por exemplo, do bagaço da cana. A maior parte deste

subproduto é utilizada pela própria indústria sucroalcooleira como combustível para geração de energia e calor, (SUN *et al.*, 2004). Somente no estado de São Paulo são gerados anualmente aproximadamente 146 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar (BRASIL, 2011). No entanto, tecnologias dedicadas a produção do etanol de segunda geração (E2G), utilizado como um biocombustível, vêm sendo desenvolvidas. O E2G é produzido a partir de material lignocelulósico (MLC) proveniente de diversas fontes lignocelulósicas como, palha de milho, de trigo e de arroz, resíduos de cana-de-açúcar, bagaço de sorgo sacarino, gramíneas, resíduos florestais. No Brasil, pelo fato de ser a matéria-prima predominante na produção de do etanol de primeira geração (E1G), a cana-de-açúcar tem sido o foco dos principais estudos para a produção de E2G (REFERENCIA) A utilização do bagaço de cana-de-açúcar em outros processo aumenta a valorização esse subproduto e também aumenta a possibilidade para uma nova geração de MLC mais produtivos, com maior conteúdo de fibras. Assim, seu uso como ação para conter ou minimizar o efeito inibitório causado pela presença de gorduras em digestores anaeróbios pode se traduzir em medida eficaz e barata.

O uso de substratos individuais na digestão anaeróbia apresenta alguns inconvenientes ligados às características do substrato como, baixas cargas orgânicas além de elevadas concentrações de nitrogênio e de AGCL que podem levar à inibição metanogênica. A digestão simultânea de dois ou mais substratos é uma opção viável para superar esses inconvenientes da mono-digestão e para melhorar sua viabilidade econômica (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014).

A co-digestão também pode aumentar o rendimento da produção de metano. Em um estudo realizado por Angelidaki e Ahring (1997) a co-digestão de esterco bovino com águas residuárias da fabricação de azeite de oliva resultou em um aumento de 100% da produção de metano, em comparação com a produção obtida apenas com a biodigestão do esterco. Ferrer *et al.*, (2014) utilizaram substratos vegetais (tomate e pimentão) na co-digestão anaeróbia de dejetos suínos. Foram obtidos valores mais elevados de potencial bioquímico de produção de metano (BMP) com o aumento da adição dos substratos agrícolas. A substituição de 50% de sólidos voláteis de dejetos de suínos por tomate e pimentão aumentou o BMP em 41% e 44%, respectivamente, em comparação com a digestão anaeróbia apenas de dejetos de suínos. Pitk *et al.* (2014) adicionaram efluente de matadouro, rico em

lipídios e proteínas, na co-digestão de esterco bovino e obtiveram um aumento de 3,5 vezes da produção de biogás volumétrico e nenhum indício de inibição por AGCL.

Em função de seu potencial efeito inibitório, substratos gordurosos devem ser sempre co-digeridos com outros tipos de substratos para reduzir a concentração de lipídios no reator anaeróbio (LANSING *et al.*, 2010).

3.5. Material Lignocelulósico

Os carboidratos presentes nas plantas, produzidos por fotossíntese, podem ser divididos em carboidratos estruturais, que atuam diretamente na sustentação da planta, e carboidratos não estruturais dissolvidos no conteúdo celular (citoplasma) das células vegetais. Por exemplo, a celulose e a hemicelulose funcionam na estruturação física das plantas, e o amido atua como reserva energética. Os carboidratos compõem cerca de 50 a 80% da matéria seca das plantas (VAN SOEST, 1994).

A celulose e a hemicelulose são os principais polissacarídeos estruturais da parede celular das plantas (PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994), que é um dos principais responsáveis pela redução da degradabilidade dos tecidos das plantas (JUNG; ENGELS, 2002), devido à deposição crescente de lignina durante o amadurecimento (ALBRECHT; WEDIN; BUXTON, 1987). A hemicelulose é uma macromolécula de menor peso molecular que a celulose e é composta por vários tipos de açúcares, como hexoses e pentoses. De acordo com o material que a compõe, esta pode ser denominada como xilana, manana, arabinoxilana, arabinogalactana ou arabana. Em muitos resíduos agroindustriais, utilizados na alimentação animal e em madeiras duras, a hemicelulose apresenta alto conteúdo de xilanas unidas por ligações β -1,4, com ramificação a outros carboidratos (PEREIRA JR., 1999). As bactérias que degradam a hemicelulose são as mesmas que degradam a celulose.

Os carboidratos presentes nas plantas também podem ser classificados como fibrosos e não fibrosos. A pectina, β -glucanas, gomas, etc. são carboidratos que desempenham papel estrutural na parede celular e são classificados como

carboidratos não fibrosos. Acelulose e hemicelulose são exemplos de carboidratos fibrosos (NRC, 2001; VAN SOEST, 1994). Os carboidratos fibrosos são substâncias que apresentam padrões de complexidade e muitas vezes estão associadas às ligações químicas de outras moléculas, como por exemplo, a lignina. A lignina é uma macromolécula componente da parede celular das plantas. Sua concentração aumenta à medida que as plantas amadurecem, atuando substancialmente na degradação microbiana dos carboidratos estruturais da parede celular. A molécula de lignina está associada aos carboidratos fibrosos da parede celular e é por isto que ela inibe acentuadamente a digestão da fibra (DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962; VAN SOEST, 1994). A Figura 3 mostra a estrutura do complexo lignocelulósico das células vegetais.

Figura 3. Estrutura do complexo lignocelulósico

Fonte: Kondo, T. *et al.* 1997

3.6. Pré-Tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos podem possuir em sua composição substâncias que os torna também um substrato para os microrganismos, como os açúcares. Porém, a camada externa de materiais lignocelulósicos é resistente à ação microbiana e não é facilmente biodegradável. Além disso, a ligação química entre a lignina, a celulose e a hemicelulose forma um complexo, tornando-os menos biodegradável durante a fermentação anaeróbia (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). Para o aumento da biodegradabilidade e aceleração do processo de hidrólise, o material lignocelulósico pode passar primeiramente por pré-tratamentos antes da digestão

anaeróbia (SUN; CHENG, 2002). Após tais pré-tratamentos, que promovem a liberação de compostos degradáveis mais rapidamente, os materiais lignocelulósicos podem, então, dependendo de sua estrutura, atuar tanto como adsorventes quanto como co-substratos.

Em geral, quando o objetivo é a conversão biológica, o pré-tratamento mais adequado para um determinado material lignocelulósico é aquele que promove maior conversão de celulose e hemicelulose em açúcares, ou que proporciona melhor acessibilidade da celulose por enzimas hidrolíticas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Os pré-tratamentos podem ser classificados em físico, físico-químico, químico e biológico. A escolha de qual tratamento utilizar deve estar relacionada à característica do material e à finalidade do hidrolisado (COSTA *et al.*, 2014). Os subitens a seguir fornecerão informações acerca dos pré-tratamentos selecionados para realização do presente trabalho.

3.6.1. Organossolve

O pré-tratamento chamado Organossolve é um processo eficiente de extração de lignina, além de promover uma relativa solubilização das hemiceluloses. Nele o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* passa por um tratamento térmico para a extração de tal composto. Para tanto, se utilizam solvente orgânico, na presença ou não de um catalisador em ambientes com alta temperatura e pressão (AZIZ, 1988; CURVELLO, 1992). Os álcoois primários, como etanol e metanol são os solventes orgânicos que apresentam maior seletividade para a deslignificação. No entanto, o etanol é mais vantajoso, pois além de ser menos tóxico que o metanol, também possui menor custo e melhores condições operacionais (KLEINERT, 1974; YAWALATA, 2001).

Em relação aos catalisadores, esses podem ser ácidos ou alcalinos. Os catalisadores ácidos podem ser advindos do próprio processo de hidrólise dos grupos acetila presentes nas hemiceluloses, gerando ácido acético, ou então um ácido pode ser adicionado, como os ácidos de Lewins que são eficientes (CARASCHI, 1997; SOUSA, 1984). Como catalisadores alcalinos utilizam-se grandes quantidades de bases que irão atuar como agentes de deslignificação (AZIZ; SARAKANEM, 1989). O pré-tratamento organossolve é capaz de separar as

frações do material lignocelulósico com pureza relativamente alta. Após o pré-tratamento, a fração celulósica pode ser convertida à glicose para a produção de etanol e outros compostos químicos (BENAR, 1992; ZHANG, 2008).

3.6.2. Ácido diluído

No pré-tratamento com ácidos diluídos as hemiceluloses são hidroliticamente quebradas liberando açúcares. Ácidos promovem a hidrólise e melhoram o rendimento de recuperação de glicose, a partir de celulose, através da solubilização das hemiceluloses e da baixa solubilização da lignina durante o pré-tratamento. A remoção de hemicelulose enfraquece a ligação química entre a lignina, a celulose e as hemiceluloses, aumentando assim a acessibilidade da celulose. O mais comumente usado é o ácido sulfúrico diluído. O ácido é misturado com o material lignocelulósico em determinada temperatura por períodos que variam de minutos a segundos. O uso de ácido para remover hemicelulose foi tentado em uma ampla variedade de matérias-primas que variam desde gramíneas a resíduos agrícolas (Mosier *et al*, 2005; Taherzadeh, & Karimi, 2007). Lloyd & Wyman (2005) avaliaram diferentes condições de pré-tratamento para a obtenção de glicose a partir da palha de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído. Obtiveram aumento no rendimento de obtenção de glicose de 56% em comparação à condição sem pré-tratamento ácido. Os autores concluíram que até 92,5% do total dos açúcares inicialmente disponíveis na palha de milho puderam ser recuperados com o pré-tratamento ácido

Canilha *et al.*, 2011 estudaram a aplicação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em amostras de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes condições de tempo, temperatura e concentração do ácido. Nesse estudo foi observado que a temperatura foi o fator que mais influenciou as variáveis de resposta e que em condições mais severas do pré-tratamento houve remoção quase completa da fração hemicelulósica. É importante comentar que as condições do pré-tratamento que levam à melhores resultado dependem das características da matéria-prima, incluindo a genética da planta, ambiente de crescimento, métodos de colheita e armazenamento, e ao processo industrial sofrido por esse resíduo. Em um estudo Benjamin *et al.*(2013), avaliaram o efeito do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído foi avaliado em seis variedades diferentes de bagaço de cana-de-açúcar. Eles concluíram que sob condições menos severas de pré-tratamento, as

diferenças na eficiência de bioconversão entre as variedades foram maiores que nas condições mais severas. Essa conclusão sugeriu que em condições menos severas de pré-tratamento a recuperação de glicose foi determinada pela composição química do material lignocelulósico.

3.6.3. Hidrotérmico

Nessa tecnologia, água a temperaturas elevadas é aplicada para a hidrólise, extração e modificação estrutural de materiais lignocelulósicos. O processamento hidrotérmico é uma tecnologia limpa que converte matérias-primas, tais como materiais lignocelulósicos, em bioenergia e produtos químicos de alto valor agregado. Além disso, tem sido considerado o pré-tratamento com melhor custo-benefício e suas principais vantagens são não precisar da adição e recuperação de produtos químicos que não sejam a água, causar poucos problemas de corrosão de equipamentos, possuir operação simples e também o fato de que as maiores das hemiceluloses podem ser dissolvidas sem a geração de produtos químicos e nem inibidores tóxicos. Por esses motivos o processamento hidrotérmico pode ser considerado como um processo ambientalmente amigável (Limayem & Riche, (2012); Ruiz *et al.*(2013)). Sob condições ótimas de processo, o pré-tratamento hidrotérmico pode ser comparado com os pré-tratamentos convencionais com ácido diluído, no entanto, sem a adição de ácidos (Laser, *et al.*, 2002).

Perez *et al.* (2007) avaliaram o pré-tratamento hidrotérmico na palha do trigo e concluíram que trata-se de um pré-tratamento eficaz para aumentar o potencial de palha de trigo como substrato para a produção de etanol. Obtiveram recuperação máxima de açúcar derivado da hemicelulose de 53%. Santucci, *et al.* (2015) concluíram que quando o pré-tratamento hidrotérmico em bagaço de cana de açúcar foi realizado por até 15 minutos e com temperaturas elevadas, a conversão da hemicelulose em açúcares foi favorecida e a produção de produtos da decomposição do hidrolisado foi minimizada.

3.6.4. Explosão a vapor com peróxido de hidrogênio

O pré-tratamento de explosão à vapor envolve o aquecimento do material lignocelulósico em altas temperaturas e pressões, seguido de ruptura mecânica do material pré-tratado por descarga violenta em um tanque coletor. O pré-tratamento com vapor de alta pressão pode ser realizado com ou sem adição de um catalisador ácido. Se nenhum ácido exógeno é adicionado no processo a hidrólise dependerá de ácidos que são liberados a partir do próprio material lignocelulósico. O ácido acético tem sido considerado o principal ácido catalisador nesse processo de autohidrólise, liberado a partir das hemiceluloses acetiladas (RAMOS, 2003).

Entre os processos de separação dos componentes de materiais lignocelulósicos, a explosão a vapor é considerada um dos mais importantes. As características atraentes da explosão a vapor em comparação com outros métodos incluem o potencial para reduzir significativamente impactos ambientais, custos e consumo de energia (Avellar & Glasser, 1998). O processo de explosão à vapor resulta numa hidrólise da hemicelulose e, em menor escala, da celulose. As reações aumentam a solubilização das hemiceluloses em água e a solubilidade da lignina em solventes orgânicos ou alcalinos, deixando a celulose como resíduo sólido (Zhuang & Vidal de 1997). Rabelo *et al.*, (2012) utilizaram o processo de explosão a vapor com peróxido de hidrogênio para tratar bagaço de cana-de-açúcar utilizado na produção de etanol de segunda geração. O estudo mostrou que a remoção de hemicelulose e lignina produz claramente um substrato com características melhoradas para a hidrólise subsequente e a maior eficiência na remoção de hemicelulose e lignina foi obtida para as condições de pré-tratamento mais severas.

Além das vantagens já citadas desse pré-tratamento, a explosão a vapor pode melhorar a produtividade de metano em fermentação anaeróbia (Take *et al.*, 2006). Lu, *et al.*, (2009) aplicaram o pré-tratamento de explosão a vapor em palha de milho que foram, posteriormente, utilizadas em fermentação anaeróbia visando à produção de metano e hidrogênio. Foram obtidos maiores produções quando se utilizou o substrato tratado em relação ao não tratado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico estão descritos os materiais e métodos utilizados nessa pesquisa, assim como os procedimentos para o acompanhamento e avaliação dos ensaios de biodigestão anaeróbia realizados.

4.1. Desenho Experimental

Ensaio de biodigestão anaeróbia foram realizados com resíduos ricos em gordura advindos de estação de tratamento de efluentes de laticínios. Em um primeiro momento foram realizados ensaios de biodigestão anaeróbia com diferentes concentrações do resíduo gorduroso para identificar a faixa de concentração onde a inibição por excesso de substrato ocorreria. A partir dos resultados desses ensaios foi possível obter a velocidade de produção de metano, a duração da fase de adaptação dos microrganismos aos substratos utilizados e a produção máxima acumulada de biogás e metano. Esses dados foram utilizados na avaliação da inibição dos microrganismos em relação aos AGCL, e na determinação da concentração utilizada nos próximos ensaios.

Na menor concentração de resíduo em que foi verificada inibição severa foram realizados novamente ensaios de biodigestão anaeróbia, porém, com adição do bagaço de cana-de-açúcar. Antes, no entanto, foi realizado um ensaio de biodigestão anaeróbia para testar a quantidade mais adequada que deveria ser adicionada. Por fim, o ensaio com a concentração inibitória de substrato e a quantidade ideal do bagaço *in natura* e pré-tratado foi realizado a fim verificar a possibilidade de reverter o processo inibitório e analisar o potencial do bagaço de cana-de-açúcar como co-substrato.

As etapas e análises realizadas durante o trabalho experimental estão delineadas na Figura 4.

Figura 4. Desenho Experimental

Fonte: Própria

4.2. Caracterização da Biomassa

A biomassa utilizada foi granular advinda de reator do tipo UASB tratando efluentes de uma indústria produtora de amido. A adaptação da biomassa foi realizada utilizando-se um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (Figura 5), operado com tempo de ciclo de 24 horas, alimentado com efluente sintético simulando água residuária de laticínio. A Tabela 1 apresenta a composição do efluente sintético que possuía DQO total de 3 g/L. A composição deste efluente foi baseada nos trabalhos de Cichello *et al.* (2013) e Matsumoto *et al.* (2012).

O reator foi mantido a 37 ° C e com agitação de 125 rpm. A adaptação da biomassa era realizada durante aproximadamente 30 dias. O processo foi realizado tanto para adaptar a biomassa às gorduras do leite quanto para causar a desgranulação dos grânulos da biomassa, pois segundo Pereira *et al.* (2005) a

biomassa floculenta é mais eficiente para a degradação de ácidos graxos de cadeia longa, quando comparada à biomassa suspensa.

Figura 5. Reator de adaptação da biomassa.

Fonte: Autoria própria

Tabela 1. Composição do efluente sintético à base de leite para o reator de adaptação.

Reagentes	Concentração
Leite em pó desnatado	2g DQO/L
Creme de leite	1g DQO/L
Ácido Peracético	0,0181 ml/L
Água Oxigenada	0,028 ml/L
Ácido Nítrico	0,39 ml/L
Solução de Macronutrientes	1,8 ml/L
Solução de Micronutrientes	1 ml/L

A composição das soluções de macronutrientes e micronutrientes utilizadas no efluente sintético está descrita, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Composição da solução de macronutrientes (Zehnder *et al.* 1980).

Reagentes	Quantidade
NH ₄ Cl	17,0 g
KH ₂ PO ₄	3,7 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	8,0 g
MgSO ₄ .2H ₂ O	9,0 g
Água Ultrapura	q.s.p 1000mL

Tabela 3. Composição da solução de micronutrientes (Zehnder *et al.* 1980).

Reagentes	Quantidade
FeCl ₂ .6H ₂ O	2,00
H ₃ BO ₃	0,05
ZnCl ₂	0,05
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,05
AlCl ₃ .6H ₂ O	0,09
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,00
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,092
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,164
EDTA	1g
Resazurina	0,2 gL
HCl 37%	1 mL
Água Ultrapura	q.s.p 1000mL

Uma vez obtida a biomassa adaptada, realizou-se análise de sólidos totais de acordo com APHA/AWWA/WEF (1998). A fim de verificar o potencial de produção de metano dos grupos de microrganismo acetogênicos e metanogênicos presentes na biomassa utilizada foram realizados ensaios de atividade metanogênica específica (AME).

4.2.1. Análise da Atividade Metanogênica Específica (AME)

Para o ensaio de atividade metanogênica específica utilizou-se uma mistura de ácidos graxos voláteis constituída de ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico, na proporção de 100:100:100 g/L, com DQO de 24,3:34,4:41,3 %, respectivamente, de acordo com Aquino *et al.* (2007). O ensaio foi realizado em frascos reatores de 120 mL e sua descrição encontra-se descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Composição do ensaio (AME) em frasco de 120 mL.

gDQO/gSSV	0,25
Biomassa (mL)	30
Mistura de AGV (mL)	0,2330
Tampão (mL)	0,767

Após a pesagem dos reagentes e adição nos frascos reatores, gás nitrogênio foi fluxionado durante 5 minutos para garantir a anaerobiose do meio. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha e lacrados, para então serem incubados à 37° C com agitação 125 rpm.

4.3. Caracterização do Substrato

Os resíduos utilizados como substrato foram cedidos gentilmente pelo laticínio Tavolaro, localizado na cidade de Brotas, no estado de São Paulo. Neste laticínio são produzidos diariamente diferentes tipos de queijos, requeijão, iogurtes, doce-de-leite, entre outros produtos lácteos. Os resíduos foram retirados da caixa de gordura

do sistema de tratamento de resíduos desse estabelecimento, como mostra a Figura 6.

Figura 6. Caixa de Gordura do laticínio Tavoraro.

Fonte: Autoria própria

O resíduo foi caracterizado através das seguintes análises físico-químicas: sólidos totais realizadas de acordo com APHA/AWWA/WEF (1998), gordura (Silva & Queiroz, 2006), e quantificação de AGCL de acordo com Neves *et al.* (2009). A análise de demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada de acordo com Yadvika *et al.* (2006) que é uma adaptação da metodologia proposta por APHA/AWWA/WEF (1998) para amostras sólidas. O resíduo foi secado à 105°C por aproximadamente seis horas em estufa. Após a secagem, foram pesados 0,025g do material seco em forma de película e adicionados aos tubos de DQO do tipo High Rate Plus. A leitura em espectrofotômetro realizada após a digestão foi feita no comprimento de onda igual à 620 nm..

4.4. Caracterização do Bagaço de cana-de-açúcar

Os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados foram cedido gentilmente pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado na cidade de Campinas, no estado de São Paulo. Os pré-tratamentos empregados foram: organossolve (140°C/3 h), hidrotérmico (190°C/10min), explosão à vapor com peróxido de hidrogênio (210°C/ 9min) e ácido sulfúrico diluído (140°C/15min/ 0,50% H_2SO_4).

Para realizar os pré-tratamentos o ácido diluído (Santoro *et al.*, 2015), organossolve (Yu *et al.*, 2015) e hidrotérmico (Santucci *et al.*, 2015) foram utilizados 30 g de bagaço descontando-se o teor de umidade. Cada reação foi realizada em uma concentração sólido-líquido de 1:10. O bagaço foi embebido na solução reagente (ou em água, no caso do pré-tratamento hidrotérmico) e foi deixado 24 horas em repouso e armazenado na geladeira. Após esse período de descanso, o material foi alimentado em reator de inox 316 com capacidade de 0,5 L. Após atingir a temperatura de trabalho de cada pré-tratamento, os reatores foram imersos em banho de glicerina durante o tempo da reação. Ao final da reação, os reatores foram retirados do banho e mergulhados imediatamente em banho de gelo. Só após o resfriamento, os reatores foram abertos e o material transferido para um saco de pano, onde foi separado em frações sólidas e líquidas. A fração sólida foi lavada, secada e analisada quanto à sua composição química. Para o pré-tratamento organossolve, após separação das duas frações, o bagaço foi lavado primeiramente com uma solução de hidróxido de sódio à 1% (m/m) para remoção da lignina superficial (não ligada quimicamente) e depois lavado com água corrente.

O pré-tratamento por explosão à vapor com peróxido de hidrogênio foi realizado em um reator de 10 L da Planta Piloto da Universidade de Lund, Suécia (Rabelo *et al.*, 2012). Aproximadamente 500 g de bagaço com 50% de umidade foram alimentados no reator e, após o tempo de reação, o material foi descarregado em um ciclone ligado na saída do reator a pressão atmosférica. O material foi coletado, lavado, seco a temperatura ambiente e analisado quanto a sua composição química.

Os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados foram moídas em moinho de facas (Pulverisette 19) utilizando peneira de 0,2 mm, e foram caracterizadas quanto a sua composição química (segundo metodologia descrita por Rabelo *et al.*, (2010). A Tabela 5 apresenta a composição do bagaço *in natura* e dos quatro tipos diferentes de pré-tratamento.

Tabela 5. Composição química das fibras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas (PT).

Material	Composição Bagaço (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos
Bagaço <i>in-natura</i>	42,62 ± 0,15	26,20 ± 0,50	22,54 ± 0,32	4,34 ± 0,11	5,30 ± 0,49
PT Explosão (210°C/9min)	57,0 ± 0,30	10,5 ± 0,40	29,2 ± 0,21	3,4 ± 0,75	0,00 ± 0,00
PT Ácido diluído (140°C/15min./0,50 %H₂SO₄)	50,82 ± 0,11	9,54 ± 0,21	28,35 ± 0,13	3,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00
PT Hidrotérmico (190°C/10min)	58,93 ± 0,97	12,86 ± 0,65	24,69 ± 0,27	5,67 ± 0,13	0,00 ± 0,00
PT Organossolve (140°C/3 h)	63,86 ± 0,29	13,97 ± 0,20	21,15 ± 0,56	4,26 ± 0,18	0,00 ± 0,00

4.5. Análise de Biodigestão Anaeróbia

Todos os ensaios de biodigestão anaeróbia foram realizados em batelada, em frascos reatores de 120 mL, onde após a adição da biomassa e substrato foi fluxionado nitrogênio para tornar o meio anaeróbio e foram incubados à 37° C e sob agitação de 100 rpm em uma mesa incubadora (Cavaleiro *et al.* 2014). No início e no final dos processos estudados foram quantificados os ácidos graxos de cadeia longa (NEVES *et al.*, 2009) e curta (Adorno *et al.*, 2014). O processo se deu por encerrado quando a produção de biogás cessou. Os substratos digeridos foram submetidos à análise de sólidos. A produção de biogás foi avaliada através de medição de pressão nos frascos e a quantificação de metano na mistura foi realizada através de cromatografia gasosa. A produção de biogás esperada foi

calculada a partir da produção teórica de metano (SPEECE, 1996), considerando que 50% do biogás seria composto por metano. Então multiplicou-se a quantidade de resíduo adicionada em cada condição pelo valor da DQO do resíduo multiplicado por duas vezes 390 mL que é o valor que 1g DQO produz de metano.

4.5.1. Determinação de Inibição Metanogênica

Nesse primeiro ensaio de biodigestão anaeróbia os resíduos foram adicionados em diferentes concentrações baseadas em resultados de Pereira *et al.* (2005) com o objetivo de identificar em qual condição haveria inibição pelo substrato. A Tabela 6 mostra como o ensaio foi constituído.

Tabela 6. Condições dos ensaios de biodigestão anaeróbia líquida para determinação de concentração inibitória.

Condição	G1	G2	G3	G4
DQO adicionada (g)	0,3	0,6	0,9	1,19
gDQO/gSTV	0,57	1,14	1,71	2,28
Resíduo (g)	1,4	2,8	4,2	5,6
Concentração gResíduo/L)	56,36	112,72	169,08	225,44
gGordura/gSTV	0,73	1,44	2,16	2,88
Biomassa (mL)	20	20	20	20
Volume tampão (mL)	24,54	24,54	24,54	24,54
Solução macronutrientes (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2
Solução micronutrientes (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1

4.5.2. Determinação da faixa de concentração inibitória

Para identificar a faixa em que ocorria inibição foram testadas concentrações abaixo de 0,57 gDQO/STV, partindo de uma concentração de aproximadamente 10% da mesma. Além disso, optou-se por analisar essas condições em biodigestão

anaeróbia sólida ao invés de líquida. A Tabela 7 mostra a conformação desse novo ensaio.

Tabela 7. Condição dos ensaios de biodigestão anaeróbia sólida para determinar a faixa de concentração inibitória.

Condição	G`1	G1
DQO adicionada (g)	0,03	0,3
gDQO/gSTV	0,057	0,57
Resíduo (g)	0,15	1,4
Concentração (gResíduo/L)	7,04	65,73
gGordura/gSTV	0,078	0,73
Biomassa (mL)	20	20
Volume tampão (mL)	1	1
Solução macronutrientes (mL)	0,2	0,2
Solução micronutrientes (mL)	0,1	0,1
Produção Teóricade Biogás (mL)	25,34	236,57

4.5.3. Determinação da condição de inibição severa

Nesse ensaio testaram-se concentrações dentro da faixa de concentração inibitória determinada (0,057 à 0,57gDQO/gSTV) a fim de identificar em qual concentração começa a ocorrer a inibição e em qual ocorre inibição severa por excesso de substrato. A Tabela 8 mostra como foi constituído esse ensaio.

Antes, porém, foi realizado um ensaio teste com a concentração inibitória escolhida para determinar a quantidade de bagaço moído que seria adicionada em cada frasco reator. Foram testadas as quantidades de 0,5 e 1,0 g de bagaço *in natura*. Após a determinação da quantidade mais adequada a ser utilizada, foi realizado o ensaio de biodigestão anaeróbia com a concentração inibitória e adição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado. A Tabela 9 mostra como foi montado esse ensaio.

Tabela 9. Condição dos ensaios de biodigestão anaeróbia com bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.

Condição	G'4	Fin	For	Fht	Fex	Fad
DQO adicionada (g)	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Resíduo (g)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
gDQO/gSTV	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Concentração (gResíduo/L)	42,25	42,25	42,25	42,25	42,25	42,25
gGordura/gSTV	0,468	0,468	0,468	0,468	0,468	0,468
Fibras (g)	0	1	1	1	1	1
Biomassa (mL)	20	20	20	20	20	20
Volume tampão (mL)	1	1	1	1	1	1
Solução macronutrientes (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Solução micronutrientes (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Fin: bagaço *in natura*

For: bagaço tratado por organossolve

Fht: bagaço tratado por hidrotérmico

Fex: bagaço tratado por explosão à vapor com peróxido de hidrogênio

Fad: bagaço tratado por ácido sulfúrico diluído

4.6. Acompanhamento da Biodigestão Anaeróbia

Durante a digestão anaeróbia foi avaliada a composição do biogás produzido e foi também realizada a quantificação cromatográfica dos produtos das reações da biodigestão anaeróbia no início e no final do processo.

4.6.1. Análise da composição de biogás

Ao longo do processo de biodigestão anaeróbia, o biogás foi quantificado por transdução de pressão. Os valores de pressão obtidos convertidos em volume, através da curva de calibração do transdutor de pressão. A curva foi construída a partir da injeção de alíquotas de ar com volume definido, em frasco com volume de 100 mL e atmosfera interna (*headspace* - HS) de 70 mL. As alíquotas tiveram volume variando de 1 a 70 mL e foram injetadas em triplicata. Foi determinado o volume relativo (V_R) de cada injeção, de acordo com a equação 1, onde V_i é o volume de gás injetado e V_{HS} é o volume do *headspace* (no caso da curva, 70 mL). A curva foi construída relacionando os valores de pressão e os valores obtidos de volume relativo.

$$V_R = \frac{V_i}{V_{HS}} \quad (1)$$

As pressões obtidas ao longo dos ensaios eram convertidas em volume relativo, e este era utilizado para o cálculo do volume de biogás produzido (V_P) através da equação 2. Nesta equação V_{HS} era o valor de atmosfera interna dos frascos utilizados no referido ensaio.

$$V_R = \frac{V_P}{V_{HS}} \quad (2)$$

A composição do biogás foi analisada por cromatografia gasosa quanto à concentração de nitrogênio, metano e gás carbônico. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso da marca Shimazu, modelo GC-2014, equipado com coluna micro empacotada com comprimento de 1,0 m e diâmetro interno de 1 mm, Hélio como gás de arraste com fluxo de 10 mL.min⁻¹. A coluna foi mantida à temperatura de 40 °C por 3 minutos, e aquecida com rampa de 60 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto. O injetor foi mantido a 100 °C. Amostras com volume de 0,5 mL eram injetadas no cromatógrafo, a pressão

ambiente. Todos os cálculos foram realizados com base na temperatura utilizada no experimento que foi 37°C. A área obtida através da análise cromatográfica era convertida em massa (μmol), através da correlação desses valores com as áreas obtidas quando da injeção de padrões (50% metano e 50% dióxido de carbono). Os valores da massa obtidos foram corrigidos utilizando-se a pressão atmosférica da cidade de Pirassununga (1,020 atm).

4.6.2. Ácidos graxos de cadeia longa

Os ácidos graxos de cadeia longa foram quantificados de acordo com Neves *et al.* (2009). As amostras foram submetidas a procedimento de extração com uma solução de diclorometano (DCM) e digestão em solução de ácido clorídrico e 1-propanol (25% v / v). Em frascos de penicilina foram adicionados 2 ml da amostra 1,5 ml da solução de ácido pentadecanóico (1g/L), utilizado como padrão interno, 1,5 mL da solução de digestão e 2 mL de DCM. A mistura foi agitada em vórtex, para promover um bom contato entre as duas fases, e digerida a 100°C durante 3,5 h. Depois da digestão, com temperatura ambiente, o conteúdo do frasco foi transferido com 2 mL de água ultra-pura para um novo frasco e o contato entre as duas fases foi promovido. Estes novos frascos foram mantidos em posição invertida durante 30 min, e então 1 mL da fase orgânica foi coletado para ser analisado por cromatografia gasosa. O cromatógrafo gasoso usado foi equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna Stabilwax, 30 m x 0,32 mm. A temperatura do injetor foi de 220° C, Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL/min. A temperatura do forno foi de 250° C,. A temperatura inicial do forno foi 50° C durante 2 min, com uma rampa de 10° C. min⁻¹ até 225°C, seguida de uma isoterma mantida durante 10 min.

Figura 8. Procedimentos de extração de AGCL.

Fonte: Autoria própria

4.6.3. Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Ácidos de cadeia curta foram quantificados de acordo com Adorno *et al.* (2014). Para o preparo das amostras foram utilizados tubos de ensaio específicos para determinação de DQO. Em cada tubo foram adicionados 1,0 g de NaCl; 2 mL da amostra; 0,2 mL de solução 2M de H_2SO_4 ; 0,01 mL de solução de ácido crotônico a 700 mg/L, que foi o padrão interno, e 0,6 mL de éter etílico gelado. Logo após a adição do éter os frascos foram fechados e agitados durante 60 segundos em agitador vórtex, à velocidade máxima, e posteriormente centrifugados a 3.000 rpm durante 1 minuto. As amostras foram então armazenadas em freezer até o momento da injeção, assim como, a seringa utilizada. A seringa deve ser limpa com metanol entre as injeções. O volume de injeção foi de 1 μ L e as temperaturas do injetor e detector 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno de 100°C por 3

minutos e 180°C por 5 minutos, com rampa de 5°C/ min. A coluna utilizada foi HP INNOWAX, 30 m x 0.25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, e o gás de arraste, H₂ com fluxo de 2 mL/min.

4.7. Inferência de parâmetros cinéticos

Aos valores de produção metanogênica acumulada ao longo do tempo, advindos de todos os ensaios de biodigestão anaeróbia realizados, foi ajustado o modelo de Gompertz (equação 3), como previamente realizado por Chen *et al.* (2006). A partir de tal ajuste foi possível a inferência da máxima produção esperada (P_{CH_4}), da velocidade máxima de produção (k) metanogênica e da duração da fase de latência (λ) dos processos.

$$P_{CH_4}(t) = P_{CH_4} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{k.e}{P_{CH_4}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad (3)$$

em que $P_{CH_4}(t)$ é a produção acumulada de metano (mmol) no tempo t ; e é $\exp(1)$, i.e. 2.71828. O modelo foi ajustado utilizando método de Levenberg-Marquardt (Microsoft Origin 9.0). É importante ressaltar que todos os parâmetros aqui inferidos são aparentes, pois não foram verificadas questões relativas à resistência à transferência de massa no estudo ora realizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização da Biomassa e do Substrato

A adaptação da biomassa teve duração de aproximadamente 30 dias. Após a adaptação a biomassa apresentou-se totalmente desgranulada com $25,57 \pm 0,64$ g/L de sólidos totais, sendo $18,23 \pm 0,56$ g/L de sólidos totais voláteis e $7,33 \pm 0,081$ g/L de sólidos fixos. A atividade metanogênica específica obtida da biomassa granular de inóculo foi de 0,2388 mmol/g STV.h e da biomassa adaptada utilizada obtida foi de 0,13 mmol/g STV.h.

A Tabela 10 apresenta a caracterização do substrato gorduroso coletado da caixa de gordura do laticínio Tavolaro.

Tabela 10. Características do Resíduo Gorduroso utilizado como substrato

Resíduo	
Cor	Branca
Sólidos Totais (g/g)	$0,3244 \pm 0,04$
Sólidos Voláteis (g/g)	$0,32 \pm 0,03$
DQO total (g/g resíduo)	$1,7364 \pm 0,09$
Proteína Bruta (%)	3,28
Gordura (Extrato etéreo) (%)	27,6
AGCL:	
Ácido Palmítico (%)	25,03
Ácido Oleico (%)	28,99
Ácido Esteárico (%)	19,79

5.2. Ensaios de Biodigestão Anaeróbia: determinação da concentração inibitória

O primeiro ensaio de biodigestão anaeróbia foi realizado a fim de determinar a concentração na qual ocorria inibição por excesso de substrato. O resíduo foi adicionado, em quatro diferentes condições, 0,6; 1,0; 1,7; e 2,3 gDQO/gSTV, e a digestão foi feita em meio líquido.

A Tabela 11 mostra a produção teórica, calculada de acordo como o descrito no item 4.5, e obtida de biogás ao longo das 432 horas de duração desse ensaio, calculada de acordo com o item 4.6.1 considerando a temperatura de 37°C para as medidas de pressão e volume. O valor obtido para o branco, que não continha resíduo, para esse experimento foi de 77 mL. As produções de biogás obtidas em todas as condições a partir de G2 foram inferiores às esperadas. Os dados obtidos estão de acordo com os verificados por Pereira *et al.*(2004), que realizaram ensaios de determinação de potencial metanogênico de uma mistura de ácidos graxos de cadeia longa e verificaram que relações acima de 1gDQO/gSTV, provocaram inibição no consórcio anaeróbio.

Tabela 11. Produção de Biogás Teórica (PBT) e Produção de Biogás Obtida (PBO).

Condição	g gordura/gSTV	PBT (mL)	PBO (mL)
G1	0,73	236,57	292,92
G2	1,44	469,19	455,07
G3	2,16	703,78	443,82
G4	2,88	938,37	490,36

Nesse experimento percebeu-se separação de fases nos frascos reatores utilizados, o que suscitou dúvida acerca do contato efetivo entre o substrato e a biomassa. Na Figura 9 é possível observar a separação de fases que ocorria nos frascos reatores. Assim, um novo ensaio foi realizado com concentrações de substrato mais baixas e também com menor quantidade de líquido no sistema. Neste ensaio foram testadas duas concentrações, a menor utilizada no ensaio anterior (G1 – 0,6gDQO/gSTV), e aproximadamente 10% desse valor (G`1- 0,06 gDQO/gSTV). Para a redução da quantidade de líquido no sistema reduziu-se a quantidade de tampão de 24, 54 mL para 1 mL, suficiente para garantir que o meio se mantivesse tamponado. A Figura 10 mostra que não houve separação de fases durante esse ensaio de biodigestão anaeróbia sólida.

Figura 9. Separação de fases na biodigestão líquida

Fonte: Autoria própria

Figura 10. Biodigestão Anaeróbia Sólida

Fonte: Própria

Os valores da produção obtidos nesse experimento foram calculados de acordo com o item 4.6.1 considerando a temperatura de 37°C para as medidas de pressão e volume. O valor da produção obtido no ensaio do branco que continha apenas à biomassa e tampão, portanto sem adição de resíduo, foi de 67 mL e a produção de biogás obtida na condição G1 de 87,37 mL. A produção obtida além de ter sido inferior à produção estimada (236,57 mL) foi também inferior à verificada no ensaio de biodigestão anaeróbia anterior com maiores quantidades de tampão (292,92 mL). Tal resultado permitiu a inferência de que o contato entre substrato e biomassa melhorou no segundo ensaio e, assim, houve maior grau de inibição na digestão com menor quantidade de tampão em função da melhoria do contato entre as fases. Os valores obtidos no ensaio anterior podem também ter sido superiores devido ao fato de os AGCL serem menos densos que o glicerol e, assim, com a separação de fases, o glicerol ter sido consumido primeiramente, aumentando a produção. O elevado valor observado para o ensaio do branco pode estar relacionado à biomassa adaptada, uma vez que se utilizou substrato sintético composto de creme de leite e leite em pó para a adaptação. Possíveis resíduos desse substrato associados à biomassa foram observados, podendo estes ter contribuído com o aumento da produção.

A produção de biogás obtida (354,44 mL) pela condição G`1 (0,06 gDQO/gSTV) foi superior à produção de biogás teórica (23,7 mL). Tal resultado mostrou que nessa condição não ocorreu inibição por excesso de substrato.

A Figura 11 mostra a produção de biogás das condições ensaiadas ao longo do tempo.

Figura 11. Produção acumulada de biogás das condições G1 (0,57 gDQO/gSTV - ■) e G0,1 (0,057gDQO/gSTV - ◆).

Fonte: Própria

A partir dos resultados do gráfico é possível notar que o tempo de ensaio foi superior ao necessário para que toda a matéria orgânica presente no substrato fosse consumida. Assim, as altas produções observadas após 100 horas de ensaio podem ser atribuídas à lise celular da biomassa, e a produção contabilizada a partir de então ter sido de origem endógena. O tempo do ensaio foi estendido, pois procurava-se identificar a completa estabilização do processo para que o ensaio fosse encerrado.

A partir desses resultados, testaram-se novas concentrações dentro da faixa de concentração de 0,06 e 0,6 gDQO/gSTV para identificar em qual condição começava a ocorrer inibição. O objetivo foi escolher a menor concentração em que se detectava a inibição severa por excesso de substrato para então serem aplicadas as fibras. As condições testadas foram: 0,06, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6, gDQO/gSTV, descritas na Tabela 7 do item Material e Métodos. As produções metanogênicas teóricas e obtidas em cada condição durante as 335 horas de ensaio calculadas de acordo com o item 4.6.1 considerando a temperatura de 37°C para as medidas de

pressão e volume, assim como para as injeções cromatográficas estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12. Produção Metanogênica Teórica (PMT) e Produção Metanogênica Observada (PMO) no ensaio com concentrações crescentes de gordura.

Condição	g gordura/ g STV	PMT (mL)	PMO (mL)
G'1	0,07	12,67	163,47
G'2	0,15	25,34	272,72
G'3	0,31	50,7	240,28
G'4	0,47	76,04	14,77
G'5	0,7	118,28	18,23

A produção obtida no ensaio do branco, composto apenas pela biomassa e tampão, sem adição de resíduo, foi de 142 mL. Sendo assim, foi possível observar que as condições G'1, G'2 e G'3, com 0,06, 0,12 e 0,24 gDQO/gSTV, respectivamente, apresentaram produções metanogênicas superiores às teóricas. As condições G'4 e G'5 com 0,4 e 0,6gDQO/gSTV, respectivamente, resultaram em produções metanogênicas mais baixas, inferiores à teórica, apresentando produção constante a partir de 150 horas de ensaio, enquanto as outras condições ainda apresentavam produção mensurável.

Tal resultado permitiu a inferência de que o contato entre substrato e biomassa melhorou no segundo ensaio e, assim, houve maior grau de inibição na digestão com menor quantidade de tampão em função da melhoria do contato entre as fases. Os valores obtidos no ensaio anterior podem também ter sido superiores devido ao fato de os AGCL serem menos densos que o glicerol e, assim, com a separação de fases, o glicerol ter sido consumido primeiramente, aumentando a produção. O elevado valor observado para o ensaio do branco pode estar relacionado à biomassa adaptada, uma vez que se utilizou substrato sintético composto de creme de leite e leite em pó para a adaptação. Possíveis resíduos desse substrato associados à biomassa foram observados, podendo estes ter contribuído com o aumento da produção. A inibição neste ensaio mostrou-se superior ao esperado em função da percentagem de gordura presente no substrato

(27%), que forneceria uma massa de gordura adicionada de 0,47 e 0,70 por grama de STV nas condições G'4 e G'5, respectivamente. Tais massas de gordura, se totalmente hidrolisadas, forneceriam relação entre alimento e microrganismo inferior à indicada como inibitória por Pereira *et al.* (2004) de 1 gDQO/gSTV. Dessa forma, pode-se inferir que, resíduos gordurosos advindos de caixas de gordura de laticínios, quando em contato efetivo com a biomassa, possuem potencial inibidor superior ao apresentado por ácidos graxos de cadeia longa, considerados os compostos mais inibidores do processo de digestão anaeróbia de gorduras. Este fato, somado à inferência de inibição severa na condição G'4, fizeram com que esta fosse a condição escolhida para a realização dos ensaios contendo bagaço de cana-de-açúcar para contenção de inibição.

5.3. Adição de bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado

Uma vez determinada a condição com a menor concentração em que foi verificada inibição por excesso de substrato, G'4, realizou-se os experimentos com adição do bagaço de cana-de-açúcar.

Inicialmente realizou-se um teste preliminar para determinar a quantidade de bagaço que seria adicionada em cada frasco reator. Foram testadas as quantidades de 0,5 (valores normalmente utilizados no LBA/FZEA/USP) e 1,0 g (máximo que se verificava possível utilizar em função do volume ocupado pelas fibras e o volume útil do reator) de fibra *in natura*, que era a que visualmente ocupava maior volume, em um ensaio de biodigestão anaeróbia com a condição inibitória escolhida. Foram verificadas maiores produções de metano no ensaio em que se utilizou 1 g de fibra (26,88 mL) do que no ensaio com 0,5 g (7,37 mL). Portanto, decidiu-se utilizar 1,0 g de fibras celulósicas no ensaio com adição de fibras pré-tratadas e *in natura*.

O ensaio de biodigestão anaeróbia com a concentração inibitória de resíduo (0,4gDQO/gSTV) e adição de 1 g fibras *in natura* e pré-tratadas foi realizado e na Figura 12 pode-se observar o volume total de metano produzido ao longo de sua duração. Caso toda a matéria orgânica expressa em DQO fosse convertida a metano, a produção metanogênica esperada para este ensaio seria de aproximadamente 76 mL de metano. As produções metanogênicas obtidas em cada

condição foram calculadas de acordo com o item 4.6.1 considerando a temperatura de 37°C para as medidas de pressão e volume, assim como para as injeções cromatográficas.

A condição deste ensaio que se destacou, em relação às demais, foi a que continha bagaço pré-tratado por organossolve, pois apresentou maior produção metanogênica e atingiu 81,55% da produção estimada. As condições com o bagaço *in natura* (Fin) e com pré-tratamento hidrotérmico (Fht) atingiram 62,55 e 45,6 % da produção metanogênica estimada, respectivamente. A condição com bagaço pré-tratado hidrotermicamente teve comportamento próximo ao da condição com bagaço *in natura*, mas ainda sim, foi inferior. As demais condições, com os pré-tratamentos explosão a vapor com peróxido de hidrogênio (Fex) e ácido sulfúrico diluído (Fad), acompanharam o comportamento inibitório do padrão que não continha bagaço (G'4), mas ainda sim apresentaram produção metanogênica ligeiramente superior. A condição Fex atingiu 20% da produção metanogênica estimada e Fad, 26,08%, enquanto que a condição G'4 atingiu somente 14,53%.

Figura 12. Volume total de metano produzido nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar: G'4 (condição padrão, sem bagaço), Fin (adição de bagaço *in natura*), For (adição de bagaço tratado com metodologia organossolve), Fht (adição de bagaço tratado por método hidrotermal), Fex (adição de bagaço tratado por metodologia de explosão a vapor e Fad (adição de bagaço tratado por método ácido diluído)

Fonte: Própria

A partir das produções metanogênicas totais e das produções totais de biogás obtidas nas condições ensaiadas, foram calculadas as porcentagens de metano presentes no biogás produzido em cada condição. Esses valores podem ser observados na Figura 13.

Figura 13. Porcentagem de metano presente no biogás produzido nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar: G'4 (condição padrão, sem bagaço), Fin (adição de bagaço *in natura*), For (adição de bagaço tratado com metodologia organossolve), Fht (adição de bagaço tratado por método hidrotermal), Fex (adição de bagaço tratado por metodologia de explosão a vapor e Fad (adição de bagaço tratado por método ácido diluído)

Em todas as condições pode-se notar que as produções metanogênicas foram superiores em relação à condição sem adição do bagaço de cana-de-açúcar. A condição com bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico diluído, apesar de ter apresentado menor produção metanogênica comparada com hidrotérmico, produziu um biogás com maior porcentagem de metano. O bagaço *in natura* e pré-tratado por organossolve forneceram biogás com maior porcentagem de metano que as demais. No entanto, em todas as condições essa porcentagem é considerada baixa uma vez que o biogás é composto por 50% de metano e 50% de dióxido de carbono.

Os resultados de produção metanogênica foram modelados pelo Software Origin. A Tabela 13 mostra os valores dos parâmetros cinéticos inferidos e a Figura 14 apresenta as representações gráficas desses parâmetros.

Tabela 13. Parâmetros Cinéticos do Ensaio com adição de bagaço de cana-de-açúcar.

Condição	Parâmetros Cinéticos		
Experimental	P_{CH_4} (mL)	λ (horas)	k
G4	11,15±0,08	72,59±3,87	0,0433±0,0155
Fin	48,39±1,16	226,83±4,49	0,0153±0,0018
For	83,95±25,68	272,77±80,92	0,0498±0,0022
Fht	42,02±8,11	237,07±44,21	0,0064±0,0025
Fex	16,83±2,34	278,26±27,48	0,0104±0,004
Fad	-	-	-

P_{CH_4} : Produção estimada

λ : Duração fase de latência

k: Constante cinética

Fin: bagaço in natura

For: bagaço tratado por organossolve

Fht: bagaço tratado por hidrotérmico

Fex: bagaço tratado por explosão à vapor com peróxido de hidrogênio

Fad: bagaço tratado por ácido sulfúrico diluído

A condição padrão G4, sem adição de fibras, apresentou comportamento como no ensaio anterior. Houve um crescimento da produção nas primeiras 150 horas de ensaio e depois a produção manteve-se constante, caracterizando a inibição.

Em relação à duração da fase de latência, todos os ensaios, com exceção do padrão, apresentaram valores semelhantes. Tal fato indica a ação adsorvente do bagaço de cana-de-açúcar indisponibilizando momentaneamente o substrato para os microrganismos. A duração da fase de produção de metano, todavia, foi diferente entre os ensaios.

Figura 14 Resultado do ajuste cinético nos ensaios de determinação do potencial metanogênico de gorduras na presença de bagaço de cana-de-açúcar: G'4 (condição padrão, sem bagaço), Fin (adição de bagaço *in natura*), For (adição de bagaço tratado com metodologia organossolve), Fht (adição de bagaço tratado por método hidrotermal), Fex (adição de bagaço tratado por metodologia de explosão a vapor e Fad (adição de bagaço tratado por método ácido diluído)

Fonte: Própria

A condição Fin passou por uma fase de latência nas primeiras 226 horas de ensaio e depois teve produção crescente até 400 horas de ensaio apresentando, a partir daí, tendência a estabilização. Na condição For, depois de superada a fase de latência, com duração de 272 horas, a produção foi crescente até o final do ensaio, não apresentando sinais de estabilização. A condição Fht apresentou fase de latência com duração de 237 horas de ensaio e depois também apresentou produção crescente. A condição Fex teve uma fase lag mais longa que as demais, e, depois de superada, a produção teve uma fase crescente até 400 horas de ensaio, indicando a partir desse ponto tendência a estabilização. A condição Fad apresentou um comportamento diferente das demais condições com uma fase lag mais longa, fazendo com o que o modelo, apesar de apresentar aderência aos dados não apresentasse coeficientes cinéticos coerentes.

Entre todos os bagaços avaliados (*in-natura* e pré-tratados) o pré-tratamento organossolve foi o que apresentou maior teor de celulose ao final do processamento. Além de apresentar uma maior disponibilidade da celulose, e consequentemente de glicose, já que celulose é constituída de unidades D-glicose, a deslignificação organossolve é tida como um processo eficiente para diminuição da recalcitrância do material e aumento da porosidade do mesmo, o que torna o acesso para enzimas e microrganismos (Oliveira, 2014) e aumenta sua capacidade adsorptiva.

Neste sentido, a maior disponibilidade e acessibilidade da celulose pode ter contribuído para que este açúcar fosse utilizado pelos microrganismos contribuindo com o aumento da produção metanogênica. Em contrapartida, o bagaço de cana *in-natura*, que apresenta como um material muito recalcitrante, também apresentou bons resultados. Quando se compara os materiais utilizados, é possível observar que os materiais que apresentam menores teores de lignina são o organossolve, seguido pelo material *in-natura*. Os dados de produção metanogênica apresentam tendência neste sentido (Tabela 5 e Figura 14).

A presença de lignina é um fator que pode atrapalhar a degradabilidade das fibras e, consequentemente, o acesso aos açúcares pelos microrganismos. A lignina pode formar uma barreira mecânica às enzimas microbianas por ligações químicas com os carboidratos ou pode inibir localmente as enzimas devido à ação tóxica dos

grupos fenólicos oriundos da degradação parcial da lignina (Patton & Gieseke (1942); Dehority & Johnson (1961); VAN SOEST (1994)).

Embora a concentração de lignina seja o principal fator que limita a digestibilidade da planta, há outros fatores, como por exemplo, a composição química do material, que pode modificar a habilidade desta macromolécula em limitar a digestibilidade dos carboidratos da parede celular (JUNG; DEETZ, 1993). O arranjo espacial e/ou a configuração geométrica do arranjo entre a lignina os demais carboidratos têm sido apontados como principal razão para explicar os parâmetros da digestibilidade (DETMANN et al., 2004).

6. CONCLUSÕES

O resíduo advindo da caixa de gordura do sistema de tratamento de resíduos do laticínio Tavalaro foi propício à biodigestão anaeróbia. Porém, nas condições com 0,37 e 0,57 gDQO/gSTV, obteve-se inibição severa da produção metanogênica.

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou potencial como adsorvente da gordura uma vez que todas as produções, nas condições em que ele foi utilizado, foram superiores em relação às que não havia adição de bagaço de cana-de-açúcar.

As condições que se destacaram em relação à produção metanogênica foram às com o bagaço *in natura* e com bagaço tratado por organossolve. Dentre os pré-tratamentos, os que se destacaram foram o organossolve e o hidrotérmico. Porém não foi possível avaliá-las como co-substrato uma vez que as produções metanogênicas não atingiram a produção estimada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao longo do desenvolvimento do trabalho e da análise dos resultados obtidos foram observadas algumas questões não esclarecidas por não corresponderem aos resultados esperados. Portanto, para trabalhos futuros envolvendo biodigestão anaeróbia de resíduos gordurosos e adição de fibras como adsorventes e possíveis co-substrato, sugere-se:

- Testar valores superiores de relação entre as quantidades de fibra e de resíduo gorduroso adicionado;
- Verificar a ação do bagaço de cana-de-açúcar como co-substrato adicionado nas condições do presente estudo nas quais não se verificou a presença de inibição e
- Estudar a influência de mistura prévia do resíduo gorduroso e do bagaço, para potencializar suas propriedades adsorptivas, assim como realizado por Palatsi *et al.* (2009).

8. REFERÊNCIAS

ALBRECHT, K. A.; WEDIN, W. F.; BUXTON, D.R. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Science*, v. 27, n. 4, p. 735-741, 1987.

ALVES, M. M. et al. Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. *Water Research*, London, v. 35, n. 1, p. 255-263, 2001a.

ALVES, M. M. et al. Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: oleic acid toxicity and biodegradability. *Water Research*, London, v. 35, n. 1, p. 264-270, 2001b.

ALVES, M. M. et al. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microbial Biotechnology*, Chichester, v. 2, n. 5, p. 538-550, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). *Standards methods for the examination of water and wastewater*. 19. ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Effects of free long-chain fatty-acids on thermophilic anaerobic-digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 37, n. 6, p. 808-812, 1992.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Codigestion of olive oil mill wastewaters with manure, household waste or sewage sludge. *Biodegradation*, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 221-226, 1997.

ANGELIDAKI, I. et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, London, v. 59, n. 5, p. 927-934, 2009.

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

AVELLAR, B.K.; GLASSER, W.G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass Bioenergy*, p.205–218, 1998.

AZIZ, S. et al. Solvent pulping- promise and programs. *Tappi Journal*, v.71, n.2, p.251-256, 1988.

AZIZ, S. SARKANEN, K. Organosolv pulping- a review. *Tappi Journal*, v. 72, n. 38, p.169-175, 1989.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GORGENS, J.F. Optimization of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment to Maximize Combined Sugar Yield from Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol*, v.172, p.610–630, 2014.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar. Safra 2008- segundo levantamento. Brasília: Conab, 2011. p. 15.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Jounal Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 38, p.1467–1475, 2011.

CARASCHI, J. C. Estudo das relações estrutura/propriedades carboximetilcelulose obtida por derivatização depolpa de bagaço de cana-de-açúcar. 188p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

CARPITA, N. C.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHAMAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 52-109, 2000.

CAVALEIRO, A. J. et al. Biochemical methane potential of raw and pre-treated meat-processing wastes. *Bioresource Technology*, Amsterdam, v. 129, p. 519-525, 2013.

CICHELO, G. C. V.; RIBEIRO, R.; TOMMASO, G. Characterization and kinetics of the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 15, n. 1, p. 27-40, 2013.

CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJORNSSON, I.; ALVES, M.M.; MATTIASSON, b. Anaerobic digestion of lipid-rich waste - effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, Kidlington, v. 32, n. 6, p. 965-975, 2007

CORRADINI, E. et al. A preliminary study for the use of natural fibers as reinforcement in starch-gluten-glycerol matrix. *Macromolecular Symposia*, Weinheim, v. 245-246, n. 1, p. 558-564, 2006.

COSTA, A. G. et al. Methane generation from lignocellulosic waste of the biofuel production: a review. *Revista DAE*, São Paulo, 2014.

CURVELO, A. A.S. Processos de deslignificação organossolve. 110p. Tese (Título em Livre Docência)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1992.

DETMANN, E. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1866-1875, Suplemento 1, 2004.

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R.; CONRAD, H. R. Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria in vitro and the effect of lignification thereon. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 4, n. 5, p. 508-512, 1962.

DOMINGUES, R. F. et al. Effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestion of milk fat for biogas production. Food Research International, Kidlington, 2015. (In press).

DONOSO-BRAVO, A., FDZ-POLANCO, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and grease trap: Assessment of enzyme addition. Process Biochemistry, London, v. 48, n. 5-6, p. 936-940, 2013.

ESCUADERO, A. et al. Semi-continuous anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste. Journal of Environmental Chemical Engineering, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 819-825, 2014.

FERRER, P. et al. The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: Effect of substrate type and inclusion level. Waste Management. v.34, p. 196–203, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Milk and milk products. Food Outlook, Rome, Nov. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/November_2013.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO, 3., 1994, Montevideo. Anais... Montevideo, 1994. p. 146-149.

GOMES, D. R. S. et al. Effect of enzymatic pretreatment and increasing the organic loading rate of lipid-rich wastewater treated in a hybrid UASB reactor. Desalination, v. 279, n. 1-3, p. 96-103, 2011.

HAMAWAND, I. Anaerobic digestion process and bio-energy in meat industry: A review and a potential. Renewable & Sustainable Energy Reviews, Kidlington, v. 44, p. 37-51, 2015.

HWU, C. S.; DONLON, B.; LETTINGA, G. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science and Technology*, London, v. 34, n. 5-6, p. 351-358, 1996.

HWU, C. S.; LETTINGA, G. Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology* v. 21, p.297-301, 1997.

HWU, C. S.; TSENG, S.; YUAN, C.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. Biosorption of long chain fatty acid in uasb treatment process. *Water Research*, London, v. 32, n. 5, p. 1571-1579, 1998.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G. (Ed.). *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: ASA; CSSA; SSSA., p. 315-343. , 1993.

JUNG, H. G.; ENGELS, F. M. Alfafa stem tissues cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science*, Madison, v. 62, p. 524-534, 2002.

KAPDI, S. S. et al. Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. *Renewable Energy*, Kidlington, v. 30, n. 8, p. 1195-1202, 2005.

KLEINERT, T. N. Organosolv pilping with aqueous alcohol. *Tappi Journal*, v.57, p. 99-102, 1974.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*. v.81, p. 33-44, 2002.

LANSING, S. et al. Wastewater transformations and fertilizer value when co-digesting differing ratios of swine manure and used cooking grease in low-cost digesters. *Biomass & Bioenergy*, Kidlington, v. 34, n. 12, p. 1711-1720, 2010.

LEAL, M. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochemistry*, London, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LEITAO, R. C. et al. Anaerobic treatment of coconut husk liquor for biogas production. *Water Science and Technology*, London, v. 59, n. 9, p. 1841-1846, 2009.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.38, p. 449-467, 2012.

LLOYD, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*, v. 96, p.1967–1977, 2005.

LU, Y. et al. Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two- or three-stage anaerobic fermentation process. *Bioresource Technology*, v.100, p. 2889–2895, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Biology of Microorganisms*. 80ª Edição. New Jersey: PRETINCE-HALL, 1996. 986 p.

MANZANO, R. P. et al. Digestibility of sugar cane bagasse treated with chemical reagents and steam pressure. *Brazilian Journal of Animal Science*, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 1196-1204, 2000.

MATA-ALVAREZ, J. et al. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Kidlington, v. 36, p. 412-427, 2014.

MENDES, A. A. et al. Application of lipases for wastewater treatment containing high levels of lipids. *Quimica Nova*, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MORAES, E. M. et al. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: OFICINA E SEMINÁRIO LATINO AMERICANO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA, 6., 2000, Recife. *Anais... Recife*, 2000. v. 2, p. 146-149.

MATSUMOTO, E. M. ; OSAKO, M. S. ; PINHO, S. C. ; TOMMASO, G. ; GOMES, T. M. ; RIBEIRO, R. . Treatment of wastewater from dairy plants using Anaerobic Sequencing Batch Reactor (ASBR) following by Aerobic Sequencing Batch Reactor (SBR) aiming the removal of organic matter and nitrification.. *Water Practice and Technology*, v. 7, p. 3, 2012.

MENDES, G. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids rich waster waters on the anaerobic biodigestion. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 32, p. 185-190, 2005a.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO Jr.; A. Application of lipases for wastewater treatment containing high levels of lipids. *Quim. Nova*, V. 28, N. 2, p. 296-305, 2005b.

MILANEZ, A.Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n.41, p. 237-294, mar. 2015.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p.673–686,2005.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, London, v. 58, n. 6, p. 374-351, 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

NEVES, L. et al. Detection and quantification of long chain fatty acids in liquid and solid samples and its relevance to understand anaerobic digestion of lipids. *Bioresource Technology*, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 91-96, 2009.

PALATSI, J. et al. Strategies for recovering inhibition caused by long chain fatty acids on anaerobic thermophilic biogas reactors. *Bioresource Technology*, Amsterdam, v. 100, n. 20, p. 4588-4596, 2009.

PALATSI, J.; AFFES, R.; FERNANDEZ, B.; PEREIRA, M.A., FLOTATS, X. Influence of adsorption and anaerobic granular sludge characteristics on long chain fatty acids inhibition process. *Water Research*, v. 46, p. 5268-5278, 2012.

PATERSON, J. A.; BELYEA, R. L.; BOWMAN J. P. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant intake and performance. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed.). *Forage quality, evaluation, and utilization*. Madison: ASA, 1994. p. 59-114

PATTON, A. R.; GIESEKER, L. Seasonal changes in the lignin and cellulose content of some Montana grasses. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 1, n. 1, p. 22-26, 1942.

PEREIRA JR, N. Intensification of the xylose fermentation process. Tese (Doutorado)- The University of Manchester, UK, 1991.

PEREIRA, M. A. et al. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, Hoboken, v. 92, n. 1, p. 15-23, 2005.

PEREZ, J.A.P. et al. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p.929–938, 2007.

PITK,P. et al. Co-digestion of sewage sludge and sterilized solid slaughterhouse waste: Methane production efficiency and process limitations. *Bioresource Technology*, v.134, p.227–232, 2013.

OLIVEIRA, M. M. Análise da porosidade nanométrica de materiais lignocelulósicos derivados de bagaço de cana-de-açúcar submetidos à compressão úmida. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 2014.

RABELO, S.C.; ROSSELL, C.E.V.; ROCHA, G.J.M.; ZACCHI, G. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by steam pretreatment impregnated with hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, v. 28, p. 1207-1217, 2012.

RABELO, S.C. Avaliação e Otimização de Pré-tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração. Tese doutorado, FEQ/Unicamp, 2010.

ROSA, M. F. et al. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. *Carbohydrate Polymers*, Kidlington, v. 81, n. 1, p. 83-92, 2010.

RUIZ, H.A. et al. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.21, p.35–51, 2013.

SANTORO, D.C.J.; ASSIS, T.; DIONÍSIO, S.R.; IENCZAK, J.L.; RABELO, S.C. Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production. 37th Symposium on Biotechnology for Biofuels and Chemical, San Diego, USA, 2015.

SANTUCCI, B.S.; MAZIERO, P.; RABELO, S.C.; CURVELO, A.A.S.; PIMENTA, M.T.B. Autohydrolysis of hemicelluloses from sugarcane bagasse during hydrothermal pretreatment: a kinetic assessment. *BioEnergy Research*, 2015.

SILVA, S. A. et al. Long-term acclimation of anaerobic sludges for high-rate methanogenesis from LCFA. *Biomass Bioenergy*, Kidlington, v. 67, p. 297-303, 2014.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006, 235 p.

SILVESTRE, G. et al. Thermophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with grease waste: effect of long chain fatty acids in the methane yield and its dewatering properties. *Applied Energy*, Kidlington, v. 117, p. 87-94, 2014.

SOUSA, B. M. F. Separação e identificação dos constituintes do bagaço de cana e sua conversão em insumos químicos pelo processo organossolúvel. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater. Nashville: Archae Press, 1996.

SUN, J. X. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, London, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.

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

SUN, Y. et al. Effects of lipid concentration on anaerobic co-digestion of municipal biomass wastes. *Waste Management*, Kidlington, v. 34, n. 6, p. 1025-1034, 2014.

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

TAKE, H. et al. Production of methane gas from Japanese cedar chips pretreated by various delignification methods. *Biochem. Eng. Journal*. v.28, p. 30–35, 2006.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAZOLLER R. F. Estudos sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto. Msc Thesis - ICB - USP, 1989, 145p.

YADVIKA et al. Modified method for estimation of chemical oxygen demand for samples having high suspended solids. *Biosource Technology*. v. 97, p. 721-726, 2006.

YALAMATA, D. Catalytic selectivity in alcohol organosolv pulping of spruce wood. Tese (Doutorado), - University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, 2001.

YU, H.; YOU, Y.; LEI, F.; LIU, Z.; ZHANG, W.; JIANG, J. Comparative study of alkaline hydrogen peroxide and organosolv pretreatments of sugarcane bagasse to improve the overall sugar yield. *Bioresource Technology*. v. 187, p.161–166, 2015.

ZHENDER, A.J.B., et al. Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium, *Arch. Microbiol.* v.124, p.1-11, 1980.

ZHUANG, Q.; VIDAL, P.F. Hemicelluloses solubilization from *Populus tremuloides* via steam explosion and characterization of the water-soluble fraction I. Autocatalytic processes. *Cellulose Chem. Technol.* v 30, p.371–384, 1996.